

УДК 576.38, 57.085.23, 57.085.25

## О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА НА ОСНОВЕ АЦЕДАНА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА (H<sub>2</sub>S) В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

© 2024 г. Р. Р. Шарипов<sup>а</sup>, И. А. Таржанов<sup>б, с</sup>, А. А. Згодова<sup>б, с</sup>, З. В. Бакаева<sup>б, д</sup>,  
А. М. Сурин<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

<sup>б</sup>Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Москва, 119296 Россия

<sup>с</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, 119435 Россия

<sup>д</sup>Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова, Элиста, 358000 Россия

\*e-mail: surin\_am@mail.ru

Поступила в редакцию 13.02.2024

После доработки 29.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Сероводород (сульфид водорода, H<sub>2</sub>S), который при физиологических условиях существует в клетках преимущественно в форме аниона HS<sup>-</sup>, рассматривают в качестве газообразного трансмиттера меж- и внутриклеточных сигналов наравне с монооксидами азота и углерода. Анализ динамики содержания H<sub>2</sub>S в живых клетках невозможен без создания чувствительных и специфичных зондов. Группой К.Н. Аһп было синтезировано несколько соединений на основе ацедана (acedan), которые в присутствии H<sub>2</sub>S присоединяли сульфгидрильную группу, образуя флуоресцирующие карбоциклические соединения. По спектральным характеристикам и скорости реагирования с H<sub>2</sub>S оптимальным оказалось вещество P3, образующее карбоциклическое соединение csP3, которое обладает таким же большим смещением Стокса, как P3 (~130 нм), но имеет более яркую флуоресценцию. В данной работе проверили пригодность csP3 для регистрации изменений H<sub>2</sub>S в растворах, имитирующих минимальный солевой состав внутриклеточной среды, а также в клетках первичной нейрональной культуры из коры головного мозга крысы. Обнаружено, что интенсивность флуоресценции csP3, который образуется при добавлении Na<sub>2</sub>S (донора H<sub>2</sub>S, 100 и 300 мкМ) к раствору P3, различается для растворов, соответствующих по солевому составу внеклеточной среде и цитозолю. В обоих случаях флуоресценция увеличивается в присутствии бикарбоната (NaHCO<sub>3</sub>, 10 мМ). Снижение полярности растворов за счет добавления диметилсульфоксида (30% по объему) сдвигало эмиссию на ~10 нм в коротковолновую область и вдвое увеличивало интенсивность. Глутамат (10 мкМ, в присутствии 10 мкМ глицина, 0 Mg<sup>2+</sup>) увеличивал флуоресценцию зонда, но только в тех нейронах, в которых не возникла отсроченная дерегуляция кальциевого гомеостаза. Добавление к клеточной культуре P3 или csP3 вызывало быстрое увеличение флуоресцентного сигнала, который через 3–5 мин сменялся медленным ростом сигнала. Сделан вывод, что продукт реакции P3 с H<sub>2</sub>S чувствителен к изменению солевого состава внутриклеточной среды и может перераспределяться в клетках между водным и более гидрофобным окружением. Эти обстоятельства затрудняют интерпретацию роста флуоресценции P3 в клетках как количественного показателя наличия H<sub>2</sub>S и требуют дополнительных исследований свойств этого и структурно родственных зондов H<sub>2</sub>S.

**Ключевые слова:** флуоресцентный зонд, сульфид водорода, первичные нейрональные культуры, глутамат, эксайтотоксичность

DOI: 10.31857/S0233475524030074, EDN: csaskz

## ВВЕДЕНИЕ

Эндогенный сероводород (сульфид водорода,  $H_2S$ ) рассматривают в качестве третьего газообразного трансмиттера меж- и внутриклеточных сигналов наравне с оксидом азота (NO) и монооксидом углерода (CO) [1–6].  $H_2S$  может образовываться в различных клетках, тканях, органах и системах двумя ферментами цистатионин- $\beta$ -синтазой и цистатионин- $\gamma$ -лиазой, использующими *L*-цистеин и гомоцистеин в качестве субстратов. В клетках мозга и эпителия сосудов был обнаружен третий фермент 3-меркаптопируват сульфид-трансфераза (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; EC2.8.1.2) [2, 7], который совместно с цистеинаминотрансферазой (производит  $H_2S$ , используя в качестве субстратов *L*-цистеин и  $\alpha$ -кетоглутарат [8–11]. Нарушения сигнального пути  $H_2S$  проявляются при нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера, синдром Дауна) [12, 13].

Для исследования роли  $H_2S$  во внутриклеточном сигналинге критично наличие флуоресцентных зондов, чувствительных к низким концентрациям  $H_2S$ , обладающих высокой яркостью (сочетанием большой молярной экстинкции и высокого квантового выхода флуоресценции), скоростью реагирования с  $H_2S$ , имеющих значительное смещение спектров эмиссии относительно спектров возбуждения (смещение Стокса) и низкую фототоксичность. Важно также знать, в каком компартменте клетки зонд локализуется. В нормальных условиях в клетке и внеклеточной среде  $H_2S$  существует преимущественно в форме аниона  $HS^-$ , и поэтому желательно, чтобы флуоресцентный зонд мог реагировать также с этим анионом. Разработка флуоресцентных зондов, обладающих перечисленными свойствами, продолжается [13–17], однако их коммерческая доступность пока весьма ограничена. Среди доступных можно отметить флуоресцентный зонд на  $H_2S$  и его анионную форму  $HS^-$ , созданный группой К.Н. Ahn на основе производных ацедана (acedan) [1]. В указанной работе синтезировано несколько производных ацедана, названных P1, P2 и P3, которые образуют в присутствии  $H_2S$  карбоциклические соединения, включающие сульфгидрильную группу и имеющие яркую флуоресценцию, и большое смещение Стокса (свыше 100 нм). Наиболее удачным по спектральным характеристикам и скорости реагирования с  $H_2S$  оказалось производное P3 (csP3, аббревиатура предложена авторами настоящей работы). Производные ацедана обладают высокой чувствительностью флуоресценции к полярности микроокружения, что позволяет рассматривать их как зонды внутриклеточных структурных

перестроек [18]. В этой связи возникает вопрос: в какой мере изменение флуоресценции P3, добавленного к культуре клеток, отражает образование csP3 в результате увеличения концентрации внутриклеточного  $H_2S$ , и в какой степени изменение флуоресценции отражает перераспределение P3 и csP3 между компартментами клетки с различной полярностью?

В данной работе мы проверили пригодность csP3 для регистрации изменений  $H_2S$  в растворах, имитирующих минимальный солевой состав внутриклеточной среды, а также в клетках первичной нейрональной культуры из коры головного мозга крысы. Обнаружено что продукт реакции P3 с сульфидом натрия ( $Na_2S$ ), который служил донором  $HS^-$ , чувствителен к изменению солевого состава внутриклеточной среды и, по-видимому, постепенно перераспределяется между водным и более гидрофобным окружением – вероятно, внутриклеточными мембранами и белками. Эти процессы могут происходить при добавлении нейротоксических доз глутамата, что осложняет интерпретацию сигналов зонда P3 как индикатора  $H_2S$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Измерения спектральных характеристик и кинетики образования флуоресцирующего зонда.** Измерения спектров флуоресценции P3 и кинетики образования из него флуоресцирующего карбоциклического соединения, содержащего сульфгидрильную группу (csP3), проводили на мультифункциональном планшетном ридере ClarioStar (BMG LABTECH GmbH, Германия). Использовали 96-луночные планшеты, стенки которых сделаны из черного пластика для предотвращения проникновения флуоресценции из соседних лунок (Corning, США). Измерения выполняли в растворе, состав которого соответствует внеклеточной среде, использованной для флуоресцентно-микроскопических измерений, но без глюкозы (см. ниже), либо в растворе, минимальный солевой состав которого соответствует внутриклеточной среде (мМ): 130 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 HEPES, pH 7.2. Состав солевых растворов, имитирующих внутриклеточную среду, выбран на основании работ [19, 20].

**Приготовление первичных культур нейрональных клеток.** Первичные культуры нейронов получали из коры головного мозга крыс линии Вистар (P1-P2), как описано ранее [21, 22]. Животных анестезировали, обезглавливали, кору удаляли и отделяли от мозговых оболочек. Извлеченные ткани промывали раствором Хенкса, не содержащим  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , измельчали, инкубировали в растворе

папаина (12 мин, 37°C) и диссоциировали в свежей MEM. Суспензию центрифугировали (200 g, 2×5 мин, 4°C), осадок ресуспендировали до концентрации 10<sup>6</sup> клеток/мл в нейробазальной среде (NBM), содержащей В-27 и пенициллин/стрептомицин. Аликвоты суспензии клеток (250 мкл) переносили в лунки со стеклянным дном (диаметр лунок 14 мм) 35-мм чашек Петри (MatTeck, США). Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C, в атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>, при 100% относительной влажности. Через 2–3 дня в среду добавляли цитозинарабинозид А (Ага-С, 5 мкМ) для снижения пролиферации глиальных клеток. Каждые 3–4 суток заменяли 1/3 среды на свежую. Культуры использовали в экспериментах через 9–11 дней после посева.

#### Флуоресцентно-микроскопические измерения.

Для измерения внутриклеточной концентрации свободного Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) клетки нагружали индикатором Xrhod-5F в форме ацетоксиметилового (AM) эфира (Xrhod-5F/AM), предварительно смешав с неионным детергентом Pluronic F-127. Концентрации Xrhod-5F/AM и Pluronic F-127 в среде с клетками составляли соответственно 1 мкМ и 0.02%. Инкубацию с индикатором проводили в нейробазальной среде (37°C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>). При выполнении флуоресцентно-микроскопических измерений нейробазальную среду замещали водно-солевым буфером, содержащим (мМ) 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, 5 глюкозы; pH 7.4.

Измерения флуоресценции в клеточных культурах выполнены на инвертированном микроскопе Nikon Ti2 (Nikon, Япония). В качестве источников возбуждающего света для P3 использовали рЕ-340Fura со светофильтром 387±6 нм и для Xrhod-5F – рЕ-300 со светофильтром 578±10 нм (CoolLED, Великобритания). Эмиссию регистрировали, используя встроенные в программно-управляемое фильтровое колесо светофильтры 483±16 и 520±18 нм для P3 и 641±37 нм для Xrhod-5F. Изображения получали с помощью охлаждаемой sCMOS камеры Prime BSI Express (Teledyne Photometrics, США). Регистрацию, хранение и первичную обработку данных проводили, используя программное обеспечение Nikon NIS-Elements (Япония).

Xrhod-5F/AM приобретен у ThermoFisher (США), Pluronic F-127 у Molecular Probes (США), зонд P3 (2-(3-(6-(2-hydroxyethylamino)naphthalen-2-yl)-3-оксороп-1-енил)-3,5-dimethoxybenzaldehyde) приобретен у Sigma-Aldrich. Базовые растворы Xrhod-5F/AM (1 мМ) и Pluronic F-127 (20%) готовили в диметилсульфоксиде.

Статистическую обработку данных и построение графиков осуществляли, используя программы Microsoft Excel и Graph Pad Prism-8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Флуоресценция P3 и продукта его взаимодействия с Na<sub>2</sub>S в буферных растворах.** Структурные формулы P3 и его производного, включающего 5-членный цикл и боковую HS-группу (csP3), которое образуется в результате взаимодействия с сульфид-ионом или сероводородом, показаны на рисунке 1 [1].

Кинетика образования csP3 в результате взаимодействия P3 (10 мкМ) с сульфидом натрия (Na<sub>2</sub>S, 100 мкМ) представлена на рис. 2. Благодаря гидролизу, Na<sub>2</sub>S служит стандартным донором SH<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>S [1, 23, 24], Реакцию проводили в солевом растворе, который мы обычно используем для флуоресцентно-микроскопических измерений клеточных культур (за исключением того, что не добавляли глюкозу; см. “Материалы и методы”). Кинетику образования csP3 отслеживали в течение 5 мин после начала реакции P3 с SH<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>S (после добавления Na<sub>2</sub>S). Измерения флуоресценции показали, что за время смешивания P3 с Na<sub>2</sub>S, раскапывания растворов по лункам и запуска регистрации (в совокупности около 5 мин) успевало пройти около 70% реакции P3 с H<sub>2</sub>S. Относительные изменения флуоресценции соответствуют данным работы [1] для таких же концентраций зонда и Na<sub>2</sub>S.

Химическая структура исходного соединения P3 и его карбоциклического сульфгидрильного производного csP3 указывают на значительную

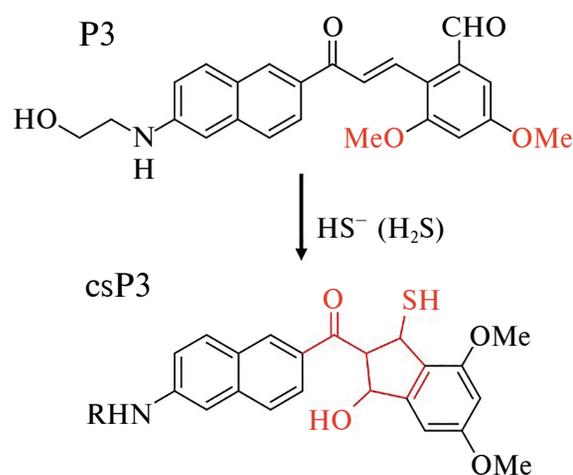
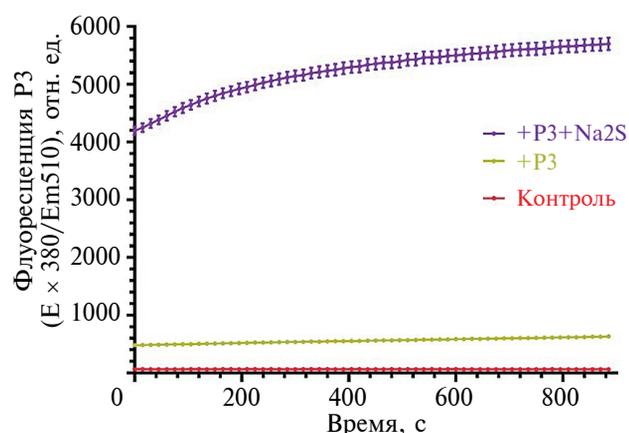


Рис. 1. Структура слабо флуоресцирующего соединения P3 и сильно флуоресцирующего продукта его взаимодействия с сульфидом водорода и сульфид-ионом в водном растворе (заимствовано с изменениями из [1]).

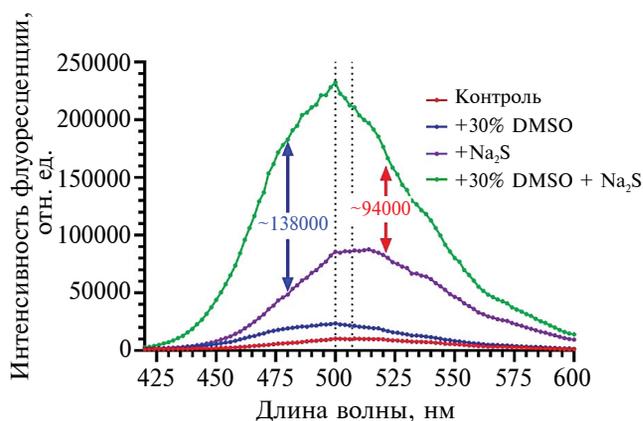
гидрофобность этих соединений (рис. 1) [1, 18]. Это позволяет предположить, что оба вещества, будучи добавленными к клеткам, могут перераспределяться между водным и менее полярным окружением, например, между мембранами и белками.

Перемещение молекулы в менее полярное окружение, как правило, вызывает сдвиг спектра эмиссии в более коротковолновую область и увеличение квантового выхода флуоресценции [25]. Мы убедились, что это универсальное правило действует для P3 и csP3, добавив диметилсульфоксид (DMSO, 30% по объему) (рис. 3). Это наблюдение соответствует данным [18] о значительной чувствительности флуоресценции производных ацедана к полярности/гидрофобности микроокружения.

Учитывая приведенные выше данные о чувствительности флуорофорной части молекулы csP3 к микроокружению, мы проверили, будет ли влиять смена солевого состава раствора на флуоресценцию зонда. Для этого сопоставили флуоресценцию csP3 в растворе, солевой состав которого напоминает таковой во внеклеточной среде организма млекопитающих (рис. 4а), с флуоресценцией csP3 в растворе, который по содержанию неорганических солей соответствует цитозолю (рис. 4б) (составы см. в “Материалах и методах”). Кроме того, проверили влияние  $\text{NaHCO}_3$  на флуоресценцию csP3, поскольку внеклеточная и внутриклеточная среды организма содержат бикарбонат, который образуется в результате окислительного фосфорилирования в митохондриях (рис. 4б и 4г). Мониторинг флуоресценции начинали через ~5 мин после смешения P3 (10 мкМ) с  $\text{Na}_2\text{S}$  (300 мкМ).



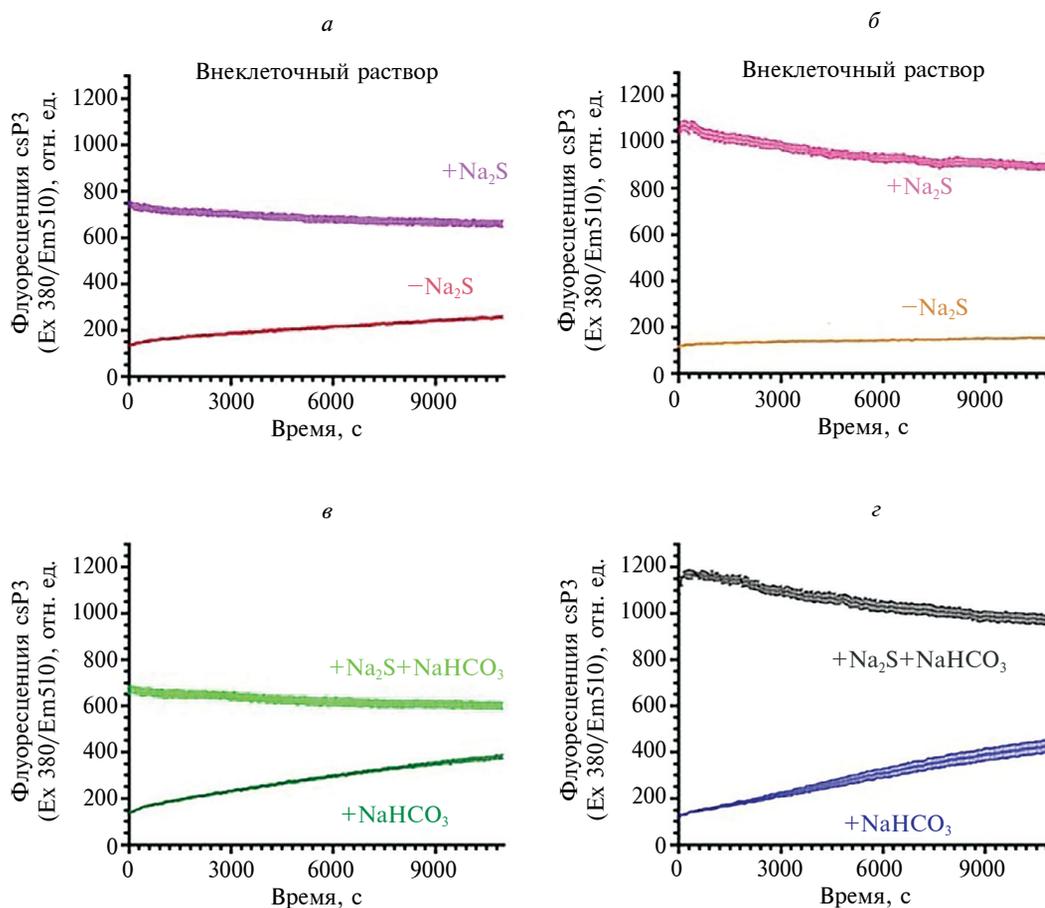
**Рис. 2.** Изменения флуоресценции, вызванные добавкой сульфида натрия ( $\text{Na}_2\text{S}$ , 100 мкМ), служащего донором  $\text{H}_2\text{S}$ , к раствору P3 (10 мкМ). Состав минимального солевого раствора (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 20 HEPES, 2  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$  pH 7.4. Длины волн возбуждения ( $E_x$ ) и регистрации флуоресценции ( $E_m$ ) соответственно  $380 \pm 8$  и  $510 \pm 10$  нм. Концентрации P3 и  $\text{Na}_2\text{S}$  соответственно 10 и 100 мкМ.



**Рис. 3.** Спектры флуоресценции исходного P3, его карбоциклического сульфидрильного производного (csP3), образовавшегося при добавлении  $\text{Na}_2\text{S}$ , и влияние полярности среды на флуоресценцию P3 и csP3. Спектры записаны через 20 мин после смешения P3 с  $\text{Na}_2\text{S}$ . Концентрации реагентов и состав раствора как на рис. 2. Спектры P3+DMSO и csP3+DMSO получены после добавления к соответствующим растворам DMSO (30% по объему). Длина волны возбуждения флуоресценции  $380 \pm 8$  нм.

Оказалось, что в растворе, приближенном по солевому составу к **внутриклеточному**, добавление  $\text{Na}_2\text{S}$  к P3 (рис. 4б) увеличивает флуоресценцию сильнее, чем в растворе, соответствующем **внеклеточному** раствору (рис. 4а). При этом со временем флуоресценция csP3 медленно снижалась. Добавление бикарбоната до концентрации, которая близка к физиологической снаружи и внутри клеток (10 мМ  $\text{NaHCO}_3$ ) [26], медленно увеличивало флуоресценцию в обоих растворах в отсутствие  $\text{Na}_2\text{S}$  (рис. 4б, 4г). Наличие бикарбоната практически не влияло на сигнал csP3 в присутствии  $\text{Na}_2\text{S}$  в обоих растворах (рис. 4б, 4г). Плавный рост флуоресценции в лунках, не имевших  $\text{Na}_2\text{S}$ , но содержавших  $\text{NaHCO}_3$ , обусловлен, возможно, абсорбцией газообразного  $\text{H}_2\text{S}$ , образовавшегося в соседних лунках, в которые добавляли  $\text{Na}_2\text{S}$ .

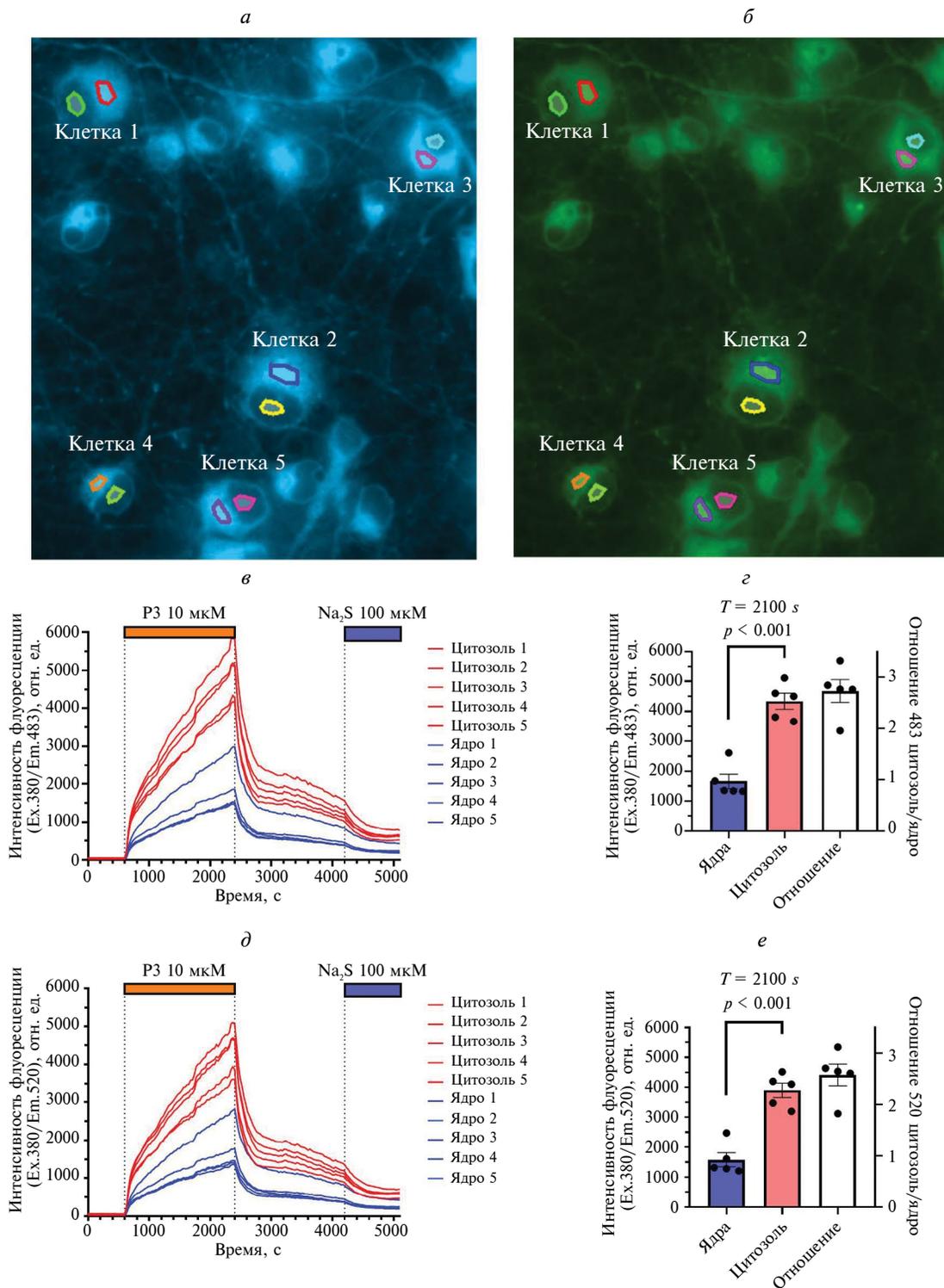
**Флуоресцентная микроскопия клеток, окрашенных P3.** Опираясь на молекулярные структуры P3 и csP3 (рис. 1), можно предположить способность этих веществ к перераспределению между водной и гидрофобной фазами и зависимость их флуоресценции от полярности микроокружения. Это предположение было подтверждено влиянием добавок диметилсульфоксида на спектры эмиссии флуоресценции P3 и csP3 (рис. 3, см. также [18]). Переход в более гидрофобное окружение вызывает одновременно с ростом интенсивности флуоресценции коротковолновый сдвиг полосы эмиссии [25], поэтому изображения (рис. 5а, 5б) и кинетику встраивания P3 в клетки и его превращения



**Рис. 4.** Влияние солевого состава раствора на флуоресценцию  $H_2S$ -зонда csP3. Флуоресценция csP3 в растворе, приближенном по составу солей к внеклеточной среде (а) и к минимальному солевому составу цитозоля (в), и влияние бикарбоната натрия ( $NaHCO_3$ , 10 мМ) на флуоресценцию csP3 во внеклеточном (б) и внутриклеточном (г) растворах. Составы растворов и pH указаны в “Материалах и методах”. Условия регистрации флуоресценции как на рис. 2.

в csP3 (рис. 5в, 5г) регистрировали на двух длинах волн эмиссии  $483 \pm 16$  и  $520 \pm 18$  нм. Видно, что флуоресценция клеток первичной нейрональной культуры из мозга крысы, к которым добавили P3 (10 мкМ), распределена в основном в цитоплазме и значительно менее интенсивна в области ядра (рис. 5а, 5б). Такое распределение зонда указывает на то, что мембранные структуры цитоплазмы и, возможно, белки связывают больше зонда, чем водная фаза, и/или имеют гораздо более интенсивную флуоресценцию. Кинетика подъема флуоресценции была нелинейной в первые 10 мин после добавления P3, а затем практически линейно возрастала течение последующих 20 мин (рис. 5в, 5д). Отмывание раствора, содержащего P3, также имела ярко выраженный двухфазный характер. Для проверки полноты превращения P3 в csP3 дополнительно вносили  $Na_2S$  (100 мкМ), служащий донором  $H_2S$ . Ускорения прироста флуоресценции не обнаружено (рис. 5в, 5д). Отсутствие

прироста флуоресценции при добавлении  $Na_2S$  может свидетельствовать о том, что (1) спустя 55 мин после добавки весь P3 уже превратился в csP3, либо (2) рост флуоресценции отражает не столько образование csP3, сколько его перераспределение между зонами клетки разной гидрофобности. Если кинетика роста флуоресценции отражает перераспределение P3 и csP3 между водным окружением и внутриклеточными структурами и компонентами (например, белками), имеющими меньшую полярность, чем вода, то отношение интенсивностей эмиссии флуоресценции при  $483 \pm 16$  и  $520 \pm 18$  нм должно непрерывно возрастать. Однако отношение интенсивностей эмиссии  $483/520$  оказалось постоянным на протяжении всего времени присутствия P3 в растворе, а также после удаления P3. Кроме того, отношение интенсивностей флуоресценции в цитоплазме и в ядре не зависело от длины волны регистрации излучения зонда (рис. 5г, 5е).



**Рис. 5.** Флуоресценция производного РЗ в области ядра существенно ниже, чем в области цитозоля. *а, б* – Изображения нейронов при возбуждении при 387 нм и регистрации эмиссии при  $483 \pm 16$  (*а*) и  $520 \pm 18$  нм (*б*); получены через 23 мин после добавления РЗ. На изображениях выделены ROI, кинетика изменений интенсивности которых приведена на графиках *в, д*. Изменения в области ядра обозначены синим цветом, в области цитозоля – красным. На панелях *е, ф* сопоставлены интенсивности (левые шкалы) и отношения интенсивностей (правые шкалы) в цитоплазме и ядре при регистрации сигналов при 483 и 520 нм (соответственно “Отношение 483 цитозоль/ядро” и “Отношение 520 цитозоль/ядро”) через 23 мин после добавления РЗ. Интенсивность флуоресценции на всех графиках представлена после вычета фона. Объектив  $40 \times / NA = 1.35$  oil.

В литературе отмечены как нейропротекторные, так и нейротоксические свойства эндогенного и экзогенного  $H_2S$  [8–12]. Поэтому мы проверили на модели глутаматной эксайтотоксичности [27–34], будут ли происходить такие изменения сигналов P3, которые можно интерпретировать, как изменения концентрации эндогенного  $H_2S$ . Для этого к культивируемым нейронам из кортекса новорожденных крыс добавляли Glu (10 мкМ, 10 мкМ глицина, 0 магния), измеряя одновременно изменения  $[Ca^{2+}]_i$  (флуоресценцию Xrhod-5F) и флуоресценцию P3/csP3. Glu ввели через 25 мин после добавления P3, когда увеличение флуоресцентного сигнала зонда приобрело линейный характер. 15-минутное действие Glu вызывало развитие отсроченной кальциевой дерегуляции (ОКД) [27] в 51% нейронов (286 из 560 клеток, три эксперимента). Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в одном из трех экспериментов показаны на рисунке 6а и 6б. В нейронах, не имевших ОКД, первоначальный скачок  $[Ca^{2+}]_i$  сменялся снижением  $[Ca^{2+}]_i$  до более низкого стабильного уровня (рис. 6а). Удаление Glu заменой раствора на бескальциевый приводило к быстрому снижению  $[Ca^{2+}]_i$ . Характерной особенностью изменений  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах, в которых развилась ОКД, является наличие вторичного подъема  $[Ca^{2+}]_i$  при продолжающемся действии Glu (рис. 6б). В таких нейронах удаление Glu приводит к снижению  $[Ca^{2+}]_i$ , как правило, после значительной задержки [21, 22, 27, 28].

Подъем флуоресценции P3/csP3 после добавления Glu происходил только в тех нейронах, в которых ОКД не развилась (рис. 6в, 6г). Это различие четко видно при совмещении усредненных графиков флуоресценции P3/csP3 (рис. 6д), а также при сопоставлении относительного прироста флуоресценции зонда в течение первых трех минут действия Glu (рис. 6е). Отметим, что начало роста флуоресценции  $H_2S$ -зонда происходило с 1.5–2-минутной задержкой относительно скачка  $[Ca^{2+}]_i$ , вызванного глутаматом (см. рис. 6а и 6в).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Интерес к роли  $H_2S$  в функционировании биологических систем от клетки до организма сильно возрос за последние 15 лет (число обзоров, реферируемых PubMed, увеличилось в 20 раз). В значительной мере этот интерес обусловлен возможным протекторным эффектом  $H_2S$  в условиях стресса [9], в том числе по отношению к клеткам центральной нервной системы [11–13]. Возможность изменить концентрацию этого газообразного трансммиттера или хотя бы относительные изменения его концентрации является необходимым условием

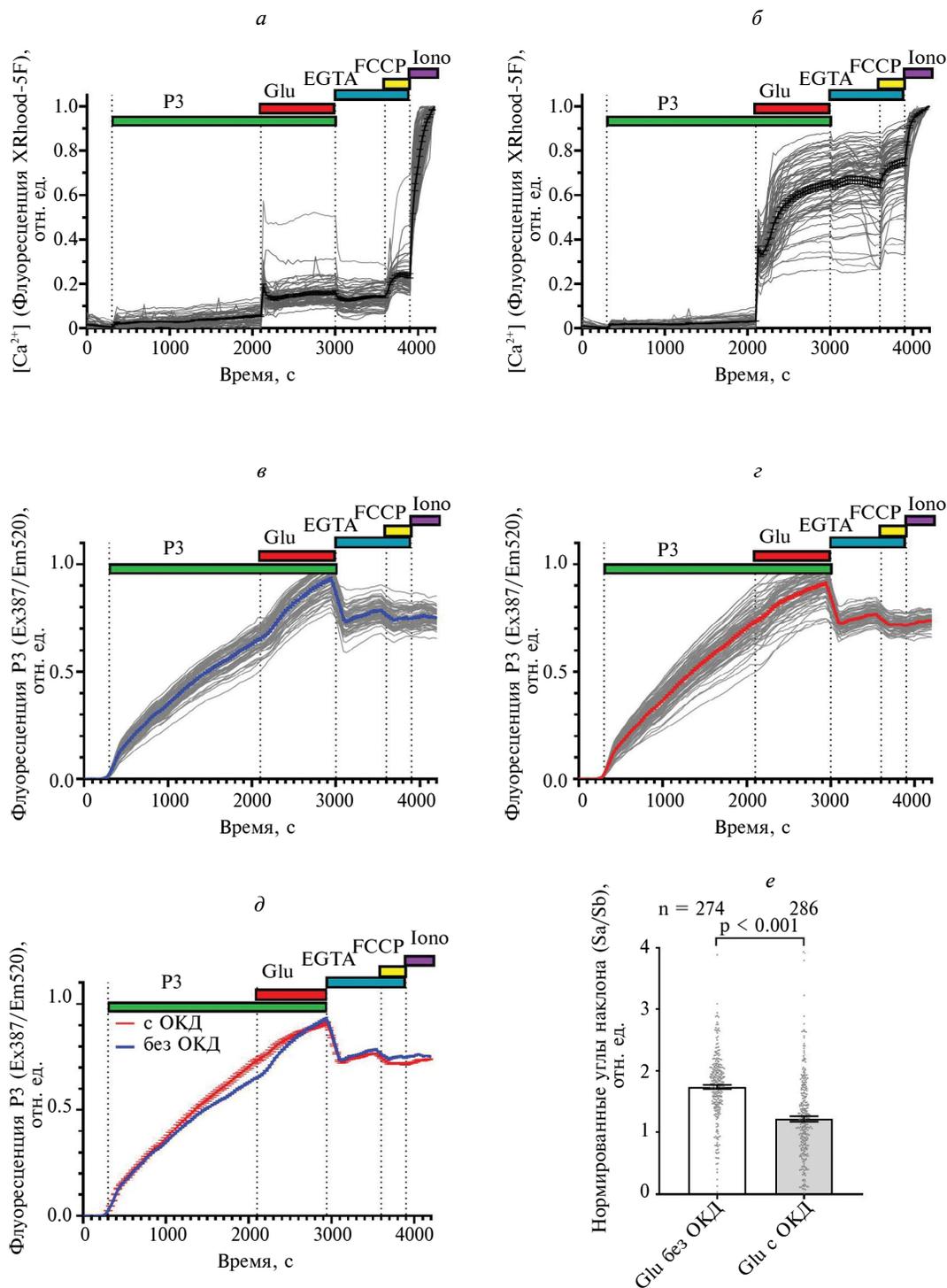
исследования роли  $H_2S$  во внутриклеточном сигналинге. В этой связи критическое значение имеет наличие нетоксичных, чувствительных и ярких флуоресцентных сенсоров, дающих возможность исследовать индивидуальные клетки методом флуоресцентной микроскопии.

Недавно описан ряд соединений [1], одно из которых, P3, коммерчески доступно и удовлетворяет указанным выше критериям. Однако свойства P3 и продукта его взаимодействия с  $H_2S$  (и с анионом  $HS^-$ ), csP3, во внутриклеточной среде пока недостаточно изучены. Необходимо учитывать, что на состав среды могут влиять внешние воздействия. В частности, ионный состав нейронов значительно изменяется при эксайтотоксическом действии глутамата [27, 28].

В данной работе исследовали пригодность P3 в качестве внутриклеточного  $H_2S$ -сенсора для измерения содержания этого газотрансммиттера в индивидуальных клетках нейрональной культуры методом флуоресцентной микроскопии. Проведенные эксперименты показали, что (1) в растворах, имитирующих по ионному составу внеклеточную или внутриклеточную среду, флуоресцентные характеристики P3 и продукта его взаимодействия с  $H_2S/HS^-$ , csP3 значительно различаются, и что (2) зонды P3 и csP3, по-видимому, диффундируют во внутриклеточные структуры, в которых флуорофорная часть зонда защищена от тушения полярным окружением (рис. 3, 4). Перераспределение P3 между водной и гидрофобной фазами может влиять на кинетику превращения P3 в csP3 и на флуоресцентные параметры обеих молекул.

В культивируемых нейронах  $H_2S$  способен модулировать активность ионотропных рецепторов NMDA-типа [8, 9, 11]. Эндогенным лигандом рецепторов этого типа служит глутамат, основной возбуждающий нейромедиатор ЦНС. Добавка Glu к нейрональным клеткам приводит к резкому изменению концентраций  $Na^+$ ,  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  в цитоплазме, приближая концентрации этих ионов к концентрации внеклеточной среды [27, 29, 30]. Действие Glu вызывает сильное закисление [31–33]. Данные, представленные на рис. 3, демонстрируют, что изменения флуоресценции P3 и csP3 будут отражать не только изменения внутриклеточного содержания  $H_2S$  (и аниона  $HS^-$ ), но также изменения ионного состава внутриклеточной среды и могут быть ошибочно интерпретированы как изменения содержания  $H_2S/HS^-$  при воздействии Glu на нейроны.

При добавлении Glu к первичной культуре нейронов происходит набухание сомы клеток [34]. Изменение формы сомы нейронов вызвано, вероятно,



**Рис. 6.** Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  и флуоресцентных сигналов  $H_2S$ -зонда P3 в some клетках при действии глутамата (Glu). *a, б* – Изменения  $[Ca^{2+}]_i$ ; *в, г* – изменения сигналов P3/csP3; *е* – изменения относительных наклонов графиков флуоресценции P3/csP3 (нормализованные углы наклона), вызванные добавлением глутамата, в нейронах имевших (+ОКД) и не имевших (–ОКД) отсроченную кальциевую дерегуляцию. На панелях *a–г* показаны результаты одного из трех аналогичных экспериментов. На панели *е* представлены данные всех трех экспериментов. Относительные наклоны (Sa/Sb) определяли как тангенсы углов наклона коротких линейных фрагментов сигналов P3 индивидуальных нейронов, полученные за 3 мин до (Sb) и в течение первых 3 мин после (Sa) добавления Glu. Измерения  $[Ca^{2+}]_i$  выполнены с помощью XRhod-5F (возбуждение  $578 \pm 10$ , эмиссия  $641 \pm 37$  нм). Глутамат (Glu, 10 мкМ) добавляли в безмагниевого растворе, содержащем 10 мкМ глицина. Возраст культуры 9 дней.

изменениями структуры клеточных мембран и, как следует из приведенных выше данных, потенциально способно повлиять на флуоресценцию P3 и/или csP3. Действительно, Glu вызывал увеличение флуоресценции P3 и/или csP3, однако только в тех нейронах, в которых ОКД не развилась (рис. 6в и 6г). Начало роста флуоресценции H<sub>2</sub>S-зонда происходило с 1.5–2-минутной задержкой относительно индуцированного глутаматом скачка [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (рис. 6в и 6г). Примерно такая же временная задержка 1.5–2 мин от момента добавления Glu до начала увеличения объема сомы нейронов наблюдалась при изучении процесса набухания нейронов методами атомно-силовой и флуоресцентной микроскопии [34].

Потоки ионов через NMDA-рецепторы быстро активируют Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азы, поддерживающие ионный гомеостаз и, соответственно, резко активируют окислительное фосфорилирование в митохондриях, снабжающих эти насосы АТФ. В результате митохондрии значительно увеличивают продукцию CO<sub>2</sub> и HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Наличие бикарбоната значительно влияет на кинетику взаимодействия P3 с донором H<sub>2</sub>S и HS<sup>-</sup>, по крайней мере в тех случаях, когда донором служит Na<sub>2</sub>S и солевой раствор по составу имитирует внутриклеточную среду в покоящихся нейронах (рис. 3). Можно ожидать, что внутри клеток флуоресценция P3 и csP3 также будет заметно зависеть от внутриклеточной концентрации HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Окрашивание зондом P3 нейронов коры головного мозга крыс в первичной культуре показало, что P3 и/или его продукт csP3 сравнительно равномерно распределены в цитоплазме и в гораздо меньшей концентрации присутствуют в ядре (рис. 5). Это обстоятельство согласуется с тем, что P3 и csP3 преимущественно липофильные молекулы и должны предпочтительно распределяться в мембраны и гидрофобные зоны белков. Не исключено, что такое перераспределение P3 между водной и гидрофобной фазами влияет на кинетику превращения P3 в csP3 и на флуоресцентные параметры обеих молекул.

Суммируя результаты данного исследования, отметим, что синтез молекул, имеющих большую чувствительность флуоресцентных параметров к H<sub>2</sub>S и быстрее с ним реагирующих, продолжается [15, 35]. Появляются альтернативные сенсоры H<sub>2</sub>S, принцип действия которых основан на отделении под действием H<sub>2</sub>S группы, тушащей флуоресценцию, от потенциального флуорофора [17], или химической модификации тушащей группы без присоединения H<sub>2</sub>S [13, 36]. Следует, однако, учесть, что у всех этих сенсоров есть общее

структурное свойство – наличие ароматической части, служащей флуорофором. Параметры флуоресценции таких зондов будут, как в случае P3 и csP3, отражать не только внутриклеточное содержание H<sub>2</sub>S и HS<sup>-</sup>, но и перераспределение зондов между компартментами клетки и структурами, различающимися полярностью. Это обстоятельство вынуждает с осторожностью интерпретировать рост флуоресценции описанных в литературе и рассмотренных в данной работе зондов как показатель образования внутриклеточной H<sub>2</sub>S и/или аниона HS<sup>-</sup>.

Авторы глубоко признательны И.А. Помыткину за предоставление зонда P3 и ценные советы при выполнении экспериментов и обсуждении результатов. Благодарим А.А. Некрасову за помощь при приготовлении культур клеток.

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

**Источники финансирования.** Работа выполнена при поддержке Государственного задания № FGФU-2022-0012 и субсидии Минобрнауки России № 08-07-S6/2021/82930.

**Соответствие принципам этики.** Эксперименты с животными проводили в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth. Edition, 2010*), а также в соответствии с “*Good Laboratory Rules practice*”, утвержденными приказом Минздрава России № 199н от 04.01.2016. Все протоколы были одобрены комитетом по этике ФГБНУ “НИИ общей патологии и патофизиологии”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singha S., Kim D., Moon H., Wang T., Kim K.H., Shin Y.H., Jung J., Seo E., Lee S.J., Ahn K.H. 2015. Toward a selective, sensitive, fast-responsive, and biocompatible two-photon probe for hydrogen sulfide in live cells. *Anal. Chem.* **87** (2), 1188–1195.
2. Wang R. 2002. Two’s company, three’s a crowd: Can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* **16** (13), 1792–1798.
3. Li Q., Lancaster J.R. 2013. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide.* **35**, 21–34.
4. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., Бирюлина Ю.Г., Носарев А.В., Петрова И.В., Медведев М.А., Орлов С.Н., Реутов В.П. 2015. Газовая сигнализация в клетках млекопитающих. *Успехи физиол. наук.* **46** (4), 53–73.
5. Сукманский О.И., Реутов В.П. 2016. Газотрансмиттеры: физиологическая роль и участие

- в патогенезе заболеваний. *Успехи физиол. наук.* **47** (3), 30–58.
6. Reutov V.P., Sorokina E.G., Sukmanskyy O.I. 2020. Cycles of nitric oxide (NO), superoxide radical anion ( $\cdot O_2^-$ ) and hydrogen sulfur/sulfur dioxide ( $H_2S/SO_2$ ) in mammals. *Current Res. Biopolymers*, **3**, 1.
  7. Wang R. 2010. Hydrogen sulfide: The third gasotransmitter in biology and medicine. *Antioxid. Redox Signal*, **12** (9), 1061–1064.
  8. Kimura H. 2010. Hydrogen sulfide: From brain to gut. *Antioxid. Redox Signal*. **12** (9), 1111–1123.
  9. Kimura H. 2020. Hydrogen sulfide signalling in the CNS – Comparison with NO. *Br.J. Pharmacol.* **177** (22), 5031–5045.
  10. Kumar M., Sandhir R. 2018. Hydrogen sulfide in physiological and pathological mechanisms in brain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. **17** (9), 654–670.
  11. Zhong H., Yu H., Chen J., Sun J., Guo L., Huang P., Zhong Y. 2020. Hydrogen sulfide and endoplasmic reticulum stress: A potential therapeutic target for central nervous system degeneration diseases. *Front. Pharmacol.* **11**, 702. doi 10.3389/fphar.2020.00702.
  12. Salehpour M., Ashabi G., Kashef M., Marashi E.S., Ghasemi T. 2023. Aerobic training with naringin supplementation improved spatial cognition via  $H_2S$  signaling pathway in Alzheimer's disease model rats. *Exp. Aging Res.* **49** (4), 407–420.
  13. Sun P., Chen H.C., Lu S., Hai J., Guo W., Jing Y.H., Wang B. 2022. Simultaneous sensing of  $H_2S$  and ATP with a two-photon fluorescent probe in Alzheimer's disease: Toward understanding why  $H_2S$  regulates glutamate-induced ATP dysregulation. *Anal. Chem.* **94** (33), 11573–11581.
  14. Wang S., Huang Y., Guan X. 2021. Fluorescent probes for live cell thiol detection. *Molecules*. **26** (12).
  15. Chen S., Hou P., Wang J., Fu S., Liu L. 2018. A rapid and selective fluorescent probe with a large Stokes shift for the detection of hydrogen sulfide. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **203**, 258–262.
  16. Chen X., Huang Z., Huang L., Shen Q., Yang N. Di, Pu C., Shao J., Li L., Yu C., Huang W. 2022. Small-molecule fluorescent probes based on covalent assembly strategy for chemoselective bioimaging. *RSC Adv.* **12** (3), 1393–1415.
  17. Yan L., Gu Q.S., Jiang W.L., Tan M., Tan Z.K., Mao G.J., Xu F., Li C.Y. 2022. Near-infrared fluorescent probe with large Stokes shift for imaging of hydrogen sulfide in tumor-bearing mice. *Anal. Chem.* **94** (14), 5514–5520.
  18. Singha S., Kim D., Roy B., Sambasivan S., Moon H., Rao A.S., Kim J.Y., Joo T., Park J.W., Rhee Y.M., Wang T., Kim K.H., Shin Y.H., Jung J., Ahn K.H. 2015. A structural remedy toward bright dipolar fluorophores in aqueous media. *Chem. Sci.* **6** (7), 4335–4342.
  19. Safiulina D., Kaasik A., Seppet E., Peet N., Zharkovsky A., Seppet E. 2004. Method for in situ detection of the mitochondrial function in neurons. *J. Neurosci. Methods*. **137** (1), 87–95.
  20. Kolikova J., Afzalov R., Surin A., Lehesjoki A.E., Khiroug L. 2011. Deficient mitochondrial  $Ca^{2+}$  buffering in the Cln8(mnd) mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Cell Calcium*. **50** (6), 491–501.
  21. Бакаева З.В., Сурин А.М., Лизунова Н.В., Згодова А.Е., Красильникова И.А., Фисенко А.П., Фролов Д.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Пинелис В.Г. 2020. Нейропротекторный потенциал пептидов HFRWPGR (ACTH 6–9 PGR), KKRRPGR, PGRP в культивируемых корковых нейронах при глутаматной эксайтотоксичности. *Докл. РАН. Науки о жизни.* **491** (1), 117–121.
  22. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E., Fisenko A., Boyarkin D., Balyasin M., Demchenko A., Pomytkin I., Pinelis V. 2019. Insulin protects cortical neurons against glutamate excitotoxicity. *Front. Neurosci.* **13**, 1027. doi 10.3389/fnins.2019.01027.
  23. Liang G.H., Adebisi A., Leo M.D., McNally E.M., Leffler C.W., Jaggar J.H. 2011. Hydrogen sulfide dilates cerebral arterioles by activating smooth muscle cell plasma membrane  $K_{ATP}$  channels. *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300** (6), H2088–H2095. doi 10.1152/ajpheart.01290.2010.
  24. Yoo D., Jupiter R.C., Pankey E.A., Reddy V.G., Edward J.A., Swan K.W., Peak T.C., Mostany R., Kadowitz P.J. 2015. Analysis of cardiovascular responses to the  $H_2S$  donors  $Na_2S$  and NaHS in the rat. *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309** (4), H605–H614.
  25. Лакович Дж. 1986. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, с. 194–221.
  26. Vaughan-Jones R.D., Spitzer K.W. 2002. Role of bicarbonate in the regulation of intracellular pH in the mammalian ventricular myocyte. *Biochem. Cell Biol.* **80** (5), 579–596.
  27. Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86** (2), 279–351.
  28. Шарипов Р.Р., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Горбачева Л.Р., Сурин А.М. 2018. Исследование механизма сенситизации нейронов к повторному действию глутамата. *Биол. мембраны.* **35** (5), 384–397.
  29. Kiedrowski L. 1999. N-methyl-D-aspartate excitotoxicity: Relationships among plasma membrane potential,  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange, mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload, and cytoplasmic concentrations of  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ , and  $K^+$ . *Mol. Pharmacol.* **56** (3), 619–632.
  30. Nicholls D.G., Budd S.L. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* **80** (1), 315–360.
  31. Bolshakov A.P., Mikhailova M.M., Szabadkai G., Pinelis V.G., Brustovetsky N., Rizzuto R., Khodorov B.I. 2008. Measurements of mitochondrial pH in

- cultured cortical neurons clarify contribution of mitochondrial pore to the mechanism of glutamate-induced delayed  $\text{Ca}^{2+}$  deregulation. *Cell Calcium*. **43** (6), 602–614.
32. Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. 2014. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной  $\text{Ca}^{2+}$ -дисрегуляцией, митохондриальной деполяризацией и последующей гибелью нейронов. *Патогенез*. **12** (4), 40–46.
33. Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Шарипов Р.Р., Пинелис В.Г. 2022. Изменения рН в матриксе митохондрий и цитозоле при индуцированной глутаматом дисрегуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза в культивируемых нейронах гиппокампа крысы. *Биол. мембраны*. **39** (4), 307–318.
34. Efremov Y.M. Yu.M., Grebenik E.A., Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Kotova S.L., Akovantseva A.A., Bakaeva Z.V., Pinelis V.G., Surin A.M., Timashev P.S. 2020. Viscoelasticity and volume of cortical neurons under glutamate excitotoxicity and osmotic challenges. *Biophys. J.* **119** (9), 1712–1723.
35. Yao L., Yin C., Huo F. 2022. Small-molecule fluorescent probes for detecting several abnormally expressed substances in tumors. *Micromachines (Basel)*. **13**, 1328. <https://doi.org/10.3390/mi13081328>
36. Vitvitsky V., Kumar R., Libiad M., Maebius A., Landry A.P., Banerjee R. 2021. The mitochondrial NADH pool is involved in hydrogen sulfide signaling and stimulation of aerobic glycolysis. *J. Biol. Chem.*, **296**, 100736–100750.

## On the Feasibility of Using an Acedane-Based Fluorescent Probe to Monitor Hydrogen Sulfide in Primary Neuronal Cultures

© 2024 г. R. R. Sharipov<sup>1</sup>, I. A. Tarzhanov<sup>2,3</sup>, A. A. Zgodova<sup>2,3</sup>, Z. V. Bakaeva<sup>2,4</sup>, A. M. Surin<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

<sup>2</sup>*National Medical Research Center of Children's Health, Russian Ministry of Health, Moscow, 119296 Russia*

<sup>3</sup>*Institute of Pharmacy, The Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Ministry of Health, Moscow, 119435 Russia,*

<sup>4</sup>*Gorodovikov Kalmyk State University, Elista, 358000 Russia*

\**e-mail: surin\_am@mail.ru*

Hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ), which, under physiological conditions, exists in cells mainly in the form of anion  $\text{HS}^-$ , is considered as a gaseous transmitter of inter- and intracellular signals along with nitrogen oxide and carbon monoxide. Analysis of the dynamics of  $\text{H}_2\text{S}$  content in living cells is impossible without creating sensitive and specific probes. Several acedan-based compounds have been synthesized in the group of K.H. Ahn (Singha et al., 2015. *Anal. Chem.* **87** (2), 1188–1195). In the presence of  $\text{H}_2\text{S}$  these probes attach to the sulfhydrylic group and form fluorescent carbocyclic compounds. The carbocyclic derivative of P3, compound csP3, was found to be optimal for fluorescence-microscopic studies in terms of spectral characteristics and response time to  $\text{H}_2\text{S}$ . In this work, we tested the suitability of csP3 to record  $\text{H}_2\text{S}$  changes in buffers mimicking the salt composition of the intracellular environment and in primary neuronal culture cells from rat cerebral cortex. It was found that reducing the polarity of the solution by adding dimethyl sulfoxide (30% by volume) caused a blue shift of the emission by ~10 nm and a twofold increase in fluorescence intensity. The csP3 fluorescence depends on the salt composition and increases in the presence of bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM). Addition of P3 or csP3 to the neuronal culture caused a rapid increase in fluorescence, which was followed by a slow increase in fluorescence signal after 3–5 min. Glutamate (10  $\mu\text{M}$ , in the presence of 10  $\mu\text{M}$  glycine, 0  $\text{Mg}^{2+}$ ) increased probe fluorescence, but only in those neurons in which delayed deregulation of calcium homeostasis did not occur. We conclude that the product of the reaction of P3 with  $\text{H}_2\text{S}$  is sensitive to a change in the salt composition of the intracellular medium and can be redistributed in cells between water and more hydrophobic environment. This means that an increase in P3 fluorescence in cells, especially after the addition of glutamate to neurons, does not necessarily indicate an increase in  $\text{H}_2\text{S}$  concentration. To confirm the feasibility of using P3 and structurally related probes as quantitative indicators of  $\text{H}_2\text{S}$  presence, additional studies of the properties of these compounds are needed.

**Keywords:** fluorescent probe, hydrogen sulfide, primary neuronal cultures, glutamate, excitotoxicity