

ISSN 0233-4755

Том 40, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 40, номер 6, 2023

ОБЗОРЫ

Роль посттрансляционного ацетилирования и деацетилирования белков
в апоптозе нейронов периферической нервной системы

В. А. Дзряян, С. В. Демьяненко

415

Действие сероводорода на спонтанные сокращения тощей кишки крысы.
Роль K_V^- , K_{Ca}^- и K_{ir} -каналов

*Д. М. Сорокина, И. Ф. Шайдулов, Д. Бучареб,
Ф. Г. Ситдииков, Г. Ф. Ситдикова*

432

АТФ вызывает сокращение денервированных скелетных мышц

А. Е. Хайруллин, А. Ю. Теплов, С. Н. Гришин, А. У. Зиганшин

443

Иммунофлуоресцентная идентификация ГАМКергических структур
в соматической мускулатуре дождевого червя *Lumbricus terrestris*

Л. Ф. Нуруллин, Н. Д. Алмазов, Е. М. Волков

449

Пространственная организация компонентов серотонинергической системы
в раннем развитии мыши

В. С. Фролова, А. Д. Иванова, М. С. Конорова, Ю. Б. Шмуклер, Д. А. Никишин

456

Интерферон $\alpha 2b$ как модулятор афферентного глутаматергического синапса
вестибулярного аппарата лягушки

И. В. Рыжова, Е. А. Корнева, Т. В. Тобиас, Е. А. Протасов, Е. А. Вершинина

463

Характеристика мембранных структур хлоропластов пшеницы

И. С. Капустина, В. В. Гурина, Е. В. Спиридонова, Н. В. Озолина

472

Contents

Vol. 40, No. 6, 2023

REVIEWS

The Role of Post-Translational Protein Acetylation and Deacetylation in the Apoptosis of Neurons of the Peripheral Nervous System

V. A. Dzreyan, S. V. Demyanenko

415

Effect of Hydrogen Sulphide on Spontaneous Contractions of the Rat Jejunum.
Role of K_V^- , K_{Ca}^- , and K_{ir}^- -Channels

D. M. Sorokina, I. F. Shaidullov, D. Buchareb, F. G. Sitdikov, G. F. Sitdikova

432

ATP Causes Contraction of Denervated Skeletal Muscles

A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, S. N. Grishin, A. U. Ziganshin

443

Immunofluorescent Identification of GABAergic Structures in the Somatic Muscle of the Earthworm *Lumbricus terrestris*

L. F. Nurullin, N. D. Almazov, E. M. Volkov

449

Spatial Organization of the Components of the Serotonergic System in the Early Mouse Development

V. S. Frolova, A. D. Ivanova, M. S. Konorova, Yu. B. Shmukler, D. A. Nikishin

456

Interferon $\alpha 2b$ As a Modulator of the Afferent Glutamatergic Synapse of the Frog Vestibular Apparatus

I. V. Ryzhova, E. A. Korneva, T. V. Tobias, E. A. Protasov, E. A. Vershinina

463

Characteristics of Membrane Structures of Wheat Chloroplasts

I. S. Kapustina, V. V. Gurina, E. V. Spiridonova, N. V. Ozolina

472

УДК 576.3+576.32/36

РОЛЬ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В АПОПТОЗЕ НЕЙРОНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. В. А. Дзрелян^а, *, С. В. Демьяненко^а

^аАкадемия биологии и биотехнологии, Южный федеральный университет, лаборатория “Молекулярная нейробиология”, Ростов-на-Дону, 344090 Россия

*e-mail: dzrelyan2016@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 31.05.2023 г.

Нейротравма — одна из основных причин инвалидности и смертности людей. Тем не менее механизмы, которые опосредуют выживание и смерть клеток периферической нервной системы, до сих пор до конца не изучены. Факторы транскрипции p53 и E2F1 являются главными регуляторами основных клеточных функций, включая репарацию ДНК, клеточный цикл, метаболизм и апоптоз. Сверхэкспрессия p53 и E2F1, показанная в ряде экспериментальных моделей травмы периферических нервов, позволяет предположить важную роль этих белков в патогенезе нейротравм. В настоящем обзоре рассмотрены эпигенетические механизмы активации и регуляции факторов транскрипции p53 и E2F1, которые могут способствовать выживанию или гибели нейронов и глиальных клеток после травматического повреждения. Рассмотрены перспективы дальнейших исследований механизмов регуляции p53 и E2F1, в том числе с участием гистондеацетилаз, для разработки нейропротекторов.

Ключевые слова: ацетилирование, гистондеацетилазы, аксотомия, p53, E2F1, апоптоз

DOI: 10.31857/S0233475523060038, **EDN:** FMPUXS

ВВЕДЕНИЕ

Эпигенетика — быстро развивающаяся область биологических исследований. Наиболее распространены эпигенетические модификации, возникающие вследствие метилирования ДНК и ацетилирования гистонов. Ацетилирование остатков лизина является одной из наиболее изученных и устойчивых модификаций гистонов, регулирующих их связывание с ДНК, доступ к факторам транскрипции и, следовательно, экспрессию генов. Ацетилирование катализируется гистонацетилазными ферментами (НАТ) с использованием ацетил-коэнзима А в качестве донора ацетильной группы, а деацетилирование — деацетилазами гистонов (HDAC). Функция НАТ и HDAC не ограничивается только гистоновыми белками и регуляцией транскрипции генов. Ряд негистоновых белков, таких как факторы транскрипции (p53, NF-κB, FoxB3, c-Myc, E2F1, HIF-1α и др.), сигнальные белки (STAT3, β-катенин, SMAD7), шапероны и структурные белки (α-тубулин, импортин-α, Ku70, HSP90) и многие другие также подвергаются ацетилированию [1]. Количество идентифицированных на сегодняшний день белков, активность которых регулируется ацетили-

рованием/деацетилированием, наверняка ниже фактического их количества. Путем посттрансляционного ацетилирования факторов транскрипции и сигнальных белков регулируется рост, дифференцировка, миграция, выживание и гибель клеток как в норме, так и при повреждении [2]. При этом эпигенетические модификации обратимы, что делает их многообещающими кандидатами для терапии системных заболеваний. Несмотря на то что ацетилированию подвергается большее количество внутриклеточных белков, чем фосфорилированию, процесс фосфорилирования/дефосфорилирования сигнальных белков в настоящее время изучен наиболее детально, чем ацетилирование [2, 3]. Описаны сотни киназ и несопоставимо меньшее количество ацетилаз, идентифицированы десятки киназных каскадов и ни одного ацетилазного.

Изучение ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков началось в связи с успехами клинического использования ингибиторов деацетилаз гистонов (iHDAC) в терапии различных форм рака и было обусловлено поиском причин цитотоксичности неселективных iHDAC [4]. Несмотря на то что в основном изучается противо-

раковая активность iHDAC, многочисленные исследования показывают, что iHDAC обладают нейропротекторным и нейрорегенеративным эффектами, начиная от снижения гибели клеток мозга и заканчивая стимуляцией репарации и регенерации при экспериментальном и клиническом инсульте [5, 6], при нейродегенеративных заболеваниях [7], и эффективны для лечения психических расстройств [8].

Исследований, направленных на изучение ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков в клетках центральной нервной системы (ЦНС) крайне мало, а исследования этих процессов при травматическом повреждении нейронов периферической нервной системы практически отсутствуют.

Аксональное повреждение, на котором мы остановили свое внимание, имеет место при спортивных и бытовых травмах, ошибках медперсонала при проведении инъекций, дорожно-транспортных происшествиях и т.д. [9, 10]. Кроме того, повреждение аксона сопровождается ранние стадии нейродегенеративных расстройств, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также развитие бокового амиотрофического склероза [11]. Аксотомия инициирует сложный каскад сигнальных и метаболических процессов, направленных на гибель или выживание нейрона.

В этом обзоре мы не будем подробно останавливаться на характеристике и механизмах действия различных семейств НАТ и HDAC, об этом было сказано в других работах [1, 6]. Данный обзор посвящен обсуждению роли системы НАТ/HDAC в регуляции активности важнейших факторов транскрипции, таких как p53 и E2F1, от которых во многом будет зависеть судьба нервных клеток после острого или хронического повреждения. Мы представим новые доказательства, свидетельствующие о дисбалансе НАТ/HDAC и, как следствие, изменении гомеостаза ацетилирования как основных причин дисфункции нервных клеток и их гибели. Наконец, мы попытаемся обосновать перспективы использования регуляции системы НАТ/HDAC для нейропротекторной терапии.

1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ НЕЙРОНОВ ПОСЛЕ АКСОТОМИИ

Аксотомия представляет собой полный физический разрыв в аксоне, вызванный растяжением или перерезкой [12]. Перерезка нерва (аксотомия) характеризуется тремя основными молекулярно-клеточными событиями: валлерова дегенерация отрезанного аксона, гибель поврежденного нейрона или его регенерация с отрастанием аксона и восстановлением нервных связей. Уяз-

вимость нейронов к аксотомии зависит от ряда факторов, таких как локализация, возраст и состояние. Внутренний ответ нейронов на повреждение аксонов заметно различается между нейронами периферической и центральной нервной системы. Нейроны периферической нервной системы (ПНС) обычно регенерируют и выживают, в то время как многие нейроны в ЦНС подвергаются дегенерации и гибели после аксотомии. Это связано с нейрональными факторами, такими как различия в экспрессии генов в ответ на аксотомии, с ненейрональными факторами, такими как тормозящие регенерацию иммунные белки, или с взаимодействием обоих типов факторов [9, 10]. У молодых животных повреждение аксонов приводит к ретроградной дегенерации и гибели нейронов как периферической, так и центральной нервной системы [9]. Как правило, чем более удалено поражение от тела нейрона, тем более устойчивым к аксотомии является аксон [9]. При его повреждении происходит передача сигналов к соме, вызывающих дифференциальную экспрессию генов. На сегодняшний день обнаружено несколько механизмов, регулирующих ретроградную передачу сигналов о повреждении. К ним относятся приток Ca^{2+} , локальный и ретроградный синтез аксоплазматических белков, прекращение притока питательных веществ с периферии [13, 14]. Повышенный уровень Ca^{2+} активирует несколько сигнальных каскадов, чтобы инициировать регенерацию. Например, известно, что Ca^{2+} активирует аденилатциклазу для повышения уровня внутриклеточного cAMP, что впоследствии приводит к CREB-зависимой экспрессии генов [15]. Кроме того, Ca^{2+} влияет на эпигенетическую регуляцию, что изменяет транскриптом [13, 16].

Выявлено несколько белков, синтезируемых или активируемых при повреждении аксонов, которые могут участвовать в передаче сигнала повреждения. К ним относятся STAT3, JNK, MAPK и другие киназы [17]. Они в свою очередь могут активировать нижестоящие факторы транскрипции через сложные пути, что вызывает изменения паттернов экспрессии генов в поврежденных нейронах [13, 15]. Например, ретроградный транспорт фосфорилированной формы киназ, регулируемых внеклеточными сигналами ERK1 и ERK2, активирует фактор транскрипции ELK1, тогда как c-Jun N-терминальная киназа JNK фосфорилирует белок c-Jun и активирует AMP-зависимый фактор транскрипции ATF3 [18]. Хотя экспрессия генов, способствующих росту в зрелых нейронах, со временем снижается как в ПНС, так и в ЦНС, после аксонального повреждения нейроны ЦНС проявляют плохую способность к регенерации, тогда как нейроны ПНС способны к восстановлению утраченных связей посредством активации транскрипции большого репертуара генов, свя-

занных с регенерацией (regeneration-associated genes, RAGs), на экспрессию которых влияет передача сигналов повреждения [13, 14]. Кроме того, полногеномное исследование аксотомированных нейронов ПНС привело к предположению о том, что активация специфических факторов транскрипции может служить ключевым узлом в регуляторных сетях, переключающих нейроны ПНС в регенеративное состояние. К таким факторам транскрипции относят: CREB (cAMP response element-binding protein), N-концевая киназа c-Jun или Smad1 (Mothers against decapentaplegic homolog 1 или SMAD family member 1), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) и AMP-зависимый фактор транскрипции ATF3 (Activating Transcription Factor-3) [19].

Исследования последних лет свидетельствуют о важной роли эпигенетической регуляции в судьбе нейронов после травматического повреждения нервов. Подтверждается участие эпигенетических механизмов в дифференцировке [20, 21], повреждении [22] и регенерации [14, 16, 17, 23, 24] нервных клеток в основном центральной нервной системы. Также объясняется значение эпигенетических механизмов в нейропластичности, обучении и памяти [25]. Однако роль эпигенетической регуляции при травматическом повреждении периферических нервов остается малоизученной.

2. ФЕРМЕНТЫ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ И ИХ РОЛЬ В ВЫЖИВАНИИ И СМЕРТИ НЕЙРОНОВ ПОСЛЕ НЕЙРОТРАВМЫ

Ацетилирование и деацетилирование гистонов и негистоновых белков осуществляют деацетилазы гистонов (HDAC) и гистонацетилтрансферазы (НАТ). НАТ переносят ацетильные группы от ацетил-коэнзима А на аминокислотные остатки лизина, а HDAC, напротив, катализируют процесс удаления ацетильных групп. Поскольку гистоны были первыми идентифицированными мишенями деацетилаз и ацетилтрансфераз, эти ферменты были названы “гистоновыми”. Дальнейшее изучение роли посттрансляционного ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков было связано с успехами клинического использования ингибиторов HDAC в терапии различных форм рака и было обусловлено поиском причин цитотоксичности неселективных ингибиторов HDAC. Были идентифицированы негистоновые субстраты НАТ и HDAC, которые являются супрессорами опухолей, белками внутриклеточной сигнализации, стероидными рецепторами, факторами транскрипции и корегуляторами, а также структурными белками, шаперонами и белками ядерного импорта. Эти белки регулируют выживание и гибель клеток, репликацию, репарацию ДНК,

клеточный цикл, реакцию клеток на стресс и старение и эволюционно являются первичными мишенями НАТ и HDAC [2].

HDAC и НАТ широко представлены в нервной системе. Однако роль разных изоформ HDAC в выживании и смерти нервных клеток неоднозначна. Некоторые HDAC опосредуют процессы выживания, в то время как другие участвуют в нейротоксических реакциях клеток, а третьи могут проявлять как нейропротекторные, так и патологические свойства в зависимости от типа клеток, их внутриклеточной локализации и характера посттрансляционных модификаций ферментов [26].

Становится все более очевидным, что НАТ/HDAC обладают способностью регулировать различные клеточные системы, одновременно влияя на патогенетические процессы на разных уровнях. В то же время эпигенетические модификации, такие как ацетилирование, обратимы, что делает их перспективными кандидатами для лечения системных заболеваний.

Показано, что iHDAC оказывают нейропротекторный эффект в опытах с моделированием повреждения спинного мозга [20, 23, 27], а также при аксотомии зрительного нерва [13, 22, 28], что свидетельствует об их потенциале в терапии нейротравм.

2.1. Гистонацетилтрансферазы

В зависимости от внутриклеточной локализации НАТ подразделяются на тип А и тип В, которые либо содержат, либо не содержат бромодомен [29]. НАТ А-типа в основном осуществляют ацетилирование, связанное с транскрипцией. Цитоплазматические НАТ В-типа ацетируют синтезированные *de novo* гистоны и негистоновые белки. На основании гомологии последовательностей, а также общих структурных особенностей и функций НАТ были сгруппированы в три основные категории: GNAT (GCN5-связанные N-ацетилтрансферазы), EP300/CREBBP (E1A-связывающий белок p300 и CREB-связывающий белок) и семейство MYST. PCAF (связанный с p300/CBP фактор), принадлежащий к семейству GNAT, является наиболее важным ферментом, ацетилирующим негистоновые белки [1, 30]. Кроме того, PCAF — единственный НАТ, даже при полном нокауте, у которого не наблюдается афенотипических изменений [31].

Повреждение ветвей периферических аксонов, но не центральных ветвей аксонов, увеличивает глобальное ацетилирование гистонов H3 и H4 в нейронах спинномозговых ганглиев (dorsal root ganglia, DRG) [13, 14].

2.2. Деацетилазы гистонов

В соответствии с функциями, клеточной локализацией и паттернами экспрессии у млекопитающих выделяют четыре класса HDAC. Класс I (HDAC1, 2, 3 и 8), класс II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 и 10) и класс IV (HDAC11) – это цинк-зависимые ферменты, в то время как у ферментов III класса – сиртуинов (Sirtuins) в качестве кофактора выступает NAD^+ [1].

HDAC I класса локализируются в ядре, повсеместно экспрессируются в тканях млекопитающих (за исключением HDAC8, который специфичен для мышц). Эти ферменты участвуют в регуляции генов транскрипции через формирование стабильных транскрипционных комплексов. HDAC1 и HDAC2 входят в состав комплексов Sin3, NuRD, CoREST и NODE, которые ингибируют процесс транскрипции [1]. HDAC1 может играть двоякую роль в регуляции жизни и смерти нейронов. Если HDAC1 взаимодействует с HDAC3, это приводит к смерти нейронов, но он также может выступать в роли нейропротектора в случае взаимодействия его с HDAC2, более короткой формой HDAC9 [32]. HDAC3 входит в состав корепрессорного комплекса NCoR/SMRT и регулирует экспрессию генов путем деацетилирования гистонов, а также ряда негистоновых белков [1]. HDAC2 и HDAC3 играют важную роль при травмах головного мозга [33].

Деацетилазы гистонов оказывают значительное влияние на синтез миелина и регенерацию периферических нервов. HDAC1 и HDAC2 были изучены в этом плане первыми. У мышей с дефицитом HDAC1/2 наблюдается значительное снижение синтеза миелина и остановка развития [34]. При этом раннее вмешательство с помощью ингибиторов HDAC1/2 при повреждении седалищного нерва может способствовать ремиелинизации и улучшению функционального восстановления [35]. Кроме того, HDAC3, HDAC4 и HDAC5 участвуют в развитии и регенерации миелиновой оболочки в периферических нервах [36, 37].

Проведение секвенирования генома клеток седалищного нерва в период его развития и регенерации после повреждения показало, что после повреждения экспрессия генов большинства сиртуинов подавлена, в то время как гены остальных изоформ HDAC активировались, а в период развития – наоборот, что указывает на возможную связь между экспрессией ферментов ацетилирования/деацетилирования и их субстратов во время развития, повреждения и регенерации [35]. Уровни общего ацетилирования в ткани нерва увеличивались в 6 раз от раннего развития (1 день) до взрослой жизни (6 месяцев). Общий уровень ацетилирования клеток седалищного нерва при его повреждении у мышей был снижен примерно в

2.5 раза по сравнению с уровнем во время развития. При посттравматической регенерации (7 дней по сравнению с 14 днями) общий уровень ацетилирования в ткани седалищного нерва повышался примерно в 1.6 раза, что согласуется с уровнем во время развития, но противоположно уровню во время травмы [35]. Эти результаты предполагают, что изменения в общем ацетилировании во время развития, повреждения и регенерации седалищного нерва могут означать, что активация ацетилирования во время развития в первую очередь обусловлена подавлением деацетилаз HDAC1/2 и активацией ацетилтрансферазы PCAF [35].

Известно, что HDAC1 активируется на ранней стадии и подавляется на поздней стадии повреждения периферических нервов [38, 39]. Недавние исследования показали, что HDAC1 может также регулировать миелинизацию Шванновских клеток путем деацетилирования негистоновых белков, таких как eEF1A1 и NF- κ B [40, 41]. Данные, полученные Sun и коллегами, предполагают, что HDAC1 или PSAF также могут играть роль в повреждении и регенерации периферических нервов, регулируя ацетилирование негистоновых белков, таких как Foxo1, Cdkn1b, Nr3c1, Jup, Stat6, Jund и Hck. Также авторы предполагают, что IL6 является мишенью для HDAC1 и PSAF, подразумевая, что ацетилирование белка может быть одним из механизмов активации воспаления на ранних стадиях повреждения. На это также указывает тот факт, что использование ингибитора гистондеацетилазы SANA снижает экспрессию HDAC1/2 и воспаление [42].

HDAC1, HDAC2 и HDAC3 вовлечены в патогенез ишемического инсульта, болезни Паркинсона, спиноцереbellарной атаксии, включая атаксию Фридрейха, болезни Гентингтона и болезни Альцгеймера. Кроме того, активность HDAC3 была связана с функцией памяти и поведением при кокаиновой зависимости. Большая часть исследований, посвященных функции HDAC3 в этих условиях, проводилась с использованием селективных ингибиторов или нокдауна HDAC3, причем большинство из них указывало на то, что ингибирование HDAC3 обеспечивает защитную среду для нейронов в животных моделях нейродегенерации. HDAC1, HDAC2, HDAC3, помимо всего прочего играют важную регулируемую роль в ганглиозных клетках сетчатки (RGC) после острого повреждения зрительного нерва и в модели глаукомы [22, 43–49].

Уровни экспрессии HDAC1, HDAC2, HDAC3 увеличиваются в посттравматических нейронах ПНС [39, 50]. HDAC1 и HDAC2, по-видимому, принимают участие в апоптозе клеток после аксотомии [39], но с какими функциональными последствиями это связано при аксотомии, неизвестно. Однако применение ингибитора HDAC

I класса MS-275 значительно увеличивает уровень ацетилирования гистонов H3 и H4, что активирует несколько генов, связанных с регенерацией [14].

HDAC класса II подразделяются на класс IIa (HDAC4, 5, 7, 9) и класса IIb (HDAC6 и 10). HDAC этих подклассов могут курсировать между цитозолем и ядром нервных клеток. Кальций-зависимый ядерный экспорт HDAC5 увеличивает ацетилирование гистонов в нейронах DRG после аксотомии периферических нервов, что иницирует экспрессию генов, участвующих в регенерации [13]. Среди них несколько известных генов, связанных с регенерацией, такие как N-концевая киназа Jun, Fos (forkhead box) и Klf (Krüppel-like factor).

HDAC6 вовлечен в ряд нейродегенеративных состояний [51, 52], включая индуцированное ишемией и реперфузией повреждение сетчатки крысы [53]. Yuan и коллеги показали, что применение ингибитора HDAC трихостатина А (TSA), а также тубацина (селективный ингибитор HDAC6) отменяло вызванное ишемией/реперфузией уменьшение толщины сетчатки, а также повышало выживаемость RGC. Повышенная экспрессия и активность HDAC6 в сетчатке из-за повреждения ишемией/реперфузией значительно ингибировались тубацином, который также ослаблял опосредованный ишемией/реперфузией апоптоз за счет снижения экспрессии TUNEL-позитивных RGC и проапоптотического белка Bax и, наоборот, увеличения экспрессии анти-апоптотического белка Bcl-2. Кроме того, тубацин повышал экспрессию связанного с аутофагией гена *BECN1* и ассоциированного с микротрубочками белка 1 легкой цепи 3B (LC3B), а также уровни Ptx2 [53].

HDAC5, HDAC6 и SIRT2 способны деацетилировать тубулин микротрубочек, регулируя рост аксонов [26]. Например, повышенный уровень HDAC5 после периферического повреждения приводит к деацетилированию тубулина проксимальнее места повреждения, тем самым дестабилизируя микротрубочки, что способствует динамической перестройки конусов роста и регенерации аксонов. Чтобы выяснить, как HDAC5 транспортируется к кончикам поврежденных аксонов, в недавнем исследовании было установлено, что HDAC5 способна взаимодействовать с активизирующим белком филамином А [54].

Класс III HDAC (SIRT1–7) включает в себя NAD⁺-зависимые ферменты, которые локализуются как в ядре, так и в цитоплазме: SIRT1, SIRT6 и SIRT7 — в ядре, в то время как SIRT2 преимущественно в цитозоле, а SIRT3, SIRT4 и SIRT5 находятся исключительно в митохондриях. Наиболее изученными являются SIRT1 и SIRT2. Существует большое количество данных, свидетельствующих о нейропротекторных свойствах SIRT1 при

ишемическом инсульте, травмах головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях [55, 56]. У мышей, нокаутных по SIRT1, наблюдалось увеличение размера инфаркта при окклюзии средней мозговой артерии [57], тогда как мыши со сверхэкспрессией SIRT1 оказывались более устойчивыми к ишемии [58]. Активаторы SIRT1 уменьшают размер инфаркта [59]. SIRT2, как правило, наоборот отводят проапоптотическую роль. Фармакологическое ингибирование или нокдаун SIRT2 может препятствовать апоптозу нейронов при ишемическом инсульте [55, 60, 61].

Класс IV HDAC и его единственный представитель HDAC11 конструктивно отличается от других HDAC и имеет ядерно-цитоплазматическую локализацию. HDAC11 является членом белкового комплекса “выживания моторного нейрона” (“Survival Motor Neuron (SMN) protein complex”), играя функциональную роль в сплайсинге мРНК [62].

На модели перерезки седалищного нерва показано, что аксотомия вызывает значительное увеличение уровня HDAC1, HDAC2 и HDAC3 [39, 63, 64], приводит к снижению уровня ацетилирования гистонов H3 и H4, а также вызывает транслокацию HDAC1 из ядра в цитоплазму и, наоборот, транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро (рис. 1). В результате аксотомии HDAC1 перемещается в цитоплазму нейронов DRG, где опосредует деацетилирование факторов транскрипции E2F1 и p53, что может приводить к нарушению их транскрипционной активности и усилению проапоптотического взаимодействия с митохондриями [64].

Так как активация гистондеацетилаз и деацетилирование гистонов приводят к подавлению белкового синтеза, то можно рассматривать изменения уровня данных белков как начальные этапы патологического процесса. Кроме того, иммунофлуоресцентный анализ показал, что в аксотомированных ганглиях происходит транслокация HDAC1 из ядра в цитоплазму в первые 24 ч после повреждения. Это происходит на фоне снижения уровня ацетилирования гистонов 3 и 4 — основных ядерных субстратов HDAC I класса [39]. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности HDAC1, HDAC2 и HDAC3 в реакцию клеток ганглиев на аксотомию [64]. Важным является факт повышенного содержания HDAC1 в цитоплазме клеток аксотомированных ганглиев. Это указывает на дополнительную нетранскрипционную активность HDAC1: обнаруженная в цитоплазме HDAC1 способна деацетилировать различные цитоплазматические белки, в том числе изученные нами факторы транскрипции p53 и E2F1, повышенное содержание которых мы также наблюдаем в аксотомированных нейронах [63, 65] и активность которых регулируется путем

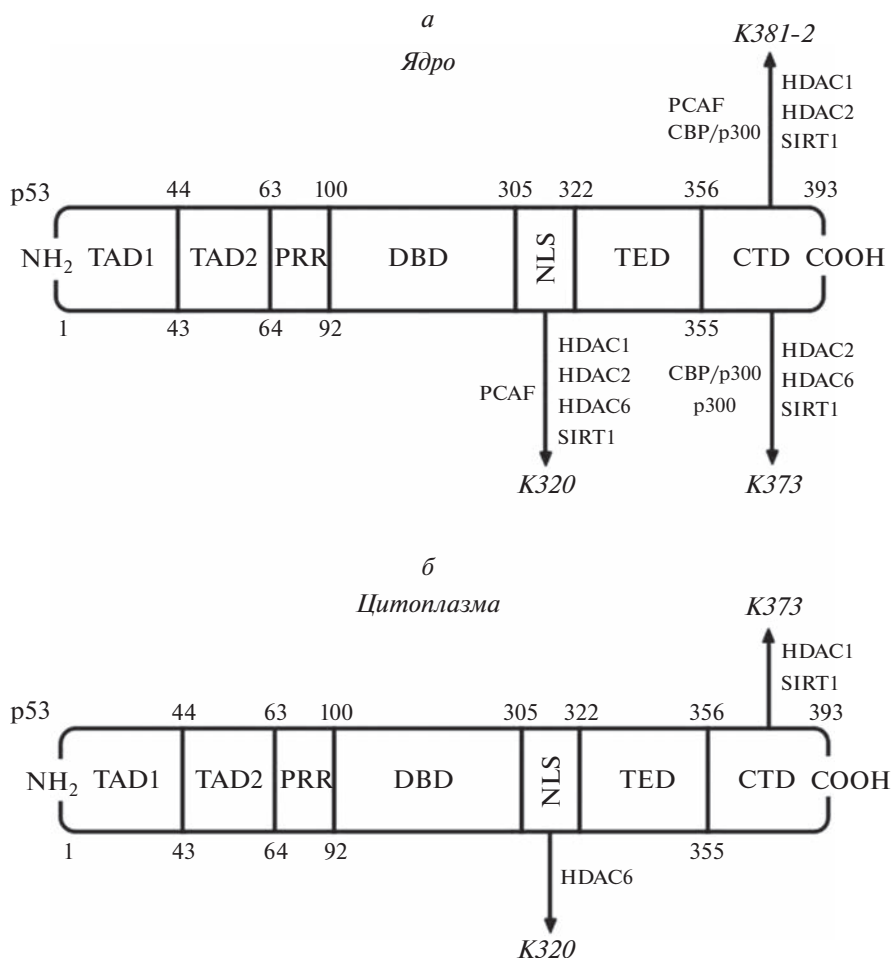


Рис. 1. Доменная структура и сайты ацетилирования фактора транскрипции p53: TAD1 и TAD2 – внутренне неупорядоченные транскрипционные домены, PRR – богатый пролином домен, DBD – ДНК-связывающий домен, NLS – сигнал ядерной локализации, TED – домен, ответственный за тетрамеризацию, CTD – внутренне неупорядоченный С-концевой домен, регулирующий активность p53; *а* – в ядре, *б* – в цитоплазме.

их ацетилирования/деацетилирования по остаткам лизина как в ядре, так и в цитоплазме.

3. НЕГИСТОНОВЫЕ СУБСТРАТЫ НАТ И HDAC ПРИ АКСОТОМИИ

Ацетилирование остатков лизина в белке приводит к конформационным изменениям белка и, следовательно, изменению его ферментативной активности, изменению липофильности белка и его внутриклеточной локализации, к изменению характера взаимодействия белка с другими белками, создавать новые сайты стыковки. При этом различные ковалентные посттрансляционные модификации могут конкурировать за одни и те же остатки лизина, необходимые для передачи сигналов или субклеточной локализации белка [66]. Интересно, что паттерны ацетилирования белков органоспецифичны. Таким образом, ацетилирование регулирует функционирование белка на

нескольких уровнях, оказывая влияние на его ферментативную активность, характер взаимодействия с другими белками, внутриклеточную локализацию, продолжительность жизни и на другие свойства белков.

Основным видом гибели клеток при аксотомии является апоптоз. Протеомные исследования экспрессии сотен белков в аксотомированных ганглиях беспозвоночных и млекопитающих указывают на последовательное повышение уровня многих сигнальных белков, способных инициировать, опосредовать или регулировать апоптоз, а также ряда белков с антиапоптотическим действием [50, 63]. На развитие апоптоза указывала повышенная экспрессия проапоптотических белков, таких как p53, p38, p75, c-Мyc, E2F1, JNK, AIF, Par4, DYRK1A, NMDAR2a, GADD153, GAD65/67, Smac/DIABLO, каспаз и PSR. Однако при этом повышался также и уровень антиапоптотических белков, в том числе рецепторов фак-

торов роста EGFR и эстрогенов, протеинкиназ ERK1 и 5, Akt, фосфатазы MKP1, белков p53, p21Waf1, MDM2 [50].

Роли посттрансляционного ацетилирования и деацетилирования факторов транскрипции p53 и E2F1, играющих центральную роль в регуляции апоптоза нервных клеток при аксотомии [50, 63, 65], будут рассмотрены в нашем обзоре более подробно.

3.1. Фактор транскрипции p53

Белок p53 контролирует транскрипцию сотен генов, участвующих в регуляции репарации ДНК, в остановке клеточного цикла, регулирует метаболизм, трансляцию мРНК, апоптоз и аутофагию. Негативными регуляторами p53 являются p21WAF1, p67 и MDM2 [67].

В нормальных нейронах уровни p53 невысоки. После синтеза в цитоплазме он транспортируется в ядро, где связывается с ДНК. Несвязанный p53 образует комплекс с MDM2, который моноубиквитинирует его и транспортирует обратно в цитоплазму, где он дополнительно убиквитинируется и быстро деградирует в протеасомах. При активации онкогенов, радиационном повреждении ДНК или окислительном стрессе p53 фосфорилируется протеинкиназами JNK, p38, ERK и тому подобными, что предотвращает его взаимодействие с MDM2, препятствует деградации и значительно повышает его уровень в ядре. Белок p53 тетрамеризуется, связывается с ДНК и стимулирует транскрипцию целой группы генов, содержащих в регуляторной области специальную нуклеотидную последовательность p53RE (p53-response element). Уже известно более 600 таких p53RE [67].

Выделен целый ряд состояний, способных активировать p53: истощение запасов нуклеотидов, нарушения цитоскелета, нарушения биогенеза рибосом, гипоксия и ишемия, гипероксия, отсутствие или избыток некоторых факторов роста или цитокинов, нарушения клеточной адгезии и фокальных контактов, нарушение прикрепления клеток к субстрату (что сопровождается p53-зависимым аноиксом), действие монооксида азота (NO) и многое другое. Все эти состояния вызывают характерные для каждого из них модификации как самого белка p53, так и сигнальных систем, контролирующих его уровень и активность [68].

Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК, репарация повреждений ДНК, а при сильном стрессовом сигнале — запуск апоптоза. Белок p53 также обнаруживается в клеточных ядрышках, являющихся “фабриками рибосом”. Нарушение синтеза рибосом в ядрышке повышает уровень p53, что передает сигнал о повреждении клетки в системы, контролирующие клеточный метаболизм, го-

меостаз и выживание. Однако ишемия головного мозга приводит к быстрому повышению уровня p53 и активации апоптоза клеток пенумбры [69]. Нами показано, что нейротравма вызывает увеличение уровня, а также транслокацию фактора транскрипции p53 из ядра в цитоплазму нейронов в спинномозговых ганглиях крыс [64]. Уровень p53 повышался уже через 1 ч после аксотомии на модели беспозвоночных и через 4 ч после перерезки седалищного нерва крысы, таким образом, повышение уровня p53 было ранним результатом аксотомии. Накопление p53 в цитоплазме нейронов указывает на дополнительную нетранскрипционную активность этого белка. p53 может индуцировать апоптоз не только транскрипционным путем, но и независимо от транскрипции. Цитоплазматический p53 непосредственно связывается с наружной митохондриальной мембраной, ингибирует антиапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-xL, активирует проапоптотические белки Bax и Bid и стимулирует Bax/Bak-опосредованное формирование мегалопор в наружной митохондриальной мембране, через которые цитохром c, SMAC/Diablo, AIF и другие проапоптотические белки выходят в цитозоль и вызывают апоптоз. Митохондриальная транслокация p53 опосредует высвобождение цитохрома c и гибель нейронов гиппокампа после транзиторной глобальной ишемии мозга у крыс [70]. При этом пифитрин-μ не только снижал уровень митохондриального p53, Puma и Noxa, но также ингибировал выход цитохрома c и каспазы-9 в цитоплазму. Endo и коллеги показали, что митохондриальная транслокация p53 через Ca^{2+} -зависимую митохондриальную пору (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) опосредует высвобождение цитохрома c и способствует апоптозу нейронов гиппокампа у крыс после преходящей глобальной церебральной ишемии [71].

Белок p53 состоит из одной полипептидной цепи из 393 аминокислот (рис. 1). В клетках он образует тетрамер из двух одинаковых димеров. Как и у многих факторов транскрипции, в первичной структуре p53 можно выделить ряд функциональных модулей. На N-конце располагается трансактивационный домен TAD (transactivation domain), подразделяющийся на два субдомена TAD1 и TAD2 (аминокислоты 1–43 и 44–63). За ними следует богатый пролином участок PRR (proline-rich region, аминокислоты 64–92), ДНК-связывающий домен DBD (аминокислоты 10–305), который распознает p53RE и связывается с ним, сигнал ядерной локализации NLS (nuclear localization sequence), домен TET (tetramerization domain, аминокислоты 322–355), ответственный за тетрамеризацию p53, и C-концевой домен (аминокислоты 356–393). Сигнал ядерной локализации (NLS) расположен в C-концевой части белка между аминокислотами 305 и 322 [67].

Транскрипционная активность и функция p53 тонко регулируются интегрированным набором высоко скоординированных посттрансляционных модификаций. Ацетилирование p53 в С-концевом домене регулирует несколько аспектов активности p53, при этом данные о влиянии ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков на клетки мозга крайне ограничены, а при аксотомии — практически отсутствуют.

p53 был первым открытым негистоновым белком, активность которого зависела от ацетилирования [72]. Ацетилирование p53 значительно усиливает его активность в ответ на повреждение ДНК. В нормальных клетках неацетилированный p53 способен активировать гены, которые участвуют в его отрицательной регуляции, например, *MDM2*. При повреждении ДНК ацетилирование p53 позволяет нарушить взаимодействие между *MDM2* и p53 и вызывает активацию проапоптотических генов [67].

В условиях нейродегенерации ацетилтрансферазы PCAF или p300 могут ацетилировать p53 по лизину в положениях K320, K373, K381 и K382; p300/CBP вовлечен в ацетилирование p53 по лизину в положениях K373, K381 и K382; hMOF и TIP60 вовлечены в ацетилирование p53 в K120 в ДНК-связывающем домене. HDAC класса I, SIRT1 и SIRT2 могут действовать как деацетилазы p53. HDAC6 деацетилирует p53 (K320) в цитоплазме, HDAC1, по-видимому, участвует в деацетилировании как ядерного (K320), так и цитоплазматического (K373) p53, в то время как HDAC2 является возможным ферментом деацетилирования p53 (K320, K373, K381, K382) исключительно в ядрах нейронов. Считается, что SIRT1 преимущественно локализован в ядрах нервных клеток, где он способен деацетилировать p53 по остаткам лизина в положениях K320, K373, K381 и K382, но показано, что в постинфарктных нейронах SIRT1 накапливался в цитоплазме [73], где может деацетилировать p53 в положении K373 [47, 74–78].

Трансактивационный домен TAD и С-концевой домен (CTD) белка-супрессора опухоли p53 представляет собой внутренне неупорядоченную область, которая связывается с различными белками-партнерами [79]. Важно отметить, что посттрансляционные модификации, такие как метилирование, фосфорилирование и ацетилирование, изменяют физико-химические свойства внутренне неупорядоченной области и модулируют ее функциональность. Следовательно, интересно исследовать изменение конформационного ансамбля с помощью посттрансляционных модификаций. Так, ацетилирование в положении K382 увеличивает склонность к образованию спиральной структуры в молекуле p53 и индуцирует образование гидрофобного ядра в спирали [79]. Если

лизин в положении K382 находится в неацетилированной форме, то между ним и другими положительно заряженными остатками в спирали происходит отталкивание и дестабилизация спирали, при этом ацетилирование остатков лизина стабилизирует структуру p53.

Knights и коллеги показали, что ацетилирование лизина в положении 320 предотвращает фосфорилирование критически важных серинов в NH₂-концевой области p53; это позволяет активировать только гены, содержащие высокоаффинные сайты связывания с p53, такие как p21/WAF, что способствует выживанию клеток после повреждения ДНК. Напротив, ацетилирование по лизину в положении 373 приводит к гиперфосфорилированию NH₂-концевых остатков p53 и усиливает взаимодействие с промоторами, к которым p53 обладает низким сродством к связыванию с ДНК, такими как те, которые содержатся в проапоптотических генах, что приводит к гибели клеток (рис. 1, 2). Кроме того, ацетилирование каждого из этих двух лизиновых кластеров по-разному регулирует взаимодействие p53 с коактиваторами и корепрессорами и приводит к различным профилям экспрессии генов [80].

Два лизина p53 в положениях 320 (K320) и 373 (K373) по-разному ацетилируются, влияя на клеточную судьбу [80]: ацетилирование K320 способствует выживанию клеток, тогда как ацетилирование K373 способствует гибели клеток. Кроме того, ацетилирование K320 необходимо для роста нейритов и регенерации аксонов [47, 74–78] (рис. 2).

Ацетилирование p53 в нейронах по лизинам на его С-конце (K372, K382) способствует росту их нейритов и аксонов и необходимо для регенерации аксонов *in vivo* [76, 77]. Опухолевой супрессор p53 и его ацетилтрансфераза p300/CBP образуют транскрипционный комплекс, который регулирует белок GAP-43, ассоциированный с ростом аксонов [81]. Эти результаты согласуются с данными наших недавних исследований, где было показано повышение уровня GAP-43 в ответ на аксотомии, а также на фоне введения неселективного ингибитора гистондеацетилаз вальпроата натрия [39].

Повышенное ацетилирование p53 в положении K381 снижает проапоптотическую активность p53 у мышей с условным нокаутом по HDAC1 и HDAC2 в аксотомированных ганглиозных клетках сетчатки (RGCs) [47]. Недавнее исследование *in vitro* позволяет предположить, что ацетилирование p53 по лизинам K381 и K382 ингибирует его способность активировать транскрипцию PUMA в нейронах коры головного мозга (рис. 2) [75]. Эти данные согласуются с данными, полученными в модели аксотомии у крыс [82].

тверждая тот факт, что ацетилирование этих лизинов не предотвращает ядерную локализацию p53 [75].

Было высказано предположение, что в ответ на повреждение ДНК фосфорилирование N-концевых остатков серина (S15, S33, S37) способствует стабилизации p53 и привлекает p300/CBP-ассоциированный фактор и PCAF для индукции ацетилирования p53 по C-концевым остаткам лизина. Причем ацетилирования лизинов K381 и K382, но не K373, достаточно для предотвращения проапоптотической активности p53 в нейронах [75]. В этих клетках с повреждением ДНК, вызванным камптотецином, запускается ацетилирование p53 по лизину K373, что, наряду со стабилизацией p53 и его фосфорилированием по серину 15, способствует связыванию p53 с проапоптотическим промотором PUMA и приводит к гибели нейронов [75]. Когда повреждение ДНК происходит в присутствии ингибитора HDAC, происходит ацетилирование лизина 373, вызванное повреждением ДНК, как в первом случае, но при этом и лизины K320, K381 и K382 ацетилированы. Этот паттерн ацетилирования аннулирует способность p53 связываться с промотором PUMA и индуцировать апоптоз в поврежденных нейронах [75]. Ингибиторы HDAC подавляли p53-зависимую экспрессию PUMA, критическое сигнальное промежуточное звено, связывающее p53 с активацией Вах, тем самым предотвращая постмитохондриальные события, включая расщепление каспазы-9 и каспазы-3.

В дополнение к этому на модели *in vitro* было показано, что ингибирование HDAC способствует росту нейронов и противодействует коллапсу конусов роста посредством p300/CBP и PCAF-зависимого ацетилирования p53 в первичных нейронах коры мозга крысы [78]. По-видимому, деацетилирование остатков лизина K320, K381 и K382 имеет решающее значение для активации экспрессии проапоптотических генов [22]. HDAC1 и HDAC2 активируют p53 путем деацетилирования его остатков лизина K381 и K382, что приводит к увеличению экспрессии генов, участвующих в апоптозе, в том числе, Bbc3 (PUMA) и Bim. Эти белки затем способствуют активации Вах, что приводит к активации каспаз и эндонуклеазы, которая расщепляет ДНК. HDAC2 может дополнительно подавлять другие мишени p53, такие как p21 [22].

На модели аксотомии путем перерезки седалищного нерва крыс было продемонстрировано снижение уровня ацетилирования p53 по лизину 373 в аксотомированных ганглиях. Это происходило на фоне увеличения активности HDAC1 [64]. Повышение активности HDAC1, по-видимому, связано с последующим снижением ацетилирования фактора транскрипции p53. На моде-

ли аксотомии *in vivo* неселективный ингибитор HDAC I класса вальпроат натрия отменял вызванное аксотомией снижение уровня ацетилирования p53 (K373), а также накопление p53 в цитоплазме, что защищало глиальные клетки ганглиев крыс от апоптоза, вызванного аксотомией [64]. Это говорит о том, что, во-первых, уровень ацетилирования белка зависит от деацетилазной активности HDAC1, во-вторых, влияет на внутриклеточную локализацию белка. Обнаружено прямое физическое взаимодействие HDAC1 с ацетилированной формой p53 (K373) в цитоплазме клеток аксотомированных ганглиев [64]. Из чего следует, что проапоптотическое действие HDAC1 в аксотомированных ганглиях связано с регуляцией уровня и внутриклеточной локализации фактора транскрипции p53 в результате его деацетилирования.

3.2. Фактор транскрипции E2F1

Регуляторами синтеза и активности p53 при аксотомии являются факторы транскрипции E2F1, с-Мус и p38, гиперэкспрессия которых была показана в протеомном исследовании аксотомированных ганглиев брюшной нервной цепочки раков [50].

Фактор транскрипции E2F1 является одним из ключевых игроков, определяющих судьбу клетки. Он контролирует экспрессию различных генов, регулирующих синтез и репарацию ДНК, клеточный цикл и апоптоз [83]. E2F1 стимулирует апоптоз при нарушении или подавлении клеточного цикла, что характерно для нейронов [84]. Его синтез контролируется MAP-киназой p38 и фактором транскрипции с-Мус [85]. E2F1 индуцирует экспрессию различных проапоптотических белков, таких как каспазы-3, -7, -8 и -9, Smac/DIABLO, Araf-1, Bcl-2, p53 и p73 [84, 86], повышенное содержание которых наблюдается в аксотомированных ганглиях беспозвоночных уже в первые 4 ч после аксонального повреждения [50], что свидетельствует об участии E2F1 в апоптозе нейронов при аксотомии. Важное наблюдение состоит в том, что уровень экспрессии E2F1 в наших экспериментах повышался как в цитоплазме, так и в ядрах нейронов. Вероятно, повышенное содержание белка в цитоплазме складывалось как за счет экспорта белка из ядра, так и за счет увеличения экспрессии самого гена [64, 87].

В ядре E2F1, очевидно, действует как фактор транскрипции. В случае цитоплазматической локализации одна из возможных функций E2F1 — его взаимодействие с митохондриями и регуляция их функций, например, путем непосредственного взаимодействия с белком Bcl-xL на наружной митохондриальной мембране и регулирования ее пермеабилитации [88, 89]. Экспрессия E2F1 в аксотомированных ганглиях достигает своего мак-

симума уже к 4 ч после аксотомии и постепенно снижается. Максимальный уровень мРНК белка наблюдается через 4 ч после аксотомии и остается повышенным в течение первых 24 ч после травмы [64]. Это говорит, во-первых, о скором E2F1-зависимом ответе в нейронах, развивающемся при аксональном стрессе, во-вторых, указывает на роль E2F1 в запуске апоптоза, после чего его содержание в клетке стремится к минимуму. Внутривентрикулярное введение низкомолекулярного ингибитора E2F1 HLM006474 крысам в течение 7 сут полностью устраняло индуцированную аксотомией повышенную экспрессию проапоптотически активных белков каспазы-3 и p53, защищая аксотомированные клетки DRG от апоптоза [87]. Следовательно, фактор транскрипции E2F1 может быть вовлечен в индуцированное аксотомией повреждение нейронов DRG и глиальных клеток.

Увеличение уровня E2F1 предшествовало активации каспазы-3 и изменениям уровня p53 в аксотомированных ганглиях крысы. Последовательное увеличение экспрессии E2F1 и p53 также показано с помощью протеомного анализа аксотомированных ганглиев раков [50]. Мы предполагаем, что в условиях аксотомии фактор транскрипции E2F1 может участвовать в активации p53 в качестве нижестоящего фактора-мишени, который, в свою очередь, вызывает вторичные изменения экспрессии генов и белков, запускающих апоптоз. Ингибирование пути E2F1/p53 предотвращает апоптоз нейронов [86, 87].

Таким образом, повышение экспрессии E2F1 может быть ключевым событием в инициации апоптоза нейронов и отдаленных глиальных клеток в аксотомированных DRG и подготавливает последующие изменения других белков, в частности p53, и общий ответ клеток в ответ на повреждение.

Белки семейства E2F обычно группируются по функциям в две категории: активаторы транскрипции и репрессоры. Активаторы, такие как E2F1, E2F2 и E2F3a, стимулируют и помогают развитию клеточного цикла, в то время как репрессоры (E2F3b, E2F4–8) ингибируют клеточный цикл. Среди белков E2F только E2F1–3a имеют сигнал ядерной локализации и взаимодействует с p53 [90].

Fogal и коллеги сообщили, что аминоконцевой домен E2F1 (аминокислоты 1–108) связывается с аминокислотными остатками 347–370 p53, которые перекрываются с его С-концевой ядерной экспортной последовательностью (NES), усиливая удержание в ядре фосфорилированного по серину 315 p53 и, таким образом, индуцируя p21, Cip1, p107 и p130 [91].

E2F1 ацетируется несколькими НАТ, что приводит к увеличению его способности связы-

ваться с ДНК и его транскрипционной активности, а также повышается его время жизни. E2F1 стабилизируется в ответ на повреждение ДНК за счет его ацетилирования PCAF, при этом E2F1 может оставаться активным в апоптотических нейронах даже в отсутствие СВР или p300. PCAF ацетирует E2F1 по трем лизинам в положениях K117, K120 и K125 [92].

Ген-супрессор опухоли ретинобластомы Rb жестко контролирует E2F1 во время клеточного цикла. В более поздней литературе сообщается о роли HDAC как клеточных регуляторов E2F1/Rb-зависимой транскрипции. Было показано, что Rb связывается с HDAC класса I, тем самым обеспечивая репрессию транскрипции генов на E2F1-чувствительных промоторах. Действительно, ингибитор гистондеацетилаз TSA проявляет заметные токсические эффекты в нормальных нейронных клетках, активируя E2F1 [93].

Таким образом, в совокупности эти данные позволяют предположить следующую модель. Белок E2F1, присутствующий как часть комплекса E2F1–Rb, вероятно, неацетилирован. Этот комплекс обладает специфическими ДНК-связывающими свойствами, репрессивен к транскрипции и стабилен, поскольку Rb предотвращает убиквитин-зависимую деградацию E2F1. Напротив, свободный E2F1, по крайней мере частично, ацетилирован, обладает ДНК-связывающими свойствами, отличными от Rb-связанного комплекса, способен активировать транскрипцию и стабилен, поскольку белки-коактиваторы, такие как PCAF, могут предотвращать его деградацию посредством ацетилирования. До сих пор неясно, сосуществуют ли эти два комплекса в клетке во времени, или же комплекс E2F1–Rb заменяется комплексом E2F1–PCAF. Исходя из текущих знаний, можно было бы ожидать, что комплекс E2F1–Rb активен в G1-фазе, а свободный белок E2F1 в комплексе с PCAF активен в S-фазе. Создание специфических антител с высоким сродством, которые распознают ацетилированную форму эндогенного E2F1, будет полезно для решения этой проблемы. Таким образом, по-видимому, в ответ на повреждение ДНК образуются два разных комплекса E2F1-Rb: репрессирующий комплекс, содержащий HDAC1 и активирующий комплекс, содержащий PCAF. Конститутивная репрессия транскрипционной активности E2F1 через HDAC необходима для выживания нейронов [93].

В совокупности эти данные демонстрируют, что ацетилирование/деацетилирование представляет собой новый механизм, с помощью которого регулируется активность E2F1. Однако информация об ацетилировании/деацетилировании E2F1 в клетках периферической нервной системы как норме, так и при патологии отсутствует.

На нашей модели перерезки седалищного нерва было продемонстрировано снижение уровня ацетилирования E2F1 по лизину 120 в аксотомированных ганглиях крыс [64]. Это происходило на фоне увеличения активности HDAC1. Повышение активности HDAC1, по-видимому, связано с последующим снижением ацетилирования фактора транскрипции E2F1. Ингибитор гистон-деацетилаз вальпроат натрия увеличивал уровень ацетилирования E2F1 по лизину K120 в нейронах аксотомированных ганглиев, защищая их клетки от апоптоза. Введение ингибитора HDAC I класса вальпроата натрия внутривентрикулярно в течение 7 сут после аксотомии снижало уровень E2F1 в цитоплазме, но увеличивало в ядре [64]. Это говорит о том, что, во-первых, уровень ацетилирования белка зависит от деацетилазной активности HDAC1, во-вторых, влияет на внутриклеточную локализацию белка. Обнаружено прямое физическое взаимодействие HDAC1 с ацетилированной формой E2F1 в цитоплазме клеток аксотомированных ганглиев [64]. Наши данные подтверждают обоснованность использования низкомолекулярных ингибиторов активности HDAC в качестве терапевтических инструментов для защиты нейронов при неврологических повреждениях и заболеваниях.

К сожалению, несмотря на многообещающие экспериментальные данные о нейропротекторных эффектах ингибиторов HDAC, полученных на клеточных и животных моделях инсульта или нейротравмы, отсутствуют доказательства их эффективности у людей, поскольку клинические испытания III фазы с ингибиторами HDAC у больных после инсульта еще не проводились или не опубликованы (источник: Clinicaltrials.gov, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Основным ограничением клинического использования ингибиторов HDAC является отсутствие изоформ-специфических ингибиторов, которые способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и имели бы меньше побочных эффектов. Остановимся более подробно на перспективах и проблемах клинического использования ингибиторов HDAC.

4. ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ HDAC

На сегодняшний день пять ингибиторов HDAC одобрены для лечения Т-клеточной лимфомы и множественной миеломы: вориностат, белиностат, панобинолат, ромидеписин и хидамид [4]. Ингибиторы HDAC можно разделить на несколько классов: самый большой класс — это гидроксаматы (например, субероиланилид гидроксамовой кислоты или вориностат (SAHA), его аналоги белиностат и панобинолат и трихостатин А), бензамиды (например, MS-275 и хиде-

мид), циклические пептиды (например, ромидеписин) и алифатические кислоты (например, вальпроевая кислота, бутират натрия и фенилбутират). В основном это неселективные ингибиторы HDAC первого поколения. Их клиническое использование в онкологии показало, что они имеют побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой системы (нарушение баланса электролитов, аритмия сердца), гематологической системы (анемия, тромбоцитопения, лимфопения), со стороны желудочно-кишечного тракта (тошнота и рвота, анорексия и диарея), общая усталость и потеря веса.

Согласно результатам III фазы клинических испытаний (NCT00071721), лечение вальпроатами не препятствовало появлению ажитации или психоза, не замедляло снижения когнитивных или функциональных способностей у пациентов с болезнью Альцгеймера средней степени тяжести и так же, как и в случае использования препарата для лечения опухолей, было связано со значительными токсическими эффектами [94]. Неудачными были и результаты III фазы клинических испытаний вальпроевой кислоты для лечения бокового амиотрофического склероза (NCT00136110) в дозах, которые в настоящее время используются для лечения эпилепсии или биполярного расстройства [95].

Тем не менее вориностат рассматривается в качестве перспективного кандидата для лечения ряда заболеваний ЦНС. Поскольку побочные эффекты вориностата и других рап-HDACi в основном обратимы, то оптимизация дозы, режима введения и способов доставки рап-HDACi может повысить их клинические перспективы как для лечения рака, так и для лечения системных заболеваний ЦНС [8]. Однако селективность ингибиторов HDAC, вероятно, будет иметь решающее значение при терапии хронических заболеваний ЦНС, таких как нейродегенеративные заболевания, поскольку длительность использования требует более широких профилей их безопасности.

В связи с этим ингибиторы HDAC второго поколения разрабатываются как селективные по изоформам HDAC. Так, направленная регуляция транскрипции была бы более эффективной при направленной регуляции активности ядерных ферментов HDAC1, HDAC2 и HDAC3. В настоящее время доступен набор соединений: 5-арил-орто-аминоанилиды в качестве ингибиторов HDAC1/2, 4-фтор-орто-аминоанилиды как ингибиторы HDAC3, пара-арилгидроксамовые кислоты в качестве селективных ингибиторов HDAC6, орто/мета-арилгидроксамовые кислоты как селективные ингибиторы HDAC8 и HDAC11, основные гидроксамовые кислоты в качестве ингибиторов HDAC10, оксадиазолы, α -разветвленные гидрок-

самовые кислоты как ингибиторы HDAC4, HDAC 5, HDAC 7 и HDAC 9 [96].

В последнее время для искусственной селективной деградации aberrantных белков-мишеней, включая HDAC, активно рассматривается новая технология протеолиза целевого белка (proteolysis targeting chimera, PROTAC) [97, 98]. Ингибиторы PROTAC имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными ингибиторами HDAC. Например, PROTAC обладают более высокой специфичностью и значительно меньшей цитотоксичностью по сравнению с традиционными ингибиторами. PROTAC могут вызывать химически индуцированную деградацию HDAC и, таким образом, нарушать как ферментативную, так и неферментативную функцию белка. Более того, PROTAC можно использовать повторно в течение многих циклов, пока не будут удалены целевые белки, поэтому требуется очень низкая концентрация препарата. Совсем недавно были разработаны некоторые ингибиторы PROTAC с высокой селективностью и меньшей цитотоксичностью для деградации HDAC6 или SIRT2 [99–102]. Однако, на наш взгляд, ингибиторы PROTAC будут более полезны для терапии повреждений ПНС, чем ЦНС, ввиду их высокой молекулярной массы, что затрудняет прохождение ГЭБ.

Использование ингибиторов HDAC в качестве нейропротекторов имеет свои сложности. Наличие ГЭБ и низкая биодоступность ингибиторов для нервных клеток ограничивает их клиническое применение. Однако современные стратегии увеличения биодоступности лекарственных препаратов, такие как заключение ингибиторов в мицеллы и липосомы, использование различных наноносителей, а также использование метода доставки с усиленной конвекцией, позволят в дальнейшем преодолеть имеющиеся ограничения клинического применения ингибиторов HDAC не только для онкотерапии, но и для нейропротекторной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение активности или экспрессии НАТ в нейронах после травматического повреждения является критическим шагом для активации апоптоза. Нарушение гомеостаза ацетилирования изменяет профиль транскрипции, что приводит к повреждению и гибели нервных клеток. Это подтверждается исследованиями с использованием ингибиторов HDAC, которые снижают апоптоз нейронов. Вероятно, опосредованное ингибиторами HDAC изменение судьбы нейронов возможно только потому, что этого события можно избежать, манипулируя его причиной, но не следствием. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что ингибиторы HDAC являются многообещаю-

щими кандидатами в нейропротекторы. К сожалению, ингибиторы HDAC первого поколения крайне неспецифичны, что при длительном их использовании может обратить вспять опосредованную деацетилированием блокировку нежелательных неспецифических промоторов повреждения и привести к цитотоксичности. Действительно, например, TSA токсичен для нормальных нейронов вследствие его способности активировать E2F1. Таким образом, введение *in vivo* ингибиторов HDAC может повысить выживаемость поврежденных нейронов за счет очень высокой опасности для близко расположенных неповрежденных нейронов и глиальных клеток.

В настоящее время наша попытка признать важность поддержания гомеостаза ацетилирования для жизнеспособности нейронов после острого или хронического повреждения серьезно ограничена недостатком экспериментальных данных. По сравнению с хорошо изученной системой киназ и регуляцией белков путем их фосфорилирования/дефосфорилирования изучение системы НАТ/HDAC в нервных неонкотрансформированных клетках только началось, оставляя нам больше вопросов, чем ответов. До сих пор неизвестны пути и механизмы перекрестных помех между микроРНК и HDAC, актуальные при различных хронических заболеваниях человека.

Тем не менее несколько параллельных линий доказательств дают нам достаточно оснований, чтобы рассматривать систему ацетилирования/деацетилирования ядерных и цитоплазматических белков как вероятное направление терапевтического вмешательства при инсульте, нейротравме или нейродегенеративных заболеваниях. А значительные успехи в разработке ингибиторов HDAC второго поколения с высокой селективностью и биодоступностью дают надежду на их клиническое использование в качестве нейропротекторов в ближайшем будущем.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда, проект № 21-15-00188.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Demyanenko S., Sharifulina S. 2021. The role of post-translational acetylation and deacetylation of signaling proteins and transcription factors after cerebral ischemia: Facts and hypotheses. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (15), 7947.

2. Spange S., Wagner T., Heinzel T., Krämer O.H. 2009. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41** (1), 185–198.
3. Mrakovcic M., Kleinheinz J., Fröhlich L.F. 2019. p53 at the crossroads between different types of HDAC inhibitor-mediated cancer cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (10), 2415.
4. Alseksek R.K., Ramadan W.S., Saleh E., El-Awady R. 2022. The role of HDACs in the response of cancer cells to cellular stress and the potential for therapeutic intervention. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (15), 8141.
5. Kao M.H., Lin T.N. 2019. Histone deacetylases in stroke. *Chin. J. Physiol.* **62** (3), 95–107.
6. Demyanenko S., Dzreyan V., Sharifulina S. 2021. Histone deacetylases and their isoform-specific inhibitors in ischemic stroke. *Biomedicines*. **9** (10), 1445.
7. Li Y., Gu Z., Lin S., Chen L., Dzreyan V., Eid M., Demyanenko S., He B. 2022. Histone deacetylases as epigenetic targets for treating Parkinson's disease. *Brain Sci.* **12** (5), 672.
8. Athira K.V., Sadanandan P., Chakravarty S. 2021. Repurposing vorinostat for the treatment of disorders affecting brain. *Neuromolecular Med.* **23** (4), 449–465.
9. Casas C., Isus L., Herrando-Grabulosa M., Mancuso F.M., Borrás E., Sabidó E., Forés J., Aloy P. 2015. Network-based proteomic approaches reveal the neurodegenerative, neuroprotective and pain-related mechanisms involved after retrograde axonal damage. *Sci. Rep.* **5**, 9185.
10. Abe N., Cavalli V. 2008. Nerve injury signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18** (3), 276–283.
11. Batulan Z., Nalbantoglu J., Durham H.D. 2005. Non-steroidal anti-inflammatory drugs differentially affect the heat shock response in cultured spinal cord cells. *Cell Stress Chaperones*. **10** (3), 185–196.
12. Richardson P.M., Miao T., Wu D., Zhang Y., Yeh J., Bo X. 2009. Responses of the nerve cell body to axotomy. *Neurosurgery*. **65** (4 Suppl), A74–A79.
13. Weng Y.L., Joseph J., An R., Song H., Ming G.L. 2016. Epigenetic regulation of axonal regenerative capacity. *Epigenomics*. **8** (10), 1429–1442.
14. Shin J.E., Cho Y. 2017. Epigenetic regulation of axon regeneration after neural injury. *Mol. Cells*. **40** (1), 10–16.
15. Rishal I., Fainzilber M. 2014. Axon-soma communication in neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* **15** (1), 32–42.
16. Wahane S., Halawani D., Zhou X., Zou H. 2019. Epigenetic regulation of axon regeneration and glial activation in injury responses. *Front. Genet.* **10**, 640.
17. Berry K.P., Lu Q.R. 2020. Chromatin modification and epigenetic control in functional nerve regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* **97**, 74–83.
18. Mar F.M., Bonni A., Sousa M.M. 2014. Cell intrinsic control of axon regeneration. *EMBO Rep.* **15** (3), 254–263.
19. Bomze H.M., Bulsara K.R., Iskandar B.J., Caroni P., Skene J.H. 2001. Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat. Neurosci.* **4** (1), 38–43.
20. Kameda T., Imamura T., Nakashima K. 2018. Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration. *Cell Tissue. Res.* **371** (1), 189–199.
21. Saha A., Tiwari S., Dharmarajan S., Otteson D.C., Belecky-Adams T.L. 2018. Class I histone deacetylases in retinal progenitors and differentiating ganglion cells. *Gene Expr. Patterns*. **30**, 37–48.
22. Schmitt H.M., Schlamp C.L., Nickells R.W. 2016. Role of HDACs in optic nerve damage-induced nuclear atrophy of retinal ganglion cells. *Neurosci. Lett.* **625**, 11–15.
23. Wong V.S., Langley B. 2016. Epigenetic changes following traumatic brain injury and their implications for outcome, recovery and therapy. *Neurosci. Lett.* **625**, 26–33.
24. Zhong J., Zou H. 2014. BMP signaling in axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **27**, 127–134.
25. Phan M.L., Gergues M.M., Mahidadia S., Jimenez-Castillo J., Vicario D.S., Bieszczad K.M. 2017. HDAC3 inhibitor RGFP966 modulates neuronal memory for vocal communication signals in a songbird model. *Front. Syst. Neurosci.* **11**, 65.
26. Thomas E.A., D'Mello S.R. 2018. Complex neuroprotective and neurotoxic effects of histone deacetylases. *J. Neurochem.* **145** (2), 96–110.
27. Wong J.K., Zou H. 2014. Reshaping the chromatin landscape after spinal cord injury. *Front. Biol. (Beijing)*. **9** (5), 356–366.
28. Schmitt H.M., Pelzel H.R., Schlamp C.L., Nickells R.W. 2014. Histone deacetylase 3 (HDAC3) plays an important role in retinal ganglion cell death after acute optic nerve injury. *Mol. Neurodegener.* **9**, 39.
29. Marmorstein R., Roth S.Y. 2001. Histone acetyltransferases: Function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11** (2), 155–161.
30. Kimura A., Matsubara K., Horikoshi M. 2005. A decade of histone acetylation: Marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J. Biochem.* **138** (6), 647–662.
31. Yamauchi T., Yamauchi J., Kuwata T., Tamura T., Yamashita T., Bae N., Westphal H., Ozato K., Nakatani Y. 2000. Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97** (21), 11303–11306.
32. Bardai F.H., Price V., Zaayman M., Wang L., D'Mello S.R. 2012. Histone deacetylase-1 (HDAC1) is a molecular switch between neuronal survival and death. *J. Biol. Chem.* **287** (42), 35444–35453.
33. Nagalakshmi B., Sagarkar S., Sakharkar A.J. 2018. Epigenetic mechanisms of traumatic brain injuries. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **157**, 263–298.
34. Chen Y.T., Zang X.F., Pan J., Zhu X.L., Chen F., Chen Z.B., Xu Y. 2012. Expression patterns of histone deacetylases in experimental stroke and potential targets for neuroprotection. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **39** (9), 751–758.
35. Sun J., Ji Y., Liang Q., Ming M., Chen Y., Zhang Q., Zhou S., Shen M., Ding F. 2022. Expression of protein acetylation regulators during peripheral nerve develop-

- ment, injury, and regeneration. *Front. Mol. Neurosci.* **15**, 888523.
36. Gomis-Coloma C., Velasco-Aviles S., Gomez-Sanchez J.A., Casillas-Bajo A., Backs J., Cabedo H. 2018. Class IIa histone deacetylases link cAMP signaling to the myelin transcriptional program of schwann cells. *J. Cell Biol.* **217**, 1249–1268.
 37. He X., Zhang L., Queme L.F., Liu X., Lu A., Waclaw R.R., Dong X., Zhou W., Kidd G., Yoon S.O., Buonanno A., Rubin J.B., Xin M., Nave K.A., Trapp B.D., Jankowski M.P., Lu Q.R. 2018. A histone deacetylase 3-dependent pathway delimits peripheral myelin growth and functional regeneration. *Nat. Med.* **24**, 338–351.
 38. Brügger V., Duman M., Bochud M., Mürger E., Heller M., Ruff S., Jacob C. 2017. Delaying histone deacetylase response to injury accelerates conversion into repair Schwann cells and nerve regeneration. *Nat. Commun.* **8**, 14272.
 39. Dzreyan V.A., Rodkin S.V., Pitinova M.A., Uzden-sky A.B. 2021. HDAC1 expression, histone deacetylation, and protective role of sodium valproate in the rat dorsal root ganglia after sciatic nerve transection. *Mol. Neurobiol.* **58** (1), 217–228.
 40. Chen Y., Wang H., Yoon S.O., Xu X., Hottiger M.O., Svaren J. 2011. HDAC-mediated deacetylation of NF-kappaB is critical for Schwann cell myelination. *Nat. Neurosci.* **14**, 437–441.
 41. Duman M., Vaquié A., Nocera G., Heller M., Stumpe M., Siva Sankar D., Dengjel J., Meijer D., Yamaguchi T., Matthias P., Zeis T., Schaeren-Wiemers N., Hayoz A., Ruff S., Jacob C. 2020. EEF1A1 deacetylation enables transcriptional activation of remyelination. *Nat. Commun.* **11** (1), 3420.
 42. He X.T., Hu X.F., Zhu C., Zhou K.X., Zhao W.J., Zhang C., Han X., Wu C.L., Wei Y.Y., Wang W., Deng J.P., Chen F.M., Gu Z.X., Dong Y.L. 2020. Suppression of histone deacetylases by SAHA relieves bone cancer pain in rats via inhibiting activation of glial cells in spinal dorsal horn and dorsal root ganglia. *J. Neuroinflammation.* **17** (1), 125.
 43. Schmitt H.M., Fehrman R.L., Maes M.E., Yang H., Guo L.W., Schlamp C.L., Pelzel H.R., Nickells R.W. 2021. Increased susceptibility and intrinsic apoptotic signaling in neurons by induced HDAC3 expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **62** (10), 14.
 44. Schmitt H.M., Grosser J.A., Schlamp C.L., Nickells R.W. 2020. Targeting HDAC3 in the DBA/2J spontaneous mouse model of glaucoma. *Exp. Eye Res.* **200**, 108244.
 45. Hervera A., Zhou L., Palmisano I., McLachlan E., Kong G., Hutson T.H., Danzi M. C., Lemmon V.P., Bixby J.L., Matamoros-Angles A., Forsberg K., De Virgiliis F., Matheos D.P., Kwapis J., Wood M.A., Puttagunta R., Del Río J.A., Di Giovanni, S. 2019. PP4-dependent HDAC3 dephosphorylation discriminates between axonal regeneration and regenerative failure. *EMBO J.* **38** (13), e101032.
 46. Zaidi S.A.H., Guzman W., Singh S., Mehrotra S., Husain S. 2020. Changes in class I and IIb HDACs by δ -opioid in chronic rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **61** (14), 4.
 47. Lebrun-Julien F., Suter U. 2015. Combined HDAC1 and HDAC2 depletion promotes retinal ganglion cell survival after injury through reduction of p53 target gene expression. *ASN Neuro.* **7** (3), 1759091415593066.
 48. Pelzel H.R., Schlamp C.L., Nickells R. W. 2010. Histone H4 deacetylation plays a critical role in early gene silencing during neuronal apoptosis. *BMC Neurosci.* **11**, 62.
 49. Schlüter A., Aksan B., Fioravanti R., Valente S., Mai A., Mauceri D. 2019. Histone deacetylases contribute to excitotoxicity-triggered degeneration of retinal ganglion cells in vivo. *Mol. Neurobiol.* **56** (12), 8018–8034.
 50. Demyanenko S., Dzreyan V., Uzdensky A. 2019. Axotomy-induced changes of the protein profile in the crayfish ventral cord ganglia. *Mol. Neurosci.* **68** (4), 667–678.
 51. Simões-Pires C., Zwick V., Nurisso A., Schenker E., Carrupt P. A., Cuendet M. 2013. HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: What makes it different from the other HDACs? *Mol. Neurodegener.* **8**, 7.
 52. d'Ydewalle C., Bogaert E., Van Den Bosch L. 2012. HDAC6 at the intersection of neuroprotection and neurodegeneration. *Traffic.* **13** (6), 771–779.
 53. Yuan H., Li H., Yu P., Fan Q., Zhang X., Huang W., Shen J., Cui Y., Zhou W. 2018. Involvement of HDAC6 in ischaemia and reperfusion-induced rat retinal injury. *BMC Ophthalmol.* **18** (1), 300.
 54. Cho Y., Sloutsky R., Naegle K.M., Cavalli V. 2015. Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration. *Cell.* **161** (3), 894–908.
 55. She D.T., Jo D.G., Arumugam T.V. 2017. Emerging roles of sirtuins in ischemic stroke. *Transl. Stroke Res.* <https://doi.org/10.1007/s12975-017-0544-4>
 56. Ng F., Wijaya L., Tang B.L. 2015. SIRT1 in the brain-connections with aging-associated disorders and lifespan. *Front. Cell Neurosci.* **9**, 64.
 57. Hernández-Jiménez M., Hurtado O., Cuartero M.I., Ballesteros I., Moraga A., Pradillo J.M., McBurney M.W., Lizasoain I., Moro M.A. 2013. Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage. *Stroke.* **44** (8), 2333–2337.
 58. Hattori Y., Okamoto Y., Nagatsuka K., Takahashi R., Kalaria R.N., Kinoshita M., Ihara M. 2015. SIRT1 attenuates severe ischemic damage by preserving cerebral blood flow. *Neuroreport.* **26** (3), 113–117.
 59. Li Z., Pang L., Fang F., Zhang G., Zhang J., Xie M., Wang L. 2012. Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2. *Brain Res.* **1450**, 116–124.
 60. Nie H., Hong Y., Lu X., Zhang J., Chen H., Li Y., Ma Y., Ying W. 2014. SIRT2 mediates oxidative stress-induced apoptosis of differentiated PC12 cells. *Neuroreport.* **25** (11), 838–842.
 61. Krey L., Lühder F., Kusch K., Czech-Zechmeister B., Könnicke B., Fleming Outeiro T., Trendelenburg G. 2015. Knockout of silent information regulator 2 SIRT2 preserves neurological function after experimental stroke in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35** (12), 2080–2088.
 62. Joshi P., Greco T.M., Guise A.J., Luo Y., Yu, F., Nesvizhskii A.I., Cristea I.M. 2013. The functional inter-

- actome landscape of the human histone deacetylase family. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 672.
63. Dzreyan V., Rodkin S., Nikul V., Pitinova M., Uzdensky A. 2021. The expression of E2F1, p53, and caspase 3 in the rat dorsal root ganglia after sciatic nerve transection. *J. Mol. Neurosci.* **71** (4), 826–835.
 64. Демьяненко С.В., Дзреян В.А., Узденский А.Б. 2022. Эпигенетические механизмы повреждения и защиты клеток центральной и периферической нервных систем. Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета. 179 с.
 65. Rodkin S., Khaitin A., Pitinova M., Dzreyan V., Guzenko V., Rudkovskii M., Sharifulina S., Uzdensky A. 2020. The localization of p53 in the crayfish mechanoreceptor neurons and its role in axotomy-induced death of satellite glial cells remote from the axon transection site. *J. Mol. Neurosci.* **70** (4), 532–541.
 66. Kim S.C., Sprung R., Chen Y., Xu Y., Ball H., Pei J., Cheng T., Kho Y., Xiao H., Xiao L., Grishin N.V., White M., Yang X. J., Zhao Y. 2006. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol. Cell.* **23** (4), 607–618.
 67. Uzdensky A. 2020. Multifunctional proteins. *Biophys. J.* **65**, 390–403.
 68. Родькин С.В., Дзреян В.А. Демьяненко С.В., Узденский А.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.
 69. Nijboer C.H., Heijnen C.J., van der Kooij M.A., Zijlstra J., van Velthoven C.T., Culmsee C., van Bel F., Hagberg H., Kavelaars A. 2011. Targeting the p53 pathway to protect the neonatal ischemic brain. *Ann. Neurol.* **70** (2), 255–264.
 70. Xie B., Gao X., Huang Y., Zhang Y., Zhu S. 2021. Remote ischemic postconditioning inhibits hippocampal neuronal apoptosis and mitophagy after cardiopulmonary resuscitation in rats. *Shock.* **55** (1), 74–82.
 71. Endo H., Kamada H., Nito C., Nishi T., Chan P.H. 2006. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J. Neurosci.* **26** (30), 7974–7983.
 72. Gu W., Roeder R.G. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell.* **90** (4), 595–606.
 73. Eid M., Dzreyan V., Demyanenko S. 2022. Sirtuins 1 and 2 in the acute period after photothrombotic stroke: Expression, localization and involvement in apoptosis. *Front. Physiol.* **13**, 782684.
 74. Uo T., Veenstra T.D., Morrison R.S. 2009. Histone deacetylase inhibitors prevent p53-dependent and p53-independent Bax-mediated neuronal apoptosis through two distinct mechanisms. *J. Neurosci.* **29** (9), 2824–2832.
 75. Brochier C., Dennis G., Riviaccio M.A., McLaughlin K., Coppola G., Ratan R.R., Langley B. 2013. Specific acetylation of p53 by HDAC inhibition prevents DNA damage-induced apoptosis in neurons. *J. Neurosci.* **33** (20), 8621–8632.
 76. Di Giovanni S., Knights C.D., Rao M., Yakovlev A., Beers J., Catania J., Avantaggiati M.L., Faden A.I. 2006. The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration. *EMBO J.* **25** (17), 4084–4096.
 77. Hasegawa K., Yoshikawa K. 2008. Necdin regulates p53 acetylation via Sirtuin1 to modulate DNA damage response in cortical neurons. *J. Neurosci.* **28** (35), 8772–8784.
 78. Gaub P., Tedeschi A., Puttagunta R., Nguyen T., Schmandke A., Di Giovanni S. 2010. HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. *Cell Death. Differ.* **17** (9), 1392–1408.
 79. Iida S., Mashimo T., Kurosawa T., Hojo H., Muta H., Goto Y., Fukunishi Y., Nakamura H., Higo J. 2016. Variation of free-energy landscape of the p53 C-terminal domain induced by acetylation: Enhanced conformational sampling. *J. Comput. Chem.* **37** (31), 2687–2700.
 80. Knights C.D., Catania J., Di Giovanni S., Muratoglu S., Perez, R., Swartzbeck A., Quong A.A., Zhang X., Beerman T., Pestell R.G., Avantaggiati M.L. 2006. Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J. Cell Biol.* **173** (4), 533–544.
 81. Tedeschi A., Nguyen T., Puttagunta R., Gaub P., Di Giovanni S. 2009. A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration. *Cell Death Differ.* **16** (4), 543–554.
 82. Wilson A.M., Morquette B., Abdouh M., Unsain N., Barker P.A., Feinstein E., Di Polo A. 2013. ASPP1/2 regulate p53-dependent death of retinal ganglion cells through PUMA and Fas/CD95 activation in vivo. *J. Neurosci.* **33**, 2205–2216.
 83. Meng P., Ghosh R. 2014. Transcription addiction: Can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? *Cell Death Dis.* **5** (8), e1360.
 84. Folch J., Junyent F., Verdager E., Auladell C., Pizarro J.G., Beas-Zarate C., Pallàs M., Camins A. 2012. Role of cell cycle re-entry in neurons: a common apoptotic mechanism of neuronal cell death. *Neurotox. Res.* **22** (3), 195–207.
 85. Bretones G., Delgado M.D., León J. 2015. Myc and cell cycle control. *Biochim. Biophys. Acta.* **1849** (5), 506–516.
 86. Camins A., Verdager E., Folch J., Beas-Zarate C., Canudas A.M., Pallàs M. 2007. Inhibition of ataxia telangiectasia-p53-E2F-1 pathway in neurons as a target for the prevention of neuronal apoptosis. *Curr. Drug Metab.* **8** (7), 709–715.
 87. Dzreyan V., Eid M., Rodkin S., Pitinova M., Demyanenko S. 2022. E2F1 Expression and apoptosis initiation in crayfish and rat peripheral neurons and glial cells after axonal injury. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (8), 4451.
 88. Ma L., Yu H.J., Gan S.W., Gong R., Mou K.J., Xue J., Sun S.Q. 2017. p53-Mediated oligodendrocyte apoptosis initiates demyelination after compressed spinal cord injury by enhancing ER-mitochondria interaction and E2F1 expression. *Neurosci. Lett.* **644**, 55–61.

89. Raimundo N., Song L., Shutt T.E., McKay S.E., Cotney J., Guan M.X., Gilliland T. C., Hohuan D., Santos-Sacchi J., Shadel G.S. 2012. Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness. *Cell*. **148** (4), 716–726.
90. Inoue K., Fry E. A., Frazier D.P. 2016. Transcription factors that interact with p53 and Mdm2. *Int. J. Cancer*. **138** (7), 1577–1585.
91. Fogal V., Hsieh J.K., Royer C., Zhong S., Lu X. 2005. Cell cycle-dependent nuclear retention of p53 by E2F1 requires phosphorylation of p53 at Ser315. *EMBO J.* **24** (15), 2768–2782.
92. Martínez-Balbás M.A., Bauer U.M., Nielsen S.J., Brehm A., Kouzarides T. 2000. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J.* **19** (4), 662–671.
93. Boutillier A.L., Trinh E., Loeffler J.P. 2003. Selective E2F-dependent gene transcription is controlled by histone deacetylase activity during neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* **84** (4), 814–828.
94. Tariot P.N., Schneider L.S., Cummings J., Thomas R.G., Raman R., Jakimovich L.J., Loy R., Bartocci B., Fleisher A., Ismail M.S., Porsteinsson A., Weiner M., Jack C.R. Jr., Thal L., Aisen P.S. 2011. Chronic divalproex sodium to attenuate agitation and clinical progression of Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry*. **68** (8), 853–861.
95. Piepers S., Veldink J.H., de Jong S.W., van der Tweel I., van der Pol W.L., Uijendaal E.V., Schelhaas H.J., Scheffer H., de Visser M., de Jong J.M., Wokke J.H., Groeneveld G.J., van den Berg L.H. 2009. Randomized sequential trial of valproic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **66** (2), 227–234.
96. Ho T.C.S., Chan A.H.Y., Ganesan A. 2020. Thirty years of HDAC inhibitors: 2020 insight and hindsight. *J. Med. Chem.* **63** (21), 12460–12484.
97. Wang C., Zheng C., Wang H., Zhang L., Liu Z., Xu P. 2022. The state of the art of PROTAC technologies for drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **5** (235), 114290.
98. Kumar D., Hassan M.I. 2022. Targeted protein degraders march towards the clinic for neurodegenerative diseases. *Ageing Res. Rev.* **1** (78), 101616.
99. Yang K., Zhao Y., Nie X., Wu H., Wang B., Almodovar-Rivera C.M., Xie H., Tang W. 2020. A cell-based target engagement assay for the identification of cereblon E3 ubiquitin ligase ligands and their application in HDAC6 degraders. *Cell Chem. Biol.* **27** (7), 866–876.
100. Cao Z., Gu Z., Lin S., Chen D., Wang J., Zhao Y., Li Y., Liu T., Li Y., Wang Y., Lin H., He B. 2021. Attenuation of NLRP3 inflammasome activation by indirubin-derived PROTAC targeting HDAC6. *ACS Chem. Biol.* **16** (12), 2746–2751.
101. Hong J.Y., Jing H., Price I.R., Cao J., Bai J.J., Lin H. 2020. Simultaneous inhibition of SIRT2 deacetylase and defatty-acylase activities via a PROTAC strategy. *ACS Med. Chem. Lett.* **11** (11), 2305–2311.
102. Schiedel M., Lehotzky A., Szunyogh S., Oláh J., Hammelmann S., Wössner N., Robaa D., Einsle O., Sippl W., Ovádi J., Jung M. 2020. HaloTag-targeted sirtuin-rearranging ligand (SirReal) for the development of proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) against the lysine deacetylase sirtuin 2 (Sirt2). *Chembiotech.* **21** (23), 3371–3376.

The Role of Post-Translational Protein Acetylation and Deacetylation in the Apoptosis of Neurons of the Peripheral Nervous System

V. A. Dzreyan¹, *, S. V. Demyanenko¹

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

*e-mail: dzreyan2016@mail.ru

Neurotrauma is among the main causes of human disability and mortality. However, the mechanisms that mediate the survival and death of cells in the peripheral nervous system are still not fully understood. The transcription factors p53 and E2F1 are the master regulators of basic cellular functions, including DNA repair, cell cycle, metabolism, and apoptosis. Overexpression of p53 and E2F1, shown in a number of experimental models of peripheral nerve injury, suggests an important role of these proteins in the pathogenesis of neurotrauma. This review discusses the epigenetic mechanisms of p53 and E2F1 activation and regulation, which may contribute to the survival or death of neurons and glial cells after traumatic injury. Prospects for further studies of the mechanisms of regulation of the p53 and E2F1 proteins, including those involving histone deacetylases, for the development of neuroprotectors are considered.

Keywords: acetylation, histone deacetylases, axotomy, p53, E2F1, apoptosis

УДК 576.7;591.1;591.13

ДЕЙСТВИЕ СЕРОВОДОРОДА НА СПОНТАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ. РОЛЬ K_V -, K_{Ca} - и K_{ir} -КАНАЛОВ

© 2023 г. Д. М. Сорокина^a, *, И. Ф. Шайдуллов^a, Д. Бучареб^a,
Ф. Г. Ситдигов^a, Г. Ф. Ситдикова^a

^aКазанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: dinagabita@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2023 г.

После доработки 01.06.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

В настоящей работе анализировали роль калиевых каналов: потенциал-зависимых (K_V), Ca^{2+} -активируемых (K_{Ca}) и входящего выпрямления (K_{ir}) при действии донора сероводорода (H_2S) — гидросульфида натрия ($NaHS$) на спонтанную сократительную активность тощей кишки крысы. В условиях изометрического сокращения на препаратах тощей кишки было показано, что $NaHS$ дозозависимо (10–500 мкМ) снижает тонус препарата, амплитуду и частоту спонтанных сокращений; при этом полуэффективная концентрация (EC_{50}) угнетающего эффекта $NaHS$ на амплитуду сокращения составила 165 мкМ. Блокатор K_V -каналов 4-АП (200 мкМ) вызывал усиление амплитуды спонтанных сокращений. На фоне 4-АП $NaHS$ (200 мкМ) приводил к снижению амплитуды и частоты спонтанной активности препарата так же, как и в контроле, а эффект на базальный тонус был выражен в меньшей степени. Блокаторы K_{Ca} -каналов большой проводимости (БК), неспецифический — ТЭА (3 мМ) и специфический — паксиллин (1 мкМ), приводили к повышению амплитуды спонтанных сокращений, при этом угнетающий эффект $NaHS$ полностью сохранялся. Селективный блокатор K_{Ca} -каналов малой проводимости (SK) NS8593 (4 мкМ) не влиял на тонус препарата и параметры спонтанных сокращений и не предотвращал действие $NaHS$. Активатор K_{ATP} -каналов диазоксид (100 мкМ) вызывал снижение базального тонуса препарата, амплитуды и частоты спонтанных сокращений. Диазоксид и блокатор K_{ATP} -каналов глибенкламид (50 мкМ) предотвращали действие $NaHS$ на тонус препарата. Блокатор K_{ir} -каналов $BaCl_2$ (30 мкМ) вызывал повышение амплитуды спонтанных сокращений и предотвращал развитие ингибиторных эффектов $NaHS$ на частоту и амплитуду спонтанных сокращений, а снижение тонуса было выражено в меньшей степени, чем в контроле. Таким образом, уменьшение базального тонуса препарата тощей кишки крысы при действии донора H_2S связано с активацией K_{ir} -каналов, включая K_{ATP} -каналы, тогда как влияние H_2S на амплитуду и частоту опосредовано усилением Ba^{2+} -чувствительной проводимости.

Ключевые слова: сероводород, калиевые каналы, сократительная активность, тощая кишка крысы

DOI: 10.31857/S0233475523060099, **EDN:** FMSRFQ

ВВЕДЕНИЕ

Сероводород (H_2S) является газообразным посредником наряду с оксидом азота и монооксидом углерода, влияющим на различные функции организма в физиологических и патологических условиях [1–8]. Экспериментальные данные указывают на протекторные эффекты H_2S при таких заболеваниях, как синдром раздраженного кишечника (СРК), воспалительные заболевания кишечника, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, язвенный колит, болезнь Крона, ожирение и рак, благодаря его противовоспалительным свойствам [9, 10]. H_2S эндогенно синтезируется ферментами: цистатионин-β-синтазой (CBS), цистатионин-γ-лиазой (CSE) и 3-меркаптопируват сульфуртрансферазой (3-MPST) [4, 6, 8, 11].

В желудочно-кишечном тракте экспрессия CBS, CSE и 3-MPST была обнаружена в различных типах клеток, включая гладкомышечные клетки, энтеральные нейроны, интерстициальные клетки Кахала (ИКК) и эпителиальные клетки [6, 12, 13].

Влияние H_2S на двигательную активность пищеварительного тракта зависит как от вида животного, так и специфического отдела желудочно-кишечного тракта и концентраций экзогенного H_2S [6, 11]. $NaHS$ преимущественно оказывает ингибиторные эффекты на спонтанную и вызванную ацетилхолином двигательную активность препаратов тонкой и толстой кишки мыши, крысы и человека [14–21]. В желудке действие H_2S зависит от концентрации: в низких концентрациях (0.1–0.2 мМ) $NaHS$ увеличивал тоническое напряже-

ние и амплитуду спонтанных сокращений препаратов антрального отдела желудка, а в высоких (0.2–1 мМ) – снижал тонус, амплитуду и частоту спонтанных сокращений [11, 17, 20, 22–28]. В двенадцатиперстной кишке крысы NaHS оказывал двухфазные эффекты, вызывая начальное кратковременное возбуждение с последующим длительным расслаблением [29].

В основе спонтанной сократительной активности гладкомышечных клеток кишечника лежит изменение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , связанное с возникновением медленных волн деполяризации, генерируемых в ИКК [30]. Гладкомышечные клетки электрически связаны с ИКК и фибробластоподобными клетками – $\text{PDGFR}\alpha^+$, вместе с которыми они образуют SIP-синцитий (SMCs, ICC and $\text{PDGFR}\alpha^+$ cells syncytium), где ИКК служат пейсмекерными клетками, ответственными за генерацию медленных волн деполяризации в гладкомышечных клетках, состоящих из фазы быстрой деполяризации, плато и реполяризации [30–32]. Фаза плато является критической для сопряжения процессов возбуждения-сокращения и зависит от баланса между входящими Ca^{2+} -токами и выходящими K^+ -токами [33]. K^+ -каналы играют фундаментальную роль в регуляции мембранного потенциала и медленных волн деполяризации. Вероятность открытия K^+ -каналов повышается в ответ на различные стимулы, включая деполяризацию мембраны (K_V -каналы) и/или повышение уровня Ca^{2+} (Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы), что ведет к гиперполяризации и снижает возбудимость и, как следствие, сократимость клетки. Кроме того, некоторые K^+ -каналы активны при значениях мембранного потенциала покоя, а их закрытие вызывает деполяризацию мембраны и сокращение [34].

По данным литературы, мишенями действия H_2S могут быть потенциал-зависимые K^+ -каналы (K_V) [35], Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы большой (BK) и малой (SK) проводимости [36–39], K^+ -каналы входящего выпрямления (K_{ir}) [40], включая АТР-зависимые K^+ -каналы ($\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналы) [41]. В гладкомышечных клетках сосудов расслабляющие эффекты H_2S преимущественно опосредуются активацией $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов, что приводит к гиперполяризации и закрытию потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов [42]. Однако данные о роли $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов в ингибиторных эффектах H_2S в гладкомышечных клетках желудочно-кишечного тракта противоречивы. Так, в препаратах желудка, толстой кишке мыши, крысы и человека H_2S подавлял спонтанную активность через активацию $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов [15], BK- и SK-каналов [13], а в тонкой кишке крысы, морской свинки и

кролика ингибиторные эффекты H_2S не зависели от $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов [4, 5, 14, 16, 23]. При этом активирующее влияние H_2S может опосредоваться активацией TRPV1-рецепторов сенсорных нервных окончаний или ингибированием K_V -каналов [20, 27, 29].

Целью нашего исследования было выявление роли потенциал-зависимых калиевых каналов (K_V), Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов (K_{Ca}) и калиевых каналов входящего выпрямления (K_{ir}) в эффектах сероводорода на спонтанную сократительную активность сегментов тощей кишки крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты проведены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (86/609/ЕЕС) и одобрены локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 8 от 05.05.2015; протокол № 33 от 25.11.2021). Регистрировали сокращения препаратов тощей кишки крысы длиной 5–7 мм в изометрических условиях с использованием установки фирмы Biopac (США). Исследуемый препарат подвешивали вертикально в ванночке объемом 20 мл, где верхняя часть соединялась с тензометрическим датчиком, а нижняя часть закреплялась на фиксированном крючке. Регистрация и последующий анализ параметров сокращения препарата проводилась с помощью программы AcqKnowledge 4.1 (Biopac, США).

В экспериментах использовался раствор Кребса (мМ): 121.0 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl_2 , 1.2 MgCl_2 , 25.0 NaHCO_3 , 1.2 NaH_2PO_4 , 8.0 глюкоза (pH 7.2–7.4, 37°C). Раствор постоянно аэрировался смесью 95% O_2 и 5% CO_2 . После закрепления препарата добивались стабилизации сокращений в течение 40–60 мин под определенным напряжением (около 1 г). В качестве донора H_2S использовали гидросульфид натрия (NaHS), который в растворе быстро диссоциирует до Na^+ и HS^- , далее HS^- взаимодействует с H^+ с образованием недиссоциированного H_2S . С учетом pH, температуры и концентрации солей в растворе было показано, что NaHS образует только 11–13% H_2S , концентрация которого в экспериментальной ванночке быстро снижается уже через 3 мин до 50% [38, 43]. Поэтому при использовании донора H_2S NaHS в концентрации 200 мкМ концентрация H_2S будет составлять 22–26 мкМ и снижаться до 11–13 мкМ через 3 мин инкубации. Данные концентрации близки к эндогенным уровням H_2S в тканях млекопитающих (от 10 нМ до 3 мкМ) [5, 37, 43–46]. При анализе дозозависимости NaHS последовательно вносили в экспериментальную ванночку раствор с повышающейся концентрацией вещества, наблюдая эффект в течение 5 мин. При вне-

сении вещества осуществляли перемешивание раствора с помощью пипетки.

В экспериментах использовали: блокатор K_V -каналов 4-аминопиридин (4-АП, 200 мкМ), неселективный блокатор Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой проводимости (БК) тетраэтил-аммоний (ТЭА, 3 мМ), селективный ингибитор БК-каналов — паксиллин (1 мкМ), селективный ингибитор Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов малой проводимости (СК) NS 8593 (4 мкМ), блокатор K_{ir} -каналов хлорид бария ($BaCl_2$, 30 мкМ), блокатор K_{ATP} -каналов глибенкламид (50 мкМ) и активатор K_{ATP} -каналов диазоксид (100 мкМ). Вещества, нерастворимые в воде, растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO), который в используемой концентрации (не более 0.01%) не влиял на спонтанную сократительную активность препарата. Анализировали базальный тонус, амплитуду и частоту спонтанных сокращений препарата тощей кишки в контроле и при добавлении исследуемых веществ. Для оценки тонического напряжения использовали значения максимального расслабления между сокращениями. Полуэффективную концентрацию (EC_{50}) рассчитывали по кривой доза—эффект с использованием нелинейной сигмоидальной аппроксимации: $y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$, где A_2 — минимальный эффект, A_1 — максимальный эффект, x_0 — EC_{50} и p — наклон кривой [47].

Исходные параметры сократительной активности в контроле принимали за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего, n указывает на количество препаратов, при этом в каждой серии использовалось не менее трех животных. Достоверность различий определяли с помощью парного t -критерия Стьюдента и дисперсионного анализа (ANOVA) с применением теста Бонферрони. Значения $p < 0.05$ считались статистически значимыми. Статистический анализ был выполнен с помощью OriginPro 2015 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контроле тоническое напряжение препарата тощей кишки составило 1.29 ± 0.09 г ($n = 19$), амплитуда — 0.90 ± 0.08 г ($n = 19$) и частота спонтанных сокращений — 29.3 ± 0.61 сокращений в минуту (мин^{-1}) ($n = 19$). Для выявления роли H_2S в регуляции спонтанной двигательной активности тощей кишки крысы добавляли NaHS последовательно в концентрациях от 10 до 500 мкМ. Добавление донора H_2S в концентрациях 10 и 50 мкМ не приводило к изменению параметров спонтанных сокращений в концентрациях от 100 до 500 мкМ и достоверно снижало тоническое напряжение препарата, амплитуду и частоту спон-

танных сокращений (рис. 1). При этом полуэффективная концентрация (EC_{50}) ингибирующего эффекта NaHS на амплитуду составила 165 мкМ. В дальнейших экспериментах использовали NaHS в концентрации 200 мкМ, которая к 10-й мин приводила к снижению тонического напряжения до 76% ($с 1.2 \pm 0.09$ до 0.99 ± 0.05 г, $n = 19$, $p < 0.05$), амплитуды до 43% ($с 0.9 \pm 0.08$ до 0.4 ± 0.06 г, $n = 19$, $p < 0.05$), частоты до 80% ($с 29.3 \pm 0.6$ до 23.4 ± 1.1 мин^{-1} , $n = 19$; $p < 0.05$) относительно контроля (рис. 1, 2а).

Известно, что K^+ -каналы играют ключевую роль в поддержании тонуса и контроле сокращения гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта, влияют на потенциал покоя, медленные волны деполяризации, продолжительность потенциала действия и динамику внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [48]. Поэтому мы изучали участие K_V -, K_{Ca} - и K_{ATP} -, и K_{ir} -каналов при действии NaHS на сократительную активность тощей кишки крысы.

Блокатор K_V -каналов 4-АП в концентрации 200 мкМ приводил к повышению амплитуды с 0.42 ± 0.07 до 0.51 ± 0.08 г, что составило 126% ($n = 9$, $p < 0.05$) относительно контроля, при этом частота сокращений и тоническое напряжение не изменялись (табл. 1). На фоне 4-АП угнетающее действие NaHS на амплитуду и на частоту сохранялось (43%, $n = 9$, $p < 0.05$ и 80%, $n = 9$, $p < 0.05$, соответственно), а на тоническое напряжение эффект был выражен в меньшей степени (89%, $n = 9$, $p > 0.05$) (рис. 3).

Неспецифический блокатор БК-каналов ТЭА в концентрации 3 мМ вызывал повышение амплитуды с 0.57 ± 0.03 до 0.69 ± 0.07 г, что составило 120% от начальных значений ($n = 4$, $p < 0.05$), при этом тонус препарата и частота спонтанных сокращений не изменялись ($n = 4$, $p > 0.05$). В условиях блокирования K^+ -каналов ТЭА (3 мМ) угнетающие эффекты NaHS на тоническое напряжение, амплитуду и частоту сокращений полностью сохранялись ($n = 5$, $p < 0.05$). Специфический блокатор БК-каналов паксиллин в концентрации 1 мкМ приводил к повышению амплитуды с 0.78 ± 0.04 до 0.96 ± 0.07 г, что составило 123% от контроля ($n = 8$, $p < 0.05$), при этом не оказывал влияния на тоническое напряжение и частоту сокращений ($n = 8$, $p > 0.05$). Последующее добавление NaHS на фоне паксиллина приводило к такому же снижению тонического напряжения препарата, амплитуды и частоты спонтанных сокращений ($n = 8$, $p < 0.05$), как и в контроле. Для выявления роли СК-каналов использовали ингибитор NS 8593 в концентрации 4 мкМ, добавление которого не приводило к достоверному изменению тонического напряжения, амплитуды и частоты спонтанных сокращений ($n = 7$, $p > 0.05$). На фоне действия NS 8593

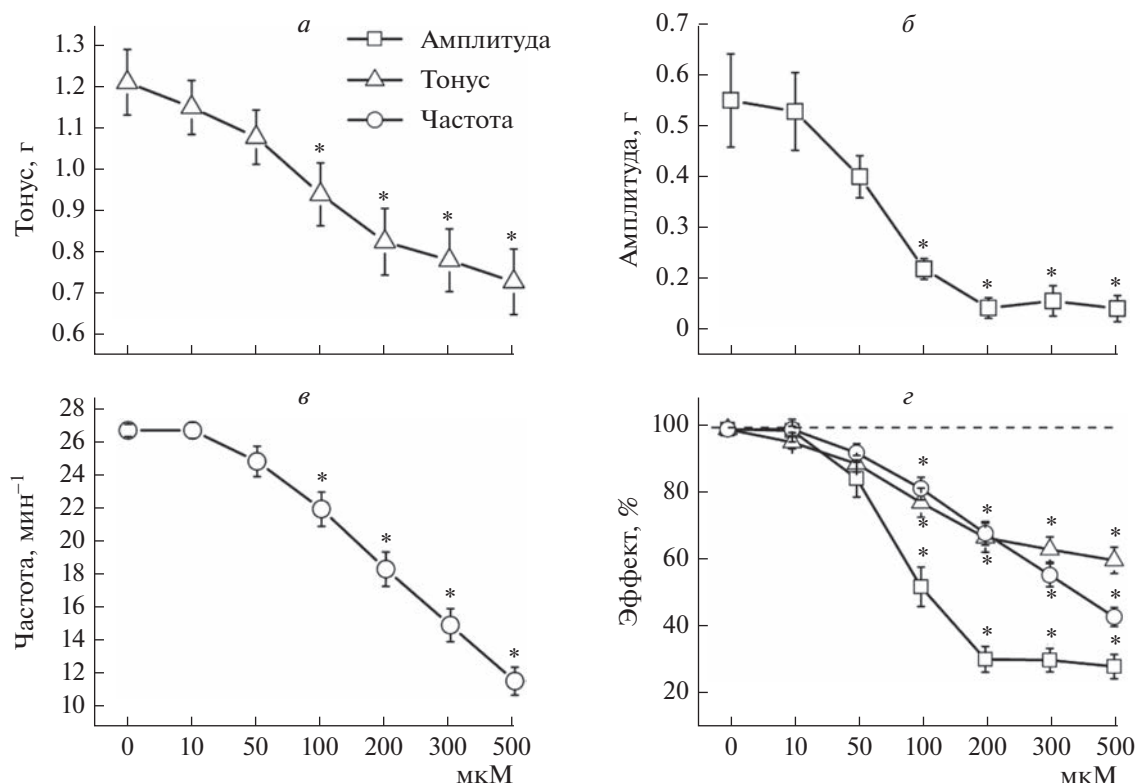


Рис. 1. Влияние NaHS на спонтанную сократительную активность тощей кишки крысы. Влияние кумулятивного добавления NaHS на тоническое напряжение, г (а), амплитуду, г (б), и частоту, мин⁻¹ (в) спонтанной сократительной активности тощей кишки крысы в концентрациях 10, 50, 100, 200, 300 и 500 мкМ. Изменение тонического напряжения препарата (треугольник), амплитуды (квадрат) и частоты спонтанных сокращений (кружок) при кумулятивной аппликации NaHS в концентрациях 10, 50, 100, 200, 300 и 500 мкМ (г). Контрольные значения были приняты за 100%. * $p < 0.05$ по отношению к исходным значениям.

эффекты NaHS на тоническое напряжение, амплитуду и частоту-сокращений сохранялись ($n = 7$, $p < 0.05$) (табл. 1).

Для выявления вклада K_{ATP} -каналов при действии NaHS использовали блокатор K_{ATP} -каналов глибенкламид в концентрации 50 мкМ, который приводил к снижению амплитуды спонтанных сокращений с 0.41 ± 0.02 до 0.27 ± 0.01 г, что составило 68% ($n = 24$, $p < 0.05$), частота и тоническое напряжение при этом не менялись ($n = 24$, $p > 0.05$) (табл. 1). На фоне действия глибенкламида эффект NaHS на амплитуду (46%, $n = 12$, $p < 0.05$) и на частоту спонтанных сокращений (85%, $n = 12$, $p < 0.05$) сохранялся, а на тоническое напряжение не проявлялся (94%, $n = 12$, $p > 0.05$) (рис. 3). Активатор K_{ATP} -каналов диазоксид в концентрации 100 мкМ приводил к снижению амплитуды с 0.50 ± 0.05 до 0.28 ± 0.03 г, что составило 59% ($n = 22$, $p < 0.05$), частоты сокращений с 32.85 ± 0.67 до 27.33 ± 1.12 мин⁻¹, что составило 83% ($n = 27$, $p < 0.05$) и тонического напряжения от 1.30 ± 0.06 до 1.21 ± 0.06 г, что составило 92% ($n = 28$, $p < 0.05$) (табл. 1). На фоне действия диазооксида эффект NaHS на амплитуду (46%, $n = 9$,

$p < 0.05$) и частоту спонтанных сокращений (81%, $n = 4$, $p < 0.05$) сохранялся, а ингибирующее влияние NaHS на тоническое напряжение не проявлялось (93%, $n = 16$, $p > 0.05$) (рис. 2б, 3).

Добавление блокатора K_{ir} -каналов $BaCl_2$ [49, 50] в концентрации 30 мкМ приводило к повышению амплитуды с 0.62 ± 0.05 до 0.71 ± 0.06 г, что составило 113% ($n = 19$, $p < 0.05$), а частота и тоническое напряжение при этом достоверно не менялись ($n = 19$, $p > 0.05$) (табл. 1). На фоне $BaCl_2$ действие NaHS на тоническое напряжение было выражено в меньшей степени, что составило 89% ($n = 13$, $p < 0.05$), влияние на амплитуду и частоту спонтанных сокращений не выявлено ($n = 13$, $p > 0.05$) (рис. 2в, 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

H_2S — газомедиатор, эндогенно продуцирующийся в желудочно-кишечном тракте специализированными ферментами, а также сульфатредуцирующими бактериями и оказывающий регуляторное влияние на моторику, висцеральную чувствительность, процессы секреции и абсорб-

Таблица 1. Параметры спонтанных сокращений тощей кишки крысы при действии NaHS: роль K^+ -каналов различных типов

	Контроль	Глибенкламид	Глибенкламид + NaHS
Амплитуда, г	0.37 ± 0.02	0.25 ± 0.03*	0.11 ± 0.02*
Тонус, г	0.91 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.80 ± 0.04 [#]
Частота, мин ⁻¹	34.90 ± 0.43	33.25 ± 0.35	29.58 ± 0.46*
	Контроль	Диазоксид	Диазоксид + NaHS
Амплитуда, г	0.57 ± 0.05	0.31 ± 0.07*	0.15 ± 0.05*
Тонус, г	1.22 ± 0.07	1.14 ± 0.07*	1.07 ± 0.06 [#]
Частота, мин ⁻¹	32.06 ± 1.12	27.50 ± 0.86*	22.25 ± 2.01*
	Контроль	4-АП	4-АП + NaHS
Амплитуда, г	0.42 ± 0.07	0.51 ± 0.08*	0.20 ± 0.04*
Тонус, г	0.58 ± 0.07	0.56 ± 0.07	0.49 ± 0.06 [#]
Частота, мин ⁻¹	21.00 ± 2.06	21.22 ± 1.94	17.00 ± 1.62*
	Контроль	BaCl₂	BaCl₂ + NaHS
Амплитуда, г	0.60 ± 0.07	0.71 ± 0.06*	0.54 ± 0.06 [#]
Тонус, г	1.23 ± 0.02	1.19 ± 0.03	1.06 ± 0.03 [#]
Частота, мин ⁻¹	28.75 ± 0.49	28.75 ± 0.52	28.00 ± 0.40 [#]
	Контроль	ТЭА	ТЭА + NaHS
Амплитуда, г	0.57 ± 0.03	0.69 ± 0.07*	0.23 ± 0.07*
Тонус, г	0.39 ± 0.08	0.39 ± 0.07	0.28 ± 0.09*
Частота, мин ⁻¹	29.0 ± 0.7	28.25 ± 0.90	22.33 ± 0.33*
	Контроль	Паксиллин	Паксиллин + NaHS
Амплитуда, г	0.78 ± 0.04	0.96 ± 0.07*	0.22 ± 0.01*
Тонус, г	0.89 ± 0.09	0.88 ± 0.05	0.77 ± 0.01*
Частота, мин ⁻¹	27.75 ± 0.64	27.75 ± 0.45	22.50 ± 2.39*
	Контроль	NS 8593	NS 8593 + NaHS
Амплитуда, г	0.55 ± 0.05	0.55 ± 0.04	0.22 ± 0.01*
Тонус, г	0.57 ± 0.08	0.55 ± 0.07	0.43 ± 0.07*
Частота, мин ⁻¹	26.28 ± 0.68	26.42 ± 0.42	21.14 ± 1.84*

* $p < 0.05$ — по отношению к исходным значениям[#] $p < 0.05$ — по отношению к эффекту NaHS в контроле.

ции [4, 11]. Роль H_2S в регуляции моторики желудочно-кишечного тракта может различаться в зависимости от физиологических особенностей исследуемого отдела. Показаны как активирующие, так и угнетающие эффекты H_2S на сократительную активность гладкомышечных клеток [15–17, 21, 23, 24, 26]. В нашем исследовании донор H_2S вызывал дозозависимое расслабление препарата тощей кишки крысы, снижая спонтанную активность. В ходе эксперимента была выявлена полуживотная концентрация (EC_{50}) NaHS, которая при действии на амплитуду спонтанных сокращений составила 165 мкМ, принимая во внимание

изменение температуры, pH и испарение H_2S , соответствует концентрации H_2S 11 мкМ [37].

Спонтанная сократительная активность гладкомышечных клеток желудочно-кишечного тракта определяется медленными волнами деполяризации, зарождающимися в ИКК и распространяющимися в гладкомышечные клетки через электрические контакты [30–32]. Деполяризация мембраны гладкомышечных клеток вызывает активацию Ca^{2+} -каналов L-типа и входящий Ca^{2+} -ток. Ионы Ca^{2+} связываются с кальмодулином и активируют киназу легких цепей миозина, которая в свою очередь фосфорилирует легкие цепи миозина и запускает процесс сокращения.

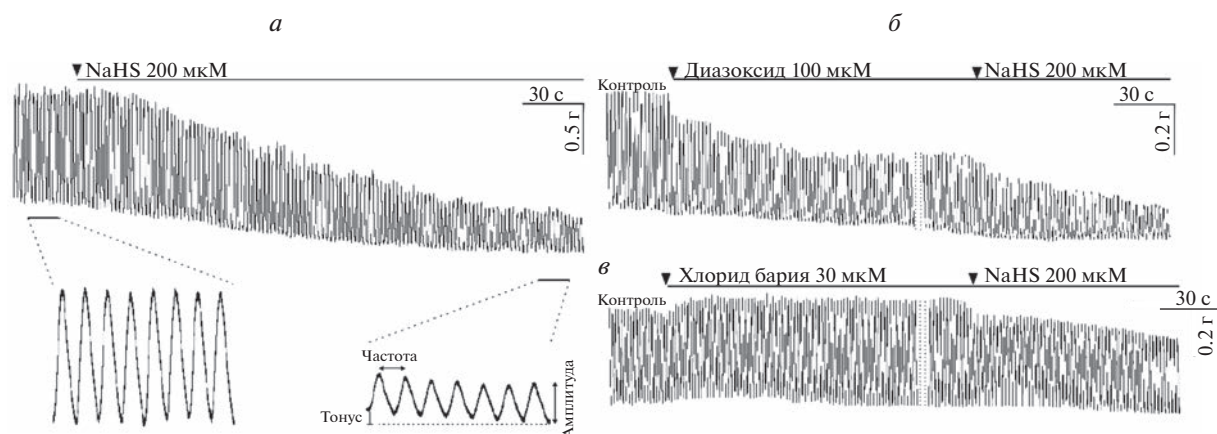


Рис. 2. Механограммы спонтанной сократительной активности тощей кишки крысы. *а* — Изменение спонтанных сокращений в условиях аппликации NaHS (200 мкМ). На вкладке показаны сокращения на расширенной временной шкале в контроле и к 6 мин аппликации NaHS. На графике обозначены измеряемые параметры: тоническое напряжение препарата, амплитуда и время между пиками, с использованием которого определяли частоту спонтанных сокращений. *б* — Изменение спонтанной сократительной активности при добавлении диазоксид (100 мкМ) и NaHS (200 мкМ) на фоне действия диазоксид. *в* — Изменение спонтанной сократительной активности при добавлении хлорида бария (30 мкМ) и NaHS (200 мкМ) на фоне действия хлорида бария. Горизонтальная линия указывает на продолжительность действия вещества.

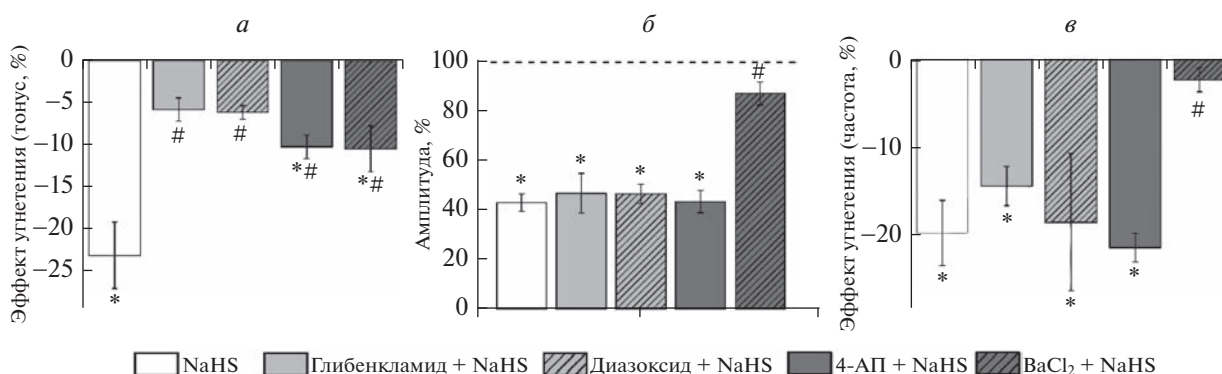


Рис. 3. Изменение тонического напряжения препарата, амплитуды и частоты спонтанных сокращений при действии NaHS (200 мкМ) в контроле и в условиях предварительной аппликации глибенкламида (50 мкМ), диазоксид (100 мкМ), 4-АП (200 мкМ) и BaCl₂ (30 мкМ). По оси ординат — эффект угнетения тонического напряжения (*а*), изменение амплитуды (*б*) и частоты (*в*). Данные представлены в процентах относительно напряжения, амплитуды и частоты в контроле. * $p < 0.05$ по отношению к исходным значениям; # $p < 0.05$ относительно эффекта NaHS.

Поэтому модуляция мембранного потенциала будет влиять на вход Ca^{2+} и его цитозольный уровень. Второй источник Ca^{2+} в цитозоле — освобождение из саркоплазматического ретикулума через инозитолтрифосфатные или рианодиновые рецепторы [30, 31]. K^+ -каналы играют существенную роль в поддержании мембранного потенциала покоя и в регуляции входящего Ca^{2+} -тока, поэтому модуляция их активности будет влиять на сократительную активность гладкомышечных клеток [34, 51, 52].

Калиевые каналы являются мишенью действия H_2S во многих тканях [35–37, 39, 40], в том

числе в гладкомышечных клетках сосудов [42], поэтому мы исследовали K_V -, BK -, SK - и K_{ir} -каналы в качестве мишеней действия H_2S .

K_V -каналы играют важную роль в регуляции возбудимости SIP-синцития, оказывая вклад в установление мембранного потенциала покоя, модулируя инициацию потенциала действия, опосредуя фазу реполяризации. K_V -каналы могут активироваться в широких пределах мембранных потенциалов между -70 мВ и $+40$ мВ. K_V -каналы, экспрессирующиеся в SIP-синцитии включают: каналы задержанного выпрямления ($\text{K}_{V1.1}$, $\text{K}_{V1.2}$, $\text{K}_{V1.5}$, $\text{K}_{V1.6}$, $\text{K}_{V2.2}$), быстрые каналы А-типа

(K_v4), медленные каналы задержанного выпрямления типа 7 (K_v7 или KCNQ) [52]. $K_v1.1$ были выявлены в ИКК и нейронах и были нечувствительны к 4-АП [53]. Каналы А-типа, образованные гомо- или гетеромерами α -субъединиц ($K_v4.1$, $K_v4.2$, и/или $K_v4.3$), составляют большинство каналов А-типа в гладкомышечных клетках кишечника [54]. В желудочно-кишечном тракте токи А-типа очень чувствительны к 4-АП и устойчивы к ТЭА. K^+ -токи задержанного выпрямления в SIP-синцитии проводятся через каналы $K_v1.2$, $K_v1.5$ и $K_v2.2$ [51, 55] и блокируются 4-АП [56, 57].

В нашей работе 4-АП приводил к повышению амплитуды спонтанных сокращений, что, по-видимому, связано с увеличением длительности потенциала действия и усилением входа Ca^{2+} , запускающих процесс сокращения [51]. В этих условиях угнетающий эффект H_2S на параметры спонтанных сокращений сохранялся, а на тоническое напряжение был выражен в меньшей степени. В предыдущих исследованиях было показано участие K_v -каналов в активирующих эффектах H_2S , проявляющихся на препаратах желудка, где низкие концентрации NaHS увеличивали тоническое напряжение и амплитуду сокращений [20, 25, 27], но не влияли на релаксацию, индуцированную NaHS [24]. Поэтому можно предположить, что в препарате тощей кишки NaHS не оказывает прямого влияния на 4-АП-чувствительные K_v -каналы. Уменьшение действия NaHS на базальный тонус, по-видимому, связано с накоплением внутриклеточного Ca^{2+} в гладкомышечной клетке в результате значительного Ca^{2+} -входа в условиях ингибирования K_v -каналов, что препятствуют расслабляющему действию NaHS.

БК-каналы ($K_{Ca1.1}$) экспрессируются в гладкомышечных клетках во всех сегментах и мышечных слоях желудочно-кишечного тракта [51] и ИКК [58]. Известно, что NaHS может напрямую активировать БК-каналы [36, 37], однако его действие зависит от субъединичного состава и наличия вспомогательных β -субъединиц [59]. Неселективный антагонист БК-каналов ТЭА (3 мМ) и селективный ингибитор БК-каналов паксиллин (1 мкМ) приводили к повышению амплитуды спонтанных сокращений, что, по-видимому, связано с ролью БК-каналов в ограничении входящего Ca^{2+} -тока [51, 60]. В этих условиях ингибирующий эффект H_2S на тонус препарата, амплитуду и частоту сокращений полностью сохранялся. СК-каналы ($K_{Ca3.1}$) играют роль в основном в энтеральных нейронах [61], где они опосредуют медленную следовую гиперполяризацию [62], но также обнаружены и в гладкомышечных клетках [63]. Блокатор СК-каналов не оказывал существенного влияния на параметры сократительной активности, а действие NaHS не зависело от ин-

гибирования СК-каналов. Таким образом, в отличие от гладкомышечных клеток толстой кишки крысы [64], в нашем препарате ингибирующие эффекты H_2S не зависели от БК- и СК-каналов.

K^+ -каналы входящего выпрямления (K_{ir}) включают три основных типа: классические K^+ -каналы ($K_{ir2.1-2.4}$), K^+ -каналы, управляемые G-белком (GIRK $K_{ir3.1-3.4}$), и АТР-зависимые K^+ -каналы (K_{ATP} $K_{ir6.1-6.2}$). Классические K_{ir} конститутивно активны, GIRK-каналы активируются G $\beta\gamma$ -субъединицами, высвобождаемыми из гетеротримерного белка G, открытие K_{ATP} -каналов определяется соотношением уровней АТР/АДР, позволяющее каналам напрямую связывать метаболическое состояние клетки с ее электрической активностью [65].

Наиболее важные K_{ir} -каналы, вовлеченные в регуляцию мембранного потенциала, экспрессирующиеся в SIP-синцитии — $K_{ir2.1}$, K_{ir3} , и K_{ir6} . $K_{ir2.1}$, K_{ir3} характерны для ИКК и чувствительны к Ba^{2+} , а K_{ir6} — для гладкомышечных клеток [31, 65]. K_{ATP} -каналы гладкомышечных клеток образованы $K_{ir6.1/K_{ir6.2}}$ и SUR2B-субъединицами [66]. Специфические активаторы этих каналов приводят к гиперполяризации мембраны и снижению сократительной активности [30]. Известно, что вазорелаксация, вызванная H_2S , напрямую связана с активацией K_{ATP} -каналов в результате прямой модификации SUR1- или $K_{ir6.1}$ -субъединиц канала [67]. В нашем исследовании активация или ингибирование K_{ATP} -каналов предотвращали угнетающий эффект H_2S на тоническое напряжение. По-видимому, в гладкомышечных клетках тощей кишки крысы присутствуют функциональные K_{ATP} -каналы, активация которых H_2S вызывает гиперполяризацию и расслабление. Роль данных типов каналов также подтверждают и исследования механизмов действия NaHS в тонкой и толстой кишке, где глибенкламид частично снимал расслабляющие эффекты NaHS [15, 17, 28].

Ba^{2+} -чувствительные K_{ir} -каналы преимущественно экспрессируются в ИКК [31, 65, 68]. $BaCl_2$ в наших экспериментах приводил к повышению амплитуды спонтанных сокращений, без изменения тонического напряжения и частоты спонтанной активности. Подобный эффект наблюдали в исследованиях препарата тонкой кишки кроликов [69]. Кроме того, Ba^{2+} (1–100 мкМ) вызывал деполяризацию гладкомышечных клеток различных отделов желудочно-кишечного тракта [68, 70]. В условиях ингибирования этих каналов значительно снижалось действие NaHS на базальный тонус, а на амплитуду и частоту спонтанной активности не проявлялось.

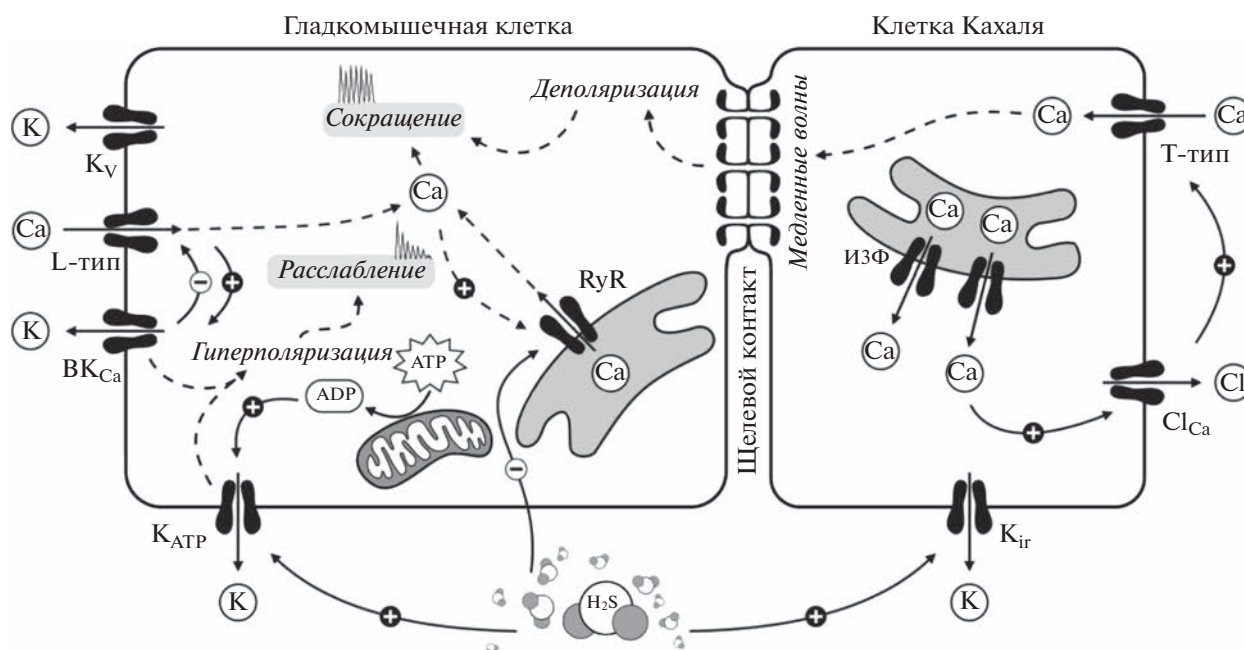


Рис. 4. Мишени действия H_2S в гладкомышечных клетках тощей кишки крысы. На основе полученных нами данных, можно предположить, что мишенями H_2S являются K_{ATP} -каналы, рианодинорные рецепторы, K_{ir} -каналы. Снижение базального тонуса гладкомышечных клеток при действии H_2S связано с активацией K_{ATP} -каналов, преимущественно экспрессирующихся в гладкомышечных клетках, и угнетением рианодинорных рецепторов [71]. Активация K_{ir} -каналов в ИКК вызывает гиперполяризацию, снижая амплитуду и частоту генерации медленных пейсмекерных волн, что отражается на параметрах спонтанной сократительной активности. BK_{Ca} — Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы большой проводимости; K_V — потенциал-зависимые K^+ -каналы; K_{ATP} — АТР-зависимые K^+ -каналы; K_{ir} — K^+ -каналы входящего выпрямления; Cl_{Ca} — Ca^{2+} -активируемые Cl^- -каналы; RyR — рианодинорные рецепторы; $ИЗФ$ — рецепторы инозитолтрифосфата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, донор H_2S дозозависимо снижает тонус препарата тощей кишки крысы, угнетает амплитуду и частоту спонтанных сокращений. Мишени действия $NaHS$ включают ряд механизмов, которые обобщены на схеме (рис. 4) с учетом полученных нами результатов ранее и в данном исследовании.

Изменение уровня Ca^{2+} в гладкомышечных клетках играет ключевую роль в регуляции базального тонуса препарата и спонтанной сократительной активности. Действительно, ранее нами было показано, что в бескальциевом растворе снижаются параметры спонтанной сократительной активности, однако эффект $NaHS$ на тонус препарата сохранялся. Кроме того, ингибирование рианодинорных рецепторов дантроленом предотвращало снижение базального тонуса при действии $NaHS$ [71]. K_{ATP} -каналы являются мишенью действия H_2S в гладкомышечных клетках, и их активация приводит к гиперполяризации и снижению базального тонуса. И наконец, Ba^{2+} -чувствительные K_{ir} -каналы, преимущественно экспрессирующиеся в ИКК, опосредуют эффекты $NaHS$ как на тонус, так и на амплитуду и частоту спон-

танных сокращений, поскольку их активация непосредственно будет влиять на генерацию медленных волн деполяризации пейсмекерными клетками. Кроме того, не исключено и непосредственное ингибирующее влияние H_2S на Ca^{2+} -каналы L-типа [13]. Снижение уровня Ca^{2+} будет приводить к изменению активности киназы/фосфатазы легких цепей миозина и, как следствие, к снижению эффективности работы сократительных белков [72].

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

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. 2006. Газообразные посредники в нервной системе. *Рос. физиол. журн.* 92 (7), 872–882.

2. Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. 2010. Сероводород: от канализаций Парижа к сигнальной молекуле. *Природа*. **9**, 29–37.
3. Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В., Зефилов А.Л. 2014. Газомедиаторы: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и использованию в клинике. *Бюл. сибир. медицины*. **13** (6), 185–200.
4. Linden D.R. 2014. Hydrogen sulfide signaling in the gastrointestinal tract. *Antioxid. Redox Signal.* **20** (5), 818–830.
5. Hermann A., Sitdikova G.F., Weiger T.M. 2012. *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology*. Heidelberg: Springer. 204 p.
6. Farrugia G., Szurszewski J.H. 2014. Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. **147** (2), 303–313.
7. 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.
8. Cirino G., Szabo C., Papapetropoulos A. 2023. Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs. *Physiol. Rev.* **103** (1), 31–276.
9. Singh P., Lembo A. 2021. Emerging role of the gut microbiome in irritable bowel syndrome. *Gastroent. Clin. North Am.* **50** (3), 523–545.
10. Belizário J.E., Faintuch J., Garay-Malpartida M. 2018. Gut microbiome dysbiosis and immunometabolism: New frontiers for treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm.* **2018**, 2037838.
11. Jimenez M., Gil V., Martinez-Cutillas M., Mañé N., Gallego D. 2017. Hydrogen sulphide as a signalling molecule regulating physiopathological processes in gastrointestinal motility. *Br. J. Pharmacol.* **174** (17), 2805–2817.
12. Martin G.R., Mcknight G.W., Dickey M.S., Coffin C.S., Ferraz J.G.P., Wallace J.L. 2010. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Dig. Liver. Dis.* **42** (2), 103–109.
13. Quan X., Luo H., Liu Y., Xia H., Chen W., Tang Q. 2015. Hydrogen sulfide regulates the colonic motility by inhibiting both L-type calcium channels and BK_{Ca} channels in smooth muscle cells of rat colon. *PLoS One*. **10** (3), e0121331.
14. Hosoki R., Matsuki N., Kimura H. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237** (3), 527–531.
15. Gallego D., Clave P., Donovan J., Rahmati R., Grundy D., Jiménez M., Beyak M.J. 2008. The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterol. Motil.* **20** (12), 1306–1316.
16. Teague B., Asiedu S., Moore P.K. 2002. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: Evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br. J. Pharmacol.* **137** (2), 139–145.
17. Nagao M., Duenes J.A., Sarr M.G. 2012. Role of hydrogen sulfide as a gasotransmitter in modulating contractile activity of circular muscle of rat jejunum. *J. Gastrointest. Surg.* **16** (2), 334–343.
18. Gil V., Gallego D., Jiménez M. 2011. Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility. *Br. J. Pharmacol.* **164** (2 B), 485–498.
19. Liu D.H., Huang X., Meng X.M., Zhang C.M., Lu H.L., Kim Y.C., Xu W.X. 2014. Exogenous H₂S enhances mice gastric smooth muscle tension through S-sulfhydration of K_v4.3, mediating the inhibition of the voltage-dependent potassium current. *Neurogastroenter. Motil.* **26** (12), 1705–1716.
20. Zhao P., Huang X., Wang Z. 2009. Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.* **616** (1–3), 223–228.
21. Shafigullin M.Y., Zefirov R.A., Sabirullina G.I., Zefirov A.L., Sitdikova G.F. 2014. Effects of a hydrogen sulfide donor on spontaneous contractile activity of rat stomach and jejunum. *Bull. Exp. Biol. Med.* **157** (3), 302–306.
22. Dunn W.R., Alexander S.P.H., Ralevic V., Roberts R.E. 2016. Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle. *Pharmacol. Ther.* **158**, 101–113.
23. Kasperek M.S., Linden D.R., Farrugia G., Sarr M.G. 2012. Hydrogen sulfide modulates contractile function in rat jejunum. *J. Surg. Res.* **175** (2), 234–242.
24. Dhaese I., Van Colen I., Lefebvre R.A. 2010. Mechanisms of action of hydrogen sulfide in relaxation of mouse distal colonic smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **628** (1–3), 179–186.
25. Shaidullov I.F., Shafigullin M.U., Gabitova D.M. 2018. Role of potassium channels in the effects of hydrogen sulfide on contractility of gastric smooth muscle cells in rats. *J. Evol. Biochem. Phys.* **54**, 400–407.
26. Gabitova D.M., Shaidullov I.F., Sabirullina G.I., Shafigullin M.U., Sitdikov F.G., Sitdikova G.F. 2017. Role of cyclic nucleotides in the effect of hydrogen sulfide on contractions of rat jejunum. *Bull. Exp. Biol. Med.* **163**, 14–17.
27. Han Y.F., Huang X., Guo X., Wu Y.S., Liu D.H., Lu H.L., Kim Y.C., Xu W.X. 2011. Evidence that endogenous hydrogen sulfide exerts an excitatory effect on gastric motility in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **673** (1–3), 85–95.
28. Huang X., Meng X.M., Liu D.H., Wu Y.S., Guo X., Lu H.L., Zhuang X.Y., Kim Y.C., Xu W.X. 2013. Different regulatory effects of hydrogen sulfide and nitric oxide on gastric motility in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **720** (1–3), 276–285.
29. Lu W., Li J., Gong L., Xu X., Han T., Ye Y., Che T., Luo Y., Li J., Zhan R., Yao W., Liu K., Cui S., Liu C. 2014. H₂S modulates duodenal motility in male rats via activating TRPV1 and K_{ATP} channels. *Br. J. Pharmacol.* **171** (6), 1534–1550.
30. Sanders K.M., Ward S.M., Koh S.D. 2014. Interstitial cells: Regulators of smooth muscle function. *Physiol. Rev.* **94** (3), 859–907.
31. Sanders K.M., Ward S.M. 2019. Nitric oxide and its role as a non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal tract. *Br. J. Pharmacol.* **176** (2), 212–227.

32. Farrugia G. 1999. Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 45–84.
33. Thornbury K.D., Ward S.M., Sanders K.M. 1992. Participation of fast-activating, voltage-dependent K currents in electrical slow waves of colonic circular muscle. *Am. J. Physiol. — Cell Physiol.* **263** (1), 226–236.
34. Currò D. 2016. The modulation of potassium channels in the smooth muscle as a therapeutic strategy for disorders of the gastrointestinal tract. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **104**, 263–305.
35. Martelli A., Testai L., Breschi M.C., Lawson K., McKay N.G., Miceli F., Taglialatela M., Calderone V. 2013. Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of K_v7 potassium channels. *Pharmacol. Res.* **70** (1), 27–34.
36. Sitdikova G.F., Weiger T.M., Hermann A. 2010. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflugers. Arch.* **459** (3), 389–397.
37. Sitdikova G.F., Fuchs R., Kainz V., Weiger T.M., Hermann A. 2014. Phosphorylation of BK channels modulates the sensitivity to hydrogen sulfide (H_2S). *Front. Physiol.* **5**, 431.
38. Jackson-Weaver O., Osmond J.M., Riddle M.A., Naik J.S., Gonzalez Bosc L.V., Walker B.R., Kanagy N.L. 2013. Hydrogen sulfide dilates rat mesenteric arteries by activating endothelial large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels and smooth muscle Ca^{2+} sparks. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **304** (11), H1446–Y1454.
39. Medina-Terol G.J., Huerta de la Cruz S., Beltran-Ornelas J.H., Sánchez-López A., Centurión D. 2022. Pharmacological evidence that potassium channels mediate hydrogen sulfide-induced inhibition of the vasopressor sympathetic outflow in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* **931**, 175160.
40. Takir S., Ortaköylü G.Z., Toprak A., Uydeş-Doğan B.S. 2015. NaHS induces relaxation response in prostaglandin $F_{2\alpha}$ precontracted bovine retinal arteries partially via K_v and K_{ir} channels. *Exp. Eye. Res.* **132**, 190–197.
41. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. 2001. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J.* **20** (21), 6008–6016.
42. Lowicka E., Beltowski J. 2007. Hydrogen sulfide (H_2S) — the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol. Rep.* **59** (1), 4–24.
43. 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** (5).
44. Kasparek M.S., Fatima J., Iqbal C.W., Duenes J.A., Sarr M.G. 2007. Role of VIP and substance P in NANC innervation in the longitudinal smooth muscle of the rat jejunum — influence of extrinsic denervation. *J. Surg. Res.* **141** (1), 22–30.
45. Olson K.R. 2009. Is hydrogen sulfide a circulating “gasotransmitter” in vertebrate blood? *Biochim. Biophys. Acta. — Bioenerg.* **1787** (7), 856–863.
46. Han Y., Shang Q., Yao J., Ji Y. 2019. Hydrogen sulfide: A gaseous signaling molecule modulates tissue homeostasis: Implications in ophthalmic diseases. *Cell Death Dis.* **10** (4), 1–12.
47. Hall D.A., Langmead C.J. 2010. Matching models to data: A receptor pharmacologist’s guide. *Br. J. Pharmacol.* **161** (6), 1276–1290.
48. Horowitz B., Ward S.M., Sanders K.M. 1999. Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 19–43.
49. Schram G., Melnyk P., Pourrier M., Wang Z., Nattel S. 2002. $K_{ir2.4}$ and $K_{ir2.1}$ K^+ channel subunits co-assemble: A potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J. Physiol.* **544** (2), 337–349.
50. Hibino H., Inanobe A., Furutani K., MuraKami S., Findlay I., Kurachi Y. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: Their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* **90** (1), 291–366.
51. Vogalis F. 2000. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. *J. Auton. Pharmacol.* **20** (4), 207–219.
52. Currò D. 2014. K^+ channels as potential targets for the treatment of gastrointestinal motor disorders. *Eur. J. Pharmacol.* **733** (1), 97–101.
53. Hatton W.J., Mason H.S., Carl A., Doherty P., Lattem M.J., Kenyon J.L., Sanders K.M., Horowitz B. 2001. Functional and molecular expression of a voltage-dependent K^+ channel ($K_v1.1$) in interstitial cells of Cajal. *J. Physiol.* **533** (2), 315–327.
54. Amberg G.C., Koh S.D., Imaizumi Y., Ohya S., Sanders K.M. 2003. A-type potassium currents in smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284** (3), C583–C595.
55. Beyder A., Farrugia G. 2012. Targeting ion channels for the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **5** (1), 5–21.
56. Grissmer S., Nguyen A.N., Aiyar J., Hanson D.C., Mather R.J., Gutman G.A., Karmilowicz M.J., Auperin D.D., Chandy K.G. 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K^+ -channels, types $K_v1.1$, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* **45** (6), 1227–1234.
57. Schmalz F., Kinsella J., Koh S.D., Vogalis F., Schneider A., Flynn E.R., Kenyon J.L., Horowitz B. 1998. Molecular identification of a component of delayed rectifier current in gastrointestinal smooth muscles. *Am. J. Physiol.* **274** (5).
58. Zhu Y., Huizinga J.D. 2008. Nitric oxide decreases the excitability of interstitial cells of Cajal through activation of the BK channel. *J. Cell. Mol. Med.* **12** (5A), 1718–1727.
59. Hermann A., Sitdikova G.F., Weiger T.M. 2015. Oxidative stress and maxi calcium-activated potassium (BK) channels. *Biomolecules.* **5** (3), 1870.
60. Hong S.J., Roan Y.F., Chang C.C. 1997. Spontaneous activity of guinea pig ileum longitudinal muscle regulated by Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Am. J. Physiol.* **272** (5 Pt 1).
61. Chen M.X., Gorman S.A., Benson B., Singh K., Hieble J.P., Michel M.C., Tate S.N., Trezise D.J. 2004. Small and intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in

- the colon and corpus cavernosum. *Naunyn Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* **369** (6), 602–615.
62. Neylon C.B., Nurgali K., Hunne B., Robbins H.L., Moore S., Chen M.X., Furness J.B. 2004. Intermediate-conductance calcium-activated potassium channels in enteric neurones of the mouse: Pharmacological, molecular and immunochemical evidence for their role in mediating the slow afterhyperpolarization. *J. Neurochem.* **90** (6), 1414–1422.
 63. Koh S.D., Sanders K.M., Carl A. 1996. Regulation of smooth muscle delayed rectifier K^+ channels by protein kinase A. *Pflügers. Arch.* **432** (3), 401–412.
 64. Quan X., Chen W., Qin B., Wang J., Luo H., Dai F. 2022. The excitatory effect of hydrogen sulfide on rat colonic muscle contraction and the underlying mechanism. *J. Pharmacol. Sci.* **149** (3), 100–107.
 65. Huang X., Lee S.H., Lu H., Sanders K.M., Koh S.D. 2018. Molecular and functional characterization of inwardly rectifying K^+ currents in murine proximal colon. *J. Physiol.* **596** (3), 379–391.
 66. Na J.S., Hong C., Kim M.W., Park C.G., Kang H.G., Wu M.J., Jiao H.Y., Choi S., Jun J.Y. 2017. ATP-sensitive K^+ channels maintain resting membrane potential in interstitial cells of Cajal from the mouse colon. *Eur. J. Pharmacol.* **809**, 98–104.
 67. Jiang B., Tang G., Cao K., Wu L., Wang R. 2010. Molecular mechanism for H_2S -induced activation of K_{ATP} channels. *Antioxid. Redox Signal.* **12** (10), 1167–1178.
 68. Flynn E.R.M., McManus C.A., Bradley K.K., Koh S.D., Hegarty T.M., Horowitz B., Sanders K.N. 1999. Inward rectifier potassium conductance regulates membrane potential of canine colonic smooth muscle. *J. Physiol.* **518** (1), 247–256.
 69. Cheng Xiang G. 2017. Effects of NaOH, HCl and $BaCl_2$ on contraction of smooth muscle in small intestine of rabbit. *Genomics. Appl. Biol.* **36** (12), 4953–4957.
 70. Lee J.Y., Ko E.J., Ahn K.D., Kim S., Rhee P.L. 2015. The role of K^+ conductances in regulating membrane excitability in human gastric corpus smooth muscle. *Am. J. Physiol. – Gastr. Liver. Physiol.* **308** (7), G625–G633.
 71. Сорокина Д.М., Шайдуллов И.Ф., Гиззатуллин А.Р., Ситдилов Ф.Г., Ситдикова Г.Ф. 2023. Роль оксида азота и ионов кальция в эффектах сероводорода на сократительную активность тощей кишки крысы. *Биофизика.* **58** (4).
 72. Tang Q., Quan X., Yan L., Ren H., Chen W., Xia H., Luo H. 2018. Mechanism of sodium hydrosulfide modulation of L-type calcium channels in rat colonic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **818**, 356–363.

Effect of Hydrogen Sulphide on Spontaneous Contractions of the Rat Jejunum. Role of K_V -, K_{Ca} -, and K_{ir} -Channels

D. M. Sorokina¹*, I. F. Shaidullov¹, D. Buchareb¹, F. G. Sitdikov¹, G. F. Sitdikova¹

¹Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia

*e-mail: dinagabita@mail.ru

In this work, we analyzed the role of voltage-gated (K_V), calcium-activated (K_{Ca}), and inward-rectifier potassium channels (K_{ir}) in the effects of hydrogen sulphide (H_2S) donor sodium hydrosulphide (NaHS) on the spontaneous contractile activity of the rat jejunum. Experiments were performed on jejunum segments under isometric contraction conditions. It was shown that NaHS reduced the basal tension of the segments, the amplitude, and the frequency of spontaneous contractions in a dose-dependent manner (10–500 μM); the half-effective concentration (EC_{50}) of the inhibitory effect of NaHS on amplitude was 165 μM . The K_V channel blocker 4-AP (200 μM) increased the amplitude of spontaneous contractions and subsequent application of NaHS (200 μM) suppressed the amplitude and frequency of spontaneous activity as well as in the control; the effect on tonic tension was less pronounced. TEA (3 mM), a non-specific blocker, and paxillin (1 μM), a specific blocker of large conductance K_{Ca} (BK) channels, increased the amplitude of spontaneous contractions, while the inhibitory effect of NaHS was completely preserved. The selective blocker of small conductance K_{Ca} (SK) channels NS8593 (4 μM) did not affect the tension and the parameters of spontaneous contractions and did not prevent the effects of NaHS. Diazoxide (100 μM), the opener of K_{ATP} channels, caused a decrease in the basal tone, the amplitude and frequency of spontaneous contractions. Diazoxide and K_{ATP} channel blocker glibenclamide (50 μM) prevented the effects of NaHS on the basal tone. The K_{ir} -channel blocker $BaCl_2$ (30 μM) increased the amplitude of spontaneous contractions and eliminated the inhibitory effects of NaHS on the frequency and amplitude of spontaneous contractions, and the basal tension decrease was less pronounced compared to control. Thus, a decrease in the tonic tension of a rat jejunum preparation under the action of an H_2S donor is associated with the activation of K_{ir} , including K_{ATP} channels, while the effects of H_2S on the amplitude and frequency of spontaneous contractions are mediated by an increase in Ba^{2+} -sensitive conductance.

Keywords: hydrogen sulphide, potassium channels, contractile activity, rat jejunum

УДК 57.021,612.816

АТР ВЫЗЫВАЕТ СОКРАЩЕНИЕ ДЕНЕРВИРОВАННЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

© 2023 г. А. Е. Хайруллин^{a, b, *}, А. Ю. Теплов^a, С. Н. Гришин^a, А. У. Зиганшин^a

^aКазанский государственный медицинский университет, Казань, 420012 Россия

^bКазанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: khajrulli@ya.ru

Поступила в редакцию 03.03.2023 г.

После доработки 18.04.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Исследована способность гуморальных агонистов (и их стойких аналогов) вызывать сокращения денервированной *m. soleus* и *m. EDL* мышцы. Ранее нами было установлено изменение эффективности модулирующего эффекта АТР под действием некоторых нефизиологических факторов в нервно-мышечных синапсах грызунов. Цель настоящего исследования – оценить эффект АТР на сократимость изолированных скелетных мышц после травматической денервации. Показано, что 28-дневная денервация приводит к увеличению силы сокращений *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных аналогом ацетилхолина. Аппликация АТР вызывает сокращение денервированных мышц, но не интактных. На фоне неселективного антагониста Р2-рецепторов сурамина действие АТР прекращалось. Мы предполагаем, что активация постсинаптических Р2Х-рецепторов денервированных мышц способна вызывать их сокращение. По всей видимости, этот эффект вызван усилением экспрессии постсинаптических рецепторов в ответ на нарушение нейротрофического контроля и проводящей способности нервного волокна.

Ключевые слова: АТР, сокращение, пуриновые рецепторы, Р2-рецепторы, денервация, скелетные мышцы, нервно-мышечный синапс

DOI: 10.31857/S0233475523060063, **EDN:** FMWQRI

ВВЕДЕНИЕ

Проблема денервационных изменений в скелетной мускулатуре привлекает исследователей более столетия, и в последнее время внимание к этой проблеме только возрастает. Скелетная мышца управляется мотонейронами и имеет ярко выраженную специализацию в этом отношении, так что при прекращении связи с ЦНС наблюдается быстрое угасание основных функций мышцы. Однако в последние десятилетия обнаружилась ключевая роль молекул АТР в координации нервно-мышечной передачи.

Роль пуринергических рецепторов в мышечных клетках исследовалась около 30 лет и к настоящему времени достаточно полно выяснена [1–7]. Однако многие аспекты вызванной АТР стимуляции скелетной мускулатуры, особенно при патологических состояниях, все еще нуждаются в уточнении.

Чувствительные к стимуляции внеклеточной АТР специфические пуринергические рецепторы участвуют в дифференцировке мышечных клеток во время эмбриогенеза, постнатального форми-

рования мышц и регенерации [1]. Интенсивность клеточного ответа на внеклеточную АТР зависит как от экспрессии конкретного рецептора на поверхности клетки (которая изменяется во время созревания мышц), так и от наличия соответствующих нуклеотидов в межклеточном пространстве. В состоянии покоя скелетные мышцы имеют довольно низкую скорость метаболизма, при этом концентрация АТР в цитозоле находится в диапазоне 5–10 мкМ [2]. АТР высвобождается во внеклеточное пространство в небольших количествах в ответ на мышечную активность или в больших количествах после повреждения и/или гибели мышечных клеток [3].

Активация всех Р2Х и большинства Р2У-рецепторов приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Однако относительный вклад специфических рецепторов зависит от вида животного, стадии эмбрионального и постнатального развития и стадии дифференцировки мышечных клеток. Значимость пуринергической сигнализации возрастает в ряде патологических

состояний, например при гипотермии или при стрессе [4, 5].

Нуклеотиды и пуринорецепторы играют роль не только в развитии и регенерации мышц, но и в процессах передачи сигналов в нервно-мышечных синапсах. Как известно, АТР высвобождается из окончаний двигательного нерва в нервно-мышечное соединение (НМС) [6]. НМС — это специализированный периферический синапс между двигательным нейроном и волокном скелетной мускулатуры, который позволяет мышечным волокнам возбуждаться пресинаптическими двигательными нервами, что приводит к быстрому сокращению мышц [8]. АТР высвобождается вместе с ацетилхолином (АХ), который является основным нейромедиатором в нервно-мышечном синапсе, а АТР стимулирует как P2-рецепторы, так и рецепторы АХ (AChR), расположенные на постсинаптической мембране [9]. АТР осуществляет свою основную функцию комедиатора (сопутствующего медиатора), регулируя сократимость двигательных единиц [10].

Итак, эффекты АТР на НМС хорошо изучены, однако патофизиологическая роль пуринергического сигнального звена до конца не раскрыта [11]. В настоящей работе мы впервые продемонстрировали, что АТР вызывает сокращение денервированной скелетной мышцы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов денервированных мышц. Эксперименты проводились на изолированных препаратах денервированных мышц *m. soleus* и *m. EDL* белых мышей массой 25–32 г. Животных содержали в специальных боксах на обычном пищевом режиме, со свободным доступом к воде. После очистки операционного поля от шерсти фиксировали оперируемое животное для удобства дальнейших манипуляций. Под наркозом в сочетании с местной новокаиновой анестезией вырезали участок длиной 2–3 мм, дистальную культю седалищного нерва перетягивали лигатурой. Конечным этапом операции являлось ушивание раны, обработка операционного поля 0.1% раствором хлоргексидина и раствором бриллиантового зеленого. После проведения операции животных содержали в течение 28 суток в одиночных клетках с водой и кормом *ad libitum*. После восстановления животных предварительно наркотизировали, вводя внутривенно раствор этанамина натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали, после чего выделяли *m. soleus* и *m. EDL* с обеих задних конечностей.

Регистрация параметров сокращения. Выделенные мышцы фиксировали одним сухожильным

концом к неподвижному штативу, второй конец прикрепляли лигатурой к датчику двигательной активности и погружали в небольшие резервуары объемом 10 мл, наполненные раствором Кребса (мМ): NaCl — 118.0, KCl — 4.75, CaCl₂ — 2.5, NaHCO₃ — 24.8, KH₂PO₄ — 1.18, MgSO₄ · 7H₂O — 1.18, глюкоза — 11, pH 7.4. Во время экспериментов раствор термостатировали при 22 ± 0.5°C. На мышцы изначально подавали нагрузку в 0.5 г, затем оставляли в покое на полчаса для адаптации к среде.

Изометрические сокращения вызывали внесением в ванночку агонистов: АТР и карбахола при остановленной перфузии, с последующей отмывкой и повторной индукцией сокращения через каждые 30 мин. АТР использовали в концентрации 100 мкМ. Контролем считали сокращение мышцы в ответ на карбахол в субмаксимальной концентрации, равной 50 мкМ. Силу сокращений мышц регистрировали с помощью датчика двигательной активности Linton FCG-01 (Великобритания), аналоговый сигнал преобразовывался системой сбора данных Biopack MP100MSW (США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Данные представлены в виде средних значений ± стандартной ошибки среднего значения; n — количество мышечных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что при 20-мин интервалах между аппликациями неселективный холиномиметик карбахол в концентрации 50 мкМ способен в течение всего времени эксперимента (2–4 ч) инициировать стабильные воспроизводимые сокращения *m. soleus* и *m. EDL* мышц.

В экспериментах на intactных мышцах карбахол в концентрации 50 мкМ вызывал сокращение силой 206 ± 11 мг для *m. soleus* и 58 ± 4 мг для *m. EDL* с латентным периодом (ЛП) в доли секунды ($n = 12$). У денервированных мышц *m. soleus* и *m. EDL* сила сокращения, индуцированного 50 мкМ карбахолом, увеличивалась до 255 ± 9 мг и 74 ± 8 мг соответственно ($p < 0.05$, $n = 12$) без изменения параметров ЛП. Вероятнее всего, увеличение силы сокращения связан с сенсibilизацией постсинаптических холинорецепторов, спрово-

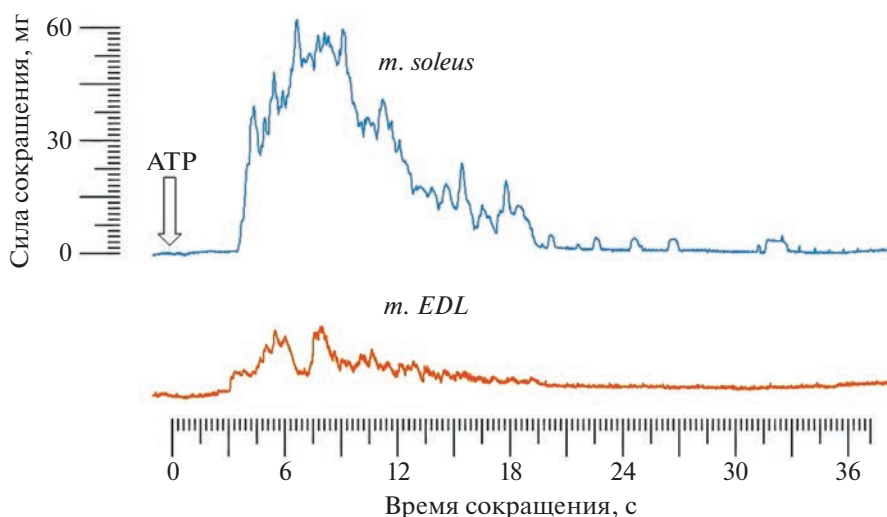


Рис. 1. Репрезентативные кривые сокращения *m. soleus* и *m. EDL* в ответ на аппликацию 100 мкМ АТР.

цированной усилением неквантовой секреции АХ [12]. Это согласуется с нашими данными [13] и объясняет повышение сократимости денервированных мышц. Усиление неквантовой секреции приводит к увеличению количества основного медиатора, АХ в синаптической щели.

Изучение вызванного АТР сокращения денервированных *m. soleus* и *m. EDL* мышцы (рис. 1) показало, что первое добавление АТР вызывало сокращение мышцы силой 64 ± 24 мг и ЛП 3.0 ± 0.5 с ($n = 12$) и 22 ± 11 мг и ЛП 2.7 ± 0.4 с ($n = 12$). Повторное добавление АТР после 20-мин отмытки не вызывало сокращения мышц. При этом аппликация АТР на интактные (неденервированные) мышцы вообще сокращений не вызывала. На данный момент мы не имеем объяснения феномена однократного сократительного ответа денервированной мышцы на внесение АТР. В качестве одной из возможностей можно предложить, что в покое у денервированных мышц концентрация ионов кальция в цитозоле ниже, чем у интактных. При повышенном уровне в покое у интактной мышцы поступление Ca^{2+} в цитозоль из наружной среды через P2X-рецепторы не приводит к сокращению, поскольку система находится на другой регуляторной ветви. В денервированной же мышце первая аппликация АТР запускает сократимость через P2X-рецепторы, но в дальнейшем стимуляция P2Y-рецепторов инициирует долговременное увеличение концентрации ионов кальция, что восстанавливает Ca^{2+} -регуляцию до состояния, близкого к нативному.

На фоне неселективного антагониста P2-рецепторов сурамина прекращалось действие АТР. Мы не обнаружили в доступной нам литературе сведений о способности денервированных мышц

мышцы отвечать на АТР и полагаем, что факт сокращения денервированных *m. soleus* и *m. EDL* мышцы в ответ на АТР нами выявлен впервые.

Как известно, повреждение мотонейронов или их аксонов сопровождается развитием денервационной атрофии скелетной мышцы. В денервированных мышечных волокнах резко снижается количество миофибрилл и митохондрий, происходит значительное увеличение чувствительности мышечных волокон к эффектам ацетилхолина [14]. По всей поверхности мышечного волокна в мембрану встраиваются экstrasинаптические холинорецепторы ($\alpha 2\beta \gamma \delta$), наблюдается возврат к так называемому эмбриональному типу распределения холинорецепторов.

АТР увеличивает время открытого состояния и частоту открытий АХ-активируемых ионных каналов в эмбриональных мышцах [15, 16]. В зрелых мышцах АТР также, по-видимому, может оказывать потенцирующий эффект, хотя здесь увеличение частоты открытий ионных каналов холинорецептора не сопровождается изменением времени их открытого состояния, а продукты гидролиза АТР (ADP, AMP, аденозин) неактивны [17].

Вероятно, АТР способна активировать непосредственно ионный канал холинорецептора. Это было отмечено при анализе действия АТР на зрелые мышцы крысы [18] и на культивируемые мышечные клетки лягушки [19]. Установлено, что никотиновый рецептор имеет сайты связывания АТР [20].

Можно предположить наличие следующих возможных механизмов сокращения денервированных скелетных мышц мышцы в ответ на воздействие АТР. Под влиянием АТР активируются постсинаптические P2-рецепторы, которые экс-

прессироваться на мембране волокон скелетных мышц после их денервации. Возможна активация, предположительно быстрых ионотропных P2X-рецепторов, а не медленных метаболитических P2Y-рецепторов, что определяет скорость латентного периода.

Степень денервационных нарушений мышцы зависит от продолжительности денервации. Возрастание активности протеолитических ферментов ведет к распаду белка в мышечных волокнах, уменьшению объема и массы мышцы [21]. На поздних стадиях денервации происходит разрастание соединительной ткани, возникают застойные явления в сосудах, развивается жировая дегенерация мышечной ткани, утрачивается способность мышцы к регенерации.

Результаты наших исследований позволяют полагать, что при выбранных нами сроках денервации в сократительной способности денервированной скелетной мышцы мышцы наиболее значительную роль играют синаптические факторы. А именно, полученные нами результаты предполагают активацию ионотропных P2X-рецепторов. Они опосредуют передачу сигналов АТР благодаря способности функционировать как лиганд-зависимые катионные каналы, но при определенных условиях могут способствовать образованию большой поры за счет образования комплексов с другими белками и мембранными липидами. Было продемонстрировано, что рецепторы P2X2, P2X4 и P2X7 экспрессируются как в миоцитах, так и в миотрубках, однако мРНК рецепторов P2X2 была обнаружена только в миотрубках [22].

Также было показано, что P2X2-рецепторы экспрессируются вместе с AChR [23], и считается, что АТР стабилизирует нервно-мышечное соединение и может играть ключевую роль в синаптической модификации во время развития НМС [9].

Подтипы P2X-рецепторов различаются по своей чувствительности к агонисту, регуляции и кинетике действия. Однако все они проницаемы для Ca^{2+} , их активация приводит к притоку внеклеточного кальция в клетку и повышению цитозольной концентрации этого иона. Поступление Ca^{2+} из-за активации рецепторов P2X также может привести к деполяризации плазматической мембраны, что, как известно, практически не влияет на электрохимический потенциал для входа Ca^{2+} . Основным эффектом стационарной деполяризации — изменение активационной кривой для потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Затем вход Ca^{2+} через P2X инициирует локальные Ca^{2+} сигналы и может запустить кальций-индуцированное высвобождение кальция [1].

Сообщалось, что рецепторы P2X4 локализируются внутри мембран Т-каналцев в мышцах крыс [6], что может свидетельствовать о важной роли этих рецепторов в сопряжении возбуждения с сокращением. Однако точная роль P2X4 рецепторов в миоцитах до конца не изучена.

Аномальная экспрессия рецепторов P2X не является уникальной для мышечных расстройств. Изменения в экспрессии P2X-рецепторов также были обнаружены при воспалительной и хронической боли, эпилепсии, депрессии и некоторых видах рака, это привело к разработке новых экспериментальных терапевтических подходов с использованием агонистов P2X-рецепторов [24].

P2-сигнализация в НМС может играть сразу несколько важных ролей. Есть основания считать, что P2-рецепторная система эволюционно гораздо более ранняя, нежели другие рецепторные системы [25]. Предполагается, что в НМС позвоночных P2-рецепторная система в онтогенезе стала менее значима, чем более эволюционно-развитая холинергическая система. Однако при возникновении патологических состояний, таких как гипотермия, гипогравитация и стресс, роль P2-рецепторов существенно возрастает [26–28]. Таким образом, можно предполагать, что P2-рецепторная сигнализация — это своеобразный защитный механизм, который организм может активировать при развитии патологического процесса. В частности, при денервации, видимо, происходит перестройка P2-рецепторного аппарата на постсинаптическом участке НМС, которая проявляется в изменении чувствительности P2-рецепторов к действию агонистов и проявлению контрактильной деятельности [29].

P2-рецепторы в настоящее время остаются в центре внимания исследователей из-за их широкой представленности во многих тканях и значительной роли, которую они играют в различных физиологических и патологических процессах. Представленные в этой работе результаты демонстрируют, что при денервации активация P2-рецепторов вызывает сокращение скелетных мышц. Для понимания механизмов этого эффекта необходимы дальнейшие исследования. Можно предполагать, что P2-рецепторы представляют собой потенциальную терапевтическую мишень для стимуляции регенерации скелетных мышц после травм или при лечении мышечных патологий.

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

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или ин-

ституциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 2/22-5 ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России на проведение научных исследований в рамках Программы развития Университета, а также в рамках программы “Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета” (ПРИОРИТЕТ-2030).

Благодарность. Коллектив авторов выражает глубокую признательность С.С. Колесникову за обсуждение материалов данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ralevic V., Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413–492.
- Macintosh B.R., Holash R.J., Renaud J.M. 2012. Skeletal muscle fatigueregulation of excitation-contraction coupling to avoid metabolic catastrophe. *J. Cell. Sci.* **125**, 2105–2114.
- Becq F. 2010. CFTR channels and adenosine triphosphate release: The impossible rendez-vous revisited in skeletal muscle. *J. Physiol.* **588**, 4605–4606.
- Khairullin A.E., Ziganshin A.U., Grishin S.N. 2020. The influence of hypothermia on purinergic synaptic modulation in the rat diaphragm. *Biophysics.* **65** (5), 858–862.
- Ziganshin A.U., Kamaliev R.R., Gabdrakhmanov A.I., Khairullin A.E., Grishin S.N. 2018. Foot-shock stimulation decreases the inhibitory action of ATP on contractility and end-plate current of frog sartorius muscle. *Int. J. Pharmacol.* **14**, 1198–1202.
- Sandonà D., Danieli-Betto D., Germinario E., Biral D., Martinello T., Liroy A., Tarricone E., Gastaldello S., Betto R. 2005. The T-tubule membrane ATP-operated P2X4 receptor influences contractility of skeletal muscle. *FASEB J.* **19**, 1184–1186.
- Романов Р.А., Колесников С.С. 2011. Первичные медиаторы. Методы и подходы для исследования секреции. *Биол. мембраны.* **28** (1), 3–13.
- Sleigh J.N., Burgess R.W., Gillingwater T.H., Cader M.Z. 2014. Morphological analysis of neuromuscular junction development and degeneration in rodent lumbrical muscles. *J. Neurosci. Methods.* **227**, 159–165.
- Burnstock G., Arnett T.R., Orriss I.R. 2013. Purinergic signaling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal.* **9**, 541–572.
- Schweitzer E. 1987. Coordinated release of ATP and ACh from cholinergic synaptosomes and its inhibition by calmodulin antagonists. *J. Neurosci.* **7**, 2948–2956.
- Khairullin A.E., Teplov A.Y., Grishin S.N., Farkhutdinov A.M., Ziganshin A.U. 2019. The thermal sensitivity of purinergic modulation of contractile activity of locomotor and respiratory muscles in mice. *Biophysics.* **64** (5), 812–817.
- Маломуж А.И., Никольский Е.Е. 2010. Неквантовое освобождение медиатора: миф или реальность? *Усп. физиол. наук.* **41** (2), 27–43.
- Galkin A.V., Giniatullin R.A., Mukhtarov M.R., Grishin S.N., Švandová I., Vyskočil F. 2001. ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.* **13** (11), 2047–2053.
- Cisterna B.A., Vargas A.A., Puebla C., Fernández P., Escamilla R., Lagos C.F., Matus M.F., Vilos C., Cea L.A., Barnafi E., Gaete H., Escobar D.F., Cardozo C.P., Sáez J.C. 2020. Active acetylcholine receptors prevent the atrophy of skeletal muscles and favor reinnervation. *Nat. Commun.* **11** (1), 1073.
- Fu W.M. 1994. Potentiation by ATP of the postsynaptic acetylcholine response at developing neuromuscular synapses in *Xenopus* cell cultures. *J. Physiol.* **477**, 449–458.
- Fu W.M. 1995. Regulatory role of ATP at developing neuromuscular junctions. *Prog. Neurobiol.* **47** (1), 31–44.
- Lu Z., Smith D.O. 1991. Adenosine 5'-triphosphate increases acetylcholine channel-opening frequency in rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. **436**, 45–56.
- Mozrzymas J.W., Ruzzier F. 1992. ATP activates junctional and extrajunctional acetylcholine receptor channels in isolated adult rat muscle fibres. *Neurosci. Lett.* **139** (2), 217–220.
- Igusa Y. 1988. Adenosine 5'-triphosphate activates acetylcholine receptor channels in cultured *Xenopus* myotomal muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)*. **405**, 169–185.
- Carlson B.J., Raftery M.A. 1993. Specific binding of ATP to extracellular sites on Torpedo acetylcholine receptor. *Biochem.* **32**, 7329–7333.
- Kostrominova T.Y. 2022. Skeletal muscle denervation: Past, present and future. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (14), 7489.
- Banachewicz W., Supłat D., Krzemiński P., Pomorski P., Barańska J. 2005. P2 nucleotide receptors on C2C12 satellite cells. *Purinergic Signal.* **1** (3), 249–257.
- Ryten M., Hoebertz A., Burnstock G. 2001. Sequential expression of three receptor subtypes for extracellular ATP in developing rat skeletal muscle. *Dev. Dyn.* **221**, 331–341.
- Burnstock G., Kennedy C. 2011. P2X receptors in health and disease. *Adv. Pharmacol.* **61**, 333–372.
- Burnstock G., Verkhratsky A. 2009. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol. (Oxf.)*. **195** (4), 415–447.
- Khairullin A.E., Grishin S.N., Gabdrakhmanov A.I., Ziganshin A.U. 2023. Effects of ATP on time parameters of contractility of rats' slow and fast skeletal muscles in normal and hypothermic conditions. *Muscles.* **2**, 23–35.
- Khairullin A.E., Grishin S.N., Eremeev A.A. 2019. Synaptic aspects of hypogravity motor syndrome. *Biophysics.* **64** (5), 828–835.
- Grishin S.N., Gabdrakhmanov A.I., Khairullin A.E., Ziganshin A.U. 2017. The Influence of glucocorticoids and catecholamines on the neuromuscular transmission. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.* **11**, 253–260.
- Khairullin A.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. 2023. P2 receptor signaling in motor units in muscular dystrophy. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 1587.

ATP Causes Contraction of Denervated Skeletal Muscles

A. E. Khairullin^{1, 2, *}, A. Y. Teplov¹, S. N. Grishin¹, A. U. Ziganshin¹

¹Kazan State Medical University, Kazan, 420012 Russia

²Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

*e-mail: khajrulli@ya.ru

In this work we investigated the ability of humoral agonists (and their stable analogues) to induce contractions in mouse denervated *m. soleus* and *m. EDL*. Previously, we had found a change in the effectiveness of the modulating effect of ATP under the influence of some non-physiological factors in the neuromuscular synapses of rodents. The aim of this study is to evaluate the effect of ATP on the contractility of isolated skeletal muscles of mice after traumatic denervation. It was shown that 28-day denervation led to an increase in the strength of contractions of *m. soleus* and *m. EDL* induced by an acetylcholine analog. The application of ATP caused the contraction of denervated but not intact muscles. In the presence of a non-selective antagonist of the P2 receptors suramin, the effect of ATP ceased. We assume that the observed ATP-induced contraction can be accounted for by activation of postsynaptic P2X receptors in denervated muscles. Apparently, this effect is caused by an increase in the expression of postsynaptic receptors in response to a violation of neurotrophic control and the conductive ability of the nerve fiber.

Keywords: ATP, muscle contraction, P2 receptors, denervation, skeletal muscles, neuromuscular synapse

УДК 612.816:612.815.2:576.5:577.25

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГАМКергических СТРУКТУР В СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЕ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *Lumbricus terrestris*

© 2023 г. Л. Ф. Нуруллин^{а, б, *}, Н. Д. Алмазов^б, Е. М. Волков^{б, **}

^аКазанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”,
Казань, 420111 Россия

^бКазанский государственный медицинский университет,
Казань, 420012 Россия

*e-mail: lenizn@yandex.ru

**e-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2023 г.

После доработки 02.04.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

Методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии в соматической мышце кожно-мускульного мешка дождевого червя установлены ГАМКергические структуры, содержащие медиатор — гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), фермент глутаматдекарбоксилазу (синтезирующий ГАМК), мембранные ГАМК-транспортеры 1, 2, 3 типов, обеспечивающие ее обратный захват, пре- и постсинаптические ГАМК-рецепторы типа А. Данные образования локализованы в зонах холинергических мионевральных синапсов. Предполагается, что ГАМК может участвовать в модуляции двигательной активности соматической мускулатуры дождевого червя, реализуя свое влияние как на пре-, так и на постсинаптических уровнях холинергических мионевральных синапсов.

Ключевые слова: ГАМК, фермент глутаматдекарбоксилаза, мембранные ГАМК-транспортеры, ГАМК-рецепторы А- и В-типов, холинергический синапс, дождевой червь

DOI: 10.31857/S0233475523060075, **EDN:** GMIYPL

ВВЕДЕНИЕ

Соматическая мышца дождевого червя имеет холинергическую иннервацию [1]. Мембрана мышечных клеток совместно с ацетилхолиновыми рецепторами (АХР) содержит рецепторы к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК), функционально подобные ГАМК-рецепторам А- и В-типов, селективная активация которых приводит к гиперполяризации мышечной мембраны [2, 3]. Предполагается, что наряду с холинергической иннервацией соматическая мышца дождевого червя имеет ГАМКергическую иннервацию, которая может участвовать в модуляции двигательной активности. Механизмами такого влияния могут быть: на пресинаптическом уровне — регуляция квантовой секреции ацетилхолина [4], на постсинаптическом — изменение величины мембранного потенциала мышечных клеток [2, 3]. Однако прямого подтверждения наличия функционирующих ГАМКергических структур в соматической мышце дождевого червя не имеется. Не установлена также их пространственная связь с холинергическими мионевральными синапсами. Таким образом,

целью настоящего исследования стала иммунофлуоресцентная идентификация присутствия в зоне холинергических синапсов: ГАМК, фермента синтеза ГАМК — глутаматдекарбоксилазы (ГДК), трех типов (GAT-1, 2, 3) мембранных транспортеров обратного захвата ГАМК, а также пре- и постсинаптических мембранных ГАМК-рецепторов, что может служить доказательством присутствия ГАМКергических структур, сопряженных с холинергической иннервацией, в соматической мышце дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Необходимо подчеркнуть, что тип *Annelida*, к которому относится дождевой червь, является древнейшей группой животных [5]. У представителей этого типа эволюционно возникали способности активного управления движением соматической мускулатуры [6]. В этой связи данное исследование важно с фундаментальной точки зрения, поскольку позволит расширить представления о формировании нервно-мышечной системы на самых ранних этапах эволюционного развития животного мира.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект и приготовление препаратов. Выделенные препараты фрагментов кожно-мышечного мешка дождевого червя *Lumbricus terrestris* закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древесы—Пакса (состав в мМ: 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na₂SO₄, 6 CaCl₂, 2 Tris и 167 сахарозы; pH 7.4) около 30 мин при комнатной температуре (22 ± 1°C). Далее в течение 30 мин препараты фиксировали в 2% растворе параформальдегида, отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатно-солевом буфере (ФБ, состав в мМ: 137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3 Na₂SO₄, 1.4 KH₂PO₄; pH 7.2). Мышцы последовательно инкубировали: 30 мин в 0.5% растворе Triton X-100; 15 мин в растворе, содержащем 5% козье сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.5% Triton X-100; 15 мин в растворе 1% БСА и 0.5% Triton X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на основе ФБ.

Окрашивание препаратов. Препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4°C в растворе А с поликлональными антителами. Использовали антитела против ГАМК; ферменту ГДК; ГАМК-транспортёрам GAT-1, 2, 3; $\alpha 1$, $\beta 2$, $\gamma 2$ субъединицам ГАМК_A-рецептора; R1, R2 субъединицам ГАМК_B-рецептора; синаптофизину. Препараты отмывали в растворе А 3 раза по 30 мин и инкубировали 1 ч при 20°C с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 488 или 647 (1 : 800) в растворе А. Окрашивание постсинаптических никотиновых АХР производили с помощью тетраметилпродамин- α -бунгаротоксина (TMR- α -Б, 20 мкг/мл; время инкубации 30 мин). Для подтверждения специфичности связывания поликлональных антител с соответствующими белками проводили контрольные эксперименты. Для негативного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля производили инкубацию препарата с первичными антителами в присутствии иммуногенного пептида, на который вырабатывались первичные антитела. Отсутствие окрашивания в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами.

Микроскопия. После отмывки в ФБ, препараты помещали в раствор ФБ с глицерином (1 : 1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США). Использовали масляный иммерсионный объектив 63×/1.4. Для возбуждения эмиссии флуорофоров применялся аргонный и гелий-неоновый лазеры. Длины волн возбуждения для флуорофоров: Alexa 488 — 488 нм, TMR — 543 нм, Alexa 647 — 633 нм. Анализ

полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (NIH, США).

Реактивы. В работе использовали параформальдегид, Tris, ФБ, Triton X-100, нормальную козью сыворотку, БСА, TMR- α -Б, глицерин (Sigma-Aldrich); первичные поликлональные антитела и соответствующие им иммуногенные пептиды (Santa Cruz Biotechnologies, США); вторичные антитела, меченные флуорофорами Alexa 488 и Alexa 647 (Invitrogen, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нервные окончания в соматической мускулатуре дождевого червя окрашивались антителами против мембранного гликопротеида синаптофизина, который в больших количествах присутствует в синаптических везикулах [7, 8]. Постсинаптические никотиновые АХР выявлялись окрашиванием образцов флуоресцентным TMR- α -Б [9]. При иммуногистохимическом окрашивании фрагментов кожно-мышечного мешка антителами против ГАМК, синаптофизина и постсинаптических АХР была обнаружена колокализация всех трех флуоресцентных маркеров (рис. 1а–1д, панель 1). Это указывает на присутствие ГАМК в локальной зоне холинергических мионевральных синапсов. Локализация фермента ГДК, выявляемая при иммуногистохимическом окрашивании, также совпадала с зоной концевой пластинки холинергического синапса (рис. 1а–1д, панель 2). Этот результат указывает на то, что в зоне холинергического синапса находятся структуры, способные как синтезировать, так и секретировать ГАМК.

Иммуногистохимическое окрашивание фрагментов кожно-мышечного мешка дождевого червя выявило также присутствие трех типов мембранных транспортеров ГАМК: GAT-1 (рис. 2, панель 1), GAT-2 (рис. 2, панель 2), GAT-3 (рис. 2, панель 3), локализация которых совпадала с локализацией синаптофизина (рис. 2а, 2б, 2г, панели 1–3) и постсинаптических никотиновых АХР (рис. 2а, 2в, 2д, панели 1–3). Таким образом, полученные данные прямо свидетельствуют о наличии в зоне холинергических мионевральных синапсов соматической мышцы червя всех трех типов мембранных транспортеров, обеспечивающих обратный захват ГАМК из примембранных клеточных пространств [10]. Этот процесс обратного транспорта ГАМК является важнейшим механизмом регуляции концентрации ГАМК в межклеточных пространствах. Эксперименты с иммуногистохимическим выявлением субъединиц $\alpha 1$ (рис. 3, панель 1), $\beta 2$ (рис. 3, панель 2) и $\gamma 2$ (рис. 3, панель 3) ГАМК_A-рецептора обнаружили их присутствие в зоне синаптического холинергического контакта, поскольку локализация их флуоресцентного маркера совпадала с таковым для синаптофизина

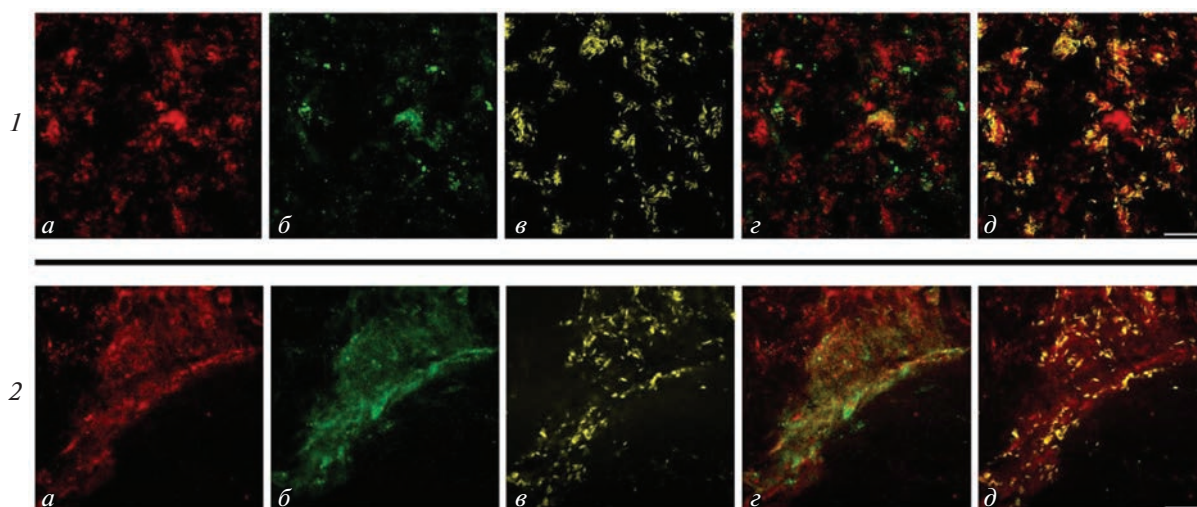


Рис. 1. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *a* – Окрашивание антителами против ГАМК (красный цвет; панель 1), против фермента ГДК (красный цвет; панель 2); *б* – окрашивание антителами против пресинаптического белка синаптофизина (зеленый цвет); *в* – окрашивание TMR- α -Б постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); *г* – наложение изображений *a* и *б*; *д* – наложение изображений *a* и *в*. Масштабная линейка: 10 мкм.

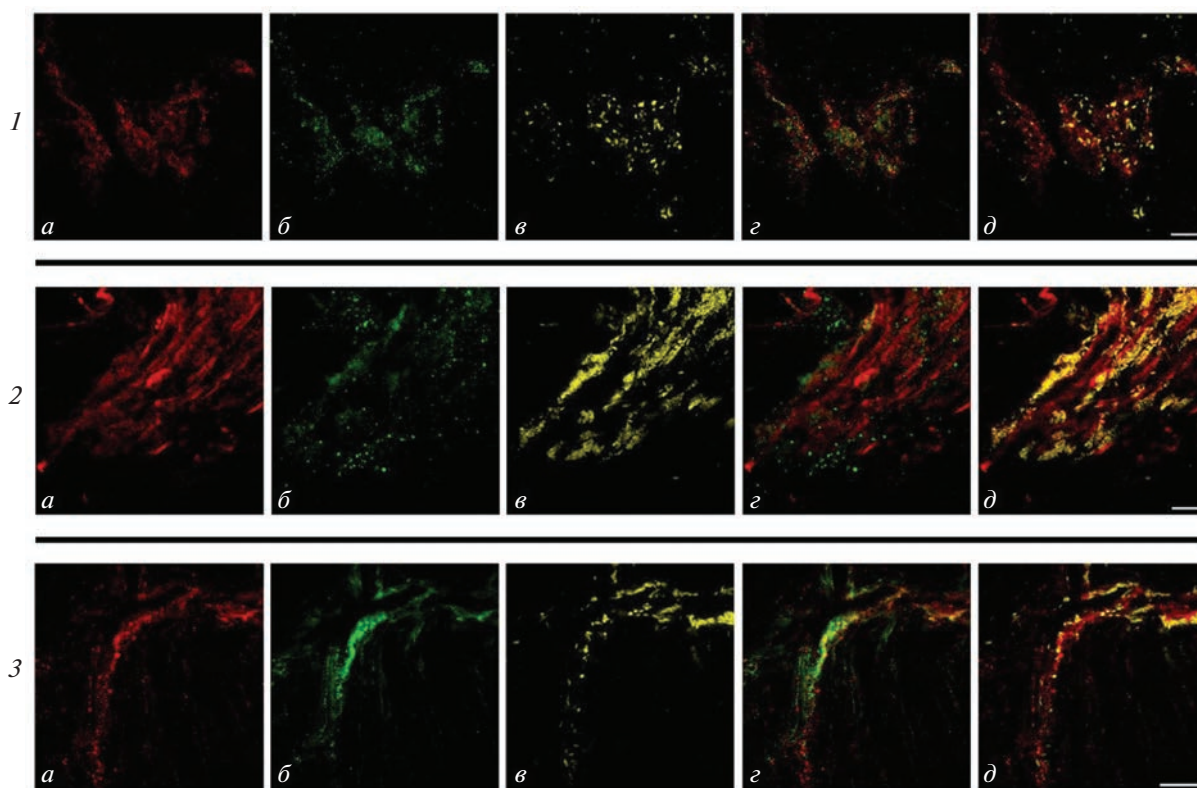


Рис. 2. Выявление ГАМК-транспортёров (ГАТ-1, 2, 3) при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* – Окрашивание антителами к GAT-1 (красный цвет; панель 1), GAT-2 (красный цвет; панель 2), GAT-3 (красный цвет; панель 3); *б* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (зеленый цвет); *в* – окрашивание никотиновых АХР при помощи TMR- α -Б (желтый цвет); *г* – наложение изображений *a* и *б*; *д* – наложение изображений *a* и *в*. Масштабная линейка: 10 мкм.

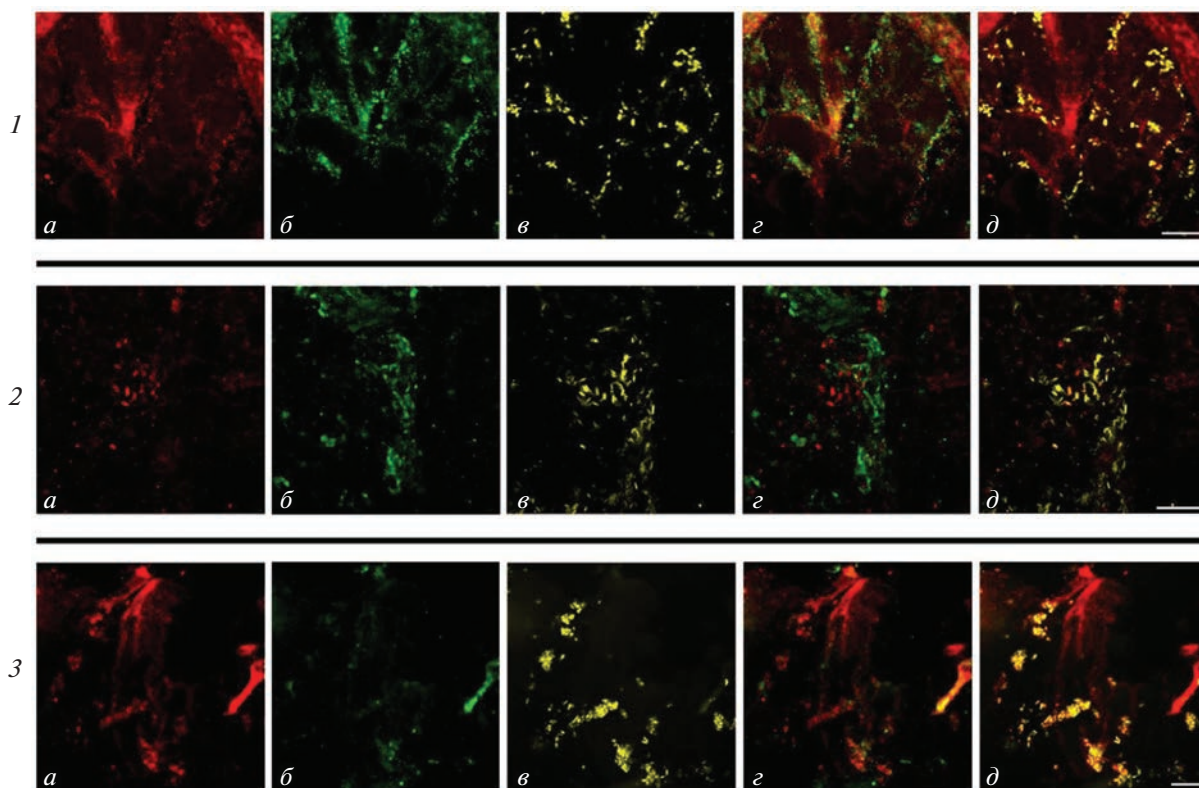


Рис. 3. Выявление субъединиц $\alpha 1$, $\beta 2$, $\gamma 2$ ГАМК_A-рецептора при тройном флуоресцентном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* — Окрашивание антителами к субъединицам $\alpha 1$ (красный цвет; панель 1), $\beta 2$ (красный цвет; панель 2), $\gamma 2$ (красный цвет; панель 3) ГАМК_A-рецептора; *б* — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (зеленый цвет); *в* — окрашивание никотиновых АХР при помощи TMR- α -Б (желтый цвет); *г* — наложение изображений *a* и *б*; *д* — наложение изображений *a* и *в*. Масштабная линейка: 10 мкм.

(рис. 3а, 3б, 3г, панели 1–3) и никотиновых АХР (рис. 3а, 3в, 3д, панели 1–3). Аналогичные результаты получены с окрашиванием субъединиц R1 (рис. 4, панель 1) и R2 (рис. 4, панель 2) ГАМК_B-рецептора, локализация которых также совпадала с локализацией синаптофизина (рис. 4а, 4б, 4г) и никотиновых АХР (рис. 4а, 4в, 4д). Таким образом, в зоне холинергического мионеврального синапса соматической мышцы дождевого червя присутствуют два типа ГАМК-рецепторов: ионотропные рецепторы типа А [11] и метаболотропные рецепторы типа В [12].

Полученные данные позволяют сформулировать следующий вывод. В зоне холинергических мионевральных синапсов в соматической мышце дождевого червя присутствуют полноценные ГАМКергические структуры, включающие все обязательные компоненты, в их числе: медиатор ГАМК; фермент, синтезирующий ГАМК, — ГДК; мембранные транспортеры всех трех типов, обеспечивающие обратный захват ГАМК, а также пре- и постсинаптические ГАМК-рецепторы типа А и В. Возникает закономерный вопрос, какие структуры являются продуцентами ГАМК? Можно выдвинуть следующие три гипотезы. Первая

гипотеза: в зоне концевых пластинок холинергических мионевральных синапсов имеются нервные терминалы ГАМКергических нейронов. Однако для подтверждения данного предположения необходимы дополнительные морфологические ультраструктурные исследования, которые смогут показать наличие двух типов нервных окончаний в локальной зоне нервно-мышечного контакта. Вторая гипотеза: это клетки глиальной нервной ткани. Подобное предположение соответствует данным литературы [13, 14]. При этом ГАМК может выступать в качестве глиотрансмиттера [15, 16]. И, наконец, третье предположение: ГАМК выступает как комедиатор в холинергических синапсах [17, 18]. Последняя гипотеза не противоречит второму предположению. Тем не менее, имеющиеся в нашем распоряжении данные не позволяют сделать окончательный вывод в пользу той или иной выдвинутой нами гипотезы или их сочетаний. Данный вопрос на данном этапе исследований, по-видимому, следует оставить открытым. В то же время проведенные нами исследования позволяют заключить, что в зоне холинергических мионевральных синапсов соматической мышцы дождевого червя присутствуют полноценные

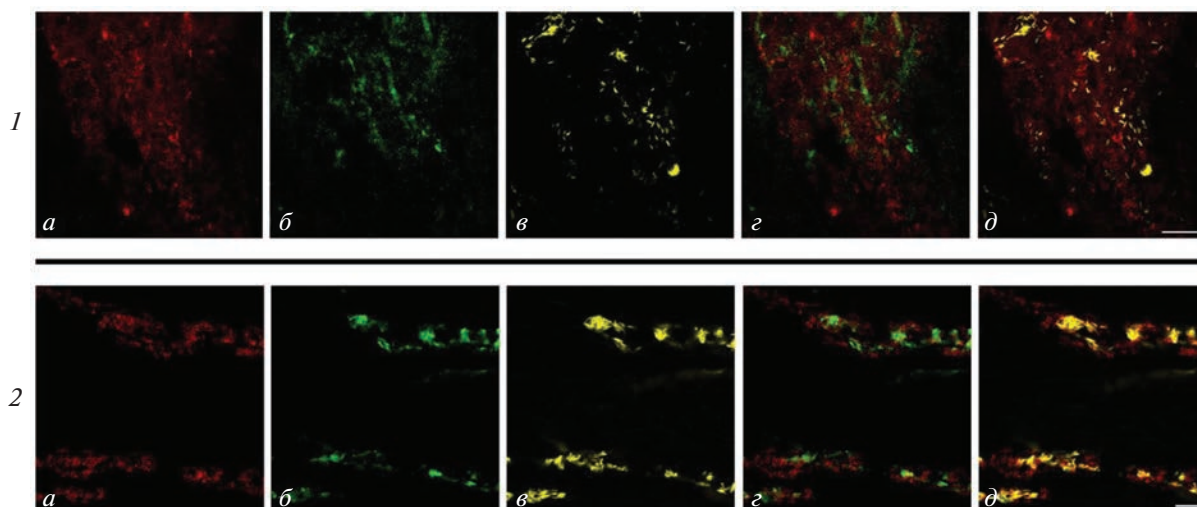


Рис. 4. Выявление субъединиц R1 и R2 ГАМК_B-рецептора при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *а* – Окрашивание антителами к R1 (красный цвет; панель 1) и R2 (красный цвет; панель 2) ГАМК_B-рецептора; *б* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (зеленый цвет); *в* – окрашивание никотиновых АХР при помощи TMR- α -Б (желтый цвет); *г* – наложение изображений *а* и *б*; *д* – наложение изображений *а* и *в*. Масштабная линейка: 10 мкм.

ГАМКергические структуры, способные синтезировать, осуществлять секрецию и обратный захват медиатора, а также взаимодействовать с пре- и постсинаптическими ионотропными и метаботропными рецепторами. Известно, что в холинергических синапсах позвоночных ГАМК способна модулировать как квантовую, так и не-квантовую секрецию медиатора, реализуя свое действие через активацию метаботропных рецепторов В-типа [4]. Аппликация ГАМК на клетки соматической мышцы дождевого червя вызывает гиперполяризацию мышечных мембран посредством селективной активации ГАМК-рецепторов А и В-типов. Последние реализуют свое действие посредством увеличения вклада “амперогенного насосного компонента” Na^+/K^+ -насоса и активного Cl^- -симпорта в интегральную величину мембранного потенциала покоя [2, 3]. Кроме того, в литературе имеются данные о функциональном сопряжении потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и метаботропных ГАМК_B-рецепторов через G-белки [12, 19]. В нейронах активация ГАМК_B-рецепторов модулирует активность потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L, N, P/Q, R, T-типов [20–22]. Вход кальция через данные типы каналов запускает экзоцитоз синаптических везикул [23–25], а временное встраивание потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов в везикулярные мембраны в процессе экзоцитоза запускает быстрый и медленный эндоцитоз, что обеспечивает связывание процессов экзоцитоза и эндоцитоза везикул [26]. Как нами было показано ранее, потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы экспрессируются в зоне нервно-мышечного контакта сома-

тической мускулатуры дождевого червя [27, 28]. Вполне возможно, что в холинергических мионевральных синапсах дождевого червя один из кальциевых механизмов регуляции экзо- и эндоцитоза везикул осуществляется при участии метаботропных ГАМК_B-рецепторов.

Таким образом, есть основания считать, что ГАМКергические структуры могут участвовать как в модуляции холинергической секреции в мионевральных синапсах, так и в регуляции порога возбудимости мышечных мембран и, в конечном счете, двигательной активности соматической мышцы дождевого червя.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-24-00239.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волков М.Е. 2012. Прижизненная окраска нервных образований флуоресцентными красителями и оптическое определение ацетилхолина в соматической мышце дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *Бюл. эксперим. биол. мед.* **154** (7), 112–115.
2. Волков Е.М., Сабирова А.Р., Нуруллин Л.Ф., Гришин С.К., Зефиоров А.Л. 2006. Влияние ГАМКергических и адренергических препаратов на активность Na^+/K^+ -насоса и котранспорта Cl^- в сома-

- тических мышечных клетках дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *Бюл. эксперим. биол. мед.* **141** (5), 572–574.
3. Volkov E.M., Nurullin L.F., Volkov M.E., Nikolsky E.E., Vyskočil F. 2011. Mechanisms of carbacholine and GABA action on resting membrane potential and Na^+/K^+ -ATPase of *Lumbricus terrestris* body wall muscles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **158** (4), 520–524.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.016>
 4. Malomouzh A.I., Petrov K.A., Nurullin L.F., Nikolsky E.E. 2015. Metabotropic GABA_B receptors mediate GABA inhibition of acetylcholine release in the rat neuromuscular junction. *J. Neurochem.* **135** (6), 1149–1160.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13373>
 5. Parry L., Tanner A., Vinther J. 2014. The origin of annelids. *Front. Palaeontology.* **57** (6), 1091–1103.
<https://doi.org/10.1111/pala.12129>
 6. Purschke G., Müller M.C.M. 2006. Evolution of body wall musculature. *Integr. Comp. Biol.* **46** (4), 497–507.
<https://doi.org/10.1093/icb/icj053>
 7. Valtorta F., Pennuto M., Bonanomi D., Benfenati F. 2004. Synaptophysin: Leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays.* **26** (4), 445–453.
<https://doi.org/10.1002/bies.20012>
 8. Kwon S.E., Chapman E.R. 2011. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron.* **70** (5), 847–854.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.001>
 9. Krause M., Wernig A. 1985. The distribution of acetylcholine receptors in the normal and denervated neuromuscular junction of the frog. *J. Neurocytol.* **14** (5), 765–780.
<https://doi.org/10.1007/BF01170827>
 10. Łątka K., Jończyk J., Bajda M. 2020. γ -Aminobutyric acid transporters as relevant biological target: Their function, structure, inhibitors and role in the therapy of different diseases. *Int. J. Biol. Macromol.* **158**, 750–772.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.126>
 11. Sallard E., Letourneur D., Legendre P. 2021. Electrophysiology of ionotropic GABA receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **78** (13), 5341–5370.
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03846-2>
 12. Shaye H., Stauch B., Gati C., Cherezov V. 2021. Molecular mechanisms of metabotropic GABA_B receptor function. *Sci. Adv.* **7** (22), eabg3362.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abg3362>
 13. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. 1999. Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* **22** (5), 208–215.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
 14. Melone M., Ciappelloni S., Conti F. 2014. Plasma membrane transporters GAT-1 and GAT-3 contribute to heterogeneity of GABAergic synapses in neocortex. *Front. Neuroanat.* **8** (72).
<https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00072>
 15. Angulo M.C., Le Meur K., Kozlov A.S., Charpak S., Audinat E. 2008. GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog. Neurobiol.* **86** (3), 297–303.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.08.002>
 16. Yoon B.E., Lee C.J. 2014. GABA as a rising gliotransmitter. *Front. Neural Circuits.* **8**, 141.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00141>
 17. Takács V.T., Cserép C., Schlingloff D., Pósfai B., Szőnyi A., Sos K.E., Környei Z., Dénes Á., Gulyás A.I., Freund T.F., Nyiri G. 2018. Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. *Nat. Commun.* **9** (1), 2848.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05136-1>
 18. Saunders A., Granger A.J., Sabatini B.L. 2015. Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *Elife.* **27** (4), e06412.
<https://doi.org/10.7554/eLife.06412>
 19. Padgett C.L., Slesinger P.A. 2010. GABA_B receptor coupling to G-proteins and ion channels. *Adv. Pharmacol.* **58**, 123–147.
[https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(10\)58006-2](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(10)58006-2)
 20. Shen W., Slaughter M.M. 1999. Metabotropic GABA receptors facilitate L-type and inhibit N-type calcium channels in single salamander retinal neurons. *J. Physiol.* **516** (Pt 3), 711–718.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0711u.x>
 21. Carter T.J., Mynlieff M. 2004. Gamma-aminobutyric acid type B receptors facilitate L-type and attenuate N-type Ca^{2+} currents in isolated hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* **76** (3), 323–333.
<https://doi.org/10.1002/jnr.20085>
 22. Chalifoux J.R., Carter A.G. 2011. GABA_B receptor modulation of voltage-sensitive calcium channels in spines and dendrites. *J. Neurosci.* **31** (11), 4221–4232.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4561-10.2011>
 23. Seagar M., Lévêque C., Charvin N., Marquèse B., Martin-Moutot N., Boudier J.A., Boudier J.L., Shoji-Kasai Y., Sato K., Takahashi M. 1999. Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **354** (1381), 289–297.
<https://doi.org/10.1098%2Frsb.1999.0380>
 24. Gandini M.A., Zamponi G.W. 2022. Voltage-gated calcium channel nanodomains: Molecular composition and function. *FEBS J.* **289** (3), 614–633.
<https://doi.org/10.1111/febs.15759>
 25. Catterall W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (8), a003947.
<https://doi.org/10.1101%2Fcsbshperspect.a003947>
 26. Xue L., Zhang Z., McNeil B.D., Luo F., Wu X.S., Sheng J., Shin W., Wu L.G. 2012. Voltage-dependent calcium channels at the plasma membrane, but not vesicular channels, couple exocytosis to endocytosis. *Cell Rep.* **1** (6), 632–638.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.011>
 27. Волков М.Е., Волков Е.М., Нуруллин Л.Ф. 2012. Иммуноцитохимическая идентификация синапсотоагмина 1, синтаксина 1, Ca^{2+} -канала N-типа и Н-холинорецептора в двигательных нервно-мышечных синапсах соматической мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *Цитология.* **54** (11), 847–852.
 28. Нуруллин Л.Ф., Волков Е.М. 2020. Иммунофлуоресцентная идентификация изоформ субъединицы $\alpha 1$ потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов семейств Ca_v1 , Ca_v2 и Ca_v3 в зонах холинергических синапсов соматической мускулатуры дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *Цитология.* **62** (2), 141–148.
<https://doi.org/10.31857/S0041377120020042>

Immunofluorescent Identification of GABAergic Structures in the Somatic Muscle of the Earthworm *Lumbricus terrestris*

L. F. Nurullin^{1, 2, *}, N. D. Almazov², E. M. Volkov^{2, **}

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

²*Kazan State Medical University, Kazan, 420012 Russia*

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

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

Using the immunofluorescence confocal microscopy, we detected the following GABAergic structures in the somatic muscle of the body wall of the earthworm: neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA); the enzyme responsible for synthesis of GABA, glutamate decarboxylase; type 1, 2, and 3 membrane transporters of GABA providing its reuptake; pre- and postsynaptic type A (ionotropic) and type B (metabotropic) GABA receptors. These structures are localized in the areas of cholinergic neuromuscular synapses. We assume that GABA can participate in modulation of motor activity of the earthworm somatic muscles both at pre- and postsynaptic levels of cholinergic neuromuscular synapses.

Keywords: GABA, glutamate decarboxylase, membrane GABA transporters, GABA receptors of type A and type B, cholinergic neuromuscular synapses, earthworm *Lumbricus terrestris*

УДК 57.017.642, 577.175.823

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РАННЕМ РАЗВИТИИ МЫШИ

© 2023 г. В. С. Фролова^{а, *}, А. Д. Иванова^а, М. С. Конорова^а,
Ю. Б. Шмуклер^б, Д. А. Никишин^{а, б}

^аМосковской государственной университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^бИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

*e-mail: frolova.veronika.2014@post.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 25.07.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Серотонин является регулятором раннего эмбрионального развития и имеет полноценную функциональную систему в доимплантационных эмбрионах млекопитающих. В данной работе было проведено описание пространственного внутриклеточного распределения серотонина, везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 и рецепторов серотонина 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A} на разных стадиях раннего эмбрионального развития мышцы. Серотонин, транспортер VMAT2 и рецептор 5-HT_{1D} визуализируются в кортикальном компартменте клеток, тогда как рецептор 5-HT_{2A} имеет более равномерное распределение по всей цитоплазме. Сравнение размеров иммунореактивных частиц показало, что статистически значимые различия между серотином и транспортером VMAT2 отсутствуют, что говорит в пользу наличия везикул, в которых серотонин накапливается при участии VMAT2 для дальнейшей межклеточной сигнализации. Кроме того, паттерны иммунореактивности рецепторов 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A} существенно различались, что может свидетельствовать о выполнении каждым из этих серотониновых рецепторов разных функций в раннем эмбриогенезе.

Ключевые слова: мышь, нейротрансмиттеры, доимплантационные эмбрионы, серотонин, серотонинергическая система

DOI: 10.31857/S023347552306004X, **EDN:** GLJNWH

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрансмиттеры — биологически активные вещества разнообразной природы, которые играют важную роль в передаче электрохимического импульса между нейронами, а также от нейронов к клеткам мышечной ткани и железистым клеткам [1]. К классическим представителям этой группы относят некоторые аминокислоты и их производные, например гистамин, индоламины, катехоламины — эволюционно древние молекулы, осуществляющие функции модуляторов долговременных морфофункциональных изменений в клетке [2]. Функциональная активность этих веществ была показана как для животных, не имеющих нервной системы (например, простейших и губок), так и для высших многоклеточных животных, обладающих сложной нервной системой [3, 4].

Долгое время эти химические соединения изучались преимущественно в контексте передачи сигналов между нервными клетками взрослого

организма. Г.А. Бузников в середине XX века впервые предположил и экспериментально продемонстрировал регуляторную роль некоторых нейротрансмиттеров, в частности серотонина, в донервном эмбриогенезе различных животных [5–10]. Наличие серотонина, его транспортеров и рецепторов на ранних стадиях эмбриогенеза, а также способность серотонинспецифических фармакологических агентов вмешиваться в эмбриональное развитие привели к предположению, что в ранних эмбрионах серотонин участвует в регуляции клеточной пролиферации и/или морфогенетических движений [11]. Однако до сих пор представление о локализации донервных трансмисмиттеров, а также о распределении их рецепторов и транспортеров в эмбриональных клетках остается неполным.

В ооцитах и ранних эмбрионах мышцы серотонин выявляется на всех стадиях развития в виде точечных структур [12, 13]. Кроме того, в раннем развитии мышцы показана экспрессия генов основных компонентов серотонинергической си-

стемы — ферментов синтеза и деградации, мембранных рецепторов, специфического мембранного транспортера [12–15]. Целью настоящей работы было исследование пространственного распределения внутри клетки серотонина и компонентов серотонинергической системы — везикулярного транспортера моноаминов VMAT2, рецепторов серотонина 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A} — в ооцитах и доимплантационных зародышах мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работу проводили на половозрелых самках мышей линии C57Bl/6, которых на ночь подсаживали к самцам для получения датированной беременности. Утро, когда была обнаружена вагинальная пробка, было принято за срок развития дрс 0.5. Эмбрионы на разных стадиях доимплантационного развития получали на сроках дрс 1.5 (двухклеточная стадия), дрс 2.0 (четырёхклеточная стадия), дрс 2.5 (восьмиклеточная стадия), дрс 3.0 (морула) и дрс 3.5 (бластоциста).

Иммуноцитохимия. GV-ооциты и эмбрионы фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре, либо в течение ночи при 4°C в 4% растворе параформальдегида, разведенном в фосфатно-солевом буфере (PBS). Затем ооциты и эмбрионы отмывали в фосфатно-солевом буфере с добавлением Triton X-100 (Sigma-Aldrich) (PBST) и обрабатывали 0.25% раствором коллагеназы (ПанЭко, П011-1) или 1% раствором додецилсульфата натрия (SDS) для снятия блестящей оболочки, после чего снова отмывали PBST. В дальнейшем образцы инкубировали в течение 1 ч в блокирующем растворе: смеси 3% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma-Aldrich), 1% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 0.1% Triton X-100, 0.01% Tween-20 (Sigma-Aldrich) и 0.01 M PBS (pH 7.4).

После этого образцы инкубировали в первичных антителах, разведенных в блокирующем растворе, в течение ночи при 4°C. Были использованы следующие первичные антитела: кроличьи антитела против серотонина (Sigma-Aldrich, S5545, 1 : 1000), кроличьи антитела против VMAT2 (Invitrogen, PA5-77496, 1 : 1000); кроличьи антитела против 5-HT_{1D} (Invitrogen, PA5-95901, 1 : 1000); кроличьи антитела против 5-HT_{2A} (Invitrogen, PA5-95288, 1 : 1000). Затем образцы отмывали PBST и инкубировали в течение 1 ч во вторичных антителах: FITC-конъюгированные козьи антитела против IgG кролика (Jackson ImmunoResearch, 111-095-003, 1 : 200). Затем образцы отмывали и монтировали на предметные стекла в среду Mowiol. Анализ иммунореактивности в образцах проводили с помощью конфокальных лазерных сканирующих установок Zeiss LSM880 (Carl Zeiss AG, Германия) и Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Германия), используя 63× и 100× масля-

ные объективы соответственно. Для визуализации использовали лазер с длиной волны возбуждающего света 488 нм. В качестве негативного контроля использовали препараты, которые не инкубировали в растворе первичных антител. Полученные изображения анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ. Размер частиц оценивался вручную на отдельных оптических срезах: после выделения очертаний частицы вычислялся диаметр круга полученной площади, что определялось как линейный размер частицы.

Вестерн-блоттинг. В качестве положительного контроля иммуносpezifического связывания препаратов для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии был проведен вестерн-блоттинг образцов ткани яичника для транспортера VMAT2, рецепторов 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A}. Для этого образцы ткани яичника гомогенизировали в буфере RIPA, а концентрацию белка измеряли с помощью набора для анализа белка BCA Pierce™ (Thermo Fisher Scientific). Образцы денатурировали в буфере Лэммли в течение 30 мин при 37°C. Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, используя 10% разделяющий буфер, а затем переносили на мембрану Immobilon-P® PVDF с помощью системы мокрого блоттинга Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories Inc.). Мембраны блокировали 5% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами (1 : 20000), которые также были использованы для иммуноцитохимического связывания, в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки в TBST мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, 111-035-003, 1 : 50000). После отмывки в TBST конъюгированные антитела визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции в 0.1 M Трис-НСl, pH 8.5, 12.5 mM люминола, 2 mM кумаровой кислоты и 0.09% H₂O₂. Изображения получали с использованием системы визуализации ChemiDoc™ и анализировали с помощью программного обеспечения Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты, полученные с помощью Вестерн-блоттинга, позволили обнаружить транспортер VMAT2, а также рецепторы 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A} в яичнике мыши (рис. 1). В качестве положительного контроля для Вестерн-блоттинга использовалась ткань полосатого тела мозга (*corpus striatum*) мыши.

Серотонин выявляется в цитоплазме GV-ооцитов и доимплантационных зародышей в виде мелких гранул. На стадии GV-ооцитов наибольшая

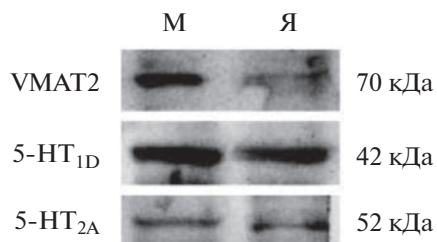


Рис. 1. Компоненты серотонинергической системы, выявленные в мозге и яичнике мыши методом Вестерн-блоттинга. М — мозг (полосатое тело), Я — яичник.

иммунореактивность серотонина выявляется в кортикальном слое (рис. 2а) и снижается к центру яйцеклетки. Аналогичная картина наблюдается на стадиях двух- (рис. 2б), четырех- (рис. 2в) и восьмиклеточных (рис. 2г) зародышей, а также на морулах (рис. 2д) — серотонин в большей степени выявляется в апикальном компартменте на периферии эмбриона (рис. 3а). На стадии бластоцисты гранулы серотонина сконцентрированы в трофобласте, тогда как во внутренней клеточной массе (эмбриобласте) практически отсутствует (рис. 2е). Измерение размера частиц серотонина на разных стадиях демонстрирует, что по мере развития он остается неизменным и составляет 0.445 ± 0.113 мкм (рис. 3д).

Везикулярный транспортер моноаминов VMAT2, ответственный за накопление серотонина в везикулярных структурах, иммуногистохимически выявляется в цитоплазме GV-ооцитов и бластомерах доимплантационных зародышей, демонстрируя схожий с серотонином паттерн иммунореактивности (рис. 3б). При использовании антител против VMAT2 неспецифическая иммунореакция выявляется по всему зародышевому пузырьку, за исключением ядрышкоподобного тельца. Частицы, выявляемые антителами к транспортеру VMAT2, локализованы в кортикальном слое цитоплазмы ооцитов (рис. 2ж) и поверхностном компартменте бластомеров двух- (рис. 2з), четырех- (рис. 2и), восьмиклеточных эмбрионов (рис. 2й) и морул (рис. 2к), а у бластоцист выявляется некоторое количество VMAT2-иммунопозитивных частиц в клетках трофобласта, и практически отсутствует маркирование в клетках внутренней клеточной массы (рис. 2л). Измерение размеров частиц, выявляемых антителами к транспортеру VMAT2, на разных стадиях показало, что он остается неизменным и составляет 0.370 ± 0.105 мкм (рис. 3д).

Рецептор серотонина 5-HT_{1D} иммуногистохимически выявляется в цитоплазме GV-ооцитов преимущественно в узком примембранном слое (рис. 2м). У доимплантационных эмбрионов рецептор 5-HT_{1D} маркирует примембранную область внешних поверхностей бластомеров (рис. 2н–2р, 3в), в бластоцисте наблюдается иммунореактив-

ность слоя клеток трофобласта (рис. 2с), а во внутренней клеточной массе иммунореактивность рецептора не выявлена. Размер частиц, выявляемых антителами к рецептору 5-HT_{1D}, на разных стадиях составляют 0.243 ± 0.048 мкм (рис. 3д).

Рецептор серотонина 5-HT_{2A} выявляется в ооцитах (рис. 2м) в виде крупных округлых везикул, распределенных по всей цитоплазме. Аналогичная картина наблюдалась у доимплантационных зародышей (рис. 2у–2ц, 3г). В бластоцистах рецептор 5-HT_{2A} выявляется как в клетках трофобласта, так и во внутренней клеточной массе (рис. 2ч). Средний диаметр везикул, выявляемых антителами к данному рецептору, составляет 1.226 ± 0.097 мкм (рис. 3д).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ внутриклеточного распределения иммунореактивности компонентов серотонинергической системы показал, что как сам серотонин, так и его везикулярный транспортер VMAT2 локализуются в большей степени в кортикальном слое ооцитов и ранних эмбрионов, выявляясь в виде мелких гранул, встроенных в клеточную мембрану. Ранее был описан диффузный равномерный характер распределения серотонина в цитоплазме на доимплантационных стадиях развития мыши [16], однако мы наблюдали отчетливый кортикальный паттерн распределения (рис. 3а). Мы проанализировали выборки размеров частиц серотонина и VMAT2, используя критерий Краскела–Уоллиса, и обнаружили отсутствие статически значимых различий между ними, что также свидетельствует о том, что выявляемые частицы действительно могут быть везикулами, в которых серотонин накоплен с помощью VMAT2. Это может свидетельствовать об активности серотонина как посредника межклеточной сигнализации на поздних стадиях оогенеза [17] и в процессе межбластомерного взаимодействия на ранних стадиях развития [18].

Паттерн распределения 5-HT_{1D}- и 5-HT_{2A}-иммунопозитивных частиц существенно различается: 5-HT_{1D} выявляется в примембранном слое ооцитов и бластомеров, занимая гораздо более узкий слой, чем серотонин и VMAT2, тогда как 5-HT_{2A} выявляется по всей цитоплазме в составе очень крупных гранул. Известно, что оба рецептора функционально активны в раннем развитии мыши [11]. Эти данные могут свидетельствовать о том, что рецепторы выполняют различные функции: рецептор 5-HT_{1D} может быть связан с межклеточной коммуникацией на ранних стадиях развития, а 5-HT_{2A} — с метаболическими процессами во внутриклеточных структурах [13]. В связи с тем, что эмбриональное развитие активно регулируется аутокринными и паракринными факторами, можно предположить, что серотонин и

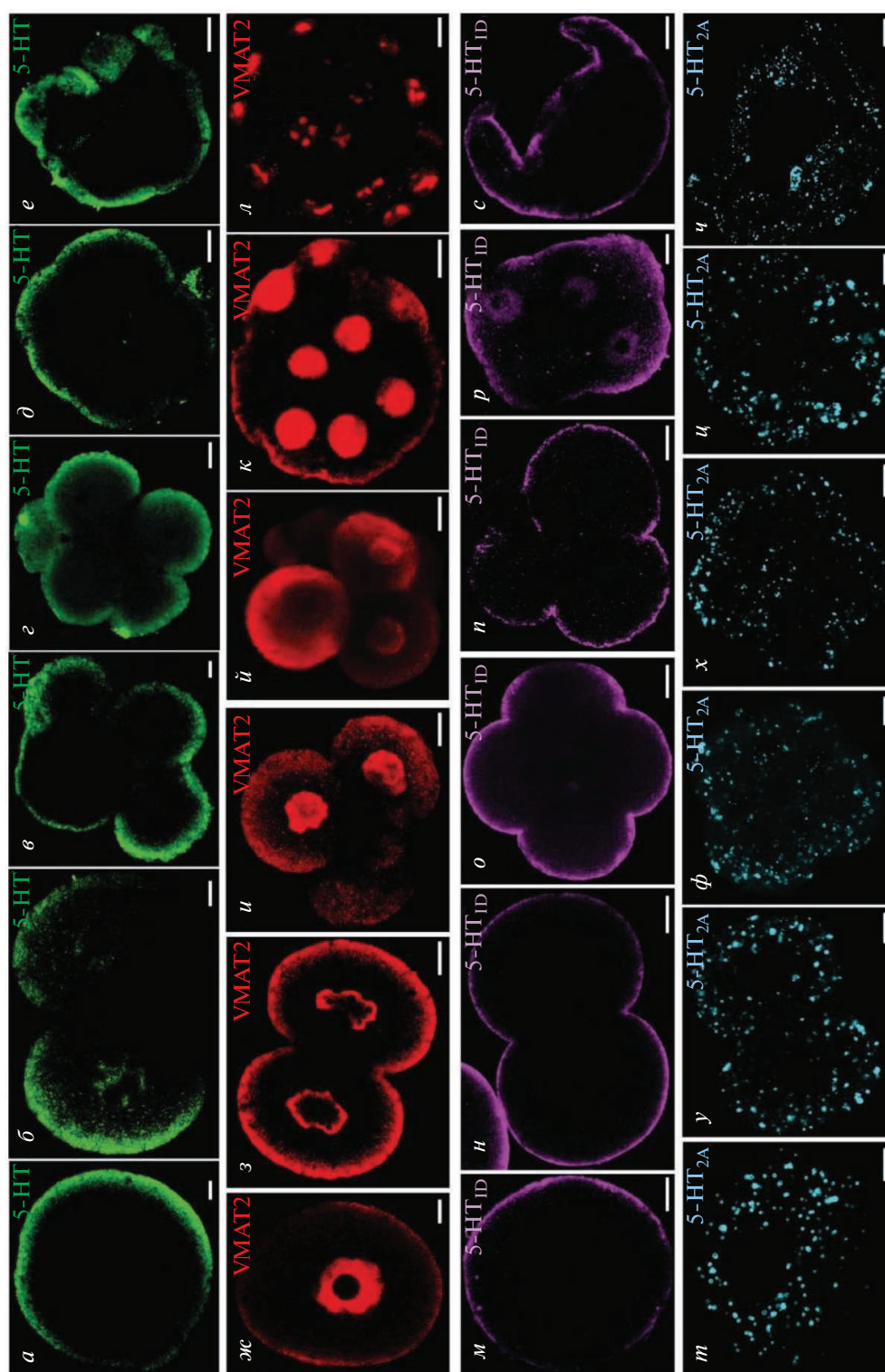


Рис. 2. Компоненты серотонинергической системы в доимплантационных эмбрионах мыши. (а–е) — распределение серотонина в GV-ооците (а), двухклеточном эмбрионе (б), четырехклеточном эмбрионе (в), восьмиклеточном эмбрионе (г), моруле (д) и бластоцисте (е); (ж–л) — распределение везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 в GV-ооците (ж), двухклеточном эмбрионе (з), четырехклеточном эмбрионе (и), восьмиклеточном эмбрионе (й), моруле (к) и бластоцисте (л); (м–п) — распределение рецептора 5-HT_{1D} в GV-ооците (м), двухклеточном эмбрионе (и), четырехклеточном эмбрионе (о), восьмиклеточном эмбрионе (п), моруле (р) и бластоцисте (с); (м–у) — распределение рецептора 5-HT_{2A} в GV-ооците (м), двухклеточном эмбрионе (н), четырехклеточном эмбрионе (ф), восьмиклеточном эмбрионе (х), моруле (у) и бластоцисте (у). Масштаб 10 мкм.

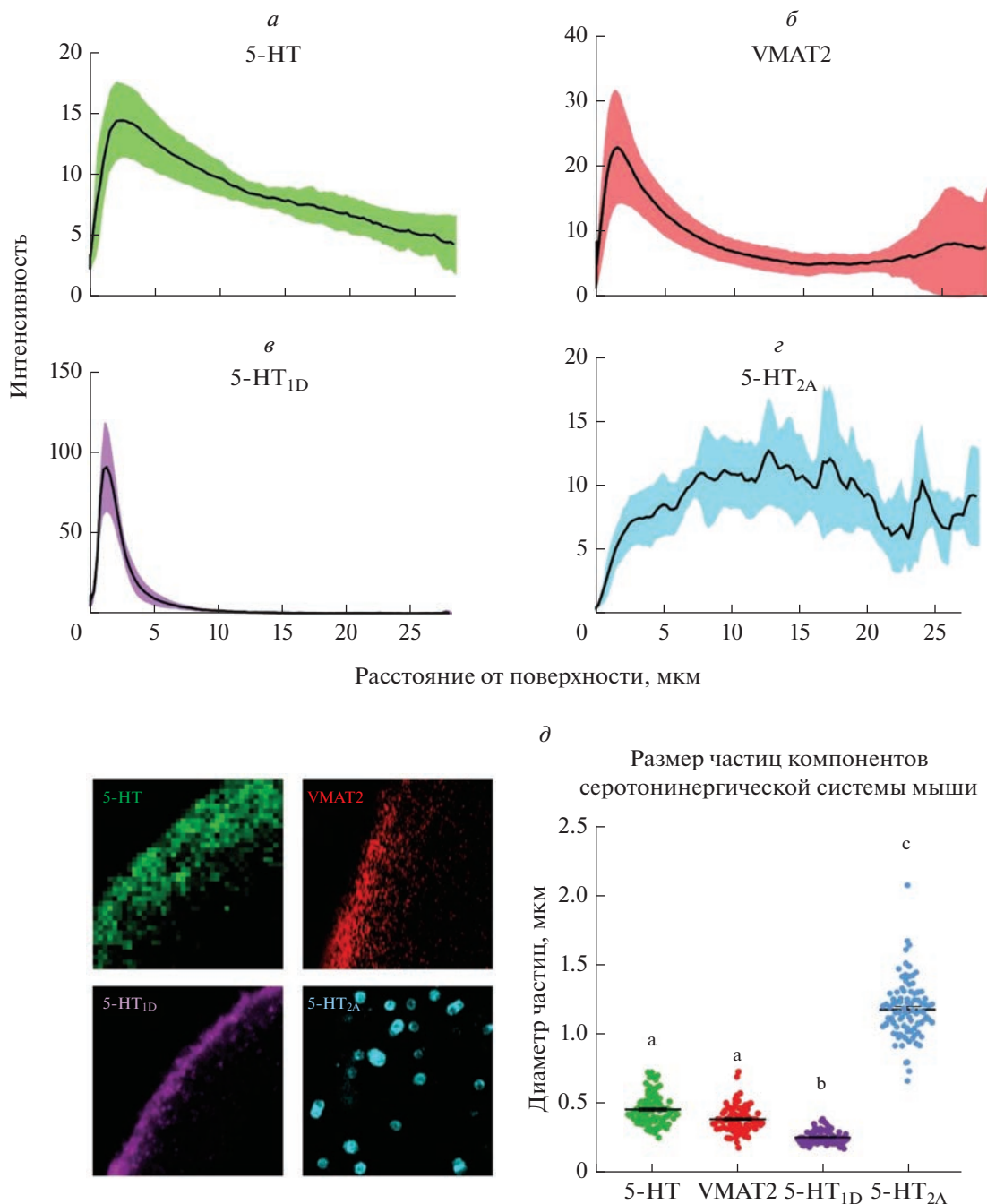


Рис. 3. Сравнение распределения и размеров компонентов серотонинергической системы в ооцитах и ранних эмбрионах млекопитающих. *а* – Распределение серотонина в GV-ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши; *б* – распределение транспортера VMAT2 в GV-ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши; *в* – распределение рецептора 5-HT_{1D} в GV-ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши; *г* – распределение рецептора 5-HT_{2A} в GV-ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши; *д* – диаметр частиц компонентов серотонинергической системы.

компоненты серотонинергической системы в раннем развитии млекопитающих могут осуществлять модуляцию действия других сигнальных молекул через механизмы взаимодействия сигнальных путей. Так, хорошо известно, что G-белок-сопряженные рецепторы образуют в клетке гомо- и гетеродимеры, от компонентного состава

которых зависит их активность и механизмы трансдукции сигнала [19]. Одним из внутриклеточных механизмов регуляции раннего развития может выступать серотонилирование белков, вовлеченных в различные молекулярные каскады [20]. Однако эти гипотезы требуют дальнейшего исследования и подтверждения.

На стадии бластоцисты серотонин, везикулярный транспортер моноаминов VMAT2 и рецептор 5-НТ_{1D} в большей степени выявляются в клетках трофобласта, а в клетках внутренней клеточной массы (эмбриобласта) их иммунореактивность выражена в гораздо меньшей степени. Этот результат говорит в пользу того, что серотонинергическая сигнализация может быть вовлечена в процесс первой клеточной дифференцировки в бластоцисте и может оказывать влияние на плюрипотентный статус клеток внутренней клеточной массы.

Полученные нами результаты показывают, что серотонин, транспортер VMAT2 и рецепторы 5-НТ_{1D} и 5-НТ_{2A} присутствуют как в GV-ооцитах, так и в доимплантационных эмбрионах и пространственно неоднородно распределены в соответствии с выполнением различных функций в эмбриональных клетках. Одновременная экспрессия двух подтипов серотониновых рецепторов (5-НТ_{1D} и 5-НТ_{2A}) в пределах одной эмбриональной клетки была продемонстрирована впервые, что является существенным дополнением к нашим представлениям о регуляции раннего развития. В раннем эмбриогенезе наблюдается одновременная или последовательная активность разных трансмиссерных систем — холинергической, дофаминергической и серотонинергической, которые участвуют в целом ряде процессов. Результаты данной работы указывают на то, что пространственно изолированные серотониновые рецепторы разных типов могут реагировать на один и тот же трансмиссер и реализовывать различные эффекты в разных эмбриональных механизмах/структурах.

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

Источники финансирования. Работа В.Ф., А.И., М.К. и Д.Н. выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-10009, <https://rscf.ru/project/22-74-10009/>. Работа Ю.Ш. и Д.Н. выполнялась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № 0108-2019-0003 в 2023 г.

Соответствие принципам этики. При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезбоживания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали нормам, одобренным биоэтической комиссией ИБР РАН (Протокол № 40 от 17.09.2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. 2000. *Molecular cell biology: Neurotransmitters, synapses, and impulse transmission* (4th ed.). New York: W. H. Freeman. 1184 p.
- Torres G., Gainetdinov R., Caron M. 2003. Plasma membrane monoamine transporters: Structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 13–25.
- Xing L., Huttner W.B. 2020. Neurotransmitters as modulators of neural progenitor cell proliferation during mammalian neocortex development. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 391.
- Yamamoto K., Vernier P. 2011. The evolution of dopamine systems in chordates. *Front. Neuroanat.* **5**, 21.
- Buznikov G.A., Chudakova I.V., Zvezdina N.D. 1964. The role of neurohumours in early embryogenesis. I. Serotonin content of developing embryos of sea urchin and loach. *Development.* **12** (4), 563–573.
- Бузников Г.А. 1967. *Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития*. М.: Наука. 265 с.
- Бузников Г.А. 1987. *Нейротрансмисмиттеры в эмбриогенезе*. М.: Наука. 232 с.
- Бузников Г.А. 2007. Донервные трансмисмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы. *Онтогенез.* **38**(4), 262–270.
- Shmukler Y.B., Nikishin D.A. 2022. Non-neuronal transmitter systems in bacteria, non-nervous eukaryotes, and invertebrate embryos. *Biomolecules.* **12** (2), 271.
- Dubé F., Amireault P. 2007. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci.* **81** (25–26), 1627–1637.
- Buznikov G.A., Shmukler Y.B., Lauder J.M. 1996. From oocyte to neuron: Do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol.* **16**, 533–559.
- Amireault P., Dubé F. 2005. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. *Biol. Reprod.* **73** (2), 358–365.
- Basu B., Desai R., Balaji J., Chaerkady R., Sriram V., Maiti S., Panicker M.M. 2008. Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *Reproduction.* **135** (5), 657.
- Amireault P., Dube F. 2005. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes. *Mol. Pharmacol.* **68** (6), 1678–1687.
- Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Багаева Т.С., Семёнова М.Л., Шмуклер Ю.Б. 2018. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и доимплантационном развитии мыши. *Онтогенез.* **49** (3), 208–216.
- Il'kova G., Rehak P., Vesela J., Čikoš S., Fabian D., Czikková S., Koppel J. 2004. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote.* **12**, 205–213.
- Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Алешина Н.М., Мальченко Л.А., Шмуклер Ю.Б. 2021. Опосредованное ооцитом влияние серотонина на функциональный статус клеток гранулезы. *Онтогенез.* **52** (2), 120–128.
- Shmukler Y., Nikishin D. 2012. Transmitters in blastomere interactions. *Cell Interactions.* 31–65.
- Kamal M., Jockers R. 2011. Biological significance of GPCR heteromerization in the neuro-endocrine system. *Front. Endocrinol.* **2**, 2.
- Bader M. 2019. Serotonylation: Serotonin signaling and epigenetics. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 288.

Spatial Organization of the Components of the Serotonergic System in the Early Mouse Development

V. S. Frolova^{1, *}, A. D. Ivanova¹, M. S. Konorova¹, Yu. B. Shmukler², D. A. Nikishin^{1, 2}

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

²*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: frolova.veronika.2014@post.bio.msu.ru*

Serotonin is a regulator of early embryonic development and has a fully functional system in preimplantation mammalian embryos. In this work, we described the spatial distribution of serotonin, the vesicular monoamine transporter VMAT2, and the serotonin receptors 5-HT_{1D} and 5-HT_{2A} at different stages of early mouse embryonic development. Serotonin, the VMAT2 transporter, and the 5-HT_{1D} receptor are visualized in the cortical compartment of cells, whereas the 5-HT_{2A} receptor has a more uniform distribution throughout the cytoplasm. Comparison of the sizes of the immunoreactive particles showed that there are no statistically significant differences between serotonin and the VMAT2 transporter, which may indicate the presence of specific vesicles containing serotonin. In addition, the two serotonin receptors, 5-HT_{1D} and 5-HT_{2A}, showed a markedly different pattern of immunoreactivity, which may indicate that they simultaneously serve different functions in early embryogenesis.

Keywords: neurotransmitters, serotonin, serotonergic system, preimplantation embryos, mouse

УДК 612.88+57.045

ИНТЕРФЕРОН $\alpha 2b$ КАК МОДУЛЯТОР АФФЕРЕНТНОГО ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОГО СИНАПСА ВЕСТИБУЛЯРНОГО АППАРАТА ЛЯГУШКИ

© 2023 г. И. В. Рыжова^{a, *}, Е. А. Корнева^b, Т. В. Тобиас^a,
Е. А. Протасов^b, Е. А. Вершинина^a

^aИнститут физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^bИнститут экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: ireneryzhova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 13.05.2023 г.

Известно, что молекулы, вовлеченные в формирование врожденного и адаптивного иммунного ответа, могут модулировать синаптическую активность центральной нервной системы. Интерфероны широко используются в лечении онкологических и вирусных заболеваний. Несмотря на то что интерфероны относят к ототоксическим веществам, механизм их воздействия на синаптическую активность внутреннего уха остается неизученным. Целью работы явилось изучение модулирующего влияния интерферона $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$) на функцию афферентного глутаматергического синапса в условиях аппликации препарата в синаптическую зону. Эксперименты были проведены на изолированном вестибулярном аппарате лягушки при помощи электрофизиологического метода. IFN- $\alpha 2b$ (0.2–40 нг/мл) вызывал повышение фоновой импульсной активности афферентных волокон с последующим снижением частоты разрядов, как правило, в ответ на аппликацию высоких концентраций. IFN- $\alpha 2b$ уменьшал ответ на аппликацию глутамата (L-Glu) и модулировал частоту активности афферентных волокон, восстановленную L-Glu на фоне блока выделения медиатора из волосковых клеток в гипер- Mg^{2+} –гипо- Ca^{2+} -растворе, что предполагает постсинаптическое влияние интерферона. Представленные данные свидетельствуют о нейромодулирующем действии IFN- $\alpha 2b$ на синаптическую активность афферентного синапса вестибулярного аппарата.

Ключевые слова: провоспалительные цитокины, интерферон, вестибулярный аппарат, волосковая клетка, глутаматергический синапс, нейроиммунотомодуляция

DOI: 10.31857/S0233475523060087, EDN: GLDJXD

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система обеспечивает защиту организма от вторжения микроорганизмов и их патологического воздействия. Считают, что индукция интерферонов является первой линией защиты организма от разнообразных патогенов [1]. Развитие вирусной инфекции может сопровождаться изменением экспрессии генов различных классов интерферонов. Интерфероны- α/β , - γ и - λ подавляют репликацию ДНК и РНК вирусов и активируют клетки иммунной системы. Интерфероны обладают иммуномодулирующим действием, играют важную роль в процессах взаимодействия нервной и иммунной систем, запуская экспрессию цитокинов в клетках центральной нервной системы (ЦНС) при развитии патологических процессов различной этиологии [2].

Препараты провоспалительных цитокинов, к которым относятся и интерфероны, используют-

ся при лечении псориаза [3], онкологических заболеваний [4, 5], рассеянного склероза и таких вирусных инфекций, как грипп [6], гепатит С [7, 8], COVID-19 [9].

Применение интерферонов в лечебной практике широко освещено в научной литературе. Анализ клинических данных позволяет заключить, что при разных видах патологии применяется терапия интерферонами с существенным варьированием длительности лечения (дни–месяцы) и доз (от 1000 до 5000000 МЕ). Однако широкое применение интерферонов, особенно в высоких дозах, ограничивается такими тяжелыми побочными эффектами, как усталость, головная боль, гипертермия, озноб, миалгия, бессонница, депрессия, психоз и бессонница. Интерфероны оказывают выраженное побочное действие и на сенсорные функции, вызывая ретинопатию [10], острую потерю слуха, тиннитус и вертиго [11, 12].

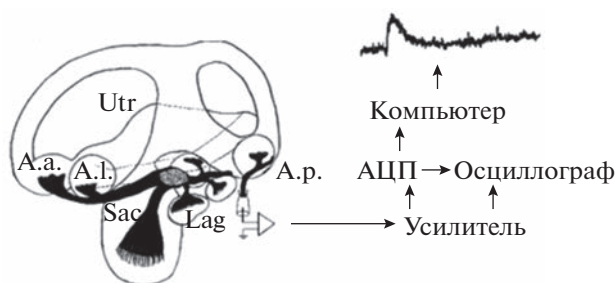


Рис. 1. Схема регистрации импульсной активности нерва, контактирующего с *ampulla posterior*, в изолированном вестибулярном аппарате лягушки. Utr — утрикулус, Sac — саккулус, Lag — лагена, A.a., A.l., A.p. — передняя, латеральная и задняя ампулы соответственно.

Несмотря на то что интерферон по клиническим данным признан ототоксическим препаратом, систематическое изучение его влияния на функцию внутреннего уха не проводилось. Задача настоящей работы состояла в исследовании влияния IFN- α 2b на активность афферентного глутаматергического синапса вестибулярного аппарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 49 изолированных вестибулярных аппаратах лягушек *Rana temporaria* ($n = 49$) в осенне-зимний период. Хрящевая капсула с вестибулярным аппаратом вскрывалась с сохранением всех структур внутреннего уха и отделялась от черепа в физиологическом растворе в чашке Петри. Препарат при комнатной температуре помещался в ванночку, непрерывно перфузируемую физиологическим раствором, максимально приближенным к составу перилимфы, в мМ: 117 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaHCO₃, 0.17 NaH₂PO₃·2H₂O, 1.8 CaCl₂, 2.5 глюкоза (pH 7.4). Ампулярный нерв заднего полукружного канала засасывался стеклянным электродом с диаметром кончика 100–300 мкм, заполненным физиологическим раствором. Импульсная активность регистрировалась с использованием усилителя переменного тока AM-Systems, Model 3000, преобразовывалась посредством аналого-цифрового преобразователя (АЦП) в прямоугольные импульсы длительностью 1.5 мс, которые контролировались на экранах двухлучевого осциллографа и компьютера онлайн и сохранялись при помощи оригинальной программы (рис. 1).

АЦП и компьютерная программа “Импульс”, с помощью которых проводилась регистрация множественной импульсной активности сенсорных волокон, контактирующих с рецепторными клетками заднего полукружного канала, разработаны и выполнены в лаборатории информационных технологий и математического моделирования Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Каждая точка записи представляла усредненное значение частоты афферентной импульсной активности, регистрируемой за 10 с. Для зрительного контроля импульсная активность подавалась параллельно на осциллограф С1-93. В каждом опыте проводилось предварительное тестирование препарата растворами L-Glu (50 мкМ, Sigma) или раствором с повышенным содержанием Mg²⁺ (рис. 2a). Аппликацию исследуемых растворов в синаптическую зону осуществляли методом внешней перфузии при помощи 6-канальной системы Warner Instrument Corporation WC-6. В экспериментах использовались растворы L-Glu в концентрации 50–100 мкМ и IFN- α 2b в концентрациях 0.2–40 нг/мл, разведенные в указанном выше физиологическом растворе (pH 7.4).

IFN- α 2b получали из аптечного препарата “Интерферон альфа-2b” (“Альтевир”, ООО Фармапарк), раствор в ампулах по 5000000 МЕ, путем очистки с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве стандарта для определения подлинности и концентрации IFN- α 2b использовали коммерческий препарат IFN-alpha 2b human (Sigma-Aldrich, SRP4595). Очистку и последующий анализ чистоты препарата IFN- α 2b выполняли на хроматографе высокого давления Agilent 1200 с использованием колонки Vydac C-18 218TP1010 250 мм длиной и 10 мм шириной. Препарат из ампул загружали на колонку с помощью петли 10 мкл, промывали раствором 30% ацетонитрила с 0.1% трифторуксусной кислотой и проводили элюцию градиентом концентрации ацетонитрила с 0.1% трифторуксусной кислотой от 30 до 60% за 10 мин со скоростью 4 мл/мин. Фракцию, содержащую пик IFN- α 2b, разбавляли в 3 раза дистиллированной водой и лиофилизировали. Лиофилизат растворяли в стерильном физиологическом растворе с 20 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.4, анализировали для определения концентрации вещества и подтверждения его подлинности на колонке Vydac C-18 218TP54 250 мм длиной и 4.6 мм шириной в градиенте концентрации ацетонитрила с 0.1% трифторуксусной кислотой от 30 до 60% за 30 мин со скоростью 1 мл/мин. Конечная концентрация IFN- α 2b в натрий-фосфатном буфере составила 0.2 мг/мл.

Для исследования взаимодействия IFN- α 2b с постсинаптическими глутаматными рецепторами использовали гипермagneвий-гипокальциевый раствор, содержащий 4 мМ Mg²⁺ и 0.1 мМ Ca²⁺ в мМ: 83.4 NaCl, 1.7 KCl, 3.4 NaHCO₃, 2.5 NaH₂PO₃·7H₂O, 0.1 CaCl₂, 4 MgCl₂·6H₂O, 2.5 глюкоза (pH 7.4), аппликация которого в синаптическую область вызывала прекращение фонового выделения глутамата волосковыми клетками. Растворы L-Glu (1 мМ) и L-Glu (1 мМ) с IFN- α 2b (40 нг/мл), применяемые в данных эксперимен-

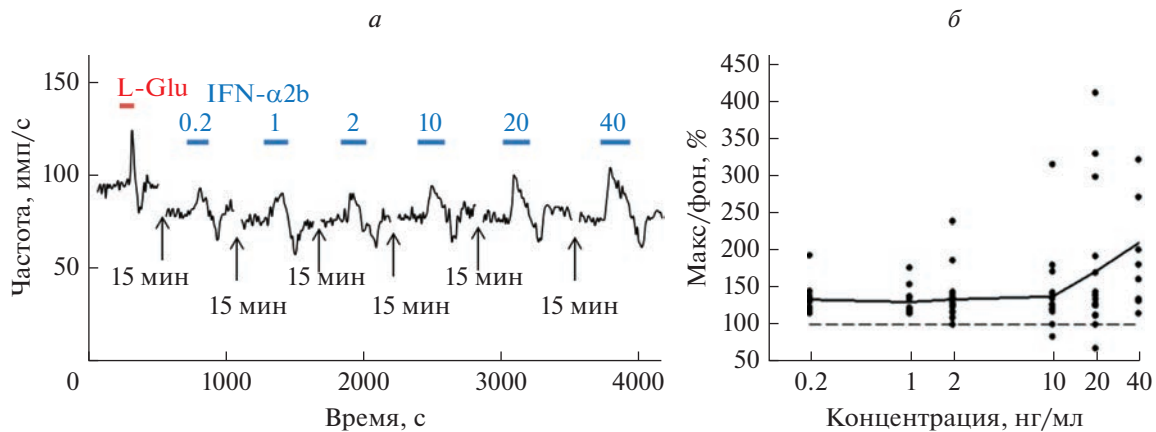


Рис. 2. Частота фоновой активности афферентных волокон, иннервирующих задний полукружный канал, при воздействии интерферона в различных концентрациях.

а – Оригинальная запись эксперимента. Горизонтальные линии – отметки аппликации IFN- $\alpha 2b$ в указанных концентрациях (нг/мл). Промежуток между аппликацией препарата составлял не менее 15 мин. *б* – Диаграмма рассеяния данных по всем опытам, отражающая средние значения изменения импульсной активности (сплошная линия, в % к фону) и разброс значений отдельных опытов относительно среднего при аппликации различных концентраций IFN- $\alpha 2b$. Горизонтальная пунктирная линия – уровень фоновой импульсации. По оси абсцисс – концентрация IFN- $\alpha 2b$ (нг/мл). По оси ординат – отношение максимального значения положительной фазы реакции при аппликации IFN- $\alpha 2b$ к частоте фоновой активности в % ($n = 12-21$).

тах, также готовились на основе гипермагниевого-гипокальциевого раствора (pH 7.4).

Влияние IFN- $\alpha 2b$ на уровень фоновой активности афферентных волокон оценивали как отношение максимального значения импульсной активности при аппликации IFN- $\alpha 2b$ к первоначальному уровню фоновой активности в процентах.

Воздействие L-Glu и L-Glu после аппликации IFN- $\alpha 2b$ оценивали в процентах как отношение Δ (разница между максимальной амплитудой ответа на аппликацию L-Glu и частотой импульсной активности в период, предшествующий его воздействию) к частоте импульсной активности в период, предшествующий подаче L-Glu.

$$\frac{\text{Макс. частота ответа (имп/с)} - \text{частота фон. имп. акт. перед аппликац. (имп/с)}}{\text{частота фон. имп. акт. перед аппликац. (имп/с)}} \cdot 100\%.$$

Последующий статистический анализ результатов проводили с нормированными данными с использованием t -теста, U-критерия Манна–Уитни и критерия Вилкоксона. Исследование влияния препаратов на импульсную активность проводили методами дисперсионного анализа для зависимых переменных (ANOVA RM), а также смешанного дисперсионного анализа (Mixed ANOVA) с последующими апостериорными сравнениями по Бонферрони при числе градаций фактора больше двух.

В ходе экспериментов оказалось, что величина ответа на аппликацию L-Glu на фоне интерферона зависит от направления изменения импульсной активности при аппликации самого интерферона. Статистическое подтверждение было получено с использованием корреляционного, кластерного (иерархический метод, between-groups linkage) и дискриминантного анализа.

Статистические решения принимали на 5% уровне значимости. Анализ данных проводился на основе программного комплекса “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS Inc).

Построение графиков изменения частоты импульсной активности во времени при действии IFN- $\alpha 2b$ осуществляли после окончания эксперимента на основании полученного цифрового материала с помощью программы MS-Excel и программы SigmaPlot 12.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние IFN- $\alpha 2b$ на фоновую активность афферентных волокон, контактирующих с задним полукружным каналом, исследовали при концентрациях 0.2, 1, 2, 10, 20 и 40 нг/мл (рис. 2).

Характер ответов на аппликацию IFN- $\alpha 2b$: скорость нарастания и динамика импульсной активности значительно варьировали от опыта к

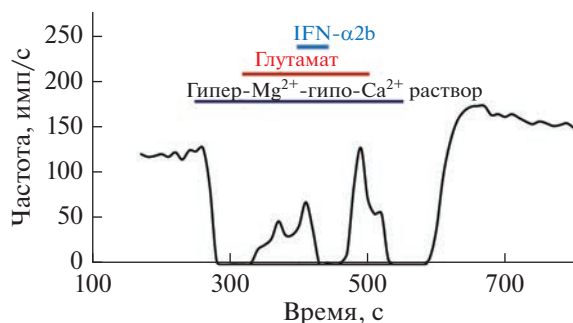


Рис. 3. Модулирующий эффект IFN- α 2b (40 нг/мл) постсинаптических глутаматных рецепторов после блока пресинаптической мембраны в гипер-Mg²⁺–гипо-Ca²⁺-растворе. Оригинальная запись эксперимента.

опыту. При этом средние значения изменения частоты фоновой активности при аппликации всех исследуемых концентраций IFN- α 2b значимо увеличивались по сравнению с уровнем фоновой активности. Различия (в %) между уровнем фоновой активности и максимальной частотой активности при аппликации различных концентраций интерферона, выявленные критерием Вилкоксона, были значимы и составляли для концентраций 0.2 нг/мл – $133.55 \pm 6.0\%$, $p = 0.018$; для 1 нг/мл – $130.2 \pm 5.85\%$, $p = 0.028$; для 2 нг/мл – $133.8 \pm 6.45\%$, $p = 0.001$; для 10 нг/мл – $137.69 \pm 11.68\%$, $p = 0.004$; для 20 нг/мл – $171.2 \pm 24.95\%$, $p = 0.021$; для 40 нг/мл – $184.9 \pm 16.1\%$, $p = 0.028$ (рис. 2б). В большинстве случаев при малых концентрациях (0.2–10 нг/мл) ответ характеризовался небольшим колебанием частоты фоновой активности в ходе перфузии синаптической области цитокином.

При аппликации IFN- α 2b в концентрациях 20–40 нг/мл после повышения частоты фоновой активности могла развиваться небольшая по амплитуде, но длительная негативная фаза ответа. При концентрациях IFN- α 2b 10–40 нг/мл уровень фоновой активности не всегда восстанавливался при длительной перфузии в физиологическом растворе.

Для исследования возможного влияния интерферона на постсинаптические структуры изучали влияние цитокина на активность постсинаптических глутаматных рецепторов. Синаптическую область перфузировали гипер-Mg²⁺–гипо-Ca²⁺-раствором, что приводило к прекращению выделения глутамата волосковыми клетками и, как следствие, к падению фоновой активности до нуля. Последующее добавление L-Glu (1 мМ) к гипер-Mg²⁺–гипо-Ca²⁺-раствору вызывало появление импульсной активности, обусловленной селективной активацией постсинаптических глутаматных рецепторов. Последующая добавка

IFN- α 2b (40 нг/мл) приводила к позитивно-негативному изменению восстановленного L-Glu уровня фоновой активности. Наблюдаемые реакции были обратимы и наблюдались в 7 опытах из 7 (рис. 3).

Высокая пластичность афферентного синапса вестибулярного эпителия обеспечивается совместным функционированием глутаматергической [13], опиатной [14], допаминергической [15] и холинергической [16, 17] систем.

Для того чтобы показать, что функция глутаматных рецепторов может быть подвержена модуляции при воздействии интерферона, сравнивали изменение частоты импульсной активности в ответ на аппликацию L-Glu в нормальном физиологическом растворе (тестовое предъявление) и на фоне действия IFN- α 2b (10 нг/мл). Для этого вначале синаптическую область в течение 1–1.5 мин перфузировали раствором, содержащим L-Glu (0.1 мМ), что сопровождалось увеличением частоты импульсной активности. После возвращения импульсной активности к исходному уровню в нормальном физиологическом растворе последовательно апплицировали IFN- α 2b (10 нг/мл, 2 мин), затем IFN- α 2b (10 нг/мл) совместно с L-Glu (0.1 мМ). Через 15 мин после окончания перфузии синаптической области раствором IFN- α 2b и L-Glu и отмывания препарата нормальным физиологическим раствором проводили контрольную аппликацию L-Glu (0.1 мМ) (рис. 4).

Результаты 12 опытов по исследованию влияния IFN- α 2b на амплитуду ответов, вызванных L-Glu, показали, что перфузия синаптической области IFN- α 2b приводила к модификации ответа L-Glu (ANOVA RM, $F(2,10) = 4.85$, $p = 0.034$, $\eta^2 = 0.492$) (рис. 4), а величины ответов на L-Glu, IFN- α 2b и L-Glu на фоне IFN- α 2b были высоко коррелированы ($r = 0.966$, $r = 0.976$ и $r = 0.97$ соответственно, $p < 0.001$). Апостериорные сравнения по Бонферрони давали значимые различия между эффектом влияния L-Glu и IFN- α 2b, $p = 0.037$. Аналогичные результаты получили при использовании критерия Фридмана и парного критерия Вилкоксона, $p = 0.009$ и $p = 0.012$ соответственно.

Как представлено на рис. 2б, увеличение средних значений при аппликации IFN- α 2b в концентрациях 20 и 40 нг/мл сопровождается значительным разбросом данных вокруг средних значений. А именно, в небольшой части опытов IFN- α 2b либо не увеличивал частоту фоновой активности афферентных волокон, либо вызывал небольшое (менее 10%) понижение частоты фоновой импульсной активности. Визуальный анализ изменения импульсной активности в ответ на воздействие L-Glu на фоне IFN- α 2b позволил предположить, что вектор модулирующего влияния цитокина на аппликацию L-Glu связан с направ-

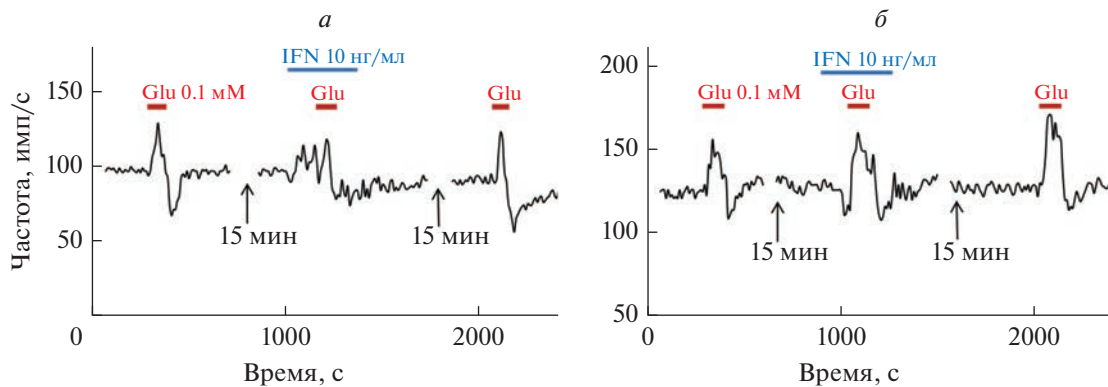


Рис. 4. Оригинальная запись двух опытов, иллюстрирующих: *a* – уменьшение ответа на аппликацию L-Glu на фоне увеличения уровня фоновой активности афферентных волокон при воздействии IFN- $\alpha 2b$; *б* – увеличение ответа на аппликацию L-Glu на фоне понижения частоты фоновой активности при аппликации IFN- $\alpha 2b$ в афферентных волокнах вестибулярного аппарата лягушки. Горизонтальные отметки над записью – время аппликации веществ, Glu – L-Glu, IFN – IFN- $\alpha 2b$.

ленностью влияния IFN- $\alpha 2b$ на уровень фоновой активности (рис. 4*a*, 4*б*). Если L-Glu апплицировали на фоне увеличения уровня фоновой активности, вызванной IFN- $\alpha 2b$, наблюдалось уменьшение величины ответа на воздействие L-Glu (рис. 4*a*). Если IFN- $\alpha 2b$ понижал уровень фоновой активности или не изменял его, то наблюдалось увеличение импульсной активности при аппликации L-Glu (рис. 4*б*).

Кластерный анализ выявил два кластера данных, значимо различающихся по характеру воздействия IFN- $\alpha 2b$ на частоту фоновой активности и по связанному с ним эффекту L-Glu (рис. 5). В дискриминантном анализе с выявленными кластерами в качестве групп при 100%-ной правильной классификации были получены значимые различия групповых средних по влиянию IFN- $\alpha 2b$ ($p = 0.009$) и L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$, $p < 0.001$.

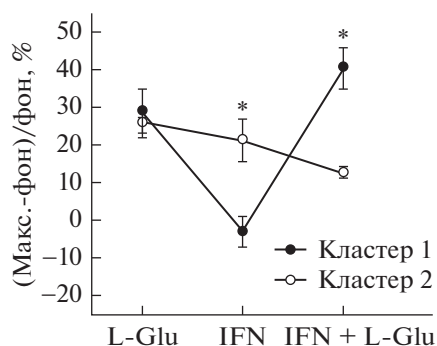


Рис. 5. Визуализация двух кластеров импульсной активности при воздействии IFN- $\alpha 2b$ (IFN) и L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$ (IFN + L-Glu). По оси ординат представлены средние значения переменных с ошибками, $M \pm SE$ в кластерах, звездочками обозначены значимые различия.

Применение двухфакторного смешанного дисперсионного анализа Mixed ANOVA подтвердило суммарную значимость изменения импульсной активности между кластерами 1 и 2 при воздействии L-Glu, IFN- $\alpha 2b$ и IFN- $\alpha 2b$ совместно с L-Glu ($F(2,20) = 19.2$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.657$). В кластерах также значимо различались изменения импульсной активности в ответ на аппликацию IFN- $\alpha 2b$ и зависящие от характера этих изменений ответы на воздействие L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$ ($F(2,20) = 12.1$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.548$).

Апостериорные сравнения выявили значимые различия в кластерах влияния на импульсную активность IFN- $\alpha 2b$ ($p = 0.009$) и влияния L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$ ($p < 0.001$). При этом в первом кластере, характеризующемся незначительным уменьшением частоты фоновой активности в ответ на аппликацию IFN- $\alpha 2b$, небольшое увеличение ответа L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$ по сравнению с величиной тестовой реакции на L-Glu было статистически незначимо. Напротив, во втором кластере, характеризующемся увеличением частоты фоновой активности при воздействии IFN- $\alpha 2b$, наблюдалось значимое уменьшение амплитуды ответа на L-Glu ($p = 0.048$) (рис. 5).

Совокупность представленных данных позволяет говорить о существовании нейроиммунотулирующего влияния цитокина в вестибулярном эпителии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерфероны представляют собой группу гормоноподобных молекул, которые в ЦНС могут синтезироваться и секретироваться макрофагами, моноцитами, Т-лимфоцитами, глияльными клетками и нейронами [18]. Показано, что у здоровых людей уровень цитокинов и хемокинов в

структурах внутреннего уха находится на крайне низком уровне. Однако при повышении уровня липополисахаридов и при патологии (болезни Меньера) наблюдается повышение уровня таких цитокинов и хемокинов, как IL-10, IL-1 β , IL-6, CCL5, CXCL1, IFN α 2 и CXCL5 [19]. Известно, что цитокины и хемокины оказывают модулирующее влияние на функции нервной системы. Сведения о нейроиммунотропном влиянии интерферонов на синаптические процессы внутреннего уха крайне ограничены.

В нашей работе впервые показано, что провоспалительный цитокин IFN- α 2b, относящийся к интерферонам I типа, может оказывать модулирующее влияние на активность афферентного глутаматергического синапса вестибулярного аппарата.

Действительно, значимое повышение уровня фоновой импульсной активности афферентного синапса под влиянием IFN- α 2b наблюдается уже при концентрации 0.2 нг/мл, что соответствует 268 пмоль/л и предполагает высокоаффинное связывание IFN- α 2b с мембранами вестибулярного эпителия, приводящее к изменению функционального состояния мембраны. Полученные нами доказательства высокой чувствительности глутаматергического синапса вестибулярного аппарата к IFN- α 2b находятся в соответствии с данными о специфическом высокоаффинном связывании интерферона с его рецепторами (IFN- α /bR) в культуре ткани мыши [20]. В наших опытах IFN- α 2b в диапазоне концентраций 0.2–10 нг/мл в одинаковой степени стимулировал фоновую импульсную активность, уровень которой восстанавливался в нормальном физиологическом растворе. Последующее увеличение концентраций IFN- α 2b (20 и 40 нг/мл) вызывало дальнейший рост частоты фоновой активности, который сопровождался увеличением разброса данных относительно среднего значения (рис. 2б). Действующие концентрации IFN- α 2b в наших опытах сопоставимы с концентрациями интерферона, оказывающими подавляющее действие на возбуждающую синаптическую передачу в нейронах задних рогов спинного мозга, где интерферон в концентрации 25 нг/мл оказывал депрессивное действие путем активации специфических рецепторов интерферона [21].

Согласно данным литературы, интерферон может оказывать как позитивное, так и негативное влияние на уровень фоновой активности не только в разных структурах ЦНС, но и в пределах одной и той же структуры. А именно, интерферон в 92% случаев повышал, но в 8% случаев понижал частоту импульсной активности в нейронах соматосенсорной коры. Интерферон стимулировал активность нейронов в гиппокампе и в амигдале в 78% случаях, но понижал в 22%. Интерферон

в 75% случаев подавлял активность нейронов вентромедиальных ядер таламуса. Авторы отмечают, что интерферон не изменял латентный период, скорость возрастания возбуждающих и тормозных процессов [22]. Интерферон- α в концентрации 300 U/мл ингибировал вызванные L-Glu возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) и предотвращал долговременную потенциацию, индуцированную высокочастотной тетанической стимуляцией. Интерферон- α значительно понижал вызванную L-Glu амплитуду ВПСП, уменьшал деполяризацию, вызванную локальным применением L-Glu, но не модифицировал деполяризацию, вызванную NMDA [23].

Известно, что фоновая активность афферентных волокон обусловлена высвобождением L-Glu из волосковых клеток [13] и активацией AMPA-рецепторов постсинаптической мембраны [24]. Учитывая тот факт, что IFN- α 2b в наших опытах увеличивал частоту фоновой активности афферентных волокон, можно предположить, что цитокин оказывает модулирующее действие посредством активации AMPA-рецепторов.

Согласно данным литературы [13–15, 17], функция глутаматергического синапса может модулироваться на пре- и постсинаптическом уровне. На пресинаптическом уровне это выражается в увеличении или уменьшении выделения медиатора базальной мембраной волосковой клетки. На постсинаптическом уровне — в изменении чувствительности постсинаптических глутаматных рецепторов. Принимая во внимание тот факт, что квантовое высвобождение глутамата из пресинаптической мембраны афферентного синапса является Ca^{2+} -зависимым процессом [25, 26], а Mg^{2+} является антагонистом Ca^{2+} , изучали возможность модулирующего влияния интерферона на постсинаптические рецепторы L-Glu в условиях блока выделения медиатора из пресинаптической мембраны при высокой концентрации катионов Mg^{2+} . В этих экспериментальных условиях импульсная активность, вызванная действием L-Glu при блоке выделения медиатора катионами Mg^{2+} , отражает устойчивую изолированную активацию рецепторов глутамата постсинаптической мембраны. Оказалось, что постсинаптическая импульсная активность афферентных волокон, вызванная аппликацией L-Glu, претерпевала позитивно-негативные изменения при воздействии IFN- α 2b. Вследствие того, что в данной серии экспериментов участие пресинаптических механизмов выделения медиатора блокируется катионами Mg^{2+} , можно утверждать, что именно постсинаптические глутаматные рецепторы подвержены модулирующему влиянию интерферона. В то же время нельзя отрицать и возможность пресинаптического влияния цитокина, модули-

рующего выделение глутамата из базальной мембраны волосковой клетки.

Для того чтобы показать, что именно рецепторы глутамата (но, например, не мускариновые рецепторы ацетилхолина, активация которых также увеличивает уровень фоновой активности афферентных волокон) были подвержены нейромодулирующему влиянию цитокина, было изучено влияние интерферона на изменение частоты импульсной активности при аппликации L-Glu. Как видно из рис. 2б, аппликация высоких доз IFN- $\alpha 2b$ в синаптическую область вызывает не только увеличение среднего значения частоты фоновой активности афферентных волокон, но и сопровождается увеличением разброса данных относительно среднего значения. В четверти опытов аппликация IFN- $\alpha 2b$ либо не меняла уровень фоновой активности афферентных волокон, либо незначительно его понижала. Статистический анализ подтвердил гипотезу о том, что вектор модулирующего влияния интерферона на амплитуду ответов L-Glu зависит от характера воздействия цитокина на фоновую активность. Если L-Glu апплицировали при возбуждающем влиянии интерферона, наблюдалось значимое уменьшение амплитуды ответа на L-Glu относительно нового, цитокином созданного уровня. Напротив, в меньшинстве опытов при неизменном уровне фоновой активности или его незначительном ингибировании наблюдалось усиление возбуждающего ответа L-Glu, но это увеличение оказалось статистически незначимо.

Можно предположить, что изменение частоты импульсной активности в ответ на аппликацию глутамата в присутствии модулирующего агента зависит от характера фоновой импульсной активности, измененной при действии модулирующего вещества (например, интерферона). Эти результаты находятся в соответствии с гипотезой о том, что фоновая и вызванная импульсная активность глутаматергического синапса вестибулярного аппарата опосредуются за счет различных механизмов [13]. Представленные данные указывают на то, что провоспалительный цитокин интерферон I типа может рассматриваться в качестве модулятора импульсной активности в афферентном глутаматергическом синапсе вестибулярного аппарата.

Согласно данным литературы, в ЦНС возбуждающее [27] и депрессивное влияние [21, 23] интерферона реализуется через различные механизмы. Например, интерферон связывается с опиатными рецепторами и с рецепторами интерферона [28, 29], уменьшает высвобождение глутамата из пресинаптической мембраны [21], ингибирует GluN2A-субъединицу NMDA-рецептора без участия классического STAT1-пути [30] и экспрессию переносчика глутамата GLAST [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые показано, что импульсный поток от вестибулярных органов в ЦНС модифицируется интерфероном в зависимости от концентрации цитокина. Такие свойства интерферона делают его одним из возможных кандидатов в нейроиммунномодуляторы афферентной синаптической передачи в периферических структурах вестибулярной системы.

Механизмы влияния интерферона в вестибулярных органах требуют пристального изучения в связи с особенностями морфологического строения и функционирования вестибулярного эпителия. В частности, необходимо ответить на вопросы: какие типы глутаматных рецепторов являются мишенью интерферона, участвует ли опиоидная система в модулирующем влиянии цитокина, воздействует ли интерферон на эфферентную систему внутреннего уха, изменяется ли влияние эфферентной системы на функции глутаматергического синапса в присутствии интерферона. В связи с отсутствием в вестибулярном эпителии глии, играющей ключевую роль в механизмах влияния интерферона в ЦНС, предстоит опровергнуть или подтвердить присутствие рецепторов интерферона в сенсорном эпителии и идентифицировать их локализацию. Эффект воздействия высоких концентраций интерферона на синаптические процессы вестибулярной периферии требует особого изучения в связи с необходимостью уменьшения рисков ототоксических осложнений при разработке схем терапевтического лечения. Данные имеют также фундаментальное значение для понимания механизмов участия интерферонов в процессах взаимодействия нервной и иммунной систем в структурах внутреннего уха.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Госпрограммы ГП-47 “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

Соответствие принципам этики. При проведении исследований мы руководствовались этическими принципами, изложенными в “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang B.X., Fish E.N. 2019. Global virus outbreaks: Interferons as 1st responders. *Semin. Immunol.* **43**, 101300. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101300>
2. Mehta S., Mukherjee S., Balasubramanian D., Chowdhary A. 2014. Evaluation of neuroimmunomodulatory activity of recombinant human interferon α . *Neuroim-*

- munomodulation*. 2014. **21** (5), 250–256.
<https://doi.org/10.1159/000357309>
3. Zhang L.J. 2019. Type1 interferons potential initiating factors linking skin wounds with psoriasis pathogenesis. *Front. Immunol.* **10**, 1440.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01440>
 4. Lasfar A., Abushahba W., Balan M., Cohen-Solal K.A. 2011. Interferon Lambda: A new sword in cancer immunotherapy. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, **349575**.
<https://doi.org/10.1155/2011/349575>
 5. Stiff A., Carson W. 2015. Investigations of interferon-lambda for the treatment of cancer. *J. Innate Immun.* **7** (3), 243–250.
<https://doi.org/10.1159/000370113>
 6. Klinkhammer J., Schnepf D., Ye L., Schwaderlapp M., Gad H.H., Hartmann R., Garcin D., Mahlaköiv T., Staeheli P. 2018. IFN- λ prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. *eLife*. **7**, e33354.
<https://doi.org/10.7554/eLife.33354>
 7. Smith K.J., Norris S., O'Farrelly C., O'Mara S.M. 2011. Risk factors for the development of depression in patients with hepatitis C taking interferon- α . *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **7**, 275–292.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S13917>
 8. Udina M., Castellví P., Moreno-España J., Navinés R., Valdés M., Fornis X., Langohr K., Solà R., Vieta E., Martín-Santos R. 2012. Interferon-induced depression in chronic hepatitis C: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Psychiatry*. **73** (8), 1128–1138.
<https://doi.org/10.4088/JCP.12r07694>
 9. Haji Abdolvahaba M., Moradi-Kalbolandi S., Zarei M., Bose D., Majidzadeh-A K., Farahmand L. 2021. Potential role of interferons in treating COVID-19 patients. *Int. Immunopharmacol.* **90**, 107171.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107171>
 10. Medhat E., Esmat G., Hamza E., Aziz A.A., Fathalah W.F., Darweesh S.K., Zakaria Z., Mostafa S. 2016. Ophthalmological side effects of interferon therapy of chronic hepatitis C. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* **5** (3), 209–216.
 11. Mendes-Corrêa M.C.J., Bittar R.S., Salmito N., Oiticica J. 2011. Pegylated interferon/ribavirin-associated sudden hearing loss in a patient with chronic hepatitis C in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **15** (1), 87–89.
 12. Sharifian M.R., Kamandi S., Sima H.R., Zaringham M.A., Bakhshae M. 2013. INF- α and ototoxicity. *Biomed. Res. Int.* 2013, **295327**.
<https://doi.org/10.1155/2013/295327>
 13. Guth P.S., Perin P., Norris C.H., Valli P. 1998. The vestibular hair cells: Post-transductional signal processing. *Prog. Neurobiol.* **54** (2), 193–247.
 14. Vega R., Soto E. 2003. Opioid receptors mediate a post-synaptic facilitation and a presynaptic inhibition at the afferent synapse of axolotl vestibular hair cells. *Neuroscience*. **118** (1), 75–85.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00971-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00971-5)
 15. Andrianov G.N., Ryzhova I.V., Tobias T.V. 2009. Dopaminergic modulation of afferent synaptic transmission in the semicircular canals of frog. *Neurosignals*. **17** (3), 222–228.
 16. Holt J.C., Jordan P.M., Lysakowski A., Shah A., Barsz K., Contini D. 2017. Muscarinic acetylcholine receptors and M-currents underlie efferent-mediated slow excitation in calyx-bearing vestibular afferents. *J. Neurosci.* **37** (7), 1873–1887.
 17. Poppi L.A., Holt J.C., Lim R., Brichta A.M. 2020. A review of efferent cholinergic synaptic transmission in the vestibular periphery and its functional implications. *J. Neurophysiol.* **123** (2), 608–629.
<https://doi.org/10.1152/jn.00053.2019>
 18. Farrar W.L., Hill J.M., Harel-Bellan A., Vinocour M. 1987. The immune logical brain. *Immunol. Rev.* **100**, 361–378.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1987.tb00539.x>
 19. Flook M., Frejo L., Gallego-Martinez A., Martin-Sanz E., Rossi-Izquierdo M., Amor-Dorado J.C., Soto-Varela A., Santos-Perez S., Batuecas-Caletrio A., Espinosa-Sanchez J.M., Pérez-Carpena P., Martínez-Martínez M., Aran I., Lopez-Escamez J.A. 2019. Differential proinflammatory signature in vestibular migraine and meniere disease. *Front. Immunol.* **10**, 1229.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01229>
 20. Cohen B., Novick D., Barak S, Rubinstein M. 1995. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol. Cell. Biol.* **15** (8), 4208–4214.
<https://doi.org/10.1128/MCB.15.8.4208>
 21. Liu C.C., Gao Y.J., Luo H., Berta T., Xu Z.Z., Ji R.R., Tan P.H. 2016. Interferon alpha inhibits spinal cord synaptic and nociceptive transmission via neuronal-gli-al interactions. *Sci. Rep.* **6**, 34356.
<https://doi.org/10.1038/srep34356>
 22. Dafny N., Prieto-Gomez B., Dong W.Q., Reyes-Vazquez C. 1996. Interferon modulates neuronal activity recorded from the hypothalamus, thalamus, hippocampus, amygdala and the somatosensory cortex. *Brain Res.* **734** (1–2), 269–274.
 23. Mendoza-Fernández V., Andrew R.D., Barajas-López C. 2000. Interferon-alpha inhibits long-term potentiation and unmasks a long-term depression in the rat hippocampus. *Brain Res.* **885** (1), 14–24.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02877-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02877-8)
 24. Bonsacquet J., Brugeaud A., Compan V., Desmadryl G., Chabbert C. 2006. AMPA type glutamate receptor mediates neurotransmission at turtle vestibular calyx synapse. *J. Physiol.* **576** (Pt. 1), 63–71.
 25. Sterling P., Matthews G. 2005. Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci.* **28**, 20–29.
 26. Safieddine S., El-Amraoui A., Petit C. 2012. The auditory hair cell ribbon synapse: From assembly to function. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**, 509–528.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113705>
 27. Qin Z.F., Hou D.Y., Fang Y.Q., Xiao H.J., Wang J., Li K.C. 2012. Interferon-alpha enhances excitatory transmission in substantia gelatinosa neurons of rat spinal cord. *Neuroimmunomodulation*. **19** (4), 235–240.
<https://doi.org/10.1159/000335167>
 28. Панченко Л.Ф., Алябьева Т.Н., Малиновская В.В., Балашов А.М. 1987. Взаимодействие альфа-интерферона с опиатными рецепторами в мозге крыс. *Бюлл. экпер. биол. мед.* **104** (7), 87–89.
 29. Wang J.Y., Zeng X.Y., Fan G.X., Yuan Y.K., Tang J.S. 2006. mu- but not delta- and kappa-opioid receptor

- mediates the nucleus submedius interferon- α -evoked antinociception in the rat. *Neurosci. Lett.* **397** (3), 254–258.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.12.046>
30. Di Filippo M., Tozzi A., Sara Arcangeli S., de Iure A., Durante V., Di Gregorio M., Gardoni F., Calabresi P. 2016. Interferon- $\beta 1a$ modulates glutamate neurotransmission in the CNS through CaMKII and GluN2A-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology*. **100**, 98–105.
31. Hosseini S., Michaelsen-Preusse K., Grigoryan G., Chhatbar C., Kalinke U., Korte M. 2020. Type I interferon receptor signaling in astrocytes regulates hippocampal synaptic plasticity and cognitive function of the healthy CNS. *Cell Rep.* **31** (7), 107666.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107666>

Interferon $\alpha 2b$ As a Modulator of the Afferent Glutamatergic Synapse of the Frog Vestibular Apparatus

I. V. Ryzhova^{1, *}, E. A. Korneva², T. V. Tobias¹, E. A. Protasov², E. A. Vershinina¹

¹*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia*

²*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia*

*e-mail: ireneryzhova@mail.ru

Reportedly, the innate and adaptive immunity molecules can modulate the synaptic activity of the central nervous system. Interferons are widely used in the treatment of oncological and viral diseases. Even though interferons are classified as ototoxic substances, the mechanism of their effect on the synaptic activity of the inner ear remains unexplored. Here, we analyzed modulating influences of interferon $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$) on the function of afferent glutamatergic synapse in the conditions of drug application to the synaptic zone. The experiments were performed on the isolated vestibular apparatus of a frog (*Rana temporaria*) using an electrophysiological method. IFN- $\alpha 2b$ (0.2–40 ng/mL) caused an increase in the background pulse activity of afferent fibers, followed by a decrease in the frequency of discharges, usually at high concentrations of the interferon. Besides, IFN- $\alpha 2b$ decreased the glutamate (L-Glu) evoked response and modulated the level of afferent fiber activity restored by L-Glu under the conditions of blockade of the glutamate release from hair cells in hyper-Mg²⁺ and hypo-Ca²⁺ solution. This suggests the postsynaptic effect of IFN- $\alpha 2b$. The presented data indicate the neuromodulating effect of interferon on the synaptic activity of the afferent synapse of the vestibular apparatus.

Keywords: pro-inflammatory cytokines, interferon, vestibular apparatus, hair cell, glutamatergic synapse, neuroimmunomodulation

УДК 577.352.33:577.115

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР ХЛОРОПЛАСТОВ ПШЕНИЦЫ

© 2023 г. И. С. Капустина^а, В. В. Гурина^а, Е. В. Спиридонова^{а, *}, Н. В. Озолина^а

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

*e-mail: yatakol@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

При исследовании рафтовых структур мембран хлоропластов пшеницы, выявленных ранее в зоне 15% сахарозы после высокоскоростного центрифугирования, была обнаружена дополнительная зона опалесценции в области 5% сахарозы. Анализ состава стерина и жирных кислот липидов этой зоны в сравнении с зоной рафтов и мембран хлоропластов показал, что в этой зоне также могут присутствовать рафтовые структуры. Это говорит о том, что мембраны хлоропластов пшеницы могут содержать два типа рафтовых структур.

Ключевые слова: хлоропласты, рафты, жирные кислоты, стерины

DOI: 10.31857/S0233475523060051, **EDN:** FMXCTT

ВВЕДЕНИЕ

Пшеница как продовольственная культура – один из основных источников энергии для человека и животных [1]. Ее урожайность во многом зависит от продуктивности фотосинтеза хлоропластов [2]. Очевидно, что эффективность фотосинтеза зависит от того, как устроена мембранная инфраструктура хлоропластов. В связи с чем изучение мембранных структур хлоропластов пшеницы является актуальной задачей.

Хлоропласты имеют сложную структуру. Внешняя оболочка хлоропласта состоит из двух липидных мембран, а внутреннее пространство (строму) пронизывают удлинённые мембраны (ламеллы), которые образуют замкнутые уплощенные пузырьки – тилакоиды. Известно, что при адаптации растений к холоду происходит перестройка мембранных элементов хлоропластов, а именно увеличивается общее количество тилакоидов, что может быть одним из факторов повышения устойчивости растений к холоду [3]. Основу мембран хлоропластов составляет липидный бислой, в который встроены белковые комплексы [4]. Липидный бислой служит не только “изолятором”, отделяющим внутреннее пространство тилакоидов (люмен) от стромы, но также является средой, в которой диффундируют молекулы пластохинона. Липиды участвуют в поддержании димерной структуры пигмент-белковых комплексов ФС1 и ФС2 [5]. В последнее время доказано, что липиды мембран образуют доменные структуры, которые

называют рафтами. По определению рафты – это специфические области мембраны, плавающие на поверхности фосфолипидного бислоя (от англ. lipid raft). Липидный и белковый состав рафтов зависят от особенностей мембраны и от условий среды, в которой находятся организмы. К рафтообразующим липидами относят стерины, сфинголипиды и глицеролипиды с насыщенными жирными кислотами [6]. Известно, что рафтовые структуры принимают участие во многих клеточных процессах (передача сигнала, эндоцитоз, импорт ДНК, участие в механизмах защиты растений от неблагоприятных факторов) [7–9]. Наименее исследованы доменные структуры в мембранах хлоропластов. Возможно, это связано с их сложной структурой. Недавно проведено изучение липидного профиля микродоменов хлоропластов галофитов [9]. Ранее нами были начаты исследования рафтов мембран хлоропластов пшеницы, и белок-липидные микродомены были обнаружены после высокоскоростного центрифугирования сахарозного градиента в области 15% сахарозы [10]. В настоящем исследовании при получении рафтовых структур была обнаружена дополнительная зона опалесценции в области 5% сахарозы, что может свидетельствовать о присутствии рафтовых микродоменов. Цель данного исследования состояла в изучении характеристик новой опалесцирующей зоны и сравнении ее с известными рафтовыми структурами мембран хлоропластов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали яровую пшеницу сорт Новосибирская 29. Растения выращивали в климатической камере до первого настоящего листа. Условия выращивания: температура воздуха 22°C, фотопериод 16/8 день/ночь. Освещенность 300 мкмоль/м² с⁻¹. Далее выделяли хлоропласты типа В (неразрушенные хлоропласты) с помощью метода дифференциального центрифугирования. Контроль чистоты фракций хлоропластов и оценку их интактности проводили с использованием инвертированного биологического микроскопа ("Axio observer Z1", Carl Zeiss, Германия) [11, 12]. Для получения липидных рафтов суспензию хлоропластов солибилизировали 1% тритоном X-100 30 мин при 4°C, наносили на градиент сахарозы 35–25–15–5% и центрифугировали при 200000 g в течение 2 ч. После центрифугирования в области 5 и 15% градиента сахарозы были выявлены опалесцирующие зоны (рис. 1). Известно, что ранее рафты хлоропластов галофитов и пшеницы были обнаружены в зоне 15% сахарозы [10, 13]. Опалесцирующая зона в области 5% сахарозы градиента ранее не исследовалась. Поэтому для настоящего исследования были взяты обе опалесцирующие зоны (5 и 15%) и суспензия хлоропластов в качестве контроля.

Общие липиды экстрагировали модифицированным методом Фолча [14]. Стерины анализировали с помощью одномерной ТСХ с использованием системы растворителей для нейтральных липидов: гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота (80 : 20 : 1). Хроматограммы обрабатывали 10% серной кислотой и нагревали до 105°C [15]. Стерины, элюированные с пластинок хлороформом и этилацетатом, подвергали силилированию гексаметилдисилазаном и N,O-бис(триметилсилил)ацетамидом. Образовавшиеся триметилсилильные производные стерина были проанализированы с помощью хроматомасс-спектрометра GC–MS 7000/7890A TripleQuad, Agilent Technologies (США). Температура испарителя 250°C, источника ионов 230°C, детектора 150°C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, 280°C. Диапазон сканирования 41–550 а.е.м. Для разделения компонентов использовали капиллярную колонку HP-5MS (30 м × 0.250 мм × 0.50 мкм), Agilent Technologies (США). Неподвижная фаза – 5% фенилметилполисилоксан. Градиент температуры: 2 мин при 150°C, затем со скоростью 10°C/мин температуру повышали до 300°C и выдерживали в течение 15 мин. Подвижная фаза – гелий, скорость потока газа – 1 мл/мин. Разделение потоков 5 : 1. Масс-спектрометр – квадруполь, способ ионизации – электронный удар (EI) (энергия ионизации 70 эВ). Идентификацию стерина проводили путем сравнения их времени удержания со стандар-

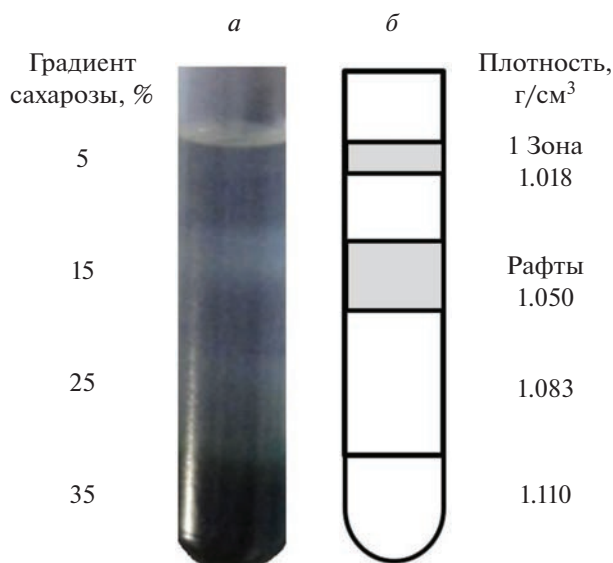


Рис. 1. Фотография (а) и схема (б) распределения суспензии хлоропластов, солибилизированной 1% тритоном X-100, после центрифугирования (200000 g, 2 ч) в градиенте плотности сахарозы (5–35%).

тами, а также использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7. Количественный анализ был проведен с использованием калибровочной кривой по холестерину, кампестерину, стигмастерину (Sigma-Aldrich, США) и β-ситостерину (European pharmacopoeia reference standard, Франция) [16].

Метилловые эфиры жирных кислот получали по методу [17]. К экстракту липидов после удаления растворителя добавляли 1% метанольный раствор серной кислоты и нагревали на водяной бане при 60°C в течение 30 мин. После охлаждения трижды экстрагировали метилловые эфиры ЖК гексаном (3 × 5). Анализ метилловых эфиров ЖК тонопласта проводили с использованием хроматомасс-спектрометра Agilent technology 5973N/6890N MSD/DS (США). Детектор – масс-спектрометр – квадруполь, способ ионизации – электронный удар (EI), энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30 м × 250 мкм × 0.50 мкм). Неподвижная фаза – полиэтиленгликоль. Подвижная фаза – гелий; скорость потока газа – 1 мл/мин. Температура испарителя 250°C, источника ионов 230°C, детектора 150°C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром – 280°C. Диапазон сканирования 41–450 а.е.м. Объем вводимой пробы – 1 мкл, разделение потоков 5 : 1. Хроматографирование проводили в изотермическом режиме при 200°C.

Для идентификации пиков метилловых эфиров жирных кислот использовали стандарты метило-

вых эфиров (Sigma, USA) и данные библиотеки масс-спектров NIST 05 [17]. Рассчитывали сумму ненасыщенных жирных кислот (Σ ННЖК), сумму насыщенных жирных кислот (Σ НЖК).

Для проведения статистической обработки данных использовали программные пакеты Microsoft Excel и SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили не менее чем в 3–5 независимых повторностях. Полученные данные представляли в виде средней арифметической (M) или медианы (Me), а разброс значений – в виде стандартного отклонения ($\pm S.D.$) или интерквартильной широты [25 процентиль – 75 процентиль]. С помощью критерия Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk) проверяли нормальность распределения (ГОСТ Р ИСО 5479–2002) [18]. При нормальном распределении для доказательства наличия значимых различий между средними применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних по методу LSD (Least Significant Difference) Фишера – метод группирования выборок с наименьшей значимой разностью. Если распределение отличалось от нормального, для доказательства наличия значимых различий между медианами использовали Н-критерий Краскела–Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента–Ньюмена–Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в мембранах хлоропластов высокое содержание белка и низкое содержание липида. Поэтому, чтобы выделить липидные рафты из мембран хлоропластов, под градиент сахарозы вносили большое количество материала – 3 мг по белку, в то время как при выделении рафтовых структур из тонопласта было достаточно 0.7 мг по белку, так как в вакуолярной мембране липидов больше, чем белков.

После высокоскоростного центрифугирования в градиенте сахарозы различной плотности была обнаружена ожидаемая опалесценция в области 15% сахарозы, свидетельствующая о наличии рафтов хлоропластов [10, 13]. Дополнительно выявлена опалесценция в области 5% (зона 1) сахарозы (рис. 1). Возможно, данная опалесценция выявилась из-за большого количества внесенного материала. Опалесцирующая зона в области 5% сахарозы представляла интерес для дальнейшего исследования. Известно, что опалесценция часто связана с рафтовыми структурами, получаемыми методом с использованием детергента [19, 20]. Для проверки наличия в зоне опалесценции 5% сахарозы рафтовых структур проводили ее сравнение с рафтовыми структурами из зоны опалесценции в области 15% сахарозы по показателям, характерным для рафтовых структур.

Липиды рафтовых микродоменов отличаются высокой степенью упорядоченности ацильных остатков высших жирных кислот (ЖК) (жидкоупорядоченная фаза Lo), а сами рафты функционируют как агенты для концентрирования мембранных и мембран-ассоциированных белков [21]. Анализ жирнокислотного состава липидов опалесцирующих зон показал, что доля насыщенных ЖК составляла 63.5% в зоне из 5% сахарозы и 79.8% в рафтах из зоны 15% сахарозы, в то время как в самой фракции хлоропластов этот показатель составлял 24.4% (табл. 1). Подобная тенденция наблюдалась в рафтах хлоропластов различных видов галофитов, насыщенность липидов варьировала от 56 до 62%, тогда как в самой фракции хлоропластов доля насыщенных ЖК составляла от 25 до 45% от суммы ЖК [22]. В опалесцирующих зонах основной насыщенной ЖК является пальмитиновая ($C16:0$). Ее количество практически в 2 раза больше чем в хлоропластах, из которых были выделены рафтовые структуры (табл. 1). Липидные рафты – мобильные структуры, для выполнения функций в клетке осуществляется их сборка, и в них “заякоривается” необходимый белок, возможно, это происходит с участием пальмитиновой кислоты. Предполагается, что $C16:0$ может образовывать тиюэфирную связь с цистеином или сложноэфирную с остатками серина и треонина и таким образом выполнять роль мембранного “якоря” для белков. Кроме этого, относительное содержание $C16:0$ в составе липидов определяет микровязкость мембран [23].

Интересно, что в исследуемых зонах содержание арахидиновой ЖК ($C20:0$) больше в 6 и 9 раз по сравнению с фракцией хлоропластов (табл. 1). Как известно, $C20:0$ относится к ЖК с очень длинной цепью (ЖКОДЦ). ЖКОДЦ одновременно находятся в обеих частях липидного бислоя, тем самым стабилизируя сильно изогнутые участки клеточных мембран [24].

Можно отметить, что в обеих опалесцирующих зонах количество миристиновой ЖК ($C14:0$) в разы больше (2.9–5.9%), чем во фракции хлоропластов (0.74), из которых были получены опалесцирующие зоны. Также в исследуемых нами зонах наблюдалось более высокое по сравнению с фракцией хлоропластов содержание стеариновой ЖК ($C18:0$). Увеличение в рафтах количества насыщенных ЖК, приводило, соответственно, к снижению количества ненасыщенных ЖК, особенно $C18:3(n-3)$ с 52 до 18% в зоне 1 и до 6% в зоне рафтов. Подобное снижение наблюдалось в рафтах хлоропластов галофитов с 30% до следовых количеств [22]. Кроме того, отмечено, что в зоне 1 присутствуют $C16:1(n-7)$ и $C16:1(n-5)$ в отличие от зоны рафтов 15% градиента сахарозы.

Таблица 1. Жирнокислотный состав липидов суспензии хлоропластов и полученных из нее микродоменов (% от суммы ЖК)

Жирная кислота	Хлоропласты	Зона 1	Рафты
C14:0 , миристиновая	0.7 [0.7; 1]	3 [3; 3.7]*	5.9 [5.4; 5.9]*
C15:0 , пентадекановая	0.2 [0.2; 0.4]	0.7 [0.6; 0.8]*	1.4 [1.3; 1.5]*
C16:0 , пальмитиновая	19.2 [19.1; 27.7]	33.7 [33.3; 35]	47.3 [46; 48]*
C16:1(n-9) , пальмитолеиновая	0.2 [0.2; 0.2]	0.7 [0.6; 0.8]*	1.7 [1.5; 1.8]*
C16:1(n-7) , пальмитолеиновая	0.2 [0.2; 0.3]	0.6 [0.6; 0.6]*	
C16:1(n-5) , пальмитолеиновая	1.4 [1.3; 1.6]	0.4 [0.4; 0.4]*	
C17:0 , маргариновая	0.2 [0.2; 0.3]	0.5 [0.5; 0.5]*	0.8 [0.7; 0.9]*
C18:0 , стеариновая	3 [3; 4]	11.8 [11.6; 12.3]*	16.8 [16.6; 17.7]*
C18:1(n-9) , олеиновая	2.5 [2.5; 2.9]	9 [7.9; 9.2]*	8.4 [7.7; 8.4]*
C18:1(n-7) , <i>цис</i> -вакценовая	1 [1; 1.1]	1.3 [1.2; 1.4]	0.6 [0.5; 0.7]*
C18:2(n-6) , линолевая	14.6 [12.5; 15.1]	6.3 [6.2; 6.3]*	3.2 [3.1; 3.7]*
C18:2(n-4)	0.4 [0.3; 0.5]		
C18:3(n-3) , α -линоленовая	52 [43.7; 52.1]	18.4 [18.1; 20.1]*	6.3 [6.1; 6.5]*
C18:4(8.11.14.17)	2.6 [2.0; 2.7]		
C20:0 , арахидовая	0.5 [0.4; 0.6]	4.6 [4.3; 4.6]*	2.9 [2.9; 3]*
C20:1(n-9) , эйкозеновая	0.1 [0.1; 0.2]		
C20:3(7.14.17)	0.2 [0.2; 0.3]		
C22:0 , бегеновая	0.8 [0.8; 0.9]	8.3 [7.5; 8.4]	5.2 [5.2; 5.4]*
Σ НЖК	24.4 [24.3; 34.7]	63.5 [62.9; 63.6]*	79.8 [79.5; 80.6]*
Σ ННЖК	75.6 [65.3; 75.8]	36.5 [36.5; 37.1]*	20.2 [19.5; 20.5]*

Примечание: $n = 3-5$. Ме [25 процентиль – 75 процентиль], * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью метода Н-критерия Краскела–Уоллиса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Если сравнить исследуемые зоны с фракцией хлоропластов, то в них отсутствовали такие ЖК, как C18:2(n-4), C20:1(n-9), C20:3(7.14.17).

В настоящее время показано, что стеринны являются одним из основных классов рафтообразующих липидов микродоменов хлоропластов [6]. Полученные нами результаты показали, что сумма общих стериннов (свободные стеринны + эфиры стериннов) в опалесцирующих зонах больше чем в мембранах, из которых они получены (табл. 2).

Причем опалесцирующая зона 1 и зона рафтов мало отличались по сумме общих стериннов. Интересно, что сумма эфиров стериннов обеих опалесцирующих зон находилась на одном уровне – 9 мкг/мг общих липидов. В мембранах хлоропластов сумма эфиров стериннов была в 3 раза ниже – 3.96 мкг/мг суммарных липидов. Известно, что эфиры стериннов играют основную роль в гомеостазе стериннов [25], регулируют уровень как свободных стериннов, так и незаменимых жирных кислот в различные периоды онтогенеза [26].

Таблица 2. Содержание свободных стерина (СС) и эфиров стерина (ЭС) суспензии хлоропластов и полученных из нее микромоменов, мкг/мг общих липидов

Стерины	Хлоропласты		Зона 1		Рафты	
	СС	ЭС	СС	ЭС	СС	ЭС
Холестерин	0.28 ± 0.1	0.37 ± 0.15	0.69 ± 0.17*	0.89 ± 0.17**	0.74 ± 0.11*	0.9 ± 0.22**
Кампестерин	0.77 ± 0.08	0.28 ± 0.11	0.79 ± 0.14	0.67 ± 0.06**	0.61 ± 0.07	0.56 ± 0.03**
Стигмастерин	0.41 ± 0.1	0.19 ± 0.05	0.6 ± 0.12*	1.63 ± 0.23**	1.25 ± 0.37*	1.83 ± 0.62**
β-ситостерин	9.82 ± 1.3	3.12 ± 1.28	8.24 ± 0.53*	5.95 ± 1.06**	6.15 ± 0.38*	5.9 ± 0.52**
Σ	11.28 ± 1.35	3.96 ± 1.43	10.32 ± 0.56	9.14 ± 1.16*	8.76 ± 0.48*	9.19 ± 0.22**
СС + ЭС	15.52 ± 3.21		19.32 ± 0.14***		18.74 ± 2.04	

Примечание: * – значимость различий по сравнению с СС хлоропластов, ** – значимость различий по сравнению с ЭС хлоропластов, *** – значимость различий по сравнению с СС + ЭС хлоропластов. $M \pm S.D.$, $n = 3-5$. значимость различий рассчитана с помощью метода LSD Фишера. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Свободные стеринны – это интегральные компоненты мембранного липидного бислоя, которые взаимодействуют с некоторыми молекулярными видами фосфо- и сфинголипидов. Преобладающими мембранными стеринами высших растений являются Δ^5 -стеринны: β-ситостерин, кампестерин и стигмастерин, показано также наличие холестерина [27]. Аналогичный спектр стерина наблюдался в мембранах хлоропластов пшеницы и полученных из них опалесцирующих зонах (табл. 2). В этих зонах, как и в самих мембранах, доля β-ситостерина была выше по сравнению с другими стеринами. Известно, что β-ситостерин как и кампестерин, может регулировать текучесть и проницаемость мембран путем взаимодействия с насыщенными алкильными цепями фосфолипидов и сфинголипидов, ограничивая их подвижность [28]. В обеих опалесцирующих зонах стигмастерин занимал второе место по содержанию после β-ситостерина. В зоне рафтов стигмастерина было больше, чем в зоне 1 (табл. 2). В микромоменах хлоропластов галофитов также были идентифицированы β-ситостерин, стигмастерин, холестерин и ряд компонентов, определение которых требует дополнительных исследований. Однако среди обнаруженных стерина доминировал стигмастерин – 38%, доля β-ситостерина составила 25%, холестерина – 6% [29]. По сравнению с β-ситостерином, стигмастерин имеет дополнительную двойную связь при С22 в боковой цепи, что делает алкильную цепь менее гибкой из-за жесткости двойной связи и, следовательно, влияет на встраивание и размещение стигмастерина в липидном бислое. Экспериментально доказано, что встраивание стигмастерина между динасыщенными и мононенасыщенными цепями ЖК приводит к меньшей упорядоченности бислоя, чем встраивание β-ситостерина [28].

Детальный анализ рафтообразующих липидов растений выявил не только наличие стерина, но и наличие двух классов сфинголипидов – гликозил-церамидов и гликозилинозитолфосфоцерамидов [27]. В мембранах хлоропластов галофитов цереброзиды занимают 3% от количества мембранных липидов, в рафтах хлоропластов цереброзидов также немного – 7% от общих липидов [22]. Эти данные показывают, что для рафтов хлоропластов галофитов цереброзиды не являются основным рафтообразующим липидом. В дальнейшем мы планируем провести подробный липидный анализ исследуемых зон.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов позволяют сделать вывод о том, что в мембранах хлоропластов пшеницы присутствуют два типа рафтовых структур, выявляемых в разных зонах сахарозного градиента после высокоскоростного центрифугирования в виде зон опалесценции. Этот вывод основан на результатах анализа состава липидов и жирных кислот.

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

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН № 0277-2022-0005 с частичным использованием средств гранта Президента МК-666.2020.11 на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгополова Н.В., Скрипин В.А., Шершнева О.М., Алябьева Ю.В. 2009. Значение озимой и яровой пшеницы в производстве продуктов питания. *Вестник КГСХА*. **5**, 52–56.
2. Петров Н.Ю., Онищенко Н.С. 2012. Фотосинтетическая деятельность и продуктивность сортов озимой пшеницы в зависимости от применяемых био-препаратов. *Вестник АГСХА*. **10** (96), 23–25.
3. Антипина О.В., Астахова Н.В., Попов В.Н., Селиванов А.А. 2015. Изменение ультраструктурной организации хлоропластов растений табака и арабидопсиса в связи с формированием устойчивости к гипотермии. *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования*. **11**, 188–192.
4. Вершубский А.В., Тихонов А.Н. 2019. pH-зависимая регуляция электронного и протонного транспорта в хлоропластах *in situ* и *in silico*. *Биол. мембраны*. **36** (4), 242–254.
5. Вершубский А.В., Тихонов А.Н. 2021. Структурно-функциональные аспекты терморегуляции электронного транспорта и синтеза АТФ в хлоропластах. *Биохимия*. **86** (1), 109–124.
6. Rozentsvet O., Nesterkina I., Ozolina N., Nesterov V. 2019. Detergent-resistant microdomains (lipid rafts) in endomembranes of the wild halophytes. *Functional Plant Biology*. **46**, 869–876.
7. Klimenko E.S., Nesterkina I.S., Ozolina N.V., Gurina V.V., Koulintchenko M.V., Konstantinov Y.M. 2020. Tonoplast rafts stimulate DNA import into the mitochondria of potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*. **14** (4), 351–354.
8. Kapustina I.S., Ozolina N.V., Gurina V.V., Spiridonova E.V., Tretyakova A.V. 2021. Protective function of lipid rafts. *Casp. J. Environ. Sci.* **19** (4), 685–690.
9. Rozentsvet O.A., Bogdanova E.S., Nurminsky V.N., Nesterov V.N., Chernyshov M.Yu. 2023. Detergent-resistant membranes in chloroplasts and mitochondria of the halophyte *salicornia perennans* under salt stress. *Plants*. **12** (6), 1265.
10. Kapustina I.S., Ozolina N.V., Gurina V.V., Spiridonova E.V., Bobkova V.A. 2021. Study of the composition of the sterols of wheat chloroplast rafts. *Vidyabharati International Interdisciplinary Research Journal. Special Issue on "Engineering Technologies and Management"*. **8**, 1180–1184.
11. Розенцвет О.А., Кособрюхов А.А., Богданова Е.С., Нестеров В.Н. 2019. Дневная динамика структурно-функциональных параметров фотосинтетического аппарата галофитов дикой флоры. *Физиология растений*. **66** (6), 431–440.
12. Филиппова Г.Г. 2017. *Фотосинтез: методические рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов биологического факультета*. Минск: БГУ. 40 с.
13. Нестеров В.Н., Нестеркина И.С., Розенцвет О.А., Озолина Н.В., Саяев Р.К. 2017. Обнаружение липид-белковых микродоменов (рафтов) и изучение их функциональной роли в хлоропластных мембранах галофитов. *ДАН*. **476** (3), 350–352.
14. Folch J., Sloan Stanley G.H., Lees M. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.
15. Кейтс М. 1975. *Техника липидологии*. М.: Мир. 322 с.
16. Нестеркина И.С., Гурина В.В., Озолина Н.В., Нурминский В.Н. 2019. Изменение содержания стерина тонопласта при осмотическом стрессе. *Биол. мембраны*. **36** (4), 301–304.
17. Christie W.W. 1993. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Adv. Lipid Methodol.* **2**, 69–111.
18. Гланц С. 1999. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика. 459 с.
19. Mongrand S., Stanislas T., Bayer E.M., Lherminier J., Simon-Plas F. 2010. Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci.* **15**, 656–663.
20. Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J., Blein J., Simon-Plas F. 2006. Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol. Cell. Proteomics*. **5** (8), 1396–1411.
21. Радюхин В.А., Баратова Л.А. 2020. Молекулярные механизмы формирования рафтов биологических мембран. *Биорг. химия*. **46** (3), 227–238.
22. Розенцвет О.А., Нестеров В.Н. 2021. Рафтообразующие липиды мембран митохондрий и хлоропластов галофита *Halocnemum strobilaceum*. *Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии*. **30** (3), 66–71.
23. Жуков А.В. 2015. Пальмитиновая кислота и ее роль в строении и функциях мембран растительной клетки. *Физиол. растений*. **62** (5), 751–760.
24. Жуков А. В. 2018. Жирные кислоты с очень длинной цепью в составе мембранных липидов. *Физиол. растений*. **65** (6), 418–437.
25. Ferrera A., Altabella T., Arróa M., Boronat A. 2017. Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progr. Lipid Research*. **67**, 27–37.
26. Девятловская А.Н., Журавлёва Л.Н. 2010. Динамика содержания стерина в анатомических частях березы бородавчатой. *Вестник КрасГАУ*. **6**, 89–93.
27. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. 2016. Растительные стерин: многообразие, биосинтез, физиологические функции. *Биохимия*. **18**, 1050–1068.
28. Grosjean K., Mongrand S., Beney L., Simon-Plas F., Gerbeau-Pissot P. 2015. Differential effect of plant lipids on membrane organization: Specificities of phytosphingolipids and phytosterols. *J. Biol. Chem.* **290** (9), 5810–5825.
29. Розенцвет О.А., Нестеров В.Н. 2021. Особенности липидного профиля детергентустойчивых мембран митохондрий и хлоропластов эукариоты *Halocnemum strobilaceum*. *Химия природ. соедин.* **5**, 696–699.

Characteristics of Membrane Structures of Wheat Chloroplasts

I. S. Kapustina¹, V. V. Gurina¹, E. V. Spiridonova¹, *, N. V. Ozolina¹

¹*Federal State Budgetary Institution of Science Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

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

When studying the raft structures of wheat chloroplast membranes, previously identified in the 15% sucrose zone after high-speed centrifugation, an additional opalescence zone was found in the 5% sucrose region. Analysis of the composition of sterols and fatty acids of lipids in this zone in comparison with the zone of rafts and chloroplast membranes showed that raft structures may also be present in this zone. This suggests that wheat chloroplast membranes may contain two types of raft structures.

Keywords: chloroplasts, rafts, fatty acids, sterols