

УДК 577.121.7

У мышей с нокаутом гена *p2rx3* изменен энергетический метаболизм нейронов гиппокампа

А. С. Зеленцова, В. М. Покровский, Е. А. Патраханов, В. С. Шмигерова, М. Ю. Скоркина*, А. В. Дейкин

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

*E-mail: marinaskorkina0077@gmail.com

Поступила в редакцию 02.11.2024

Принята к печати 18.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27551

РЕФЕРАТ Гиппокамп является ключевой структурой мозга, связанной с формированием долговременной памяти, в механизмах развития которой центральное место занимает энергетический метаболизм нейронов. Рецептор P2X3 в гиппокампе рассматривается как привлекательная мишень при поиске новых биологически активных субстанций, направленных на ослабление тревожности, эпилептических состояний и улучшение когнитивных функций. В работе изучали интенсивность митохондриального дыхания, гликолитическую емкость и энергетический фенотип нейронов гиппокампа у мышей с нокаутом гена *p2rx3*. Мыши с нокаутом гена *p2rx3* получены путем редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9. Первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа получали от двухдневных новорожденных мышат с генотипами *p2rx3*^{-/-} и *p2rx3*^{+/+}. Митохондриальное дыхание измеряли на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse Bioscience HS mini (Agilent, США), используя соответствующие наборы для проведения митостресс-теста, гликотеста и теста оценки энергетического фенотипа. Для трансгенных мышей с генотипом *p2rx3*^{-/-} характерен аэробный тип митохондриального дыхания, повышение продукции АТФ на 84.4% ($p < 0.05$), усиление максимального дыхания на 72.3% ($p < 0.05$) и дыхательного резерва на 36% ($p < 0.05$). При этом запасная дыхательная емкость митохондрий, скорость гликолиза и гликолитическая емкость у этих мышей снижены, соответственно, на 36.6, 75.7 и 78.6% ($p < 0.05$). Полученные данные указывают на работу митохондрий, близкую к максимальной, по своей энергетической мощности. Животные с нокаутом гена *p2rx3* являются уникальной моделью для поиска фармакологических мишеней, направленных на коррекцию энергетического метаболизма клеток головного мозга и устраняющих когнитивные дисфункции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ген *p2rx3*, гиппокамп, первичная смешанная культура нейронов, митохондриальное дыхание.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; ЦНС – центральная нервная система; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; АМРА – альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота; САМК II – кальциевая кальмодулин-зависимая протеинкиназа; CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; ECAR – скорость закисления среды; FCCP – карбонилцианид-4-(трифторметокси)-фенилгидразон; NMDA – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат; OCR – скорость потребления кислорода; PBS – фосфатный буфер; P2X3KO – мыши с нокаутом рецептора P2X3.

ВВЕДЕНИЕ

Энергетический метаболизм нейронов гиппокампа тесно связан с когнитивными функциями, процессами памяти и обучения [1]. В механизмах синаптической передачи сигнала в гиппокампе участвуют АТФ и пуриновые рецепторы [2]. Функциональной особенностью семейства рецепторов P2X является генерация внутриклеточных Ca²⁺-сигналов, когда

уровень мембранного потенциала близок к уровню физиологического покоя [3]. Рецептор P2X3 в гиппокампе считается привлекательной мишенью для изучения процессов тревожности и мотивации [4], а также патогенеза эпилептических состояний [5]. У мышей с нокаутом рецептора P2X3 (P2X3KO) наблюдаются аномалии в синаптической пластичности гиппокампа, нарушения долгосрочной депрес-

сии в синапсах CA1, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа. Вместе с тем, мыши P2X3KO нормально справлялись с тестами пространственного обучения в водном лабиринте, что позволяет предположить лучшую способность к обучению у животных с нокаутом гена *p2rx3*. Кроме того, мыши P2X3KO быстрее, чем мыши дикого типа, выполняли задачу, которая включала визуальное определение местоположения платформы и плавание к ней [5]. Несмотря на многочисленные работы, посвященные различным сторонам функционирования рецептора P2X3 [6], недостаточно изученной остается взаимосвязь этого рецептора с митохондриальной функцией, определяющей активность клеточного метаболизма, кальциевый гомеостаз и, как следствие, регуляцию синаптической пластичности гиппокампа в ЦНС. В представленной работе изучали интенсивность митохондриального дыхания, гликолитическую емкость и оценивали энергетический фенотип нейронов гиппокампа у мышей с нокаутом гена *p2rx3*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа с лабораторными животными

Мышей содержали в условиях конвенционального вивария Белгородского государственного национального исследовательского университета в ус-

ловиях искусственно регулируемого светового дня (день/ночь = 12/12 ч) при температуре 22–26°C и свободном доступе к корму и воде. В работе руководствовались этическими принципами обращения с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS No. 170). Болезненные манипуляции с животными проводили с использованием регламентирующих стандартов: Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, и рекомендаций комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИУ «БелГУ» (экспертное заключение № 01и/23 от 23.01.2023).

Животных с редактированным геномом получали путем микроинъекции генетической конструкции в пронуклеус зиготы мыши-донора с последующей пересадкой репродуктивного материала самке-реципиенту (рис. 1Б) [7–9]. С помощью инструмента онлайн-поиска CHOPCHOP была отобрана гидовая (направляющая) РНК (single guide RNA – sgRNA), узнающая последовательность второго экзона гена *p2rx3*. Выбранная sgRNA 5'-GGCCTACCAAGTG-CGGGACACGG(CCA)-3' (PAM, указан в скобках)

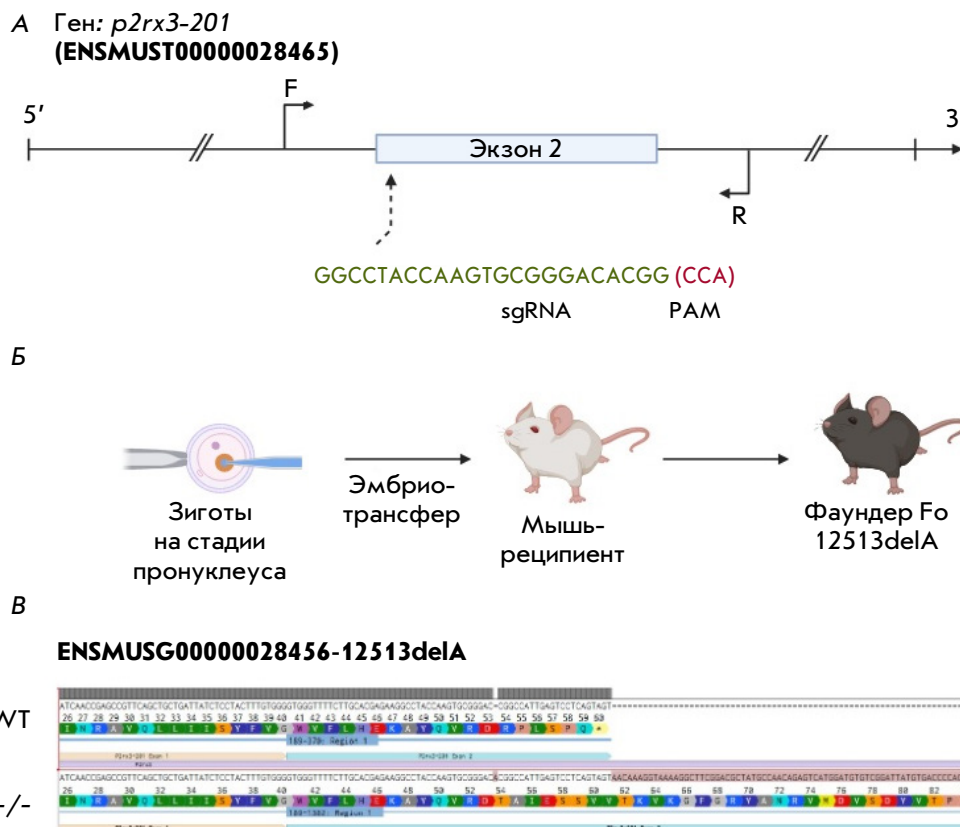


Рис. 1. Создание мыши с нокаутом гена *p2rx3*. **А** – направляющая РНК, выбранная для редактирования гена методом CRISPR/cas9. **Б** – процесс пронуклеарной инъекции и создания поколения F0. **В** – транскрипт гена *p2rx3* дикой мыши (WT) и мыши с нокаутом этого гена

(рис. 1А), не имеющая нецелевых сайтов менее чем с тремя несоответствиями, была протестирована в серии контрольных экспериментов на бластоцистах и использована при создании мышей с нокаутом гена *p2rx3*.

Генетический анализ потомства

Генотипирование мышей проводили секвенированием по Сенгеру ПЦП-продукта, содержащего зону узнавания выбранной sgRNA (прямой и обратный праймеры 5'-АСТААГСАГГААСТСАТСССАА-3', 5'-САТААТССГАСАТССАТГАС-3' («Евроген», Россия), рис. 1А. в ЦКП «Геном» согласно рекомендованному протоколу. Результаты анализировали с помощью Интернет-ресурса Decodr.

В результате получили животных со сдвигом рамки считывания гена *p2rx3* на один нуклеотид в экзоне 2, что привело к замене шести кодонов и образованию стоп-кодона (рис. 1В). Мутация успешно закрепилась в первом поколении. Мыши с гомо- и гетерозиготной мутацией жизнеспособны. Животные были переведены на генетический фон C57Bl/6.

Выделение, посев и культивирование первичной смешанной культуры гиппокампа новорожденных мышат

Первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа получали от двухдневных мышат, которых подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации позвонков. Ножницами разрезали кожу у основания черепа. Отделяли голову и погружали в лоток с измельченным льдом. Извлекали мозг и помещали его в чашку Петри с охлажденным фосфатно-солевым раствором (PBS, pH 7.4). Большие полушария головного мозга разделяли под биноклем (Leica, Германия). Гиппокамп помещали на предметное стекло с «лункой» в каплю охлажденного PBS, измельчали на 6–8 частей и переносили в пробирку с 0.25% раствором трипсин-EDTA. Ткань трипсинизировали в 0.25% растворе трипсин-EDTA (Gibco, 25200056) в течение 20 мин при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе Binder (ФРГ). После трипсинизации проводили трехкратную отмывку клеточной суспензии в PBS (pH 7.4). К полученной суспензии добавляли 2 мл нейробазальной среды (Gibco, 21103049), содержащей 2% добавки белка B-27 (Gibco, 17504044), 0.5 мМ L-глутамакса (Gibco, 25030081), 1% ПенСтреп («ПанЭко», Россия) [10].

Первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа культивировали в восьмилуночных планшетах для анализатора клеточного метаболизма Seahorse HS mini (Agilent, США). В канавки вокруг лунок вносили по 400 мкл стерильной дистиллированной воды. Культуральные лунки В–Г покрывали 10 мкл

поли-D-лизина в концентрации 0.01 мг/мл, в лунки коррекции фона А и Н вносили по 180 мкл дистиллированной воды. Планшеты оставляли на 1 ч в ламинарном шкафу под УФ-лампой. Затем планшеты трижды промывали дистиллированной водой и высушивали в ламинарном шкафу. В каждую ячейку планшета Cell Culture Miniplates (Agilent) вносили по 80 мкл клеточной суспензии, содержащей 2×10^4 клеток гиппокампа. В три ячейки восьмилуночного планшета вносили первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа мышей *p2rx3*^{-/-}, в другие три ячейки вносили культуру клеток гиппокампа мышей с генотипом *p2rx3*^{+/+}. Число клеток для посева и выбор оптимальной концентрации FCCP для выполнения митостресс-теста определяли, выполнив предварительно калибровку прибора по оптимизации числа клеток и поиску концентрации FCCP для заданного типа клеток, согласно инструкции производителя. Клетки в планшетах выращивали в течение 3 сут с ежедневной сменой ½ порции среды.

Метаболические тесты

Для проведения метаболических тестов были сформированы две группы животных (по 30 особей в каждой) с генотипами *p2rx3*^{-/-} (опытная) и *p2rx3*^{+/+} (контрольная).

Оценка параметров митохондриального дыхания. Дыхание митохондрий измеряли на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse Bioscience HS mini (Agilent). За 24 ч до анализа гидратировали сенсорный картридж (Agilent), заполняя его калибровочным стандартным раствором (Seahorse XF Calibrant) по 200 мкл в каждую лунку. Картридж помещали в инкубатор без CO₂ при температуре 37°C на 24 ч. Готовили аналитическую среду, используя среду Seahorse XF DMEM Media, содержащую глюкозу в конечной концентрации 10 мМ, пируват 1 мМ и L-глутамин 2 мМ, согласно рекомендациям производителя. Для оценки митохондриальной функции использовали набор MitostressTest kit. Стоковые растворы готовили согласно инструкции производителя. Набор включает олигомицин, FCCP, смесь ротенона и антимицина А. В эксперименте готовили рабочие растворы в конечной концентрации на лунку: олигомицин – 1 мкМ, FCCP – 2.5 мкМ, ротенон/антимицин А – 0.5 мкМ. Митострессоры вводили в клеточные культуры инъекционно через порты сенсорного картриджа Cartridge Agilent Seahorse XFp (Agilent, США). Выполняли калибровку картриджа, а затем меняли калибровочную тарелку на тарелку с клетками и измеряли скорость потребления кислорода (OCR), отражающую степень митохондриального дыхания в клетке. Выполняли по три технических

измерения в каждой опытной и контрольной ячейке. Данные нормировали по числу клеток. Используя программный продукт Multi-File Seahorse XF Mitostress test (США), рассчитывали базальное дыхание, утечку протонов, максимальное дыхание, запасную дыхательную емкость, немитохондриальное дыхание, продукцию АТР, коэффициент сопряжения дыхания. Немитохондриальное дыхание оценивали как минимальное измеренное значение OCR после инъекции смеси ротенон/антимидин А. Базальное дыхание рассчитывали как последнее значение параметра OCR, измеренное до первой инъекции за вычетом немитохондриального дыхания. Максимальное дыхание вычисляли как разницу между максимальными значениями OCR после инъекции FCCP и немитохондриальным дыханием. Потерю протонов рассчитывали как минимальное значение OCR после инъекции олигомицина за вычетом немитохондриального дыхания. Продукцию АТР рассчитывали после добавления олигомицина по разнице между последним значением OCR, измеренным до инъекции олигомицина и минимальным значением OCR после инъекции олигомицина. Запасную дыхательную емкость митохондрий рассчитывали как разницу между максимальным и базальным дыханием. Коэффициент эффективности дыхания вычисляли как отношение продукции АТР к базальному дыханию.

Изучение биоэнергетического баланса клетки. Энергетический фенотип нейронов оценивали с использованием набора Cell Energy Phenotype (Kit 103325-100, Agilent). В наборе использовали олигомицин (ингибитор АТР-синтазы) в конечной концентрации 100 мкМ и FCCP (митохондриальный разобщитель) в конечной концентрации 100 мкМ. Концентрация стрессового раствора олигомицин/FCCP, которую вносили в порт картриджа, составляла 1.0/1.0 мкМ. По результатам измерений с помощью программного продукта Multi-File Seahorse XF Cell Energy Phenotype (США) рассчитывали стрессовый OCR и ECAR согласно формулам:

$$\text{Stressed OCR} = \frac{\text{Stressed OCR}}{\text{Baseline OCR}} \times 100, \quad (1)$$

$$\text{Stressed ECAR} = \frac{\text{Stressed ECAR}}{\text{Baseline ECAR}} \times 100, \quad (2)$$

где *Stressed OCR* – стрессовый фенотип по скорости поглощения кислорода, %;

Stressed ECAR – стрессовый фенотип по скорости закисления среды, %;

Stressed OCR/ECAR – скорость поглощения кислорода / скорость закисления среды после внесения в среду митострессоров (смесь олигомицина и FCCP);

Baseline OCR/ECAR – скорость поглощения кислорода / скорость закисления среды до внесения стрессоров.

Гликотест-стресс. Анализ проведен с использованием набора Glycolysis Stress Test.

В наборе использовали глюкозу в конечной концентрации 10 мМ, олигомицин (1 мкМ) и 2-дезоксиглюкозу (500 мМ), которые инъецировали в клеточные культуры через порты сенсорного картриджа Cartridge Agilent (Seahorse XFP). Выполняли калибровку картриджа, а затем меняли калибровочную тарелку на тарелку с клетками и измеряли скорость закисления среды (ECAR). Данные нормировали по числу клеток. Используя программный продукт Multi-File Seahorse XF Glycotest (США), рассчитывали скорость гликолиза, гликолитическую емкость нейронов, гликолитический резерв и негликолитическое заселение. Скорость гликолиза рассчитывали как разницу между максимальным значением ECAR до инъекции олигомицина и последним измерением ECAR до инъекции глюкозы. Гликолитическую емкость оценивали как разницу между максимальным измеренным ECAR после инъекции олигомицина и последним измерением ECAR до инъекции глюкозы. Гликолитический резерв оценивали как гликолитическую емкость, деленную на скорость гликолиза (мрН/пмоль/мин/клетка) и умноженную на 100%. Негликолитическое закисление учитывали как последнее измерение ECAR до инъекции глюкозы. Все метаболические тесты выполняли в четырех повторностях по три технических измерения в каждой.

Статистический анализ

Экспериментальные данные обрабатывали, используя программное обеспечение Wave 2.6 (США), а также пакет описательной статистики Excel 10.0. Экспериментальные данные представлены медианой и стандартным отклонением ($M \pm SD$). Учитывая, что все полученные числовые данные не подчиняются гипотезе нормального распределения, статистическую значимость полученных результатов оценивали с использованием критерия Манна–Уитни для выборок с числом измерений $n \leq 20$. Критическим уровнем значимости считали $p = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У трансгенных животных был изучен энергетический фенотип первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа. В тестах данного типа надежным индикатором скорости гликолиза является скорость закисления среды (ECAR). Однако, когда высокоаэробные клетки подвергаются стрессу, продукция углекислого газа митохондриями может провоциро-

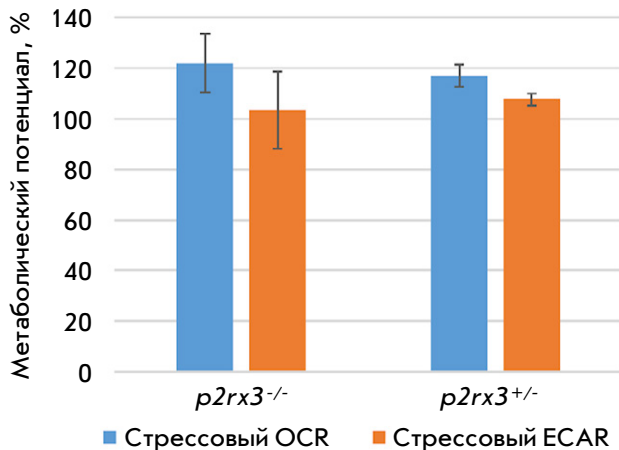


Рис. 2. Метаболический потенциал первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа трансгенных мышей с нокаутом гена $p2rx3$

вать усиление ECAR [11] и увеличивать вклад гликолиза в метаболический потенциал. С помощью этого теста оценили восприимчивость клеток гиппокампа полученных трансгенных мышей к этому эффекту. Показано, что нейроны гиппокампа трансгенных животных как гомозиготных, так и гетерозиготных данному эффекту не подвержены. Энергетический фенотип митохондриального дыхания первичной смешанной культуры гиппокампа нейронов трансгенных животных – аэробное дыхание, основу которого составляет окислительное фосфорилирование. В первичной смешанной культуре нейронов гиппокампа, полученных от мышей $p2rx3^{-/-}$, соотношение скорости потребления кислорода (OCR) к скорости закисления среды (ECAR) составило 1.2, у мышей с генотипом $p2rx3^{+/-}$ – $OCR/ECAR = 1.1$. Явно выраженных различий в метаболическом фенотипе нейронов гиппокампа между исследуемыми группами животных не обнаружено (рис. 2).

При изучении особенности митохондриального дыхания получили кривые скорости поглощения

кислорода в режиме реального времени (приложение рис. 1SA). Установлено увеличение практически всех параметров митохондриального дыхания за исключением запасной дыхательной емкости, полученной от гомозигот $p2rx3^{-/-}$ (табл. 1).

Согласно данным табл. 1, в культуре нейронов, полученных от мышей $p2rx3^{-/-}$, существенно возрас-тали немитохондриальное, базальное и максимальное дыхание, а также дыхательный резерв, соответственно, на 52.4% ($p < 0.05$), 72.3% ($p < 0.05$) и 61.3% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. Для культуры нейронов гиппокампа, полученной от мышей $p2rx3^{-/-}$, было характерно повышение продукции АТР на 84.4% ($p < 0.05$), дыхательного резерва – на 36% ($p < 0.05$) и коэффициента эффективности дыхания – на 43% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. Вследствие высокой интенсивности митохондриального дыхания запасная дыхательная емкость первичной смешанной культуры гиппокампа мышей $p2rx3^{-/-}$ снижена на 36.6% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем.

В первичной смешанной культуре нейронов гиппокампа мышей $p2rx3^{-/-}$ скорость гликолиза и гликолитическая емкость существенно снижены – на 75.7% ($p < 0.05$) и 78.6% ($p < 0.05$) – по сравнению с аналогичными показателями у мышей с генотипом $p2rx3^{+/-}$ (рис. 3).

Гликолитический резерв нейронов гиппокампа мышей $p2rx3^{-/-}$ повышен практически в 2 раза: $351.3 \pm 158.2\%$ против $163.2 \pm 60.5\%$ в культуре гиппокампа мышей $p2rx3^{+/-}$ (гликолитические кривые, полученные в режиме реального времени, представлены в приложении рис. 1SB).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа, полученной как от животных с генотипом $p2rx3^{-/-}$, так и с $p2rx3^{+/-}$, характерен аэробный тип дыхания, когда клетка использует преимущественно окислительное фосфорилирование. Установленный

Таблица 1. Параметры митохондриального дыхания культуры нейронов гиппокампа мышей с нокаутом гена $p2rx3$

Параметр	$p2rx3^{+/-}$ (контроль)	$p2rx3^{-/-}$ (опыт)	U-критерий Укрит ≤ 17
Немитохондриальное дыхание, пмоль/мин/клетка	27.1 ± 5.3	$56.9 \pm 18.0^*$	0
Базальное дыхание, пмоль/мин/клетка	65.9 ± 12.2	$238.1 \pm 7.9^*$	0
Максимальное дыхание, пмоль/мин/клетка	124.3 ± 8.9	$320.9 \pm 18.5^*$	0
Потеря протонов (H^+), пмоль/мин/клетка	14.5 ± 8.1	40.4 ± 16.4	19
АТР-продукция, пмоль/мин/клетка	36.1 ± 12.8	$231.5 \pm 9.9^*$	0
Дыхательный резерв, пмоль/мин/клетка	56.0 ± 16.4	$87.4 \pm 14.3^*$	0
Запасная дыхательная емкость, %	188.3 ± 45.20	$137.8 \pm 7.2^*$	0
Коэффициент эффективности дыхания, %	58.8 ± 21.6	$103.4 \pm 10.4^*$	1

*Достоверность различий при $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

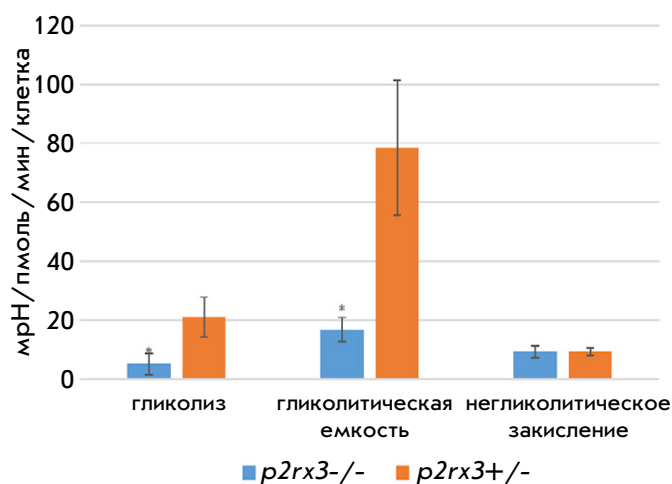


Рис. 3. Показатели гликолитической функции первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа мышей с нокаутом гена *p2rx3*. * – достоверность различий при $p < 0.05$ по сравнению с гетерозиготами

в эксперименте аэробный тип метаболизма нейронов гиппокампа и отсутствие переключения энергетического фенотипа при введении стрессоров митохондриального дыхания указывает на повышенную биоэнергетическую функцию митохондрий.

Мы установили, что нейроны гиппокампа мышей с нокаутом гена *p2rx3*^{-/-} имеют повышенное базальное и немитохондриальное дыхание по сравнению с нейронами гиппокампа, полученными от мышей *p2rx3*^{+/-}. Наши результаты также показывают, что нейроны гиппокампа *p2rx3*^{-/-} имеют высокий уровень продукции АТФ и сниженную скорость гликолиза и гликолитической емкости, которая фактически характеризует максимальную способность генерировать АТФ в процессе гликолиза. Полученные данные свидетельствуют, что нейроны гиппокампа с нокаутом гена *p2rx3*^{-/-} в базальном состоянии работают уже близко к максимуму своей митохондриальной энергетической мощности. Сочетание интенсивного митохондриального дыхания вместе с утечкой протонов, которые направляются на производство активных форм кислорода (АФК), на фоне сниженной запасной дыхательной емкости указывает на снижение способности нейронов справляться со значительными колебаниями в биоэнергетических потребностях при различных клеточных стрессах, а также при старении. Усиление окислительного фосфорилирования в нейронах является основной причиной повышенного уровня АФК [12]. Основной вопрос заключается в том, вследствие чего нейроны с нокаутом гена *p2rx3* имеют такие большие энергетические потребности. Согласно опубликованным данным, более высокие энергетические

потребности имеют нейроны дофаминовой субстанции мышей с болезнью Альцгеймера [13]. Такие энергозатраты связаны с большим аксональным разветвлением, которое требует высокоэффективной продукции митохондриального АТФ за счет увеличения плотности митохондрий в терминалях [13]. Мы не определяли степень ветвления нейронов у полученных трансгенных мышей, поэтому, исходя из опубликованных данных, можем только выдвинуть гипотезу о роли ионотропных рецепторов в усилении биоэнергетики нейронов гиппокампа.

Ген *p2rx3* кодирует рецептор P2X3, который экспрессируется в разных областях мозга, в том числе в пирамидных нейронах, зубчатых гранулярных клетках и интернейронах гиппокампа [14]. Учитывая, что гиппокамп является ключевой структурой мозга, связанной с формированием долговременной памяти, изменения активности ионотропных рецепторов – пуринергических (P2X) и глутаматергических (NMDA) – могут модулировать пластичность и гиппокамп-зависимое обучение, а также память. Эта пластичность основана на активации гиппокампальных киназ и изменении уровня внутриклеточного кальция [15]. Описаны перекрестные взаимодействия рецепторов семейства P2X с NMDA. Доказано, что активация рецепторов семейства P2X ингибирует токи Ca^{2+} через рецепторы семейства NMDA. Функциональное значение такого взаимодействия связано с тем, что рецепторы P2X служат низкочастотными фильтрами кальциевого сигнала в условиях физиологического покоя, когда для входа кальция не требуется деполяризация мембраны, как в случае с рецепторами NMDA [3]. У мышей с нокаутом гена *p2rx3* наблюдалось нарушение долговременной депрессии в синапсах гиппокампа CA1, CA3 и зубчатых гранулярных клетках, а также лучшая способность к обучению и ориентации в пространстве [5]. Ингибирование рецепторов семейства P2X (семейства P2X3, P2X4, P2X6) усиливает индукцию долговременной памяти [3]. Известно, что во время долгосрочной потенциации, лежащей в основе памяти и обучения, изменяется выработка энергии в митохондриях [16], увеличивается активность митохондриального кальциевого насоса [17] и усиливается экспрессия митохондриальных генов [18]. Блокирование митохондриального окислительного фосфорилирования приводит к значительному ухудшению долгосрочной депрессии синапсов [19]. Выработка энергии в митохондриях имеет решающее значение для высвобождения трансмисмиттеров посредством экзоцитоза везикул, мобилизации везикул резервного синаптического пула и регуляции синаптической силы [20]. Не исключено, что повышенные биоэнергетические потребности нейронов могут

быть связаны с чрезмерной активацией NMDA-рецепторов. Согласно [21], активация рецепторов NMDA увеличивает объем шипиков в культивируемых нейронах гиппокампа и повышает поверхностную экспрессию рецепторов AMPA (альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота). Описана регуляция деления митохондрий в дендритах, сопровождающаяся увеличением содержания Ca^{2+} в митохондриальном матриксе, опосредованного активацией Ca^{2+} и кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CAМК II) [22]. Показана локализация NMDA-подобного рецептора на мембране митохондрий, который усиливает активность АТФ-синтазы и выработку АТФ нейронами [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в работе результаты свидетельствуют о том, что у мышей с нокаутом гена *p2rx3* повышена биоэнергетическая функция митохондрий. Для трансгенных мышей с генотипом *p2rx3*^{-/-} характерен аэробный тип митохондриального дыхания, высокая продукция АТФ, повышенное базальное и немитохондриальное дыхание, усиление потери протонов, достаточно высокий уровень коэффициента эффективности дыхания, при этом запасная дыхательная емкость митохондрий, скорость гликолиза

и гликолитическая емкость снижены. Полученные данные указывают на работу митохондрий, близкую к максимуму своей энергетической мощности. Не исключено, что такая активация энергетического метаболизма клетки связана с реципрокными взаимодействиями между ионотропными пуринергическими и глутаматергическими рецепторами. Важным и открытым остается вопрос о том, как будет изменяться биоэнергетический баланс нейронов гиппокампа у животных с нокаутом гена *p2rx3* на фоне блокады NMDA-рецепторов. Понимание взаимодействий между пуринергическими и глутаматергическими рецепторами имеет важное значение, поскольку эти рецепторы вовлечены в определенные типы гиппокамп-зависимой памяти. Животные с нокаутом гена *p2rx3* являются уникальной моделью для поиска фармакологических мишеней, направленных на коррекцию энергетического метаболизма клеток головного мозга и устраняющих когнитивные дисфункции. ●

*Научное исследование проведено
при поддержке Российского научного фонда
(грант № 23-24-00600).*

*Приложения доступны на сайте
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27551>*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rubin R.D., Watson P.D., Duff M.C., Cohen N.J. // *Front. Hum. Neurosci.* 2014. V. 8. P. 742.
- Lalo U., Pankratov Y. // *Neuropharmacology*. 2023. V. 229. P. 109477.
- Pankratov Y.V., Lalo U.V., Krishtal O.A. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 19. P. 363–369.
- Wang Y., Mackes J., Chan S., Haughey N.J., Guo Z., Ouyang X., Furukawa K., Ingram D.K., Mattson M.P. // *J. Neurochem.* 2006. V. 99. № 5. P. 1425–1434.
- Zhou X., Ma L.M., Xiong Y., Huang H., Yuan J.X., Li R.H., Li J.N., Chen Y.M. // *Neurochem. Res.* 2016. V. 41. № 6. P. 1263–1273.
- Oparin P., Khokhlova O., Cherkashin A., Nadezhdin K., Palikov V., Palikova Y., Korolkova Y., Mosharova I., Rogachevskaja O., Baranov M., et al. // *Mol. Ther.* 2025. V. 33. № 2. P. 771–785.
- Gurskiy Y.G., Garbuz D.G., Soshnikova N.V., Krasnov A.N., Deikin A., Lazarev V.F., Sverchinsky D., Margulis B.A., Zatsepina O.G., Karpov V.L., et al. // *Cell Stress Chaperones*. 2016. V. 21. № 6. P. 1055–1064.
- Silaeva Y.Y., Kirikovich Y.K., Skuratovskaya L.N., Deikin A.V. // *Russ. J. Develop. Biol.* 2018. V. 49. № 6. P. 356–361.
- Kalmykov V.A., Kusov P.A., Yablonskaia M.I., Korshunov E.N., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Silaeva Y.Yu., Deykin A.V., Lukyanov N.E. // *Research Results in Pharmacology*. 2018. V. 4. № 4. P. 115–122. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.4.32209>
- Zelentsova A.S., Borisova A.Y., Shmigerova V.S., Skorkina M.Y., Deykin A.V. // *Genes and Cells*. 2024. V. 19. № 1. P. 201–210. doi: 10.17816/gc529662
- Vohwinkel C.U., Lecuona E., Sun H., Sommer N., Vadász I., Chandel N.S., Sznajder J.I. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 43. P. 37067–37076.
- Hill B.G., Benavides G.A., Lancaster J.R. Jr., Ballinger S., Dell'Italia L., Jianhua Z., Darley-Usmar V.M. // *Biol. Chem.* 2012. V. 393. № 12. P. 1485–1512.
- Pacelli C., Giguère N., Bourque M.J., Lévesque M., Slack R.S., Trudeau L.É. // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. № 18. P. 2349–2360.
- Jang I.S., Rhee J.S., Kubota H., Akaike N., Akaike N. // *J. Physiol.* 2001. V. 536. P. 505–519.
- Medina J.H., Viola H. // *Front. Mol. Neurosci.* 2018. V. 11. P. 361.
- Wieraszko A. // *Brain Res.* 1982. V. 237. № 2. P. 449–457.
- Stanton P.K., Schanne F.A. // *Brain Res.* 1986. V. 382. № 1. P. 185–188.
- Williams J.M., Thompson V.L., Mason-Parker S.E., Abraham W.C., Tate W.P. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998. V. 60. № 1. P. 50–56.
- Cunha R.A., Vizi E.S., Ribeiro J.A., Sebastião A.M. // *J. Neurochem.* 1996. V. 67. № 5. P. 2180–2187.
- Ivannikov M.V., Sugimori M., Llinás R.R. // *J. Mol. Neurosci.* 2013. V. 49. № 1. P. 223–230.
- Divakaruni S.S., van Dyke A.M., Chandra R., LeGates T.A., Contreras M., Dharmasri P.A., Higgs H.N., Lobo M.K., Thompson S.M., Blanpied T.A. // *Neuron*. 2018. V. 100. № 4. P. 860–875.e7.
- Duarte F.V., Ciampi D., Duarte C.B. // *Cell Mol. Life Sci.* 2023. V. 80. № 6. P. 173.
- Korde A.S., Maragos W.F. // *Mitochondrion*. 2021. V. 59. P. 76–82.