

ISSN 0233-4755

Том 41, Номер 3

Май-Июнь 2024



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Журналу

40

лет

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 41, номер 3, 2024

ОБЗОРЫ

- Электрофизиология сердца *Danio rerio*
А. В. Карпушев, В. Б. Михайлова, А. А. Костарева, Б. С. Жоров 175
- Физико-химические особенности связывания тромбина с мембраной тромбоцита
Р. Р. Керимов, Д. Ю. Нечипуренко, М. А. Пантелеев 191
- ***
- Анализ молекулярных механизмов влияния хронического облучения на электрические сигналы растений пшеницы
П. А. Пирогова, Т. А. Здобнова, А. В. Иванова, М. А. Гринберг, В. А. Воденев 201
- Нарушения регуляции объема клеток эндотелия роговицы при кератоконусе
И. М. Кузеина, Л. Е. Каткова, Г. С. Батурина, И. Г. Пальчикова, И. А. Искаков, Е. И. Соленов 211
- Изменение регуляции гистонового кода при инициации параптозоподобной гибели опухолевых клеток Нер-2 окисленными производными дисульфирама
М. Е. Соловьева, Ю. В. Шаталин, В. С. Акатов 219
- Влияние 20-гидроксиэкдизона на функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышей
А. А. Семенова, А. Д. Игошкина, Н. В. Микина, Р. Г. Савченко, Л. В. Парфенова, М. В. Дубинин 233
- О возможности использования флуоресцентного зонда на основе ацедана для регистрации сульфида водорода (H₂S) в клетках первичных нейрональных культур
Р. Р. Шарипов, И. А. Таржанов, А. А. Згодова, З. В. Бакаева, А. М. Сурин 243
- Сравнительное исследование механизмов кальциевого ответа в сперматозоидах человека и мыши
Ю. Д. Коробкина, М. А. Пантелеев, А. Н. Свешникова 254
- Особенности жирнокислотного состава липидов вакуолярной мембраны в условиях стресса, вызванного ионами меди
И. С. Капустина, В. В. Гурина, Н. В. Озолина, Е. В. Спиридонова 275
-

CONTENTS

Vol. 41, No. 3, 2024

REVIEWS

- Electrophysiology of the *Danio rerio* Heart
A. V. Karpushev, V. B. Mikhailova, A. A. Kostareva, B. S. Zhorov 175
- Physicochemical Features of Thrombin Binding to Platelet Membrane
R. R. Kerimov, D. Yu. Nechipurenko, M. A. Pantelev 191
- ***
- Analysis of Molecular Mechanisms of Chronic Irradiation Effects on Electrical Signals in Wheat Plants
P. A. Pirogova, T. A. Zdobnova, A. V. Ivanova, M. A. Grinberg, V. A. Vodeneev 201
- Cell Volume Regulation of Endothelial Cells Is Impaired in Keratoconus Cornea
I. M. Kuseina, L. E. Katkova, G. S. Baturina, I. G. Palchikova, I. A. Iskakov, E. I. Solenov 211
- Changes in Histone Code Regulation during the Initiation of Paraptosis-Like Death of HEP-2 Tumor Cells by Oxidized Disulfiram Derivatives
M. E. Solovieva, Yu. V. Shatalin, V. S. Akatov 219
- The Effect of 20-Hydroxyecdysone on the Functioning of Isolated Mouse Skeletal Muscle Mitochondria
A. A. Semenova, A. D. Igoshkina, N. V. Mikina, R. G. Savchenko, L. V. Parfenova, M. V. Dubinin 233
- On the Feasibility of Using an Acedane-Based Fluorescent Probe to Monitor Hydrogen Sulfide in Primary Neuronal Cultures
R. R. Sharipov, I. A. Tarzhanov, A. A. Zgodova, Z. V. Bakaeva, A. M. Surin 243
- Comparative Investigation of the Mechanisms of Calcium Response in Human and Murine Spermatozoa
J. D. Korobkina, M. A. Pantelev, A. N. Sveshnikova 254
- Characteristics of the Fatty Acid Composition of the Vacuolar Membrane Lipids Under the Conditions of Stress Induced by Copper Ions
I. S. Kapustina, V. V. Gurina, N. V. Ozolina, E. V. Spiridonova 275
-
-

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ СЕРДЦА *DANIO RERIO*

© 2024 г. А. В. Карпушев^{а, *}, В. Б. Михайлова^б, А. А. Костарева^б, Б. С. Жоров^{а, б}

^аИнститут эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

^бНациональный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России,

Санкт-Петербург, 197341 Россия

*e-mail: akarpushev@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.11.2023

После доработки 30.01.2024

Принята к печати 30.01.2024

Тропическая рыбка *Danio rerio* имеет большую популярность как модельный объект для электрофизиологических исследований сердечной физиологии и патологии человека. *D. rerio* отличается сходство с человеком таких функциональных параметров электрической активности сердца, как частота сердечных сокращений, морфология потенциала действия, а также набор деполяризующих и реполяризующих клеточную мембрану ионных токов. *D. rerio* легко разводить, с рыбой несложно обращаться в эксперименте и легко модифицировать генетически. В обзоре представлены современные данные по структурно-функциональной организации ионных каналов в миоцитах сердца *D. rerio*.

Ключевые слова: *Danio rerio*, сердце, кардиомиоцит, ионный ток, электрофизиология

Список сокращений: МПП – мембранный потенциал покоя; ПД – потенциал действия; СР – саркоплазматический ретикулум; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЭКГ – электрокардиограмма; I_{CaL} – Ca^{2+} -ток L-типа; I_{CaT} – Ca^{2+} -ток T-типа; I_f или I_h – пейсмекерный ток; I_{KACH} – ацетилхолин-зависимый K^+ -ток внутреннего выпрямления; I_{KATP} – АТР-чувствительный K^+ -ток внутреннего выпрямления; I_{KCa} – ток Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов; I_{K2p} – ток K^+ -каналов с двумя поровыми доменами; I_{Kr} – быстрая компонента K^+ -тока задержанного выпрямления; I_{Ks} – медленная компонента K^+ -тока задержанного выпрямления; I_{Kslow} – медленно инактивирующийся K^+ -ток; I_{Kur} – ультрабыстрый K^+ -ток задержанного выпрямления; I_{K1} – K^+ -ток внутреннего выпрямления; I_{Na} – Na^+ -ток; I_{to} – транзиторный выходящий ток; LQTS – синдром длинного интервала QT; NCX – натрий-кальциевый обменник; $V_{0.5a}$ и $V_{0.5i}$ – потенциал половины максимальной стационарной активации и инактивации.

DOI: 10.31857/S0233475524030015, EDN: csxfqk

ВВЕДЕНИЕ

Популярными моделями в исследовательских работах по изучению нормальной или патологической физиологии сердца человека являются мелкие грызуны – крысы и мыши [1, 2]. Главное преимущество использования грызунов заключается в сходстве с человеком анатомии сердца. Однако результаты работы на грызунах не всегда могут быть соотнесены с физиологией сердца человека. Отличительными особенностями физиологии сердца мелких грызунов являются высокая частота сердечных сокращений (ЧСС), мощный транзиторный выходящий ток I_{to} и медленно инактивирующийся K^+ -ток I_{Kslow} и отсутствие K^+ -токов задержанного выпрямления I_{Kr} и I_{Ks} [3–5]. Таким

образом, лабораторные грызуны обладают характерным электрофизиологическим профилем: короткий потенциал действия (ПД), сильно выраженная фаза начальной быстрой реполяризации и низкий потенциал фазы плато.

Пресноводная тропическая рыбка *Danio rerio* успешно используется как альтернатива млекопитающим в исследованиях процессов развития и тестирования фармакологических препаратов [6–10]. Экспериментальная работа с этим объектом обладает рядом преимуществ: короткий репродуктивный цикл, высокий уровень жизнеспособного потомства, оптическая транспарентность в эмбриональный период, а также дешевизна и простота содержания. Эмбрионы *D. rerio* достаточно малы для осуществления пассивной диффузии

кислорода во все ткани организма. Это дает шанс на развитие даже особям с тяжелейшими кардиальными нарушениями, в то время как зародыши млекопитающих стремительно гибнут.

Как и рыбка *Danio rerio*, к эктотермным животным относится другой модельный объект — лягушка. Электрофизиология сердца лягушки обладает сильно выраженной сезонной зависимостью [11–13]. Показано, что профиль ПД предсердных и желудочковых кардиомиоцитов и плотность K^+ -токов внутреннего выпрямления I_{K1} и I_{KAcH} в большой степени меняются в зависимости от сезона [13]. Кроме того, в сердце лягушки не описан важнейший ток реполяризации I_{Kr} [14], а основным реполяризующим током является I_{Ks} [15–17].

Регистрация электрофизиологических процессов в сердце *D. rerio* осуществляется методами электрокардиографии, микроэлектродной техники, методами локальной фиксации потенциала и оптического картирования с использованием потенциал-чувствительных и кальций-чувствительных флуоресцентных красителей [18–22].

Сердце *Danio rerio*

Сердце — первый орган, который начинает функционировать у эмбриона *D. rerio*. Первые сердечные сокращения можно обнаружить уже через 24 ч после оплодотворения [23]. На этом этапе сердце представляет собой линейную трубку, состоящую из двух концентрических монослоев: внутреннего эндокарда и внешнего миокарда. К 48 ч после оплодотворения все предшественники миокарда инкорпорируются в сердце, которое уже сформировало петлю. На этой стадии четко различимы предсердие и желудочек, разделенные атриовентрикулярным каналом. В течение 3–5 дней после оплодотворения эпикард покрывает миокард [24–26], и трабекулярные кардиомиоциты появляются в результате отслоения стенки миокарда [27, 28]. Клапаны формируются в атриовентрикулярном канале и в выносящем тракте [29, 30]. Коронарная сосудистая система в сердце *D. rerio* развивается через несколько недель после оплодотворения, когда эндокардиальные клетки из атриовентрикулярного канала разрастаются по поверхности желудочка [31].

Примерно через 3 месяца после оплодотворения сердце *D. rerio* имеет диаметр около 1 мм. Сердце *D. rerio* двухкамерное, включает предсердие и желудочек, также выделяют венозный синус и луковичку аорты. Предсердие и желудочек состоят из миокарда, снаружи покрытого эпикардом, а изнутри — эндокардиальными клетками [32]. Стенка желудочка состоит из трех слоев

специализированного миокарда. Преобладающая губчатая мышечная ткань состоит из трабекул, радиально выступающих в просвет камеры. Тонкий слой кортикального миокарда толщиной от 2 до 4 клеток окружает трабекулярный слой. Монослой уплощенных кардиомиоцитов лежит на стыке между кортикальным и трабекулярным миокардом. Сердце взрослого животного сильно иннервировано [33] и васкуляризировано [32], имеет систему коронарных сосудов, которая снабжает кортикальный слой кислородом и питательными веществами [31]. Таким образом, несмотря на различия в размерах и его более простое устройство, гистологическая организация сердца *D. rerio* и млекопитающих схожа.

ЭКГ и потенциал действия

При анатомическом отличии сердца *D. rerio*, его функциональные характеристики, ЧСС и ЭКГ, близки к таковым человека [34, 35]. ЧСС *D. rerio* составляет примерно 120–130 ударов в минуту у взрослой рыбки и около 190 ударов в минуту у эмбрионов в возрасте 48 ч при температуре воды +28°C [18, 36–38]. По данным Schweizer и соавторов [38] в диапазоне температур воды от +18 до +30°C ЧСС эмбрионов *D. rerio* изменяется в пределах от 82.8 до 218.0 ударов в минуту.

Морфологические элементы ЭКГ *D. rerio* представлены Р-волной, QRS-комплексом и Т-волной [39]. Профиль ЭКГ *D. rerio* характеризуется высокой степенью сходства с ЭКГ человека [40] (рис. 1а). Однако при сравнении ЭКГ следует иметь в виду, что регистрация ЭКГ *D. rerio* происходит при значительно более низких температурах по сравнению с температурой человека [10]. По данным Liu и соавторов [41], интервалы PR, QRS и QT у взрослого животного при температуре воды +25°C составляют 63.5 ± 7.2 , 35.0 ± 3.3 и 282 ± 29 мс соответственно. Внутривентрикулярное введение хлорида калия вызывает аритмию с характеристиками, сходными с атриовентрикулярной блокадой у человека. Наблюдаются нерегулярные удлинения интервала RR, изменения длительности интервала PR, увеличение длительности комплекса QRS вместе с уменьшением положительного и увеличением отрицательного компонентов, удлинение или выпадение зубца Р. В некоторых работах показана инверсия Т-волны ЭКГ *D. rerio*, причем частота встречаемости инверсии сильно различается — от 5 до 97% случаев записи ЭКГ [37, 42–44]. Также негативная Т-волна регистрируется при криогенных и ампутационных повреждениях миокарда желудочка рыбки [41]. Более того, Т-волна может отсутствовать или регистрироваться

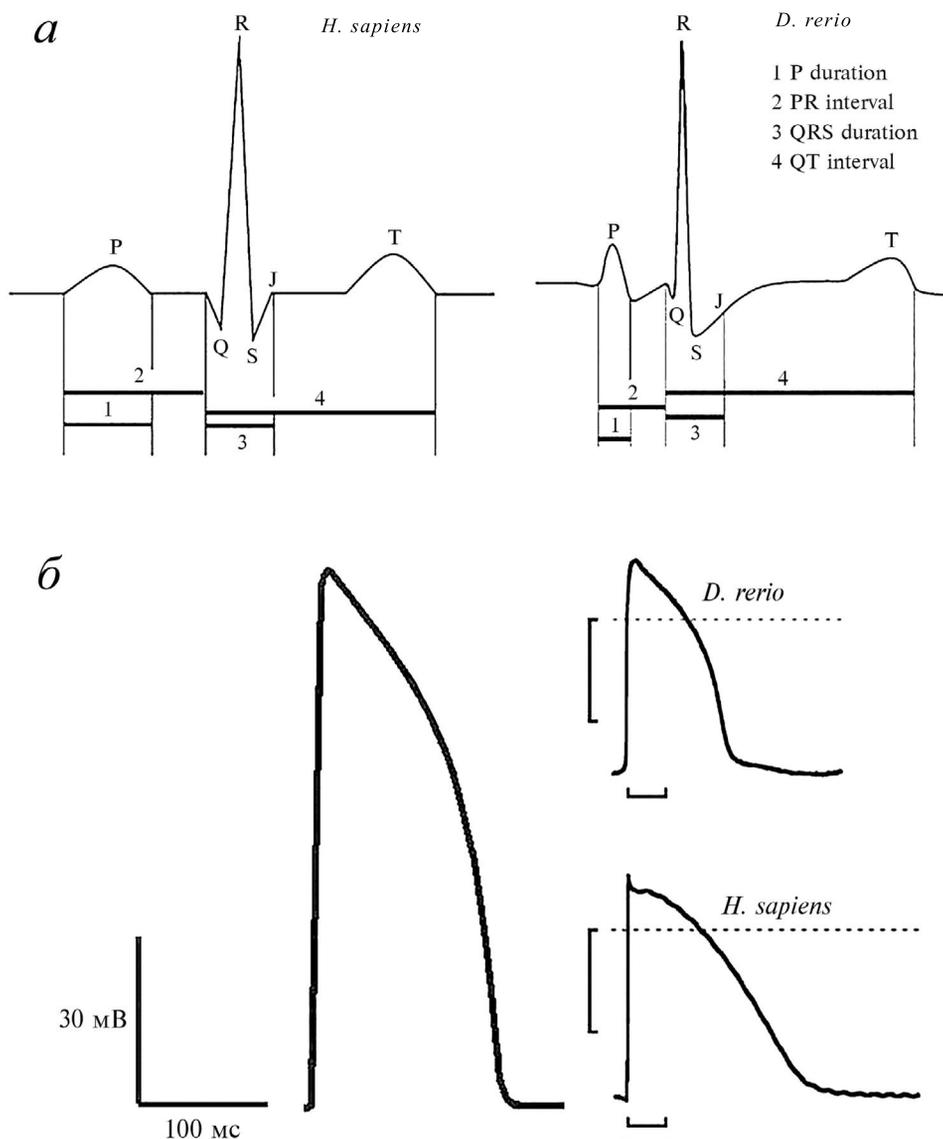


Рис. 1. *a* – Сравнение ЭКГ человека и *D. rerio* [48]. *б* – Пример записи ПД желудочкового кардиомиоцита в изолированном сердце *D. rerio* [19]. Сравнение ПД желудочковых кардиомиоцитов *D. rerio* и человека [97].

как положительная, так и отрицательная у одной и той же рыбки [44]. Инверсия зубца Т ЭКГ человека может быть нормой у детей и подростков вследствие доминирования правого желудочка или может быть связана с различными патологиями: ишемической болезнью сердца, гипертрофией миокарда правого желудочка и др. [45]. Что является нормой для рыбки, и связана ли полярность Т-волны с анатомией желудочка рыбки (трабекулярная структура миокарда затрудняет оценку

толщины стенки желудочка), на сегодняшний день является предметом дискуссии [43, 44].

Запись ЭКГ *D. rerio* выполняется с помощью игольчатых электродов, расположенных на вентральной поверхности в мышечной ткани на глубине 0.5–1 мм по средней линии или косо лево-каудально – право-краниально [39, 41, 46–48]. Положительный электрод в грудной области, отрицательный каудальнее в грудной или анальной области. Zhao и соавторы [42] использовали три варианта отведения ЭКГ с помощью трех

регистрирующих электродов в грудной области в вершинах воображаемого треугольника с геометрией подобной треугольнику Эйнтховена, но с полярностью противоположной той, что присутствует в расположении электродов в стандартных отведениях от конечностей человека. Сходство в профиле QRS-комплекса рыбки и человека авторы называют зеркальным, так как сонаправленность полярности зубцов наблюдается при разнонаправленности полярности электродов. В следующей работе Zhao и соавторы [43] с помощью четырех электродов в грудной области выполнили запись ЭКГ в двух отведениях одновременно, моделируя I и II отведения у человека, и показали, что электрическая ось сердца *D. rerio* имеет средний угол -69° в системе координат ЭКГ, т. е. представляет собой зеркальное отражение главной оси сердца человека (в среднем $+60^\circ$) относительно горизонтальной оси координат.

ЧСС *D. rerio* определяется работой синоатриального узла. Последний расположен в кольцевой структуре на венозном полюсе сердца, на границе между венозным синусом и предсердием, около синоатриального клапана [49–51]. Среднее время,

необходимое для возбуждения всего предсердия изолированного сердца *D. rerio*, составляет 20 ± 2 мс [10]. Задержка проведения в атриовентрикулярном канале составляет 47 ± 8 мс, после чего наступает возбуждение желудочка, причем сначала в апикальной области. Время активации желудочка примерно 14 ± 2 мс при спонтанной активности и 24 ± 3 мс при эктопической стимуляции.

Морфологически кардиомициты *D. rerio* представляют собой удлинённые клетки, существенно более узкие, чем рабочие клетки миокарда млекопитающих, и обладают меньшей электрической емкостью (рис. 2) [19, 52]. Кроме того, кардиомициты рыбок лишены Т-трубочек, что дополнительно способствует низкой электрической емкости мембраны. Однако, несмотря на отсутствие Т-трубочек, отношение электрической емкости клеточной мембраны к объему желудочковых миоцитов *D. rerio* составляет примерно 12 условных единиц [52], что близко по значению к кардиомицитам млекопитающих [53].

Мембранный потенциал покоя (МПП) изолированных желудочковых кардиомицитов *D. rerio* по разным данным составляет примерно от -70

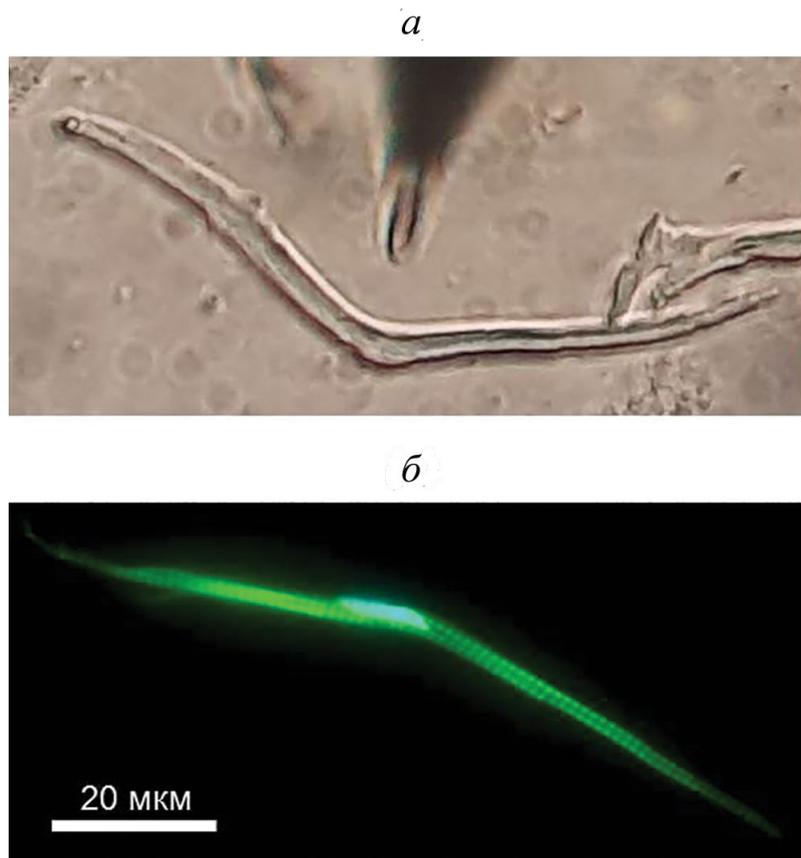


Рис. 2. *a* – Микрофотография в проходящем свете изолированного желудочкового кардиомицита *D. rerio*. *б* – Эпифлуоресцентная микрофотография актиновых филаментов желудочкового кардиомицита *D. rerio*, окрашенных фаллоидином-Alexa Fluor 488 (зеленый). Ядро окрашено DAPI (синий) [19].

до -80 мВ [18, 52, 54]. Brette и соавторы [52] регистрировали ПД в изолированных желудочковых кардиомиоцитах взрослых *D. rerio*. Электрическая емкость клеток составляла 26.0 ± 1.1 пФ. Длительность ПД на уровнях 25, 50 и 90% реполяризации при частоте стимуляции 0.1 Гц составляли 48 ± 14 , 112 ± 23 и 151 ± 30 мс соответственно. Увеличение частоты стимуляции до 2 Гц сопровождалось уменьшением длительности ПД. Авторы исследования подчеркивают, что профиль ПД близок к таковому крупных млекопитающих, в том числе человека. В ПД кардиомиоцитов сердца *D. rerio* присутствуют все фазы, за исключением начальной быстрой реполяризации, фазы 1. Наиболее важная черта сходства заключается в наличии хорошо выраженной фазы плато в желудочковых ПД *D. rerio* (рис. 1б), что выгодно отличает рыбку как модельный объект по сравнению с мелкими грызунами, у которых фаза плато отсутствует. Присутствие фазы плато проявляется на профиле ЭКГ в виде четко оформленного интервала QT [40, 55]. Вместе с тем имеется и некоторое отличие в морфологии ПД, отсутствие фазы начальной быстрой реполяризации, фазы 1 [18]. Ген *KCND3*, кодирующий субъединицу канала $K_v4.3$, был обнаружен в геноме *D. rerio* (табл. 1) [56], однако соответствующий ионный ток I_{to1} , отвечающий за развитие фазы 1, в кардиомиоцитах не регистрировался [18, 57]. $K_v4.3$ может присутствовать во внесердечных тканях, так как K^+ -ток А-типа, эквивалентный I_{to} кардиомиоцитов регистрировался в скелетных мышцах [58].

Nemtsas и соавторы [18] регистрировали ПД в предсердных и желудочковых миоцитах интактного изолированного сердца *D. rerio*. Анализ записей показал, что развитие деполяризации в клетках миокарда *D. rerio* происходит медленнее по сравнению с кардиомиоцитами млекопитающих. Авторы отмечают отсутствие начального спайка, характерного для ПД человека, наличие фазы плато и меньшую длительность ПД по сравнению с ПД кардиомиоцитов человека.

Реакция сердца *D. rerio* на действие различных фармакологических агентов сходна с реакцией сердца человека. Препараты, снижающие амплитуду желудочкового ПД или укорачивающие ПД человека, такие как тетродотоксин, лидокаин, нитрендипин или нифедипин, имеют сходные эффекты на желудочковые миоциты *D. rerio* [18, 57, 59]. Блокаторы каналов быстрой компоненты задержанного выпрямления hERG, такие как E4031 или терфенадин, увеличивают длительность ПД как в миоцитах сердца *D. rerio*, так и человека [18, 57].

Натриевый ток

Потенциал-зависимый Na^+ -ток I_{Na} входящего направления обуславливает развитие деполяризации мембраны в клетках возбудимых тканей [60, 61]. Наличие I_{Na} отмечается в миокарде как предсердия, так и желудочка сердца *D. rerio* (рис. 3а) [18, 19, 62]. В культуре кардиомиоцитов, выделенных из предсердия или желудочка, максимальные плотности I_{Na} при -30 мВ составляют 97.9 и 99.3 пА/пФ соответственно [62]. В работе Karpushev и соавторов [19] плотности I_{Na} при потенциале -35 мВ в свежесделанных желудочковых миоцитах взрослых рыбок составляет 317.9 ± 34.6 пА/пФ. Потенциал половины максимальной стационарной инактивации ($V_{0.5i}$) I_{Na} несколько более отрицательный в миоцитах предсердия *D. rerio*, чем в клетках желудочка, -77.6 и -71.1 мВ соответственно. Соответствующие коэффициенты наклона графиков потенциал-зависимости стационарной инактивации 5.3 и 4.7 мВ. Смещение $V_{0.5i}$ в сторону гиперполяризации по отношению к МПП в миоцитах предсердий, по данным Nemtsas и соавторов [18], указывает на меньшую доступность Na^+ -каналов для активации при генерации ПД. В то же время коэффициенты наклона предполагают пониженную чувствительность к стационарной инактивации I_{Na} в предсердии по сравнению с желудочком [62]. По данным Furukawa и соавторов [63], биофизические характеристики I_{Na} в кардиомиоцитах *D. rerio* и человека сходны. В миоцитах предсердия *D. rerio* потенциал половины максимальной стационарной активации ($V_{0.5a}$) I_{Na} , максимальная проводимость I_{Na} и коэффициент наклона графика потенциал-зависимости стационарной активации составляют -39.1 ± 1.1 мВ, 0.55 ± 0.06 нСм/пФ и 5.9 ± 0.2 мВ соответственно. Для миоцитов желудочка эти параметры принимают значения -37.4 ± 2.3 мВ, 0.65 ± 0.03 нСм/пФ и 5.5 ± 0.2 мВ соответственно [63]. Как указывалось выше, нарастание деполяризации в рабочих клетках сердца *D. rerio* происходит значительно медленнее, чем в кардиомиоцитах человека, что, по мнению Nemtsas и соавторов [18], связано с меньшей плотностью I_{Na} . Однако на культуре кардиомиоцитов рыбки показано, что плотность I_{Na} не различается в клетках, выделенных из предсердия или желудочка. Вместе с тем активация Na^+ -каналов в предсердии происходит при более низких потенциалах по сравнению с желудочком [62].

Ортологами сердечной изоформы гена поробразующей субъединицы Na^+ -канала млекопитающих в сердце *D. rerio* являются гены *SCN5Laa* и *SCN5Lab* (табл. 1) [64]. Этим генам соответствуют каналы $Na_v1.5a$ и $Na_v1.5b$. Экспрессия этих

Таблица 1. Ионные токи, α -субъединицы и гены ионных каналов в кардиомиоцитах *D. rerio* и *H. sapiens*

| Ионный ток | α -Субъединица | Ген | α -Субъединица | Ген |
|-----------------|--|---|---|---|
| | <i>D. rerio</i> | | <i>H. sapiens</i> | |
| I_{Na} | Na _v 1.5a Na _v 1.5b | <i>SCN5Laa</i> <i>SCN5Lab</i> | Na _v 1.5 | <i>SCN5A</i> |
| I_{CaL} | Ca _v 1.2 (α 1C) * Ca _v 1.3a (α 1Da) Ca _v 1.3b (α 1Db) | <i>CACNA1C</i> <i>CACNA1Da</i> <i>CACNA1Db</i> | Ca _v 1.2 (α 1C) Ca _v 1.3 (α 1D) ** | <i>CACNA1C</i> <i>CACNA1D</i> |
| I_{CaT} | Ca _v 3.1 (α 1G) * Ca _v 3.2a (α 1Ha) Ca _v 3.2b (α 1Hb) | <i>CACNA1G</i> <i>CACNA1Ha</i> <i>CACNA1Hb</i> | Ca _v 3.1 (α 1G) ** Ca _v 3.2 (α 1H) ** | <i>CACNA1G</i> <i>CACNA1H</i> |
| I_{to} | | | K _v 1.4 K _v 4.2 K _v 4.3 | <i>KCNA4</i> <i>KCND2</i> <i>KCND3</i> |
| I_{Kr} | K _v 11.2 (ERG2) K _v 11.1 (ERG1) K _v 11.1 (ERG1) K _v 11.1 (ERG1) K _v 11.3 (ERG3) | <i>KCNH6</i> <i>KCNH2a</i> <i>KCNH2b</i> <i>KCNH7</i> | K _v 11.1 (hERG1) | <i>KCNH2</i> |
| I_{Ks} | K _v 7.1 | <i>KCNQ1</i> | K _v 7.1 | <i>KCNQ1</i> |
| I_{Kur} | | | K _v 1.5 *** | <i>KCNA5</i> |
| I_{K1} | K _{ir} 2.4 **** K _{ir} 2.2a **** K _{ir} 2.2b K _{ir} 2.1a K _{ir} 2.1b K _{ir} 2.3 | <i>KCNJ14</i> <i>KCNJ12a</i> <i>KCNJ12b</i> <i>KCNJ2a</i> <i>KCNJ2b</i> <i>KCNJ4</i> | K _{ir} 2.2 K _{ir} 2.1 K _{ir} 2.3 | <i>KCNJ12</i> <i>KCNJ2</i> <i>KCNJ4</i> |
| I_{KATP} | K _{ir} 6.1 K _{ir} 6.2 | <i>KCNJ12a</i> | K _{ir} 6.1 K _{ir} 6.2 | <i>KCNJ8</i> <i>KCNJ11</i> |
| I_{KACH} | K _{ir} 3.1 K _{ir} 3.4 | <i>KCNJ12B</i> | K _{ir} 3.1 (GIRK1) K _{ir} 3.4 (GIRK4) | <i>KCNJ3</i> <i>KCNJ5</i> |
| I_f | HCN4 | <i>KCNJ2a</i> | HCN4***** HCN1 HCN2 | <i>HCN4</i> <i>HCN1</i> <i>HCN2</i> |
| I_{NCX} | NCX1h | <i>KCNJ2b</i> | NCX1 | <i>SLC8A1</i> |
| I_{K2p} ***** | TWIK-1 (K _{2p} 1.1) TASK-1 (K _{2p} 3.1) TASK-3 (K _{2p} 9.1) | <i>KCNJ4</i> | TWIK-1 (K _{2p} 1.1) TASK-1 (K _{2p} 3.1) | <i>KCNK1</i> <i>KCNK3</i> |
| I_{KCa} ***** | K _{Ca} 2.1 (SK1) K _{Ca} 2.2 (SK2) K _{Ca} 2.3 (SK3) K _{Ca} 1.1 (BK) | <i>KCNN1</i> <i>KCNN2</i> <i>KCNN3</i> <i>KCNMA1a</i> <i>KCNMA1b</i> | K _{Ca} 2.1 (SK1) K _{Ca} 2.2 (SK2) K _{Ca} 2.3 (SK3) K _{Ca} 1.1 (BK) | <i>KCNN1</i> <i>KCNN2</i> <i>KCNN3</i> <i>KCNMA1</i> |

* Ca_v1.2 и Ca_v3.1 являются основными изоформами α -субъединиц Ca²⁺-каналов в сердце *D. rerio* [74].

** *CACNA1D* (Ca_v1.3), *CACNA1G* (Ca_v3.1) и *CACNA1H* (Ca_v3.2) экспрессируются в пейсмекерных клетках и проводящей системе сердца человека [73].

*** Ультрабо́стрый ток I_{Kur} канала K_v1.5 обнаруживается у человека только в рабочих предсердных кардиомиоцитах [92].

**** K_{ir}2.4 и K_{ir}2.2a являются основными изоформами α -субъединиц каналов I_{K1} в сердце *D. rerio* [98].

***** HCN4 является основной изоформой HCN каналов в синоатриальном узле и других отделах проводящей системы сердца млекопитающих [110].

***** I_{K2p} и I_{KCa} в сердце *D. rerio* не обнаружены [93].

В аналогичной позиции у человека расположен остаток цистеина [67].

Кальциевые токи

Вход Ca^{2+} через плазматическую мембрану необходим для запуска сократительной функции клеток миокарда и контролируется потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами. Различные протоколы стимуляции и использование фармакологических препаратов продемонстрировали, что I_{Ca} в предсердных и желудочковых миоцитах *D. rerio* представляет собой комбинацию Ni^{2+} -чувствительного I_{CaT} с низким порогом активации и высокопорогового нифедипин-чувствительного I_{CaL} (рис. 3б, 3в) [18, 19, 52, 68, 69]. Присутствие I_{Ca} в кардиомиоцитах эмбриона *D. rerio* показано с помощью блокатора NNC55–0396 [57].

В рабочем миокарде млекопитающих преобладающей изоформой Ca^{2+} -канала является $Ca_v1.2$, которая принадлежит к L-типу [70, 71]. Ca^{2+} -каналы T-типа экспрессируются в сердце плода, а в здоровом сердце взрослого человека их присутствие ограничено пейсмекерными клетками [72, 73]. В кардиомиоцитах *D. rerio* вход Ca^{2+} обеспечивается двумя изоформами: $Ca_v1.2$ и $Ca_v3.1$ (табл. 1), последняя принадлежит к T-типу [74]. Naverinen и соавторы [74] показали, преобладание генетической экспрессии изоформы $Ca_v3.1$, но более выраженную функциональную активность $Ca_v1.2$. В работе Karpushev и соавторов [19], напротив, зарегистрировано значительное преобладание I_{CaT} над I_{CaL} в желудочковых кардиомиоцитах с плотностями токов 7.4 ± 1.3 и 4.8 ± 0.7 пА/пФ соответственно.

Гены *SACNA1C* и *SACNA1G*, кодирующие субъединицы $Ca_v1.2$ и $Ca_v3.1$ соответственно, экспрессируются в одинаковой степени как в предсердии, так и в желудочке *D. rerio* [74]. Кроме того, в миокарде взрослых *D. rerio* показана экспрессия генов субъединиц каналов L-типа: $Ca_v1.1a$, $Ca_v1.1b$, $Ca_v1.3a$, $Ca_v1.3b$, $Ca_v1.4a$ и $Ca_v1.4b$, T-типа: $Ca_v3.2a$, $Ca_v3.2b$, $Ca_v3.3a$, $Ca_v3.3b$ и P/Q-, N- и R-типов: $Ca_v2.1a$, $Ca_v2.1b$, $Ca_v2.2a$, $Ca_v2.2b$, $Ca_v2.3a$, $Ca_v2.3b$ [74]. Однако уровень экспрессии этих изоформ на два-три порядка ниже, чем $Ca_v1.2$ и $Ca_v3.1$. Обнаружена экспрессия генов β -субъединиц: двух $\beta 2$ (*SACNB2a* и *SACNB2b*) и двух $\beta 4$ (*SACNB4a* и *SACNB4b*) [75, 76], а также $\alpha 2\delta$ -субъединицы *SACNA2D1a* [77].

В сердце *D. rerio* Ca^{2+} -каналы T-типа активируются при потенциале около -60 мВ, тогда как Ca^{2+} -каналы L-типа активируются при -40 мВ [18, 74]. I_{CaT} достигает пиковой плотности тока

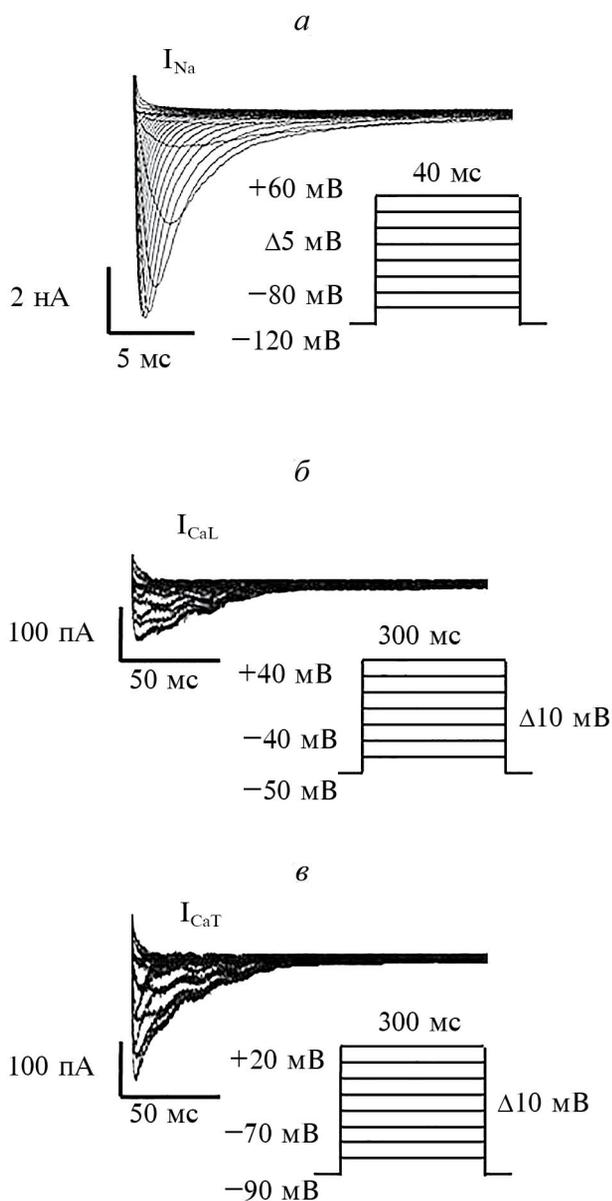


Рис. 3. Примеры записи потенциал-зависимых натриевого тока I_{Na} (а), кальциевых токов L-типа I_{CaL} (б) и T-типа I_{CaT} (в) в изолированных желудочковых кардиомиоцитах *D. rerio* [19]. На врезках протоколы подачи тестирующих стимулов.

генов меняется на разных стадиях развития *D. rerio*. В сердце эмбриона рыбки экспрессируются оба ортолога, в то время как в миокарде взрослого животного экспрессируется только *SCN5Lab* [65]. Отличительной особенностью Na^+ -канала *D. rerio* является высокая чувствительность к тетродотоксину [66]. Причину такого свойства обуславливает присутствие аминокислотного остатка тирозина Y401 в P-петле домена I α -субъединицы канала.

при -30 мВ, затем I_{CaL} достигает пиковой плотности тока при 0 мВ. Таким образом обеспечивается непрерывное присутствие деполяризующего I_{Ca} , противодействующего реполяризующему K^+ -току I_K . Баланс деполяризующего I_{Ca} и реполяризующего I_K формирует фазу плато ПД. Отмечается, что в сердце *D. rerio* I_{CaL} обеспечивает на 80% Ca^{2+} -транзист в отличие от кардиомиоцитов человека, где вклад I_{CaL} оценивается только в $20-25\%$ [71, 78].

Калиевые токи задержанного выпрямления

Быстрая компонента K^+ -тока задержанного выпрямления I_{Kr} является основным реполяризующим током в рабочих клетках миокарда предсердия и желудочка *D. rerio* (рис. 4а) [18, 62]. I_{Kr} регистрируется как в культуре эмбриональных кардиомиоцитов [68], так и в свежeweделенных миоцитах взрослых рыбок [18]. В сердце взрослых *D. rerio* блокатор I_{Kr} E4031 увеличивает длительность ПД миоцитов предсердия и желудочка [18] и интервала QT [37]. Эти наблюдения согласуются с данными, полученными на человеке [79]. Кроме того, E4031 уменьшает ЧСС, что предполагает участие I_{Kr} в пейсмеркерной активности [37]. Подобный эффект наблюдается и в сердце млекопитающих [80, 81]. В сердце *D. rerio* I_{Kr} проводится каналом ERG2, субъединица которого кодируется геном *KCNH6*, а не каналом ERG1, гена *KCNH2*, как в сердце человека (табл. 1) [82–84]. Scholz и соавторы [85] проанализировали биофизические характеристики I_{Kr} с помощью гетерологической экспрессии в ооцитах *Xenopus* генов каналов ERG *D. rerio* и человека. По сравнению с ERG человека $V_{0.5a}$ канала рыбки сдвинуто в сторону более положительных потенциалов, а $V_{0.5i}$ сдвинуто в сторону более отрицательных потенциалов. Таким образом, активация ERG *D. rerio* несколько замедлена, тогда как деактивация значительно ускорена.

Кроме того, в сердце *D. rerio* обнаружена экспрессия генов *KCNH2A*, *KCNH2B* и *KCNH7* (табл. 1) [1]. Наличие гетерозиготной мутации в гене *KCNH2* *D. rerio* воспроизводит фенотип, подобный клиническому фенотипу синдрома длинного интервала QT (LQTS) человека [86, 87]. Фармакологические препараты, чье действие также заключается в удлинении интервала QT у человека, оказывают сходное действие на сердце эмбрионов *D. rerio*: увеличение длительности ПД, блок проведения в атриовентрикулярном соединении и замедление ЧСС [88, 89]. Таким образом, наличие I_{Kr} делает *D. rerio* удобной моделью для реконструкции LQTS [40].

Долгое время не удавалось обнаружить в сердце *D. rerio* медленную компоненту K^+ -тока задержанного выпрямления I_{Ks} [18]. Abramochkin и коллеги [90] смогли зарегистрировать I_{Ks} в свежeweделенных желудочковых кардиомиоцитах как ток, чувствительный к хроманолу 293В (рис. 4б). Апликация хроманола 293В на интактное сердце *D. rerio* увеличивает длительность ПД. В предсердии и желудочке *D. rerio* обнаружен транскрипт гена α -субъединицы канала $K_v7.1$ *KCNQ1* (табл. 1). Однако экспрессия гена *KCNE1*, кодирующего β -субъединицу minK на порядок ниже [90, 91]. Предполагается, что вследствие низкого уровня экспрессии *KCNE1*, канал $K_v7.1$ в кардиомиоцитах *D. rerio* формируется преимущественно без участия β -субъединицы minK, что объясняет более быструю, чем в сердце человека, кинетику I_{Ks} . В сердце человека, напротив, канал представляет собой комплекс субъединиц $K_v7.1$ и minK.

Ультрабыстрый K^+ -ток задержанного выпрямления I_{Kur} , генерируемый каналом $K_v1.5$, обнаруживается только в рабочих предсердных кардиомиоцитах человека, где он сильно выражен, но полностью отсутствует в желудочковых клетках [92]. I_{Kur} не обнаружен в сердце *D. rerio* [93].

Калиевый ток внутреннего выпрямления

K^+ -ток внутреннего выпрямления I_{K1} был обнаружен как Ba^{2+} -чувствительный ток в изолированных кардиомиоцитах *D. rerio* [18]. Присутствие I_{K1} показано в клетках миокарда предсердия и желудочка *D. rerio*, как и в сердце человека. Причем плотность I_{K1} примерно в 5 раз выше в желудочковых миоцитах, чем в предсердных, что также согласуется с данными, полученными на млекопитающих [94–96].

Наборы субъединиц каналов не идентичны у рыбки и млекопитающих. Поэтому Ravens [97] высказывает предположение, что *D. rerio* может не воспроизводить аритмии, связанные с определенными каналопатии с участием каналов внутреннего выпрямления K_{ir} человека. В кардиомиоцитах *D. rerio* каналы образованы главным образом субъединицами $K_{ir2.4}$ и $K_{ir2.2a}$ [98], в то время как в миокарде человека преобладают $K_{ir2.1}$, $K_{ir2.2}$ и $K_{ir2.3}$ (табл. 1) [99, 100]. Кроме того, показана экспрессия в предсердии и желудочке *D. rerio* генов субъединиц $K_{ir2.1a}$, $K_{ir2.1b}$, $K_{ir2.2b}$ и $K_{ir2.3}$ [98]. Отмечается, что чувствительность каналов K_{ir2} рыбки к блокированию Ba^{2+} отличается от таковой у млекопитающих: $K_{ir2.4}$ на два порядка более чувствителен, в то время как $K_{ir2.1a}$ на порядок менее чувствителен [98].

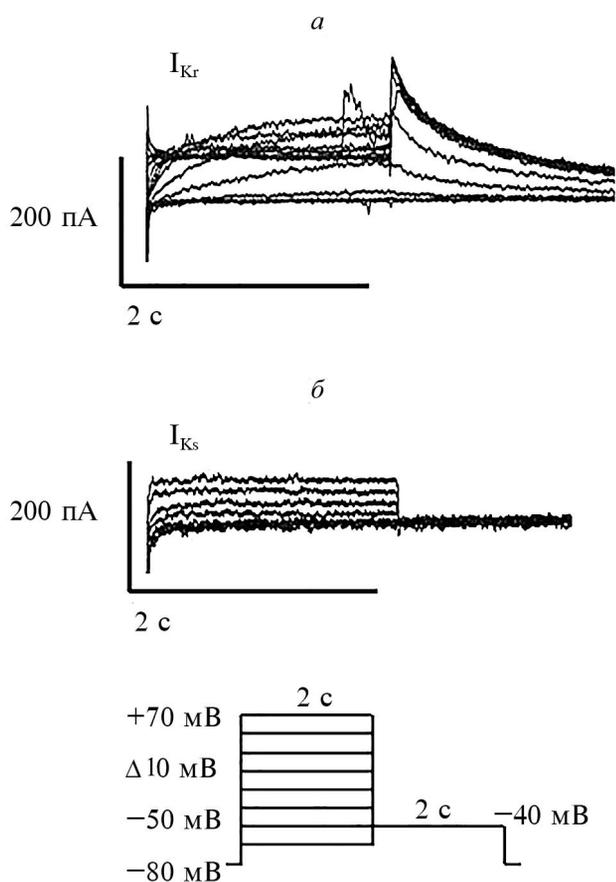


Рис. 4. Примеры записи калиевых токов задержанного выпрямления I_{Kr} (а) и I_{Ks} (б) в изолированных желудочковых кардиомиоцитах *D. rerio* [19]. На врезке протокол подачи тестирующих стимулов.

Лиганд-управляемые калиевые каналы

В миокарде предсердия и желудочка *D. rerio* показана экспрессия генов *KCNJ8* и *KCNJ11* (субъединицы $K_{ir}6.1$ и $K_{ir}6.2$), а также *ABCC9* (субъединицы *SUR2A* и *SUR2B*, рецептора сульфонилмочевин) (табл. 1) [101]. АТФ-чувствительный K^+ -ток внутреннего выпрямления I_{KATP} регистрируют в предсердных и желудочковых миоцитах. Этот ток генерируется каналами, образованными субъединицами $K_{ir}6.2$ и *SUR2*, в то время как функционально активные каналы гладкомышечных клеток сосудов образованы субъединицами $K_{ir}6.1$ и *SUR2*. Отмечается, что активаторы АТФ-чувствительных K^+ -каналов пинацидил, миноксидил и диазоксид не вызывают генерацию I_{KATP} в кардиомиоцитах *D. rerio* [101].

В кардиомиоцитах предсердия *D. rerio* показано наличие ацетилхолин-зависимого K^+ -тока внутреннего выпрямления I_{KACH} [18]. Skarsfeldt

и соавторы [93] обнаружили в сердце *D. rerio* экспрессию генов *KCNJ3* и *KCNJ5*, кодирующих I_{KACH} каналы $K_{ir}3.1$ и $K_{ir}3.4$ соответственно (табл. 1). Несмотря на экспрессию мРНК *KCNJ3* и *KCNJ5* в обеих камерах сердца, карбахол активирует I_{KACH} только в предсердных кардиомиоцитах или интактной предсердной ткани. Следовательно, как и в человеческом сердце, I_{KACH} , по-видимому, представляет собой предсердно-селективный ионный ток [102]. Активация I_{KACH} каналов уменьшает длительность ПД в предсердии *D. rerio* и замедляет ЧСС [93].

Пейсмекерный f-ток

Как и у млекопитающих, ЧСС у *D. rerio* контролируется активностью клеток водителя ритма [103]. Пейсмекерные клетки, экспрессирующие транскрипционный фактор *Isslet-1*, организованы в виде кольцевой структуры вокруг венозного полюса сердца, на границе между венозным синусом и предсердием около синоатриального клапана [104].

Пейсмекерный ток “funny” I_f или активируемый гиперполяризацией I_h был обнаружен в культуре кардиомиоцитов рыбки, причем как в миоцитах предсердия, так и желудочка [62]. Присутствие I_f в миокарде обеих камер сердца *D. rerio* контрастирует с данными у человека, где I_f в основном обнаруживается в клетках проводящей системы [105, 106], редко в предсердных миоцитах [107], а в желудочковых миоцитах — только при патологических состояниях, таких как сердечная недостаточность [108, 109]. Высказывается предположение о наличии двух разных ионных каналов, пропускающих I_f в сердце *D. rerio*, так как в пейсмекерном токе выделяют два компонента: медленный и быстрый.

Основной изоформой HCN каналов в синоатриальном узле и других отделах проводящей системы сердца млекопитающих является HCN4 [110]. Кроме того, присутствует экспрессия *HCN1* и *HCN2* [111, 112]. В сердце *D. rerio* экспрессируются *HCN4* и *HCN4L* — ортологи гена млекопитающих *HCN4* (табл. 1) [113]. Токи каналов HCN4 и HCN4L, реконструированных в ооцитах *Xenopus*, демонстрируют более быструю кинетику активации и положительный сдвиг потенциал-зависимости проводимости тока по сравнению с HCN4 человека [113].

Натрий-кальциевый обменник

Натрий-кальциевый обменник NCX является антипортером, основная функция которого сводится к выводу Ca^{2+} из клетки в обмен на вход Na^+

[114]. В зависимости от МПП и трансмембранного градиента Na^+ и Ca^{2+} NCX может выносить один ион Ca^{2+} наружу в обмен на транспорт трех ионов Na^+ внутрь клетки (прямой режим), либо наоборот выносить три иона Na^+ в обмен на один ион Ca^{2+} (обратный режим) [115]. У млекопитающих имеется три изоформы NCX, NCX1–3, из которых в сердце доминирует NCX1 [116, 117].

NCX1h представляет собой кардиоспецифичную изоформу NCX в сердце *D. rerio* [118, 119]. Уровень экспрессии и активность NCX в кардиомиоцитах *D. rerio* более высокие по сравнению с млекопитающими [120]. При деполяризации мембраны и повышении внутриклеточной концентрации $[\text{Na}^+]_i$ в цитозоле NCX в обратном режиме работы вместе с I_{Ca} запускает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР) [121, 122]. Роль NCX как проводника Ca^{2+} в клетку в обратном режиме работы возрастает при высокой частоте стимуляции, когда происходит снижение I_{Ca} и повышение $[\text{Na}^+]_i$ [120, 123]. В кардиомиоцитах рыб NCX важен для входа Ca^{2+} и активации сокращения при мембранных потенциалах выше +10 мВ [120]. В предсердных кардиомиоцитах форели показано, что продолжительные периоды деполяризации мембраны индуцируют загрузку СР Ca^{2+} , который постепенно истощается после блокирования NCX ингибитором обменника XIP (exchanger-inhibiting peptide) [123]. Блокирование NCX с помощью XIP также снижает сократимость сердца на 50%, указывая на заметную роль обратного режима работы NCX во входе наружного Ca^{2+} в кардиомиоциты рыб.

Мутация tremblor (tre) выключает функцию NCX1h, нарушает гомеостаз внутриклеточного Ca^{2+} и нормальный сердечный ритм [118]. Введение эмбрионам *D. rerio* с tre-мутацией мРНК NCX1h восстанавливает сердечный ритм, что свидетельствует о ключевой роли NCX1h в регуляции сердечной функции.

Калиевые каналы с двумя поровыми доменами

Калиевые каналы с двумя поровыми доменами $\text{K}_{2\text{P}}$, или каналы утечки, участвуют в формировании МПП во всех возбудимых клетках [124]. В геноме человека описано 15 генов каналов $\text{K}_{2\text{P}}$, разделенных на 6 подсемейств. В сердце человека преобладает экспрессия *KCNK1*, канал TWIK-1/ $\text{K}_{2\text{P}}1.1$, и *KCNK3*, канал TASK-1/ $\text{K}_{2\text{P}}3.1$. В сердце *D. rerio* показана экспрессия генов *KCNK3* и *KCNK9*, кодирующих субъединицы каналов TASK-1/ $\text{K}_{2\text{P}}3.1$ и TASK-3/ $\text{K}_{2\text{P}}9.1$, но соответствующие им ионные токи не обнаруживаются (табл. 1) [93]. Нокдаун генов *KCNK3a* и *KCNK3b* в эмбрионах *D. rerio*

вызывает развитие брадикардии и дилатацию предсердий [125]. Кроме того, в сердце *D. rerio* обнаружена экспрессия ортологов гена млекопитающих *KCNK1*, кодирующего субъединицу канала TWIK-1/ $\text{K}_{2\text{P}}1.1$ [126]. Нокдаун *KCNK1a* и *KCNK1b* у личинок *D. rerio* вызывает брадикардию и дилатацию предсердий.

Кальций-зависимые калиевые каналы

В миокарде млекопитающих присутствуют кальций-зависимые K^+ -каналы малой SK1–3 и промежуточной IK/SK4 проводимости [127]. Наличие этих каналов показано в предсердных, желудочковых миоцитах и в проводящей системе сердца, где они вовлечены в реполяризацию клеточной мембраны во время генерации ПД. В сердце *D. rerio* показана экспрессия генов *KCNN1*, *KCNN2* и *KCNN3*, кодирующих субъединицы каналов SK1/ $\text{K}_{\text{Ca}}2.1$, SK2/ $\text{K}_{\text{Ca}}2.2$ и SK3/ $\text{K}_{\text{Ca}}2.3$, но соответствующие им ионные токи не обнаружены (табл. 1) [93]. Кальций-зависимый K^+ -канал большой проводимости BK/ $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ находится на плазматической мембране нервных, скелетных мышечных волокон, гладкомышечных и эпителиальных клеток [128]. Любопытным исключением являются кардиомиоциты, у которых BK/ $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ отсутствует на поверхности клетки, но располагается на внутриклеточных мембранах, преимущественно в митохондриях [129, 130]. Pineda и соавторы [131] продемонстрировали субклеточную локализацию K^+ -канала большой проводимости $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ в сердце человека и мыши. В сердце *D. rerio* обнаружена экспрессия ортологов гена *KCNMA1*, кодирующего субъединицу канала $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ [132]. Нокдаун *KCNMA1b*, у эмбрионов *D. rerio* вызывает синусовую брадикардию, дилатацию и уменьшение сократимости предсердия и желудочка [131].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имеющиеся на сегодняшний день литературные данные свидетельствуют о том, что сердце *D. rerio* обладает электрофизиологическими характеристиками, профилем ПД и паттерном ионных токов, позволяющими рассматривать его как релевантный модельный объект в биомедицинских исследованиях сердечной деятельности. При этом следует учитывать различия в составе белковых субъединиц ионных каналов, отсутствие I_{to} и I_{Kur} , наличие I_{CaT} и I_{f} в рабочих миоцитах. Перспективным направлением представляется широкое применение редактирования генома *D. rerio*, в том числе замена генов интереса *D. rerio* человеческими ортологами, т.е. гуманизация рыбок, с целью

реконструкции клинических фенотипов сердечно-сосудистых заболеваний человека с последующей функциональной оценкой биоэлектрической активности кардиомиоцитов электрофизиологическими методами.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 22-15-00186).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Leong I.U.S., Skinner J.R., Shelling A.N., Love D.R. 2010. Identification and expression analysis of *kenh2* genes in the zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396** (4), 817–824.
- Genge C.E., Lin E., Lee L., Sheng X., Rayani K., Gunawan M., Stevens C.M., Li A.Y., Talab S.S., Claydon T.W., Hove-Madsen L., Tibbits G.F. 2016. The zebrafish heart as a model of mammalian cardiac function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **171**, 99–136.
- Derangeon M., Montnach J., Baró I., Charpentier F. 2012. Mouse models of SCN5A-related cardiac arrhythmias. *Front. Physiol.* **3**, 210.
- Nerbonne J.M., Nichols C.G., Schwarz T.L., Escande D. 2002. Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice: What have we learned, and where do we go from here? *Circ. Res.* **89** (11), 944–956.
- Kaese S., Verheule S. 2012. Cardiac electrophysiology in mice: A matter of size. *Front. Physiol.* **3**, 345.
- Mittelstadt S.W., Hemenway C.L., Craig M.P., Hove J.R. 2008. Evaluation of zebrafish embryos as a model for assessing inhibition of hERG. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **57** (2), 100–105.
- Bakkers J. 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.* **91** (2), 279–288.
- Dahme T., Katus H.A., Rottbauer W. 2009. Fishing for the genetic basis of cardiovascular disease. *Dis. Model. Mech.* **2** (1–2), 18–22.
- Stainier D.Y., Fouquet B., Chen J.N., Warren K.S., Weinstein B.M., Meiler S.E., Mohideen M.A., Neuhäuss S.C., Solnica-Krezel L., Schier A.F., Zwartkruis F., Stemple D.L., Malicki J., Driever W., Fishman M.C. 1996. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development.* **123**, 285–292.
- Verkerk A.O., Remme C.A. 2012. Zebrafish: A novel research tool for cardiac (patho)electrophysiology and ion channel disorders. *Front. Physiol.* **3**, 255.
- Harri M.N., Talo A. 1975. Effect of season and temperature acclimation on the heart rate-temperature relationship in the isolated frog's heart (*Rana temporaria*). *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* **52** (2), 409–412.
- Chapovetsky V., Katz U. 2003. Effects of season and temperature acclimation on electrocardiogram and heart rate of toads. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **134** (1), 77–83.
- Abramochkin D., Kuzmin V. 2018. Electrophysiological differences in cholinergic signaling between the hearts of summer and winter frogs (*Rana temporaria*). *J. Comp. Physiol. B.* **188** (4), 649–656.
- Abramochkin D.V., Filatova T.S., Pustovit K.B., Voronina Y.A., Kuzmin V.S., Vornanen M. 2022. Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **268**, 111204.
- Giles W.R., Shibata E.F. 1985. Voltage clamp of bullfrog cardiac pace-maker cells: A quantitative analysis of potassium currents. *J. Physiol.* **368**, 265–292.
- Simmons M.A., Creazzo T., Hartzell H.C. 1986. A time-dependent and voltage-sensitive K⁺ current in single cells from frog atrium. *J. Gen. Physiol.* **88** (6), 739–755.
- Hume J.R., Giles W., Robinson K., Shibata E.F., Nathan R.D., Kanai K., Rasmusson R. 1986. A time- and voltage-dependent K⁺ current in single cardiac cells from bullfrog atrium. *J. Gen. Physiol.* **88** (6), 777–798.
- Nemtsas P., Wettwer E., Christ T., Weidinger G., Ravens U. 2010. Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. *J. Mol. Cell Cardiol.* **48** (1), 161–171.
- Karpushev A.V., Mikhailova V.B., Klimenko E.S., Kulikov A.N., Ivkin D.Y., Kaschina E., Okovityi S.V. 2022. SGLT2 inhibitor empagliflozin modulates ion channels in adult zebrafish heart. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (17), 9559.
- Jou C.J., Spitzer K.W., Tristani-Firouzi M. 2010. Blebbistatin effectively uncouples the excitation-contraction process in zebrafish embryonic heart. *Cell Physiol. Biochem.* **25** (4–5), 419–424.
- Panáková D., Werdich A.A., Macrae C.A. 2010. Wnt11 patterns a myocardial electrical gradient through regulation of the L-type Ca²⁺ channel. *Nature.* **466** (7308), 874–878.
- Wythe J.D., Juryneć M.J., Urness L.D., Jones C.A., Sabeh M.K., Werdich A.A., Sato M., Yost H.J., Grunwald D.J., Macrae C.A., Li D.Y. 2011. Hadp1, a newly identified pleckstrin homology domain protein, is required for cardiac contractility in zebrafish. *Dis. Model. Mech.* **4** (5), 607–621.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203** (3), 253–310.
- Serluca F.C. 2008. Development of the proepicardial organ in the zebrafish. *Dev. Biol.* **315** (1), 18–27.

25. Peralta M., González-Rosa J.M., Marques I.J., Mercader N. 2014. The epicardium in the embryonic and adult zebrafish. *J. Dev. Biol.* **2** (2), 101–116.
26. Weinberger M., Simões F.C., Patient R., Sauka-Spengler T., Riley P.R. 2020. Functional heterogeneity within the developing zebrafish epicardium. *Dev. Cell.* **52** (5), 574–590.
27. Liu J., Bressan M., Hassel D., Huisken J., Staudt D., Kikuchi K., Poss K.D., Mikawa T., Stainier D.Y. 2010. A dual role for ErbB2 signaling in cardiac trabeculation. *Development.* **137** (22), 3867–3875.
28. Staudt D.W., Liu J., Thorn K.S., Stuurman N., Liebling M., Stainier D.Y. 2014. High-resolution imaging of cardiomyocyte behavior reveals two distinct steps in ventricular trabeculation. *Development.* **141** (3), 585–593.
29. Beis D., Bartman T., Jin S.W., Scott I.C., D'Amico L.A., Ober E.A., Verkade H., Frantsve J., Field H.A., Wehman A., Baier H., Tallafuss A., Bally-Cuif L., Chen J.N., Stainier D.Y., Jungblut B. 2005. Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development. *Development.* **132** (18), 4193–4204.
30. Scherz P.J., Huisken J., Sahai-Hernandez P., Stainier D.Y. 2008. High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function. *Development.* **135** (6), 1179–1187.
31. Harrison M.R., Bussmann J., Huang Y., Zhao L., Osorio A., Burns C.G., Burns C.E., Sucov H.M., Siekmann A.F., Lien C.L. 2015. Chemokine-guided angiogenesis directs coronary vasculature formation in zebrafish. *Dev. Cell.* **33** (4), 442–454.
32. Hu N., Yost H.J., Clark E.B. 2001. Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *Anat. Rec.* **264** (1), 1–12.
33. Mahmoud A.I., O'Meara C.C., Gemberling M., Zhao L., Bryant D.M., Zheng R., Gannon J.B., Cai L., Choi W.Y., Egnaczyk G.F., Burns C.E., Burns C.G., MacRae C.A., Poss K.D., Lee R.T. 2015. Nerves regulate cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Dev. Cell.* **34** (4), 387–399.
34. Pott A., Rottbauer W., Just S. 2014. Functional genomics in zebrafish as a tool to identify novel antiarrhythmic targets. *Curr. Med. Chem.* **21** (11), 1320–1329.
35. Wang L.W., Huttner I.G., Santiago C.F., Kesteven S.H., Yu Z.Y., Feneley M.P., Fatkin D. 2017. Standardized echocardiographic assessment of cardiac function in normal adult zebrafish and heart disease models. *Dis. Model Mech.* **10** (1), 63–76.
36. Barrionuevo W.R., Burggren W.W. 1999. O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): Influence of temperature and ambient O₂. *Am. J. Physiol.* **276** (2), R505–R513.
37. Tsai C.T., Wu C.K., Chiang F.T., Tseng C.D., Lee J.K., Yu C.C., Wang Y.C., Lai L.P., Lin J.L., Hwang J.J. 2011. In-vitro recording of adult zebrafish heart electrocardiogram – a platform for pharmacological testing. *Clin. Chim. Acta.* **412** (21–22), 1963–1967.
38. Schweizer M., Dieterich A., Triebkorn R., Köhler H.R. 2017. Drifting away of a FET endpoint: The heart rate in *Danio rerio* embryos is extremely sensitive to variation in ambient temperature. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **99** (6), 684–689.
39. Milan D.J., Jones I.L., Ellinor P.T., MacRae C.A. 2006. In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291** (1), H269–H273.
40. Leong I.U., Skinner J.R., Shelling A.N., Love D.R. 2010. Zebrafish as a model for long QT syndrome: The evidence and the means of manipulating zebrafish gene expression. *Acta Physiol. (Oxf).* **199** (3), 257–276.
41. Liu C.C., Li L., Lam Y.W., Siu C.W., Cheng S.H. 2016. Improvement of surface ECG recording in adult zebrafish reveals that the value of this model exceeds our expectation. *Sci. Rep.* **6**, 25073.
42. Zhao Y., James N.A., Beshay A.R., Chang E.E., Lin A., Bashar F., Wassily A., Nguyen B., Nguyen T.P. 2021. Adult zebrafish ventricular electrical gradients as tissue mechanisms of ECG patterns under baseline vs. oxidative stress. *Cardiovasc. Res.* **117** (8), 1891–1907.
43. Zhao Y., Chen C., Yun M., Issa T., Lin A., Nguyen T.P. 2021. Constructing adult zebrafish einthoven's triangle to define electrical heart axes. *Front. Physiol.* **12**, 708938.
44. Arel E., Rolland L., Thireau J., Torrente A.G., Bechard E., Bride J., Jopling C., Demion M., Le Guennec J.Y. 2022. The effect of hypothermia and osmotic shock on the electrocardiogram of adult zebrafish. *Biology (Basel).* **11** (4), 603.
45. D'Ascenzi F., Anselmi F., Adami P.E., Pelliccia A. 2020. Interpretation of T-wave inversion in physiological and pathological conditions: Current state and future perspectives. *Clin. Cardiol.* **43** (8), 827–833.
46. Sun P., Zhang Y., Yu F., Parks E., Lyman A., Wu Q., Ai L., Hu C.H., Zhou Q., Shung K., Lien C.L., Hsiai T.K. 2009. Micro-electrocardiograms to study post-ventricular amputation of zebrafish heart. *Ann. Biomed. Eng.* **37** (5), 890–901.
47. Lin M.H., Chou H.C., Chen Y.F., Liu W., Lee C.C., Liu L.Y., Chuang Y.J. 2018. Development of a rapid and economic in vivo electrocardiogram platform for cardiovascular drug assay and electrophysiology research in adult zebrafish. *Sci. Rep.* **8** (1), 15986.
48. Zhao Y., Yun M., Nguyen S.A., Tran M., Nguyen T.P. 2019. In vivo surface electrocardiography for adult zebrafish. *J. Vis. Exp.* **150**, 10.3791/60011.
49. Abu Nahia K., Migdał M., Quinn T.A., Poon K.L., Łapiński M., Sulej A., Liu J., Mondal S.S., Pawlak M., Bugajski Ł., Piwocka K., Brand T., Kohl P., Korzh V., Winata C. 2021. Genomic and physiological analyses of the zebrafish atrioventricular canal reveal

- molecular building blocks of the secondary pacemaker region. *Cell Mol. Life Sci.* **78** (19–20), 6669–6687.
50. Stoyek M.R., MacDonald E.A., Mantifel M., Bailie J.S., Selig B.M., Croll R.P., Smith F.M., Quinn T.A. 2022. Drivers of sinoatrial node automaticity in zebrafish: comparison with mechanisms of mammalian pacemaker function. *Front. Physiol.* **13**, 818122.
 51. Sedmera D., Reckova M., deAlmeida A., Sedmerova M., Biermann M., Volejnik J., Sarre A., Raddatz E., McCarthy R.A., Gourdie R.G., Thompson R.P. 2003. Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284** (4), H1152–H1160.
 52. Brette F., Luxan G., Cros C., Dixey H., Wilson C., Shiels H.A. 2008. Characterization of isolated ventricular myocytes from adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374** (1), 143–146.
 53. Vornanen M., Shiels H.A., Farrell A.P. 2002. Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **132** (4), 827–846.
 54. Asimaki A., Kapoor S., Plovie E., Karin Arndt A., Adams E., Liu Z., James C.A., Judge D.P., Calkins H., Churko J., Wu J.C., MacRae C.A., Kléber A.G., Saffitz J.E. 2014. Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Sci. Transl. Med.* **6** (240), 240ra74.
 55. Yu F., Zhao Y., Gu J., Quigley K.L., Chi N.C., Tai Y.C., Hsiai T.K. 2012. Flexible microelectrode arrays to interface epicardial electrical signals with intracardiac calcium transients in zebrafish hearts. *Biomed. Microdevices.* **14** (2), 357–366.
 56. Lovering R.C., Roncaglia P., Howe D.G., Laulederkind S.J.F., Khodiyar V.K., Berardini T.Z., Tweedie S., Foulger R.E., Osumi-Sutherland D., Campbell N.H., Huntley R.P., Talmud P.J., Blake J.A., Breckenridge R., Riley P.R., Lambiase P.D., Elliott P.M., Clapp L., Tinker A., Hill D.P. 2018. Improving interpretation of cardiac phenotypes and enhancing discovery with expanded knowledge in the gene ontology. *Circ. Genom. Precis. Med.* **11** (2), e001813.
 57. Alday A., Alonso H., Gallego M., Urrutia J., Letamendia A., Callol C., Casis O. 2014. Ionic channels underlying the ventricular action potential in zebrafish embryo. *Pharmacol. Res.* **84**, 26–31.
 58. Coutts C.A., Patten S.A., Balt L.N., Ali D.W. 2006. Development of ionic currents of zebrafish slow and fast skeletal muscle fibers. *J. Neurobiol.* **66** (3), 220–235.
 59. Miranda M., Egaña J.T., Allende M.L., Eblen-Zajjur A. 2019. Myocardial monophasic action potential recorded by suction electrode for ionic current studies in zebrafish. *Zebrafish.* **16** (5), 427–433.
 60. Gosselin-Badaroudine P., Moreau A., Chahine M. 2014. Nav 1.5 mutations linked to dilated cardiomyopathy phenotypes: Is the gating pore current the missing link? *Channels (Austin).* **8** (1), 90–94.
 61. Rook M.B., Evers M.M., Vos M.A., Bierhuizen M.F. 2012. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc. Res.* **93** (1), 12–23.
 62. Warren K.S., Baker K., Fishman M.C. 2001. The slow mo mutation reduces pacemaker current and heart rate in adult zebrafish. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281** (4), H1711–H1719.
 63. Furukawa T., Koumi S., Sakakibara Y., Singer D.H., Jia H., Arentzen C.E., Backer C.L., Wasserstrom J.A. 1995. An analysis of lidocaine block of sodium current in isolated human atrial and ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **27** (2), 831–846.
 64. Novak A.E., Taylor A.D., Pineda R.H., Lasda E.L., Wright M.A., Ribera A.B. 2006. Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel alpha-subunit genes. *Dev. Dyn.* **235** (7), 1962–1973.
 65. Chopra S.S., Stroud D.M., Watanabe H., Bennett J.S., Burns C.G., Wells K.S., Yang T., Zhong T.P., Roden D.M. 2010. Voltage-gated sodium channels are required for heart development in zebrafish. *Circ. Res.* **106** (8), 1342–1350.
 66. Haverinen J., Hassinen M., Vornanen M. 2007. Fish cardiac sodium channels are tetrodotoxin sensitive. *Acta Physiol. (Oxf).* **191** (3), 197–204.
 67. Vornanen M., Hassinen M., Haverinen J. 2011. Tetrodotoxin sensitivity of the vertebrate cardiac Na⁺ current. *Mar. Drugs.* **9** (11), 2409–2422.
 68. Baker K., Warren K.S., Yellen G., Fishman M.C. 1997. Defective “pacemaker” current (I_h) in a zebrafish mutant with a slow heart rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** (9), 4554–4559.
 69. Rottbauer W., Baker K., Wo Z.G., Mohideen M.A., Cantiello H.F., Fishman M.C. 2001. Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel alpha1 subunit. *Dev. Cell.* **1** (2), 265–275.
 70. McDonald T.F., Pelzer S., Trautwein W., Pelzer D.J. 1994. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **74** (2), 365–507.
 71. Bers D.M. 2008. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 23–49.
 72. Vassort G., Talavera K., Alvarez J.L. 2006. Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium.* **40** (2), 205–220.
 73. Shah K., Seeley S., Schulz C., Fisher J., Gururaja Rao S. 2022. Calcium channels in the heart: Disease states and drugs. *Cells.* **11** (6), 943.
 74. Haverinen J., Hassinen M., Dash S.N., Vornanen M. 2018. Expression of calcium channel transcripts in the zebrafish heart: Dominance of T-type channels. *J. Exp. Biol.* **221** (Pt 10), jeb179226.
 75. Ebert A.M., McAnelly C.A., Srinivasan A., Linker J.L., Horne W.A., Garrity D.M. 2008. Ca²⁺ channel-independent requirement for MAGUK family

- CACNB4 genes in initiation of zebrafish epiboly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105** (1), 198–203.
76. Chernyavskaya Y., Ebert A.M., Milligan E., Garrity D.M. 2012. Voltage-gated calcium channel CACNB2 ($\beta 2.1$) protein is required in the heart for control of cell proliferation and heart tube integrity. *Dev. Dyn.* **241** (4), 648–662.
77. Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L., McLaren S., Sealy I., Caccamo M., Churcher C., Scott C., Barrett J.C., Koch R., Rauch G.J., White S., Chow W., Kilian B., Quintais L.T., Guerra-Assunção J.A., Zhou Y., Gu Y., Yen J., Vogel J.H., Eyre T., Redmond S., Banerjee R., Chi J., Fu B., Langley E., Maguire S.F., Laird G.K., Lloyd D., Kenyon E., Donaldson S., Sehra H., Almeida-King J., Loveland J., Trevanion S., Jones M., Quail M., Wiley D., Hunt A., Burton J., Sims S., McLay K., Plumb B., Davis J., Clee C., Oliver K., Clark R., Riddle C., Elliot D., Threadgold G., Harden G., Ware D., Begum S., Mortimore B., Kerry G., Heath P., Phillimore B., Tracey A., Corby N., Dunn M., Johnson C., Wood J., Clark S., Pelan S., Griffiths G., Smith M., Glithero R., Howden P., Barker N., Lloyd C., Stevens C., Harley J., Holt K., Panagiotidis G., Lovell J., Beasley H., Henderson C., Gordon D., Auger K., Wright D., Collins J., Raisen C., Dyer L., Leung K., Robertson L., Ambridge K., Leongamornlert D., McGuire S., Gilderthorp R., Griffiths C., Manthra-vadi D., Nichol S., Barker G., Whitehead S., Kay M., Brown J., Murnane C., Gray E., Humphries M., Sycamore N., Barker D., Saunders D., Wallis J., Babbage A., Hammond S., Mashreghi-Mohammadi M., Barr L., Martin S., Wray P., Ellington A., Matthews N., Ellwood M., Woodmansey R., Clark G., Cooper J., Tromans A., Grafham D., Skuce C., Pandian R., Andrews R., Harrison E., Kimberley A., Garnett J., Fosker N., Hall R., Garner P., Kelly D., Bird C., Palmer S., Gehring I., Berger A., Dooley C.M., Ersan-Ürün Z., Eser C., Geiger H., Geisler M., Karotki L., Kirn A., Konantz J., Konantz M., Oberländer M., Rudolph-Geiger S., Teucke M., Lanz C., Raddatz G., Osoegawa K., Zhu B., Rapp A., Widaa S., Langford C., Yang F., Schuster S.C., Carter N.P., Harrow J., Ning Z., Herrero J., Searle S.M., Enright A., Geisler R., Plasterk R.H., Lee C., Westerfield M., de Jong P.J., Zon L.I., Postlethwait J.H., Nüsslein-Volhard C., Hubbard T.J., Roest Crolius H., Rogers J., Stemple D.L. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. **496** (7446), 498–503.
78. Bovo E., Dvornikov A.V., Mazurek S.R., de Tombe P.P., Zima A.V. 2013. Mechanisms of Ca^{2+} handling in zebrafish ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* **465** (12), 1775–1784.
79. Jost N., Virág L., Bitay M., Takács J., Lengyel C., Biliczki P., Nagy Z., Bogáts G., Lathrop D.A., Papp J.G., Varró A. 2005. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: A vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation*. **112** (10), 1392–1399.
80. Wettwer E., Scholtysik G., Schaad A., Himmel H., Ravens U. 1991. Effects of the new class III antiarrhythmic drug E-4031 on myocardial contractility and electrophysiological parameters. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17** (3), 480–487.
81. Yang T., Tande P.M., Refsum H. 1991. Negative chronotropic effect of a novel class III antiarrhythmic drug, UK-68,798, devoid of beta-blocking action on isolated guinea-pig atria. *Br. J. Pharmacol.* **103** (2), 1417–1420.
82. Schmitt N., Grunnet M., Olesen S.P. 2014. Cardiac potassium channel subtypes: New roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol. Rev.* **94** (2), 609–653.
83. Warmke J.W., Ganetzky B. 1994. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91** (8), 3438–3442.
84. Vornanen M., Hassinen M. 2016. Zebrafish heart as a model for human cardiac electrophysiology. *Channels (Austin)*. **10** (2), 101–110.
85. Scholz E.P., Niemer N., Hassel D., Zitron E., Bürgers H.F., Bloehs R., Seyler C., Scherer D., Thomas D., Kathöfer S., Katus H.A., Rottbauer W.A., Karle C.A. 2009. Biophysical properties of zebrafish ether-à-go-go related gene potassium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381** (2), 159–164.
86. Arnaout R., Ferrer T., Huisken J., Spitzer K., Stainier D.Y., Tristani-Firouzi M., Chi N.C. 2007. Zebrafish model for human long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104** (27), 11316–11321.
87. Hassel D., Scholz E.P., Trano N., Friedrich O., Just S., Meder B., Weiss D.L., Zitron E., Marquart S., Vogel B., Karle C.A., Seemann G., Fishman M.C., Katus H.A., Rottbauer W. 2008. Deficient zebrafish ether-à-go-go-related gene channel gating causes short-QT syndrome in zebrafish reggae mutants. *Circulation*. **117** (7), 866–875.
88. Langheinrich U., Vacun G., Wagner T. 2003. Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **193** (3), 370–382.
89. Milan D.J., Peterson T.A., Ruskin J.N., Peterson R.T., MacRae C.A. 2003. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation*. **107** (10), 1355–1358.
90. Abramochkin D.V., Hassinen M., Vornanen M. 2018. Transcripts of Kv7.1 and MinK channels and slow delayed rectifier K^+ current (IKs) are expressed in zebrafish (*Danio rerio*) heart. *Pflügers Arch.* **470** (12), 1753–1764.
91. Wu C., Sharma K., Laster K., Hersi M., Torres C., Lukas T.J., Moore E.J. 2014. Kcnq1-5 (Kv7.1-5) potassium channel expression in the adult zebrafish. *BMC Physiol.* **14**, 1.

92. Ravens U., Odening K.E. 2017. Atrial fibrillation: Therapeutic potential of atrial K⁺ channel blockers. *Pharmacol. Ther.* **176**, 13–21.
93. Skarsfeldt M.A., Bomholtz S.H., Lundegaard P.R., Lopez-Izquierdo A., Tristani-Firouzi M., Bentzen B.H. 2018. Atrium-specific ion channels in the zebrafish—A role of IKACH in atrial repolarization. *Acta Physiol. (Oxf)*. **223** (3), e13049.
94. Koumi S., Backer C.L., Arentzen C.E. 1995. Characterization of inwardly rectifying K⁺ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. **92** (2), 164–174.
95. Amos G.J., Wettwer E., Metzger F., Li Q., Himmel H.M., Ravens U. 1996. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J. Physiol.* **491**, 31–50.
96. Panama B.K., McLerie M., Lopatin A.N. 2007. Heterogeneity of IK1 in the mouse heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293** (6), H3558–H3567.
97. Ravens U. 2018. Ionic basis of cardiac electrophysiology in zebrafish compared to human hearts. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **138**, 38–44.
98. Hassinen M., Haverinen J., Hardy M.E., Shiels H.A., Vornanen M. 2015. Inward rectifier potassium current (I_{K1}) and Kir2 composition of the zebrafish (*Danio rerio*) heart. *Pflügers Arch.* **467** (12), 2437–2446.
99. Gaborit N., Le Bouter S., Szuts V., Varro A., Escande D., Nattel S., Demolombe S. 2007. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J. Physiol.* **582** (Pt 2), 675–693.
100. Hughes B.A., Kumar G., Yuan Y., Swaminathan A., Yan D., Sharma A., Plumley L., Yang-Feng T.L., Swaroop A. 2000. Cloning and functional expression of human retinal kir2.4, a pH-sensitive inwardly rectifying K⁺ channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279** (3), C771–C784.
101. Singareddy S.S., Roessler H.I., McClenaghan C., Ikle J.M., Tryon R.C., van Haften G., Nichols C.G. 2022. ATP-sensitive potassium channels in zebrafish cardiac and vascular smooth muscle. *J. Physiol.* **600** (2), 299–312.
102. Anumonwo J.M., Lopatin A.N. 2010. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J. Mol. Cell Cardiol.* **48** (1), 45–54.
103. Stoyek M.R., Quinn T.A., Croll R.P., Smith F.M. 2016. Zebrafish heart as a model to study the integrative autonomic control of pacemaker function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **311** (3), H676–H688.
104. Tessadori F., van Weerd J.H., Burkhard S.B., Verkerk A.O., de Pater E., Boukens B.J., Vink A., Christoffels V.M., Bakkens J. 2012. Identification and functional characterization of cardiac pacemaker cells in zebrafish. *PLoS One*. **7** (10), e47644.
105. Verkerk A.O., Wilders R., van Borren M.M., Peters R.J., Broekhuis E., Lam K., Coronel R., de Bakker J.M., Tan H.L. 2007. Pacemaker current (I_p) in the human sinoatrial node. *Eur. Heart J.* **28** (20), 2472–2478.
106. Han W., Zhang L., Schram G., Nattel S. 2002. Properties of potassium currents in Purkinje cells of failing human hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283** (6), H2495–H2503.
107. Hoppe U.C., Beuckelmann D.J. 1998. Characterization of the hyperpolarization-activated inward current in isolated human atrial myocytes. *Cardiovasc. Res.* **38** (3), 788–801.
108. Cerbai E., Sartiani L., DePaoli P., Pino R., Maccherini M., Bizzarri F., DiCiolla F., Davoli G., Sani G., Mugelli A. 2001. The properties of the pacemaker current I(F) in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33** (3), 441–448.
109. Fenske S., Mader R., Scharr A., Paparizos C., Cao-Ehlker X., Michalakis S., Shaltiel L., Weidinger M., Stieber J., Feil S., Feil R., Hofmann F., Wahl-Schott C., Biel M. 2011. HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart. *Circ. Res.* **109** (9), 1015–1023.
110. Herrmann S., Schnorr S., Ludwig A. 2015. HCN channels—modulators of cardiac and neuronal excitability. *Int. J. Mol. Sci.* **16** (1), 1429–1447.
111. Fenske S., Krause S.C., Hassan S.I., Becirovic E., Auer F., Bernard R., Kupatt C., Lange P., Ziegler T., Wotjak C.T., Zhang H., Hammelmann V., Paparizos C., Biel M., Wahl-Schott C.A. 2013. Sick sinus syndrome in HCN1-deficient mice. *Circulation*. **128** (24), 2585–2594.
112. Herrmann S., Layh B., Ludwig A. 2011. Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **51** (6), 997–1006.
113. Liu J., Kasuya G., Zempo B., Nakajo K. 2022. Two HCN4 channels play functional roles in the zebrafish heart. *Front. Physiol.* **13**, 901571.
114. van Opbergen C.J.M., van der Voorn S.M., Vos M.A., de Boer T.P., van Veen T.A.B. 2018. Cardiac Ca²⁺ signalling in zebrafish: Translation of findings to man. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **138**, 45–58.
115. Ottolia M., Torres N., Bridge J.H., Philipson K.D., Goldhaber J.I. 2013. Na/Ca exchange and contraction of the heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **61**, 28–33.
116. Shigekawa M., Iwamoto T. 2001. Cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange: Molecular and pharmacological aspects. *Circ. Res.* **88** (9), 864–876.
117. Khananshvili D. 2013. The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX) — structure, function, and regulation in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **34** (2–3), 220–235.
118. Langenbacher A.D., Dong Y., Shu X., Choi J., Nicoll D.A., Goldhaber J.I., Philipson K.D., Chen J.N. 2005. Mutation in sodium-calcium exchanger 1 (NCX1) causes cardiac fibrillation in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102** (49), 17699–17704.

119. Chu L., Yin H., Gao L., Gao L., Xia Y., Zhang C., Chen Y., Liu T., Huang J., Boheler K.R., Zhou Y., Yang H.T. 2021. Cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger 1 (ncx1h) is critical for the ventricular cardiomyocyte formation via regulating the expression levels of gata4 and hand2 in zebrafish. *Sci. China Life Sci.* **64** (2), 255–268.
120. Zhang P.C., Llach A., Sheng X.Y., Hove-Madsen L., Tibbits G.F. 2011. Calcium handling in zebrafish ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300** (1), R56–R66.
121. Birkedal R., Shiels H.A. 2007. High [Na⁺]_i in cardiomyocytes from rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293** (2), R861–R866.
122. Hove-Madsen L., Llach A., Tibbits G.F., Tort L. 2003. Triggering of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and contraction by reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchange in trout atrial myocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284** (5), R1330–R1339.
123. Hove-Madsen L., Llach A., Tort L. 2000. Na⁺/Ca²⁺-exchange activity regulates contraction and SR Ca²⁺ content in rainbow trout atrial myocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279** (5), R1856–R1864.
124. Wiedmann F., Frey N., Schmidt C. 2021. Two-pore-domain potassium (K2P-) channels: Cardiac expression patterns and disease-specific remodelling processes. *Cells.* **10** (11), 2914.
125. Liang B., Soka M., Christensen A.H., Olesen M.S., Larsen A.P., Knop F.K., Wang F., Nielsen J.B., Andersen M.N., Humphreys D., Mann S.A., Huttner I.G., Vandenberg J.I., Svendsen J.H., Haunsø S., Preiss T., Seeböhm G., Olesen S.P., Schmitt N., Fatkin D. 2014. Genetic variation in the two-pore domain potassium channel, TASK-1, may contribute to an atrial substrate for arrhythmogenesis. *J. Mol. Cell Cardiol.* **67**, 69–76.
126. Christensen A.H., Chatelain F.C., Huttner I.G., Olesen M.S., Soka M., Feliciangeli S., Horvat C., Santiago C.F., Vandenberg J.I., Schmitt N., Olesen S.P., Lesage F., Fatkin D. 2016. The two-pore domain potassium channel, TWIK-1, has a role in the regulation of heart rate and atrial size. *J. Mol. Cell Cardiol.* **97**, 24–35.
127. Weisbrod D. 2020. Small and intermediate calcium activated potassium channels in the heart: Role and strategies in the treatment of cardiovascular diseases. *Front. Physiol.* **11**, 590534.
128. Maqoud F., Cetrone M., Mele A., Tricarico D. 2017. Molecular structure and function of big calcium-activated potassium channels in skeletal muscle: Pharmacological perspectives. *Physiol. Genomics.* **49** (6), 306–317.
129. Singh H., Stefani E., Toro L. 2012. Intracellular BK_{Ca} (iBK_{Ca}) channels. *J. Physiol.* **590** (23), 5937–5947.
130. Kulawiak B., Szewczyk A. 2022. Current challenges of mitochondrial potassium channel research. *Front. Physiol.* **13**, 907015.
131. Pineda S., Nikolova-Krstevska V., Leimena C., Atkinson A.J., Altekoeester A.K., Cox C.D., Jacoby A., Huttner I.G., Ju Y.K., Soka M., Ohanian M., Trivedi G., Kalvakuri S., Birker K., Johnson R., Moleenaar P., Kuchar D., Allen D.G., van Helden D.F., Harvey R.P., Hill A.P., Bodmer R., Vogler G., Dobrzynski H., Ocorr K., Fatkin D. 2021. conserved role of the large conductance calcium-activated potassium channel, KCa1.1, in sinus node function and arrhythmia risk. *Circ. Genom. Precis. Med.* **14** (2), e003144.
132. Rohmann K.N., Deitcher D.L., Bass A.H. 2009. Calcium-activated potassium (BK) channels are encoded by duplicate slo1 genes in teleost fishes. *Mol. Biol. Evol.* **26** (7), 1509–1521.

Electrophysiology of the *Danio rerio* Heart

© 2024 г. A. V. Karpushev^{1, *}, V. B. Mikhailova², A. A. Kostareva², B. S. Zhorov^{1, 2}

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

^bAlmazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341 Russia

*e-mail: akarpushev@yandex.ru

Tropical teleost fish *Danio rerio* is increasingly used as a model object for electrophysiological studies of human cardiac physiology and pathology. *D. rerio* is characterized by the similarity with humans in such functional parameters of the electrical activity of the heart as heart rate, action potential morphology, as well as in a set of ion currents depolarizing and repolarizing the cell membrane. *D. rerio* is easy to breed, easy to handle experimentally, and easy to genetically modify. This overview presents current data on the structural and functional organization of ion channels in *D. rerio* heart myocytes.

Keywords: *Danio rerio*, heart, cardiomyocyte, ion current, electrophysiology

УДК 616-005.1-08

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ТРОМБИНА С МЕМБРАНОЙ ТРОМБОЦИТА

© 2024 г. Р. Р. Керимов^a, Д. Ю. Нечипуренко^{a, b, c, *}, М. А. Пантелеев^{a, b, c},

^aЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия

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

^cНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, Москва, 117997 Россия

*e-mail: ne4ipur@gmail.com

Поступила в редакцию 03.11.2023

После доработки 07.12.2023

Принята к печати 11.12.2023

Тромбин – ключевой фермент системы свертывания крови, который активно изучается с начала прошлого века. Образование тромбина из протромбина в области повреждения сосуда приводит не только к формированию фибрина – важного структурного компонента гемостатического сгустка, но и к активации тромбоцитов, эндотелия и клеток иммунной системы. Считается, что связывание тромбина с поверхностью тромбоцитов играет критическую роль в процессе их активации, а также может обеспечивать поддержание высокой концентрации тромбина внутри тромба вследствие концентрирования протеазы на поверхности тромбоцитов. На данный момент все основные рецепторы тромбина на тромбоцитах тщательно охарактеризованы: благодаря различным экспериментальным методам установлены физико-химические параметры соответствующих межмолекулярных взаимодействий. Так как взаимодействие тромбина с тромбоцитами приводит к их активации, включающей изменения количества рецепторов в результате секреции гранул, правильная интерпретация наблюдаемых особенностей кинетических кривых связывания сильно усложняется. Известно, что некоторые рецепторы в результате активации тромбоцита способны перераспределяться на мембране и образовывать димеры и кластеры, что делает кинетику связывания тромбина с тромбоцитами чрезвычайно сложным процессом, зависящим от множества факторов, таких как концентрации активаторов, состояние тромбоцитов и других локальных параметров системы. Данный обзор ставит своей целью описать современные представления о взаимодействии тромбина с мембраной тромбоцита и обозначить важные нерешенные вопросы в данной области исследований. В обзоре представлена не только информация о структурных и кинетических особенностях связывания тромбина с отдельными мембранными белками тромбоцита, но и анализ связи между соответствующими параметрами взаимодействия и ранее полученными данными о кинетике связывании протеазы с поверхностью тромбоцита.

Ключевые слова: тромбин, тромбоциты, гликопротеины, PAR-рецепторы, константа связывания, мембранный комплекс

DOI: 10.31857/S0233475524030026, **EDN:** csvdqu

ВВЕДЕНИЕ

Тромбин (фактор свертывания IIa) играет центральную роль в системе свертывания крови и является одним из главных активаторов тромбоцитов [1, 2], что объясняет его популярность как объекта медицинских и биохимических исследований. Большинство ныне используемых антикоагулянтных препаратов либо блокируют тромбин напрямую, либо повышают эффективность естественных ингибиторов тромбина или же блокируют фактор Ха, отвечающий за наработку тромбина

[3]. Как более ранние, так и современные научные работы свидетельствуют о критической роли накопления тромбина в тромбоцитарных агрегатах для их стабилизации [1, 3]. Рост локальной концентрации тромбина напрямую влияет на своевременную и необратимую активацию тромбоцитов, а также на их необратимую агрегацию, которые необходимы для увеличения плотности упаковки тромбов и последующего образования фибрина.

Связывание молекул тромбина с мембранными белками не только запускает процесс активации

тромбоцитов, но и играет значительную роль в накоплении тромбина в растущем тромбоцитарном агрегате. Так как в тромбе подавляющее большинство объема заполнено плотно упакованными тромбоцитами, считается, что существенная часть суммарной концентрации тромбина в тромбе определяется именно связанной фракцией тромбина.

Таким образом, знание особенностей процесса связывания тромбина с тромбоцитами и кинетики его накопления на поверхности этих клеток имеет большое значение для развития как более глубокого понимания механизмов гемостатического ответа, так и соответствующих клинических приложений.

Краткая история исследований

Наиболее ранние экспериментальные исследования взаимодействия тромбина с тромбоцитами можно датировать концом 1910-х годов. Статья Райта и Минот [2] дала начало этому направлению исследований гемостаза и показала, что тромбин способен вызывать активацию и следующие за этим “метаморфозы” тромбоцитов.

К концу XX века ряд лабораторий поставили своей целью количественное определение кинетики связывания тромбина с поверхностью тромбоцитов. В качестве основного метода исследования данные работы использовали радиоактивно-меченный тромбин (^{125}I -тромбин) [4–11, 12]. Идея эксперимента заключается в том, что радиоактивно-меченный тромбин связывается с тромбоцитами с такой же кинетикой, как и немеченый тромбин, и радиоактивное излучение йода можно использовать для оценки количества свободного и связанного тромбина. При инкубации суспензии тромбоцитов с радиоактивным тромбином их мембраны связывают определенное количество молекул протеазы, и измерение уровня излучения данных тромбоцитов после их выделения из раствора показывает количество связанного тромбина, которое можно нормализовать на количество клеток. Следует отметить, что в ранних работах молекулярные механизмы связывания тромбина с мембраной тромбоцита были неизвестны, в том числе было неясно, происходит ли связывание с фосфолипидами или мембранными белками. Тем не менее, инкубируя тромбоциты с меченым тромбином (при разных концентрациях), ученые могли построить зависимость количества связанного тромбина от начальной добавленной концентрации. Полученные результаты с помощью метода Штека–Уоллоха [13] можно представить в виде зависимости обратных величин связанного тромбина от свободного, график которой будет иметь вид линейной зависимости при условии

равновесной реакции. По параметрам этой прямой можно определить количество сайтов связывания и константу диссоциации реакции.

В большинстве подобных исследований наблюдалось, что тромбоциты обладают по крайней мере двумя типами сайтов связывания тромбина: так называемыми “высоко” и “низкоаффинными” сайтами (следует отметить, что некоторые данные показывали наличие “среднего” типа [11]). Основным параметром для данной классификации являлась константа диссоциации K_d комплекса тромбина с соответствующими типами сайтов. Важно отметить, что значения вышеописанных параметров, приведенные в литературе, демонстрируют существенный разброс. Если представить графически выборку результатов значений K_d и количества сайтов связывания тромбина (рис. 1), то можно видеть, что в разных работах эти значения могли отличаться более чем на 2 порядка. Это могло быть вызвано различием экспериментальных методов, используемых концентраций тромбина или отсутствием общепринятой классификации сайтов по их аффинности [14]. Также следует отметить, что тип метки и ее локализация на молекуле белка могут существенно влиять на процессы взаимодействия тромбина с рецепторами на поверхности тромбоцита.

Решение этой проблемы не заставило себя долго ждать: развитие молекулярно-биологических, протеомных и биохимических методов исследования позволили ученым не только определить специфичные рецепторы тромбина на поверхности тромбоцитов, но также выделить их и описать кинетику всех реакций и белковых взаимодействий. Кроме того, стало возможным количественно оценить уровни экспрессии рецепторов в тромбоцитах. В основе современной картины специфического взаимодействия тромбина с тромбоцитами человека лежит его взаимодействие с тремя основными рецепторами.

Сайты связывания тромбина на тромбоцитах

Первым предполагаемым сайтом связывания тромбина оказался так называемый гликокалицин – гликозилированный внеклеточный участок гликопротеина GPIIb α , входящего в состав комплекса GPIIb/IX/V [15]. Эти комплексы в изобилии присутствуют на поверхности тромбоцитов, в количестве 20 000–50 000 копий на тромбоцит [1, 16, 17]. Было установлено, что данная субъединица содержит сайт связывания, характеризующийся высоким сродством к α -тромбину, на долю которого приходится до 90% общего количества тромбина, взаимодействующего с тромбоцитами [18]. Оценки K_d связывания тромбина с данным

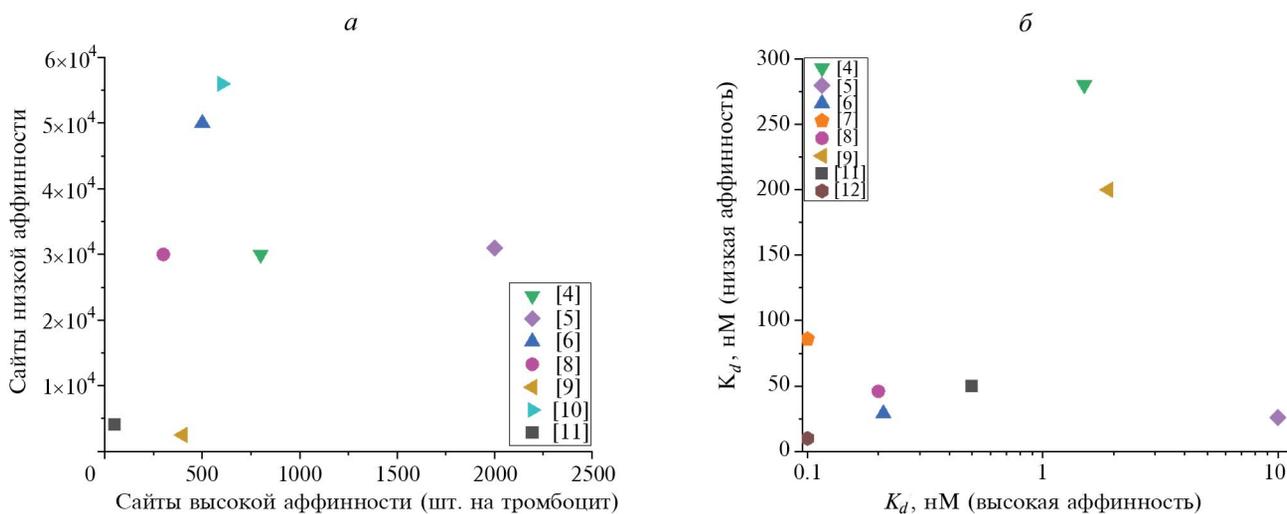


Рис. 1. Графическое представление количества сайтов связывания тромбина и их аффинности в выборке различных экспериментальных работ. *a* – Среднее количество сайтов связывания тромбина на поверхности тромбоцита. По оси X отложено количество сайтов высокой аффинности, по оси Y – низкой аффинности. *б* – Средняя константа диссоциации для сайтов высокой и низкой аффинности. По оси X – K_d сайтов высокой аффинности (логарифмический масштаб), по оси Y – низкой аффинности. Каждая точка – данные из определенной статьи, представленной в обзоре. Цвет и форма символа соответствуют номеру статьи в списке литературы.

сайтом, полученные в разных работах, лежат в достаточно широком диапазоне значений от 50 до 500 нМ [10, 19]. Этот белок способен связывать молекулу тромбина, взаимодействуя как с экзосайтом I, так и с экзосайтом II тромбина [20–22]. Ранние кристаллические структуры комплексов GPIIb/IIIa–тромбин демонстрировали, что одна молекула GPIIb/IIIa связывает одну молекулу тромбина (часть работ также предполагала возможность связывания двух молекул тромбина разными экзосайтами на одной молекуле GPIIb/IIIa), однако более современные исследования показали, что как раз тромбин, используя оба своих экзосайта, связывается с двумя соседними молекулами GPIIb/IIIa, тем самым повышая стабильность прикрепления к мембране тромбоцита [11, 23].

Хотя было установлено, что GPIIb/IIIa может связывать тромбин в значительных количествах и играет ключевую роль в активации тромбоцитов, наличие одного подобного сайта не позволяло полностью описать сложную кинетику связывания тромбина с тромбоцитами. Число сайтов GPIIb/IIIa и их K_d количественно соответствовали параметрам ранее описанных сайтов низкой аффинности, однако наличие сайтов высокой аффинности, число которых измерялось сотнями или тысячами на тромбоцит, а K_d даже по самым высоким оценкам не превышала 10 нМ, не могло быть объяснено взаимодействием с GPIIb/IIIa. Более того, было показано, что GPIIb/IIIa при связывании с тромбином не подвергается

протеолитическому расщеплению [24], что вызвало еще больше вопросов о его роли в процессе активации тромбоцитов тромбином. Также при помощи флуоресцентной микроскопии удалось показать, что в процессе связывания тромбина на поверхности тромбоцита, локализация GPIIb/IIIa на мембране может не совпадать с “высоко-аффинными” сайтами [25], что, по всей видимости, означает наличие другого, более чувствительного рецептора тромбина на мембране тромбоцита.

Через несколько лет после открытия GPIIb/IIIa произошел значительный прорыв в данной области, когда удалось открыть весьма многообещающую мишень – трансмембранные белки, известные как PAR (protease-activated receptors) и образующие подсемейство рецепторов, связанных с G-белками, активируемых путем расщепления участка их внеклеточного домена. Несколько вариантов подобных рецепторов были обнаружены как в тромбоцитах человека, так и мыши [26]. Среди них основные рецепторы тромбина в тромбоцитах человека были названы PAR1 и PAR4 [14, 27, 28] (примечательно, что в мышинных тромбоцитах PAR1 не синтезируется, а его роль, предположительно, выполняет PAR3).

PAR1 стал первым открытым рецептором тромбина из данного семейства в тромбоцитах человека [29]. В среднем тромбоцит имеет порядка 1000–3000 копий PAR1 на своей мембране [1, 30]. При

связывании с PAR1 тромбин расщепляет экзодомен, находящийся у внеклеточного N-конца PAR1, что приводит к образованию нового N-конца, который выступает лигандом, специфично связываясь с другой областью рецептора PAR1 и запуская сигнальный путь активации тромбоцитов [26, 31]. Экзодомен PAR1 имеет два сайта связывания тромбина: помимо связывания с активным центром, PAR1 обладает гирудин-подобной последовательностью, которая взаимодействует с экзосайтом I тромбина, вызывая аллостерические эффекты, тем самым снижая энергетический барьер для расщепления PAR1 [32, 33]. Роль этой гирудин-подобной последовательности в усилении активации PAR1 была показана на основе экспериментальных данных, полученных для тромбина, содержащего мутации как в экзосайте I, так и в экспериментах с PAR-1 с мутацией в его экзодомене. Исследования показали, что константа диссоциации связывания тромбина с PAR1 находится в низком наномолярном диапазоне ($K_d \sim 1$ нМ), с константой Михаэлиса $K_m = 10-28$ мкМ и $k_{cat} = 58-340$ с⁻¹ [34, 35]. Эти значения свидетельствуют об относительно высокой аффинности связывания, что обеспечивает активацию PAR1 и запуск соответствующих сигнальных путей при наличии даже низких концентраций тромбина (<0.01 ед/мл, что примерно соответствует <0.1 нМ).

PAR4 был четвертым открытым рецептором данного семейства и является значительно менее аффинным рецептором тромбина в тромбоцитах человека [36]. В отличие от PAR1, у PAR4 отсутствует гирудин-подобная последовательность, поэтому его взаимодействие с тромбином происходит только в активном сайте [36, 37]. Было показано, что рекомбинантный экзодомен PAR4 расщепляется α -тромбином с $K_m = 61$ мкМ и $k_{cat} = 17-18$ с⁻¹ [13, 36]. Примечательно, что ключевое различие заключается в k_{cat} , который по оценкам от 4 до 20 раз ниже, чем у PAR1. Это уменьшение, в первую очередь, связано именно с отсутствием гирудин-подобной последовательности в PAR4, что делает его неспособным, в отличие от PAR1, менять свою конформацию для снижения энергетического барьера расщепления при связывании с тромбином.

На сегодняшний день точная роль PAR4 в связывании с тромбином и последующем запуске сигнальных путей, остается предметом дискуссий. Некоторые более ранние исследования показали, что ингибирование PAR4 не оказывает существенного влияния на активацию тромбоцитов и образование тромбов [37]. В свою очередь, результаты других работ позволяют предположить, что PAR4 из-за его более низкого сродства к тромбину может

играть важную роль дополнительного рецептора в присутствии более высоких концентраций тромбина [38]. Также было показано, что активация PAR4 влияет на уровень внутриклеточного кальция тромбоцитов, и его ингибирование ведет к уменьшению концентрации кальция в тромбоците, особенно на поздних этапах активации [39].

В начале 2000-х годов была выдвинута гипотеза, что даже одного PAR1 достаточно для описания всей активации тромбоцитов, индуцированной тромбином, особенно при низких концентрациях тромбина [20]. Кроме того, модель двух рецепторов PAR с различной аффинностью к тромбину идейно соответствует ранее полученным данным о двух-сайтовом профиле связывания тромбина. Однако даже самые высокие оценки количества молекул PAR на поверхности тромбоцитов не согласуются с параметрами взаимодействия тромбина с поверхностью тромбоцитов, описанных в ранних работах: суммарное количество рецепторов PAR, экспрессируемых в тромбоцитах, оказывается почти в 10 раз меньше общего числа сайтов связывания тромбина.

Кроме того, модель взаимодействия тромбоцитов с тромбином, основанная только на PAR, не могла объяснить ранее полученные экспериментальные результаты, в которых ингибирование GPIIb α оказывало критическое влияние на ответ тромбоцитов на тромбин, особенно при его низких концентрациях [19, 24, 29, 40]. Более того, отсутствие GPIIb α у пациентов с синдромом Бернара-Сулье (характеризующимся дефицитом комплекса GP IIb-IX-V) не только влияет на взаимодействие тромбоцитов с мультимерами фактора фон Виллебранда, но и вызывает дефекты активации тромбоцитов тромбином [41]. Снижение уровня активации в таком случае сравнимо с эффектом, описанным в экспериментах по ингибированию сайтов GPIIb α на поверхности тромбоцита [19, 24].

Современная картина взаимодействия тромбина с мембраной тромбоцитов

Накопленные за десятилетия исследований результаты позволяют предположить наличие сложных взаимодействий между рецепторами PAR и сайтами связывания GPIIb α в процессах активации тромбоцитов под действием тромбина. Одним из таких примеров является то, что PAR1 и PAR4 обладают способностью образовывать кластеры (гомодимеры PAR1-PAR1, PAR4-PAR4 и гетеродимеры PAR1-PAR4), состоящие из двух, реже трех молекул, а также кластеры PAR-GPIIb α [1, 42]. Примечательно, что эти кластеры обычно отсутствуют в покоящихся тромбоцитах, но могут собираться

на мембране при их активации [43]. Было также показано, что для образования гетеродимеров PAR1 и PAR4 требуется их конформационное изменение, которое индуцируется в ответ на активацию рецепторов α -тромбином. Комплексы GPIb/IX/V также способны образовывать так называемые кластеры – мультимерные комплексы из нескольких рецепторов – в ответ не только на биохимическую активацию, но и на достаточные напряжения сдвига, которые могут испытывать прикрепленные к поверхности тромбоциты в условиях артериального потока [44].

В одной из работ было продемонстрировано, что GPIb α способен ускорять расщепление PAR1 тромбином, тем самым увеличивая эффективность активации тромбоцитов человека [45]. В работах по изучению гидролиза PAR1 на неактивных тромбоцитах было показано, что ингибирование связывания тромбина с GPIb α также препятствует расщеплению PAR1 на тромбоцитах человека. Примечательно, что связывание GPIb α с тромбином увеличивает отношение k_{cat}/K_m , характеризующее процесс расщепления PAR1 примерно в 6–7 раз, что позволяет предположить, что GPIb α потенциально служит “кофактором” для индуцированной тромбином активации PAR1 и дальнейшей сигнализации в тромбоцитах *in situ*, в особенности в ответ на низкие концентрации тромбина [46–48]. Точные механизмы, с помощью которых взаимодействие тромбина с GPIb α ускоряет гидролиз PAR1, остаются неизвестными.

С физико-химической точки зрения характерное время связывания тромбина с GPIb α должно быть сравнимо или даже меньше, чем соответствующий параметр для процесса образования комплекса тромбин-PAR1 [24, 45].

Даже если константы скорости ассоциации тромбина-GPIb α сравнимы с кинетикой реакции тромбин-PAR1, то количество GPIb α на мембране тромбоцитов как минимум на порядок больше, чем PAR1. Можно предположить, что молекула тромбина, связавшись одним из своих экзосайтов с GPIb α , имеет повышенную аффинность и сниженный энергетический барьер для образования комплекса с PAR1 и последующего расщепления рецептора. Таким образом, при наличии пары близко расположенных GPIb α и PAR1 молекула тромбина способна прочно связаться через экзосайт II с GPIb α , после чего экзосайт I тромбина связывается с PAR1, что приводит к его расщеплению и запуску внутриклеточного сигнального пути активации тромбоцита. Эта гипотеза парного связывания тромбина через комбинацию GPIb α –PAR1 также согласуется с наличием наблюдаемых

в *in vitro* сайтов высокой аффинности ($K_d < 1$ нМ), превышающих аффинность связывания изолированных PAR1 ($K_d \sim 1$ нМ) и GPIb α ($K_d \sim 100$ нМ).

Сегодня известно, что при активации тромбоцитов существенная часть комплекса GPIb-IX-V локализуется в липидных рафтах [49, 50]. Учитывая связывание тромбина с GPIb α , можно предположить, что такие рафты позволяют существенно сконцентрировать ключевых участников тромбин-зависимых реакций на поверхности тромбоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как современные представления об описанных выше мембранных белках тромбоцита и их взаимодействии с тромбином соотносятся с данными о кинетике связывания тромбина с тромбоцитами, описанными в литературе?

Как видно из рис. 1, в большинстве работ оценки количества сайтов низкой аффинности имели значения более 20 000, что, в целом, соответствует измеренному количеству молекул GPIb α на поверхности тромбоцита. Также имеется неплохое согласие между соответствующими диапазонами K_d , описанными для GPIb α (50–500 нМ) и описанными параметрами для низкоаффинных сайтов (10–300 нМ, рис. 1). Таким образом, образование комплекса тромбина с GPIb α , по всей видимости, соответствует связыванию с сайтами, характеризующимися низкой аффинностью (рис. 2а). Связывание тромбина с сайтами высокой аффинности, в свою очередь, соответствует взаимодействию тромбина с PAR-рецепторами, а также одновременно взаимодействию тромбина с GPIb α и PAR-рецептором (рис. 2б, 2в). Таким образом, образование более стабильных комплексов тромбина одновременно с GPIb α и PAR, которое может соответствовать взаимодействию с сайтами высокой аффинности, может происходить в два этапа: связывание с GPIb α и последующее взаимодействие с PAR-рецепторами, запускающее их протеолитическую активацию. В пользу такой картины свидетельствуют данные о существенном уменьшении скорости активации PAR1 рецепторов при ингибировании связывания тромбина с GPIb α [45].

Следует отметить, что тромбин – центральный фермент каскада свертывания крови – не имеет Gla-домена и поэтому, в отличие от большинства факторов свертывания, не связывается с отрицательно заряженными фосфолипидами. Однако достаточно большое количество молекул GPIb α в мембране тромбоцита может приводить

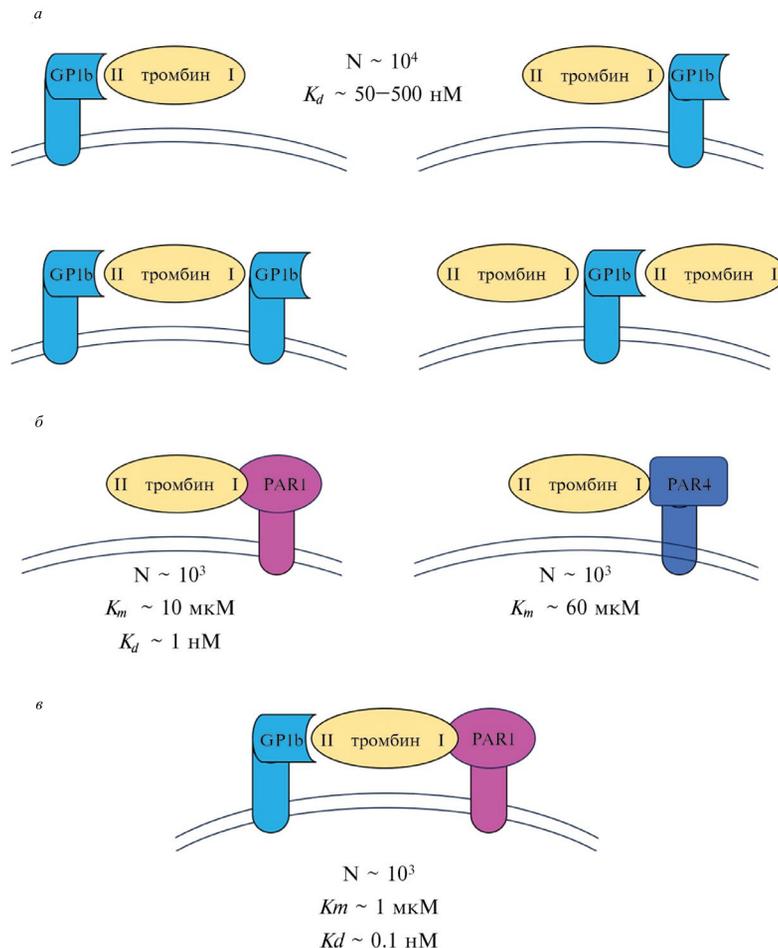


Рис. 2. Иллюстрация возможных взаимодействий тромбина с рецепторами на поверхности тромбоцита. Римскими цифрами I и II показаны соответствующие эксосайты молекулы тромбина. *a* – Связывание тромбина с GPIIb. Оба эксосайта тромбина способны связываться с сайтом GPIIb. Связывание одной молекулы тромбина двумя соседствующими GPIIb является наиболее частой конформацией. Связывание двух молекул тромбина с одной молекулой GPIIb, предположительно нестабильно и не реализуется *in vivo*. *б* – Связывание тромбина с PAR1 и PAR4 и основные параметры реакции расщепления рецепторов. *в* – Возможная конформация – кластер GP-PAR1 с высокой аффинностью к тромбину, где GPIIb выступает в качестве кофактора в реакции расщепления PAR1 тромбином.

к существенному накоплению тромбина на поверхности этих клеток, а также влиять на параметры его переноса в тромбоцитарном агрегате.

Для того чтобы оценить потенциальные эффекты такого связывания, можно рассмотреть ситуацию в равновесии, когда локальная концентрация свободного тромбина соответствует 10 нМ. В таком случае в 10 фл (10 мкМ³) плазмы будет содержаться в среднем 60 молекул тромбина (рис. 3). Данный объем соответствует среднему объему тромбоцита, на поверхности которого, в свою очередь, в случае равновесия будет связано порядка 1000 молекул (если считать $K_d = 100 \text{ нМ}$ для сайтов низкой аффинности, а их количество взять равным 10 000). Таким образом, даже в случае достаточно рыхлого тромба, половину объема которого составляет плазма, а половину – тромбоциты, количество связанного тромбина в равновесии будет на порядок

превышать количество свободного. Данный эффект может иметь несколько последствий с точки зрения регуляции тромбообразования: во-первых, накопление тромбина на мембране тромбоцита может служить важным механизмом, предотвращающим его активный перенос потоком на раннем этапе тромбообразования, – по аналогии с похожим эффектом, который, по всей видимости, имеет место для факторов свертывания при их взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидами [51]. Во-вторых, процесс связывания тромбина с тромбоцитами может существенно влиять на динамику его распространения в тромбоцитарном агрегате и тем самым – на пространственно-временную картину его активности в тромбе. Однако для оценки данного эффекта необходимо знать не только равновесные константы связывания, но и кинетические параметры взаимодействия

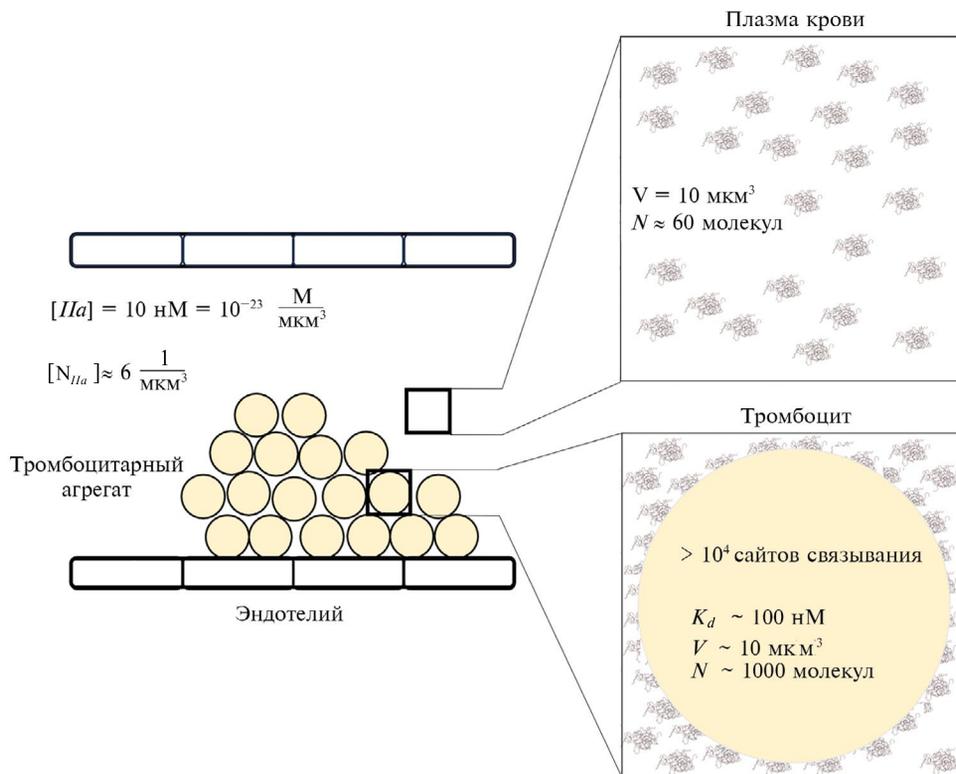


Рис. 3. Анализ количества свободного и связанного тромбина в тромбоцитарном агрегате. Расчеты произведены при условии, что локальная концентрация тромбина достигает 10 нМ, а один тромбоцит имеет порядка 10^4 сайтов связывания тромбина с $K_d \sim 100$ нМ.

тромбина с тромбоцитами. Кинетические кривые, полученные в ранних работах, свидетельствуют о характерном времени отсоединения тромбина (предположительно, от сайтов низкой аффинности, т.е. GPIIb/IIIa) – порядка 5 мин [6], что соответствует скорости реакции диссоциации комплекса порядка 0.003 с^{-1} . Связывание тромбина с тромбоцитами может также влиять на скорость его ингибирования. Известно, что время полужизни тромбина в плазме человека без тромбоцитов составляет порядка минуты. К сожалению, надежных данных о характерном времени жизни тромбина в связанной с тромбоцитами форме на сегодняшний день нет, однако, исходя из молекулярных особенностей взаимодействия тромбина с рецепторами на поверхности тромбоцитов, а также с основным ингибитором – антитромбином III, кажется разумным предположить, что время полужизни тромбина в связанном состоянии будет больше, чем в свободном.

В заключение следует отметить, что наличие достаточно широкого диапазона значений описанных в литературе параметров связывания тромбина с тромбоцитами (рис. 1) диктует необходимость экспериментального анализа процесса

распространения тромбина в тромбе и привлечение соответствующих математических моделей для количественной оценки влияния связывания на параметры транспорта этого центрального активатора в структуре тромбоцитарного агрегата.

Благодарности. Авторы выражают благодарность А.Д. Мегалинскому за техническую помощь.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-24-01028.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A., Newman P. 2019. *Platelets*. 4th Edition. Academic Press. Elsevier, p. 169–221, 243–257.
2. Wright J.H., Minot G.R. 1917. The viscous metamorphosis of the blood platelets. *J. Exp. Med.* **26**, 395–409.

3. Harter K., Levine M., Henderson S.O. 2015. Anticoagulation drug therapy: A review. *West J. Emerg. Med.* **16** (1), 11–17.
4. Workman E.F. Jr., White G.C. II, Lundblad R.L. 1977. High affinity binding of thrombin to platelets. Inhibition by tetranitromethane and heparin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 925–932.
5. White G.C., Lundblad R.L., Griffith M.J. 1981. Structure–function relations in platelet–thrombin reactions. Inhibition of platelet–thrombin interactions by lysine modification. *J. Biol. Chem.* **256**, 1763–1766.
6. Tollefsen D.M., Feagler J.R., Majerus P.W. 1974. The binding of thrombin to the surface of human platelets. *J. Biol. Chem.* **249** (8), 2646–2651.
7. Tollefsen D.M., Majerus P.W. 1976. Evidence for a single class of thrombin-binding sites on human platelets. *Biochemistry.* **15**, 2144–2149.
8. Shuman M.A., Tollefsen D.M., Majerus P.W. 1976. The binding of human and bovine thrombin to human platelets. *Blood.* **47**, 43–54.
9. Martin B.M., Wasiewski W.W., Fenton J.W., Dewtiller T.C. 1976. Equilibrium binding of thrombin to platelets. *Biochemistry.* **15** (22), 4886–4893.
10. Mustard J.F., Kinlough-Rathbone R.L., Packham M.A. 2002. *History of platelets. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. Pathophysiology, pharmacology, and therapeutics.* Cambridge University Press, p. 3–24.
11. De Marco L., Mazzucato M., Masotti A., Ruggeri Z.M. 1994. Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha. *J. Biol. Chem.* **269** (9), 6478–6484.
12. Gralnick H.R., Williams S., McKeown L.P., Hansmann K., Fenton J.W. 2nd, Krutzsch H. 1994. High-affinity alpha-thrombin binding to platelet glycoprotein Ib alpha: Identification of two binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91** (14), 6334–6338.
13. Steck T., Wallach D. 1965. The binding of kidney-bean phytohemagglutinin by Ehrlich ascites carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta.* **97** (3), 510–522.
14. Lundblad R.L., White G.C. 2005. The interaction of thrombin with blood platelets. *Platelets.* **16** (7), 373–375.
15. Okumura T., Jamieson G.A. 1976. Platelet glycoprotein: A single receptor for platelet aggregation induced by thrombin or ristocetin. *Thromb. Res.* **8**, 701–706.
16. Burkhart J.M., Vaudel M., Gambaryan S. 2012. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* **120**, e73–e82.
17. Harmon J.T., Jamieson G.A. 1985. Thrombin binds to a high-affinity approximately 900,000-dalton site on human platelets. *Biochemistry.* **24**, 58–64.
18. Mazzucato M., Marco L.D., Masotti A., Pradella P., Bahou W.F., Ruggeri Z.M. 1998. Characterization of the initial alpha-thrombin interaction with glycoprotein Ib alpha in relation to platelet activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 1880–1887.
19. Dörmann D., Clemetson K.J., Kehrel B.E. 2000. The GPIb α thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood.* **96**(7), 2469–2478.
20. Rivera J., Lozano M.L., Navarro-Núñez L., Vicente V. 2009. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica.* **94**, 700–711.
21. De Cristofaro R., De Candia E., Landolfi R., Rutella S., Hall S.W. 2001. Structural and functional mapping of the thrombin domain involved in the binding to the platelet glycoprotein Ib. *Biochemistry.* **40**, 13268–13273.
22. Clemetson K.J., Clemetson J.M. 1995. Platelet GPIb α -V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin. Thromb. Hemost.* **21**, 130–136.
23. Zarpellon A., Celikel R., Roberts J.R., McClintock R.A., Mendolicchio G.L., Moore K.L., Jing H., Varughese K.I., Ruggeri Z.M. 2011. Binding of α -thrombin to surface-anchored platelet glycoprotein Ib α sulfotyrosines through a two-site mechanism involving exosite I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108** (21), 8628–8633.
24. Ruggeri Z.M., Zarpellon A., Roberts J.R., McClintock R.A., Jing H., Mendolicchio G.L. 2010. Unraveling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib. *J. Thromb. Haemost.* **104** (5), 894–902.
25. Hayes K.L., Tracy P.B. 1999. The platelet high-affinity binding site for thrombin mimics hirudin, modulates thrombin-induced platelet activation, and is distinct from the glycoprotein Ib–IX–V complex. *J. Biol. Chem.* **274** (2), 972–980.
26. Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I., Coughlin S.R. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* **64**, 1057–1068.
27. De Candia E. 2012. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. *Thromb. Res.* **129** (3), 250–256.
28. Kahn M.L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M.J., Ishihara H., Coughlin S.R. 1999. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.* **103** (6), 879–887.
29. Coughlin S.R. 1999. How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 11023–11027.
30. Brass L.F., Vassallo R.R. Jr., Belmonte E., Ahuja M., Cichowski K., Hoxie J.A. 1992. Structure and function of the human platelet thrombin receptor. Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus. *J. Biol. Chem.* **267**, 13795–13798.
31. Andersen H., Greenberg D.L., Fujikawa K., Xu W., Chung D.W., Davie E.W. 1999. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of

- thrombin-stimulated platelet procoagulant activity (clotting, phospholipid, annexin V, calcium flux). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 11189–11193.
32. Heuberger D.M., Schuepbach R.A. 2019. Protease-activated receptors (PARs): Mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thrombosis J.* **17**, 4.
33. Gandhi P.S., Chen Z., Appelbaum E., Zapata F., Di Cera E. 2011. Structural basis of thrombin–protease-activated receptor interactions. *Life*. **63** (6), 375–382.
34. Nieman M.T., Schmaier A.H. 2007. Interaction of thrombin with PAR1 and PAR4 at the thrombin cleavage site. *Biochemistry*. **46** (29), 8603–8610.
35. Vu T.K., Wheaton V.I., Hung D.T., Charo I., Coughlin S.R. Domains specifying thrombin-receptor interaction. 1991. *Nature*. **353**, 674–677.
36. Xu W.F., Andersen H., Whitmore T.E., Presnell S.R., Yee D.P., Ching A., Gilbert T., Davie E.W., Foster D.C. 1998. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 6642–6646.
37. Coughlin S.R. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1800–1814.
38. Boknäs N., Faxälv L., Centellas D.S., Wallstedt M., Ramström S., Grenegård M., Lindahl T.L. 2014. Thrombin-induced platelet activation via PAR4: Pivotal role for exosite II. *Thromb. Haemost.* **112**, 558–565.
39. Covic L., Gresser A.L., Kuliopulos A. 2000. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*. **39**, 5458–5467.
40. Ramakrishnan V., DeGuzman F., Bao M., Hall S.W., Leung L.L., Phillips D.R. 2001. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98** (4), 1823–1828.
41. Jamieson G.A., Okumura T. 1978. Reduced thrombin binding and aggregation in Bernard–Soulier platelets. *J. Clin. Invest.* **61**, 861–864.
42. Milligan G., Smith N.J. 2007. Allosteric modulation of heterodimeric G-protein coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 615–620.
43. Arachiche A., Mumaw M.M., de la Fuente M., Nieman M.T. 2013. Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1-enhanced cleavage of PAR4 by α -thrombin. *J. Biol. Chem.* **288** (45), 32553–32562.
44. Ozaki Y., Suzuki-Inoue K., Inoue O. 2013. Platelet receptors activated via multimerization: Glycoprotein VI, GPIb α -IX-V, and CLEC-2. *J. Thromb. Haemost.* **11** (Suppl. 1), 330–339.
45. De Candia E., Hall S.W., Rutella S., Landolfi R., Andrews R.K., De Cristofaro R. 2001. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *J. Biol. Chem.* **276** (7), 4692–4698.
46. Estevez B., Kim K., Delaney M.K., Stojanovic-Terpo A., Shen B., Ruan C., Cho J., Ruggeri Z.M., Du X. 2016. Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood*. **127** (5), 626–636.
47. Yaping Z., Samuel M.E., Cheng Z., Xiaoping D. 2022. Signaling mechanisms of the platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Platelets*. **33** (6), 823–832.
48. Nieman M.T. 2016. Protease-activated receptors in hemostasis. *Blood*. **128** (2), 169–177.
49. Shrimpton C.N., Borthakur G., Larrucea S., Cruz M.A., Dong J.F., López J.A. 2002. Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation. *J. Exp. Med.* **196** (8), 1057–1066.
50. Komatsuya K., Kaneko K., Kasahara K. 2020. Function of platelet glycosphingolipid microdomains/lipid rafts. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (15), 5539–5556.
51. Megalinskiy A.D., Loginova V.M., Shibeko A.M., Ataulakhanov F.I., Panteleev M.A., Nechipurenko D.Y. 2022. The role of immobilized phospholipids in the initiation of blood coagulation under flow conditions. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A, Membr. Cell Biol.* **16**, 38–48.

Physicochemical Features of Thrombin Binding to Platelet Membrane

© 2024 г. R. R. Kerimov¹, D. Yu. Nechipurenko^{1-3, *}, M. A. Panteleev¹⁻³

¹*Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia*

²*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

³*National Medical Research Center of Children's Hematology, Oncology and Immunology named after D. Rogachev, Moscow, 117997 Russia*

*e-mail: ne4ipur@gmail.com

Thrombin is a key enzyme of the blood coagulation system, which has been actively studied since the beginning of the last century. The formation of thrombin from prothrombin in the area of vessel injury leads not only to the formation of fibrin – an important structural component of the hemostatic clot – but also to the activation of platelets, endothelium and immune system cells. The binding of thrombin to the platelet surface is thought to play a critical role in the process of platelet activation and may also ensure the maintenance of a high concentration of thrombin within the thrombus due to the concentration of protease on the platelet surface. To date, all major thrombin receptors on platelets have been thoroughly characterized: through various experimental methods, the physicochemical parameters of the corresponding intermolecular interactions have been established. Since the interaction of thrombin with platelets leads to their activation, which includes changes in the number of receptors as a result of granule secretion, the interpretation of the observed kinetic binding curves faces a number of difficulties. It is known that some receptors as a result of platelet activation are able to redistribute on the membrane and form dimers and clusters, which makes the kinetics of thrombin binding to platelets an extremely complex process depending on many factors, such as activator concentrations, platelet state, and other local parameters of the system. This review aims to describe the current understanding of the interaction of thrombin with the platelet membrane and to outline important unresolved issues in this area of research. The survey provides not only information on structural and kinetic features of thrombin binding to individual platelet membrane proteins, but also analyzes the relationship between the relevant interaction parameters and previously obtained data on the integral kinetics of protease binding to the platelet surface.

Keywords: thrombin, platelets, glycoproteins, PAR receptors, binding constant, membrane complex

УДК 57.043

АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

© 2024 г. П. А. Пирогова^a, Т. А. Здобнова^a, А. В. Иванова^a, М. А. Гринберг^a, В. А. Воденев^{a, *}

^aФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского”, Нижний Новгород, 603022 Россия

*e-mail: v.vodeneev@mail.ru

Поступила в редакцию 06.12.2023

После доработки 18.01.2024

Принята к публикации 19.01.2024

Влияние ионизирующего излучения (ИИ) на растения реализуется во многом за счет изменения статуса сигнальных систем и модификации стрессовых сигналов. Варибельный потенциал (ВП) – один из типов электрических сигналов растений. ИИ способствует увеличению амплитуды ВП, однако механизмы такого влияния практически неизвестны. Возможный путь реализации возникающих при действии ИИ изменений – регуляция экспрессии генов. В настоящей работе исследовано изменение экспрессии генов участников генерации и распространения ВП у облученных растений. Эксперименты были выполнены на 14–15-дневных растениях пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.), выращенных в условиях хронического облучения (источник ⁹⁰Sr–⁹⁰Y) с мощностью дозы 31.3 мкГр/ч. Максимальная накопленная доза составила около 11.3 мГр. У облученных растений показано отсутствие изменений экспрессии генов кальциевого (*TPC1*), анионных (*ALMT1* и *CLC1*), калиевого (*AKT1*) каналов, H⁺-АТФ-азы (*HAI*) и NADPH-оксидазы (*RBOHs*). Выявлено уменьшение экспрессии гена калиевых каналов *SKOR*. Блокатор калиевых каналов – хлорид тетраэтиламмония вызывал увеличение амплитуды реакции у контрольных растений, сопоставимое с увеличением амплитуды у облученной группы. Полученный результат свидетельствует, что одним из путей влияния ИИ на электрические сигналы растений является угнетение экспрессии калиевого канала.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, дистанционные электрические сигналы, варибельный потенциал, калиевые каналы, *SKOR*, *Triticum aestivum*

DOI: 10.31857/S0233475524030039, **EDN:** csqqth

ВВЕДЕНИЕ

Исследование влияния ионизирующего излучения (ИИ) на живые организмы, в частности растения, является актуальной задачей в наши дни, поскольку расширяются сферы его применения. Растения подвергаются воздействию ИИ в различных случаях, например при произрастании на территориях с повышенным радиационным фоном, решении селекционных задач или выращивании в оранжереях во время космических миссий [1–4]. Особый интерес вызывают эффекты, оказываемые на растения облучением в малых дозах в хроническом режиме, поскольку такие условия воздействия наиболее приближены к встречающимся в природной среде с повышенным уровнем

ИИ. При данном типе облучения биологические эффекты описываются как нелинейные, зачастую приводящие к стимуляции физиологических процессов [5–7]. ИИ, в том числе в малых дозах, оказывает влияние на важнейшие физиологические процессы (фотосинтез, транспирация, биосинтез соединений). Такие эффекты отчасти могут объясняться влиянием ИИ на уровень экспрессии генов [6, 7]. Известно, что уже малые дозы ИИ могут приводить к существенным изменениям в профилях экспрессии различных генов [8, 9]. Характерной особенностью малых доз ИИ является также модуляция эффекта от действующих на фоне облучения дополнительных неблагоприятных факторов, таких как повышенная температура, засуха, засоление, тяжелые металлы, микрогравитация

[10–14]. Облучение может способствовать как усилению, так и ослаблению вызванных дополнительными стрессорами негативных эффектов, оцениваемых по морфометрическим и физиологическим показателям. Одним из потенциальных механизмов формирования подобных измененных ответов может являться модификация стрессовых сигналов растений, вызванных неблагоприятными факторами, под влиянием малых доз ИИ.

Дистанционные электрические сигналы – один из типов стрессовых сигналов растений – имеют большое значение для функционирования растения в изменяющихся условиях окружающей среды. Электрические сигналы способны передавать информацию о действии стрессора и приводить к формированию системного ответа. Такой ответ представляет собой скоординированное изменение активности физиологических процессов, лежащие в основе адаптации [15–18]. Ранее было показано, что ИИ способно влиять на дистанционные электрические сигналы растений: как потенциал действия [19], так и переменный потенциал (ВП) [14]. Механизмы такого влияния пока остаются неясными, что может быть связано с тем, что молекулярные механизмы генерации и распространения электрических сигналов у растений изучены недостаточно. Известно, что формирование ВП связано с возникновением потоков кальция, калия и анионов и изменением активности H^+ -АТФ-азы плазматических мембран [20]. Несмотря на то, что на сегодняшний день однозначно не идентифицирована молекулярная природа систем ионного транспорта, вносящих вклад в формирование ВП, круг наиболее вероятных кандидатов обозначен [21]. Так, в инициации ВП, по-видимому, принимают участие кальций-проницаемые ионные каналы: лиганд-зависимые (GLR, CNGC), механочувствительные каналы (MCA, MSL) и аннексин (ANN1) [22–26]. Входящий поток Ca^{2+} индуцирует выходящий поток анионов, связанный с активацией анионных каналов, относящихся, вероятно, к семействам CLC, SLAC и ALMT [27, 28], и инактивацию H^+ -АТФ-азы. В формировании фазы реполяризации ВП предполагают участие таких K^+ -каналов, как SKOR и GORK [27, 29]. Распространение ВП связывают с совместным движением волн Ca^{2+} и активных форм кислорода (АФК), возникающих при участии АФК-зависимых Ca^{2+} -каналов и Ca^{2+} -активируемой NADPH-оксидазы, продуцирующей АФК [24, 30].

К настоящему времени показано, что ИИ способно влиять на отдельные системы генерации и распространения ВП. Такое влияние может

реализовываться через изменение экспрессии генов (генетическая регуляция) и, предположительно, через изменение активности белков (физиологическая регуляция) за счет генерирующихся в результате облучения АФК. Первый путь показан, в частности, для анионных каналов [9] и NADPH-оксидазы [31–33], второй путь – для H^+ -АТФ-азы [14] и некоторых ионных каналов [34]. Однако на сегодняшний день оценка влияния ИИ выполнена в отношении ограниченного круга участников генерации и распространения электрических сигналов.

Цель работы заключается в анализе механизмов влияния ИИ на ВП растений, в частности, в определении вызванных хроническим облучением изменений экспрессии генов белков, участвующих в генерации и распространении ВП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание растений и условия облучения.

Объект исследования – 14–15-дневные растения пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта “Дарья”. Семена проращивали в течение 3 дней в дистиллированной воде, после чего саженцы пересаживали в горшки с песком. Растения выращивали при температуре 24°C под люминесцентными лампами белого света и флюора в условиях 16-часового светового периода. Экспериментальную группу облучали с помощью источника ^{90}Sr - ^{90}Y активностью 0.1 МБк и мощностью дозы 31.3 мкГр/ч. Максимальная накопленная доза составляла около 11.3 мГр.

Измерение параметров переменного потенциала.

Электрическую активность регистрировали экстраклеточно с помощью $Ag^+/AgCl$ -макроэлектродов ЭВЛ-1М3 (Гомельский приборный завод, Беларусь), расположенных на втором листе целого растения и на срезанном втором листе длиной 15 см. Измерительный электрод контактировал с листом на расстоянии 3 см от зоны теплового воздействия посредством нити, смоченной стандартным раствором (0.1 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 0.5 мМ $CaCl_2$). Электрод сравнения располагался во влажном песке (в случае целых растений) или в емкости, в которую был погружен срезанный край листа. Экстраклеточный потенциал записывали с помощью высокоомного усилителя рН-метра/иономера мультитеста ИПЛ-113 (Семико, Россия), затем обрабатывали в программе param2.

ВП регистрировали в ответ на нагрев до 65°C кончика листа в заполненной водой ячейке в течение 7 мин. Адаптация растения перед регистрацией

реакции составляла 1 ч. После возникновения ВП запись потенциалов проводили в течение 25 мин.

Ингибиторный анализ. Вклад K^+ -каналов в развитие ВП у контрольных и облученных растений оценивали с помощью ингибиторного анализа. В качестве ингибитора использовали 1 мМ хлорид тетраэтиламмония (ТЭА), блокирующий работу K^+ -каналов. Срезанный второй лист пшеницы длиной 15 см помещали в сосуд с ТЭА и инкубировали 5 мин в вакуумной установке при давлении 0.2 атм. Для контроля срезанный лист помещали в сосуд со стандартным раствором и проводили инкубацию в аналогичных условиях. Временной период между загрузкой ингибитора и регистрацией ВП составлял 60 мин.

Анализ экспрессии генов. Изменение экспрессии генов потенциальных мишеней ИИ, предположительно участвующих в генерации и распространении ВП (табл. 1), оценивали методом ПЦР в реальном времени. Гены интереса выбирали на основании данных литературы.

Для анализа использовали срезанные и замороженные в жидком азоте вторые интактные листья растений пшеницы. Суммарную РНК выделяли из 100 мг замороженного образца с помощью реагента ExtractRNA (BCO32, Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Качество выделенной РНК проверяли с помощью спектрофотометра для микрообъемов NanoVue (GE, США) и электрофореза в 1.2% агарозном геле (20 мин, 7 В/см). 1 мкг суммарной РНК обрабатывали ДНКазой DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, США) и проводили синтез кДНК с использованием набора реактивов MMLV RT kit (SKO21, Евроген, Россия) и oligo(dT) праймера (SB001, Евроген, Россия) согласно инструкциям производителя.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием специфических праймеров (табл. 1) и набора qPCRmix-HS SYBR+HighROX (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя. В реакционную смесь добавляли по 1 мкл кДНК (4 технические повторности каждой реакционной смеси и отрицательного контроля). Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе The Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Программа ПЦР: 1) горячий старт при 95°C, 10 мин; 2) денатурация ДНК при 95°C, 15 с; 3) отжиг праймеров, синтез ДНК и детекция флуоресцентного сигнала при 60°C, 1 мин. Этапы 2–3 повторяли 40 раз. Значения порогового цикла C_t определяли с помощью программного обеспечения 7500 Software

(Applied Biosystems, США). Полученные результаты анализировали по методике $\Delta\Delta C_t$ [35]. Изменение относительной экспрессии (RQ) определяли по формуле: $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ [35]. В качестве референсных генов использовали β -актин (*ACTB*) и гомолог белка слияния вакуолей (*MON1*) [10, 33].

Статистическая обработка данных. Эксперименты включали 7–16 биологических повторностей. Статистическую обработку результатов проводили с помощью MS Excel (Microsoft Corporation, США). Для анализа использовали средние значения величин с ошибкой среднего. Статистически значимые различия определяли с помощью t-теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние ИИ на параметры ВП. Локальный нагрев кончика листа вызывает генерацию и распространение ВП у растений пшеницы (рис. 1). Хроническое облучение растений приводит к возрастанию амплитуды ВП: в контроле она составляет 68.9 ± 3.9 мВ, в облученной группе – 83.1 ± 1.9 мВ (рис. 1). Для дальнейшего анализа механизмов наблюдаемого эффекта эксперименты были дополнительно проведены на срезанных листьях. У облученных растений на срезанных листьях также наблюдается увеличение амплитуды ВП: в контроле – 21.9 ± 2.6 мВ, в облученной группе – 31.8 ± 3.8 мВ (рис. 1).

Влияние ИИ на экспрессию генов участников генерации и распространения ВП. По результатам ПЦР в реальном времени у облученных растений определили относительный уровень экспрессии генов белков, участвующих в генерации и распространении ВП (рис. 2). ИИ оказывает действие на экспрессию генов участников генерации ВП. Показано, что уровень экспрессии гена калиевого канала SKOR у облученных растений был статистически значимо ниже. На экспрессию гена двупорового кальциевого канала (*TPC1*), анионных каналов (*ALMT1* и *CLCI*), калиевого канала входящего направления (*AKT1*), H^+ -АТФ-азы плазматической мембраны (*HAI*) и семейства NADPH-оксидаз ИИ не влияло.

Влияние ИИ на вклад калиевых каналов в развитие ВП. Для оценки вклада K^+ -каналов в развитие ВП под действием ИИ проведены электрофизиологические измерения при помощи ингибиторного анализа с ТЭА. ТЭА вызывает возрастание амплитуды ВП у контрольных растений (рис. 3). Амплитуда ВП контрольных растений составляет 21.9 ± 2.6 мВ, при действии ингибитора – 31.9 ± 3.4 мВ. ТЭА статистически значимо

Таблица 1. Праймеры исследуемых генов для ПЦР в реальном времени

| Белок | Ген | Код GenBank | Длина продукта, п.о. | Прямой (F) и обратный (R) праймеры (5'–3') |
|--|---------------|--------------|----------------------|--|
| Н ⁺ -АТФ-аза плазматической мембраны | <i>HAI</i> | AY543630 | 142 | F: TTGGTCTGTTGCCCTGTTT |
| | | | | R: ATCCCAAGCCTCCTACCAGT |
| Al-чувствительный транспортер малата 1 | <i>ALMT1</i> | AB081803 | 124 | F: TGCAGCCAACCCTGAGCTAT |
| | | | | R: CACTGGAGACGGCACAGTCA |
| Хлорный анионный канал 1 | <i>CLC1</i> | HM998551 | 146 | F: ACACAATTTGCACCAGCAGC |
| | | | | R: GCCAATCCACCTCCAAGTGA |
| K ⁺ -канал SKOR | <i>SKOR</i> | XM_044569353 | 134 | F: TGGCAACTGTTGGCTATGGT |
| | | | | R: GCCTTTGACGATAAGCGCAG |
| K ⁺ -канал входящего направления АКТ1 | <i>AKT1</i> | AF207745 | 139 | F: CATCATCTCGCCCTACGACC |
| | | | | R: ATTATCCGTCGCAGCTAGGC |
| Двупоровый Ca ²⁺ -канал 1 | <i>TPC1</i> | AY114121 | 144 | F: CGGGAGGGCAATGAGTTTCT |
| | | | | R: TCCCTTTGATCGTAAGCCTGT |
| NADPH-оксидаза | <i>RBOHs*</i> | — | 139 | F: CCGAGACGCTCAAGCTCAA |
| | | | | R: CGGCGATCACCTTGTGGA |
| Гомолог белка слияния вакуолей MON1 | <i>MON1*</i> | — | 117 | F: TTCTAGGTGGCACAGATGCG |
| | | | | R: CAGCCTGTCTTGTGCTTGG |
| β-Актин | <i>ACTB</i> | AB181991 | 135 | F: GGAGAAGCTCGCTTACGTG |
| | | | | R: GGGCACCTGAACCTTTCTGA |

* Для генов, последовательности которых для *T. aestivum* неизвестны, праймеры подбирали на основании гомологичной последовательности, полученной путем множественного выравнивания известных последовательностей этого гена других представителей злаковых (Gramineae, taxid: 4479).

не изменяет амплитуду реакции у растений из облученной группы (рис. 3). Амплитуда ВП облученных растений составляет 31.8 ± 3.8 мВ, при действии ТЭА — 36.3 ± 3.3 мВ. Таким образом, блокировка K⁺-каналов ТЭА у контрольных растений приводит к росту амплитуды ВП на 46%, что соответствует подобному увеличению у облученных растений. Дополнительного статистически значимого прироста амплитуды у облученных растений не происходит.

ОБСУЖДЕНИЕ

У растений пшеницы, выращенных в условиях хронического облучения, обнаружено увеличение амплитуды ВП (рис. 1), что соответствует полученным ранее результатам [14]. Наблюдаемый эффект может объясняться изменением количества и активности участвующих в генерации и распространении ВП систем. Распространение ВП связывают

с совместным движением волн Ca²⁺ и АФК за счет АФК-зависимых Ca²⁺-каналов и Ca²⁺-активируемой NADPH-оксидазы [24, 30]. Вход Ca²⁺ в клетку индуцирует изменение мембранного потенциала с последующей активацией анионных и K⁺-каналов, а также инактивацией H⁺-АТФ-азы плазматических мембран. Известно, что облучение изменяет проницаемость мембраны для отдельных ионов за счет влияния на ионные каналы [34]. Эффект ИИ на ВП может быть обусловлен влиянием на системы, участвующие в генерации и распространении ВП, в частности, вследствие изменения уровня экспрессии кодирующих их генов.

У облученных растений показано отсутствие изменений экспрессии генов кальциевого (*TPC1*), анионных (*ALMT1* и *CLC1*), калиевого (*AKT1*) каналов, H⁺-АТФ-азы (*HAI*) и NADPH-оксидазы (*RBOHs*) (рис. 2). Из литературных источников известно, что ИИ может вызывать изменение экспрессии генов других участников генерации

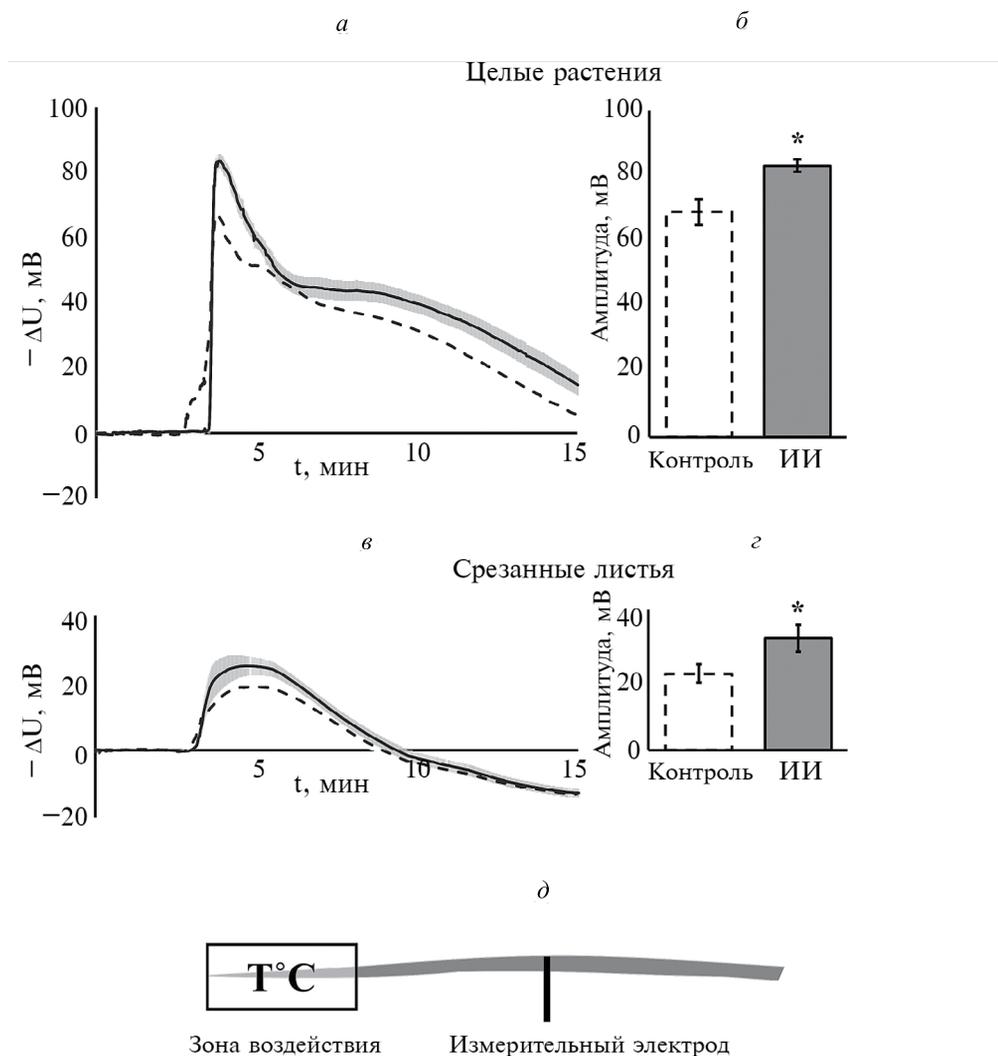


Рис. 1. Влияние ИИ на параметры ВП. *a* и *в* – Усредненные записи ВП у контрольных и облученных растений на целых растениях и отрезанных листьях соответственно; *б* и *г* – амплитуда ВП у контрольных и облученных растений на целых растениях и отрезанных листьях соответственно; *д* – схема эксперимента: расстояние между зоной воздействия и измерительным электродом 3 см; $n = 8-16$; $*p < 0.05$.

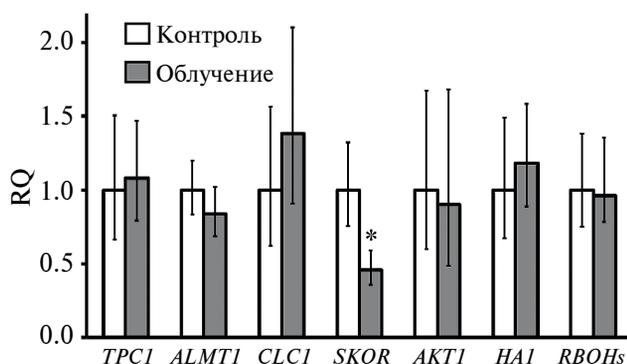


Рис. 2. Влияние ИИ на относительную экспрессию (RQ) генов белков, участвующих в генерации и распространении ВП; $n = 7$; $*p < 0.05$.

и распространения ВП, включая анионный канал SLAC1 [9] и NADPH-оксидазу [10, 31–33, 36]. Отсутствие влияния ИИ на эти гены в нашей работе может объясняться отличающимися объектами исследования и условиями облучения как в отношении типа ИИ, так и дозы облучения. Изменение экспрессии гена при хроническом облучении обнаружено только для K^+ -канала SKOR (рис. 2). Наблюдаемое уменьшение экспрессии гена одного из основных функциональных участников электрогенеза – K^+ -канала – может объяснять увеличение амплитуды реакции (рис. 1) за счет снижения степени перекрытия анионного потока, отвечающего за развитие деполяризации, и калиевого потока, вовлеченного в развитие реполяризации.

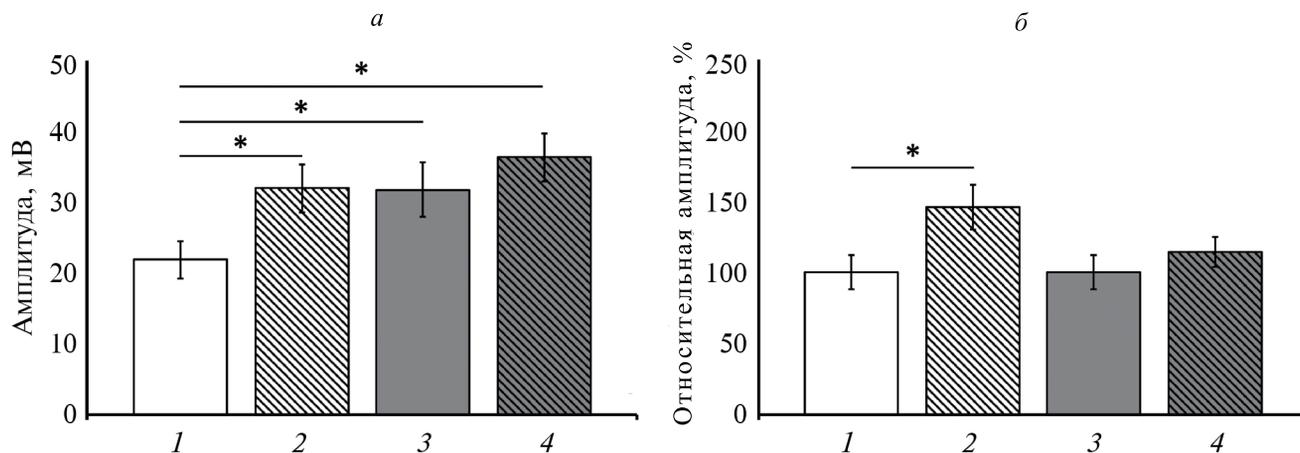


Рис. 3. Влияние блокатора калиевых каналов (ТЭА, 1 мМ) на амплитуду ВП у контрольных и облученных растений пшеницы. *а* – Амплитуда ВП. *б* – Относительная амплитуда ВП; за 100% приняты значения амплитуды ВП в отсутствие ТЭА для контрольных и облученных растений. 1 – Контроль, 2 – контроль + ТЭА, 3 – ИИ, 4 – ИИ + ТЭА; $n = 16$; * $p < 0.05$.

При модификации экспрессии большинства генов ключевыми участниками сигнального каскада, как правило, выступают транскрипционные факторы. При действии облучения в регуляции экспрессии генов ключевую роль играют транскрипционные факторы из семейств WRKY, MYB, HSF, ZAT [31, 37, 38], предположительно, за счет АФК, генерирующихся в ходе облучения [6]. Роль возможного претендента регуляции транскрипции K^+ -канала SKOR может выполнять транскрипционный фактор из семейства WRKY [39].

Выполненный ингибиторный анализ подтвердил участие K^+ -каналов в формировании вызванных ИИ изменений параметров ВП. K^+ -каналы играют важную роль на фазе реполяризации, однако выходящий поток K^+ начинается в фазу деполяризации, поэтому угнетение потока K^+ может привести к возрастанию амплитуды ВП. В эксперименте показано, что блокирование K^+ -каналов вызывает сходное с действием ИИ возрастание амплитуды ВП (рис. 3). Дополнительного вызванного блокатором возрастания амплитуды ВП у облученных растений не происходит (рис. 3).

Стоит отметить, что для K^+ -каналов, вносящих вклад в генерацию ВП, наряду с изменением экспрессии генов при облучении (рис. 2), возможна физиологическая регуляция активности другими факторами: АФК и изменением рН. Для каналов SKOR и GORK показана модуляция активности молекулами АФК [40, 41], которые генерируются в ходе облучения. Закисление внутренней и наружной среды в физиологическом диапазоне рН увеличивает количество K^+ -каналов, не доступных для активации [42]. Ранее в аналогичных условиях

облучения было показано увеличение активности одного из ключевых ферментов рН-гомеостаза – H^+ -АТФ-азы [14, 43], выкачивающей протоны из цитоплазмы в апопласт [44]. Повышенная активность H^+ -АТФ-азы также может оказывать влияние на калиевый ток и параметры электрических сигналов в целом за счет сдвигов электрохимических градиентов ионов на цитоплазматической мембране.

Полученные результаты и имеющиеся данные литературы позволяют предположить схему влияния ИИ на амплитуду электрических сигналов (рис. 4). К системам, участвующим в генерации и распространении электрических сигналов, относятся: системы продукции АФК (NADPH-оксидазы), Ca^{2+} -каналы, анионные каналы, K^+ -каналы и H^+ -АТФ-азу. Реализация эффекта ИИ возможна за счет изменения экспрессии генов (генетическая регуляция) и, предположительно, активности готовых белков (физиологическая регуляция). Посредником в реализации такого влияния в большинстве случаев выступают АФК, генерирующиеся под действием ИИ. Регуляция экспрессии генов осуществляется при участии транскрипционных факторов, активность которых при влиянии ИИ регулируется преимущественно через АФК. Вызванное облучением изменение экспрессии генов имеет место только для K^+ -канала выходящего направления SKOR (рис. 2). Понижение уровня экспрессии SKOR вызывает, вероятно, угнетение выходящего потока ионов K^+ . Это ведет к увеличению амплитуды ВП вследствие перекрытия деполяризующего потока анионов и реполяризующего потока K^+ . Наряду с генетической регуляцией имеет место физиологическая регуляция.

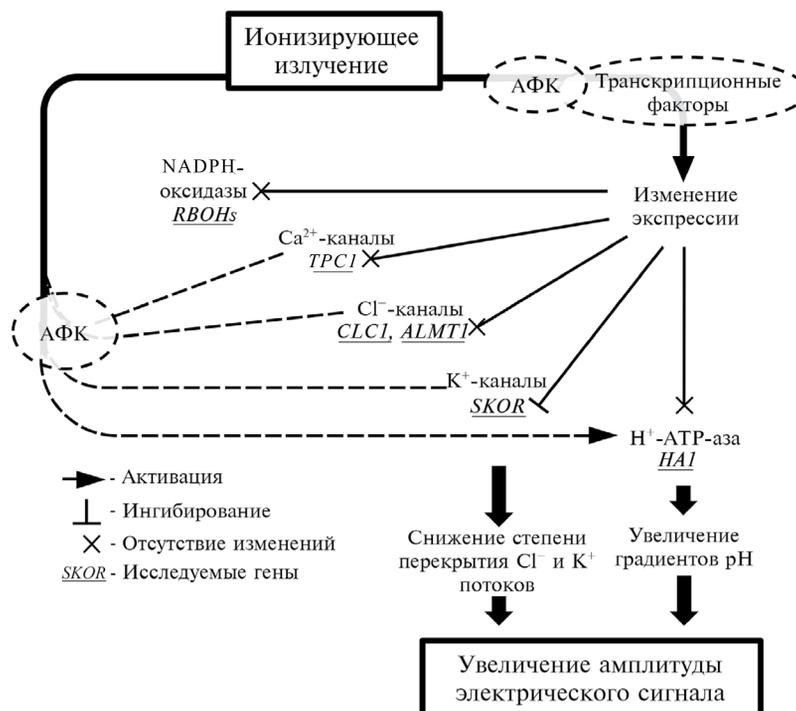


Рис. 4. Гипотетическая схема путей влияния ИИ на электрические сигналы. Схема основана на данных литературы (обозначены пунктирными линиями, ссылки приводятся в тексте раздела “Обсуждение”) и результатах, полученных в настоящей работе (обозначены сплошными линиями).

В предыдущих работах было продемонстрировано усиление активности H⁺-АТФ-азы у облученных растений [14], в то же время изменения экспрессии гена H⁺-АТФ-азы не было показано (рис. 2), что указывает на регуляцию на уровне готовых ферментов. Также под действием ИИ может происходить изменение проницаемости мембраны для ионов Ca²⁺, Cl⁻, K⁺ за счет влияния на ионные каналы [19, 34, 45, 46]. Таким образом, наиболее вероятным механизмом возрастания амплитуды ВП под действием ИИ выступает увеличение активности H⁺-АТФ-азы и снижение уровня экспрессии гена K⁺-канала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе получены результаты о роли калиевых каналов в реализации влияния ИИ на ВП, дополняющие понимание механизмов, лежащих в основе действия ИИ на стрессовые сигналы растений. Показано уменьшение уровня экспрессии гена калиевого канала SKOR и участие калиевых каналов в вызванном ИИ изменении амплитуды ВП. Мы предполагаем, что ключевую роль в механизме модификации ВП при облучении играют K⁺-каналы наряду с системой регуляции pH. Полученные

данные позволяют расширить понимание механизмов работы стрессовых сигналов растений в условиях действия малых доз и хронического облучения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-24-00340.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mousseau T.A., Møller A.P. 2020. Plants in the light of ionizing radiation: What have we learned from Chernobyl, Fukushima, and other “hot” places? *Front. Plant Sci.* **11**, 552.
2. Wang J., Zhang Y., Zhou L., Yang F., Li J., Du Y., Liu R., Li W., Yu L. 2022. Ionizing radiation: Effective physical agents for economic crop seed priming and the underlying physiological mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (23), 15212.

3. Duarte G.T., Volkova P.Y., Perez F., Horemans N. 2023. Chronic ionizing radiation of plants: An evolutionary factor from direct damage to non-target effects. *Plants*. **12** (5), 1178.
4. Grinberg M.A., Vodeneev V.A., Il'in N.V., Mareev E.A. 2023. Laboratory simulation of photosynthesis in a wide range of electromagnetic and radiation environment parameters. *Astron. Rep.* **67**, 71–77.
5. Kovalchuk I., Molinier J., Yao Y., Arkhipov A., Kovalchuk O. 2007. Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation. *Mutat. Res.* **624** (1–2), 101–113.
6. Gudkov S.V., Grinberg M.A., Sukhov V., Vodeneev V. 2019. Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants. *J. Environ. Radioact.* **202**, 8–24.
7. Volkova P., Bondarenko E., Kazakova E. 2022. Radiation hormesis in plants. *Curr. Opin. Toxicol.* **30**, 100334.
8. Hayashi G., Shibato J., Imanaka T., Cho K., Kubo A., Kikuchi S., Satoh K., Kimura S., Ozawa S., Fukutani S., Endo S., Ichikawa K., Agrawal G.K., Shioda S., Fukumoto M., Rakwal R. 2014. Unraveling low-level gamma radiation-responsive changes in expression of early and late genes in leaves of rice seedlings at Iitate Village, Fukushima. *J. Hered.* **105** (5), 723–738.
9. Duarte G.T., Volkova P.Y., Geras'kin S.A. 2019. The response profile to chronic radiation exposure based on the transcriptome analysis of Scots pine from Chernobyl affected zone. *Environ. Pollut.* **250**, 618–626.
10. Vanhoudt N., Vandenhove H., Horemans N., Wannijn J., Hees M., Vangronsveld J., Cuypers A. 2010. The combined effect of uranium and gamma radiation on biological responses and oxidative stress induced in *Arabidopsis thaliana*. *J. Environ. Radioact.* **101** (11), 923–930.
11. Alikamanoglu S., Yalcili O., Sen A. 2011. Effect of gamma radiation on growth factors, biochemical parameters, and accumulation of trace elements in soybean plants (*Glycine max* L. Merrill). *Biol. Trace Elem. Res.* **141** (1–3), 283–293.
12. Macovei A., Garg B., Raikwar S., Balestrazzi A., Carbonera D., Buttafava A., Tuteja N. 2014. Synergistic exposure of rice seeds to different doses of gamma-ray and salinity stress resulted in increased antioxidant enzyme activities and genespecific modulation of TC-NER pathway. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 676934.
13. Deng C., Wang, T., Wu J., Xu A., Li H., Liu M., Bian P. 2017. Modulation of modeled microgravity on radiation-induced adaptive response of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Mutat. Res.* **796**, 20–28.
14. Grinberg M., Gudkov S., Balalaeva I., Gromova E., Sinitsyna Y., Sukhov V., Vodeneev V. 2021. Effect of chronic β -radiation on long-distance electrical signals in wheat and their role in adaptation to heat stress. *Environ. Exp. Bot.* **184**, 104378.
15. Zandalinas S.I., Mittler R., Balfagón D., Arbona V., Gómez-Cadenas A. 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol. Plant.* **162** (1), 2–12.
16. Sukhov V., Sukhova E., Vodeneev V. 2019. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **146**, 63–84.
17. Johns S., Hagihara T., Toyota M., Gilroy S. 2021. The fast and the furious: Rapid long-range signaling in plants. *Plant Physiol.* **185** (3), 694–706.
18. Ladeynova M., Kuznetsova D., Mudrilov M., Vodeneev V. 2023. Integration of electrical signals and phytohormones in the control of systemic response. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (1), 847.
19. Esch H., Miltenburgett H., Hug O. 1964. The influence of electrical potentials on algal cells by X-rays. *Biophys. J.* **1**, 380–388.
20. Vodeneev V., Akinchits E., Sukhov V. 2015. Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Plant Signal Behav.* **10** (9), e1057365.
21. Mudrilov M.A., Ladeynova M.M., Kuznetsova D.V., Vodeneev V.A. 2023. Ion channels in electrical signaling in higher plants. *Biochem. Moscow.* **88**, 1467–1487.
22. Mousavi S.A., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. 2013. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signaling. *Nature.* **500** (7463), 422–426.
23. Mangano S., Juarez S.P., Estevez J.M. 2016. ROS regulation of polar growth in plant cells. *Plant Physiol.* **171** (3), 1593–1605.
24. Demidchik V. 2018. ROS-activated ion channels in plants: Biophysical characteristics, physiological functions and molecular nature. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (4), 1263.
25. Meena M.K., Prajapati R., Krishna D., Divakaran K., Pandey Y., Reichelt M., Mathew M.K., Boland W., Mithöfer A., Vadasserya J. 2019. The Ca²⁺ channel CNGC19 regulates arabidopsis defense against spodoptera herbivory. *Plant Cell.* **31** (7), 153–1562.
26. Moe-Lange J., Gappel N.M., Machado M., Wudick M.M., Sies C., Schott-Verdugo S.N., Bonus M., Mishra S., Hartwig T., Bezruczyk M., Basu D., Farmer E.E., Gohlke H., Malkovskiy A., Haswell E.S., Lercher M.J., Ehrhardt D.W., Frommer W.B., Kleist T.J. 2021. Interdependence of a mechanosensitive anion channel and glutamate receptors in distal wound signaling. *Sci. Adv.* **7** (37), eabg4298.
27. Hedrich R. 2012. Ion channels in plants. *Physiol. Rev.* **92** (4), 1777–1811.
28. Saito S., Uozumi N. 2019. Guard cell membrane anion transport systems and their regulatory components: an elaborate mechanism controlling stress-induced stomatal closure. *Plants.* **8** (1), 9.
29. Cuin T.A., Dreyer I., Michard E. 2018. The role of potassium channels in *Arabidopsis thaliana* long distance electrical signalling: AKT2 modulates tissue

- excitability while GORK shapes action potentials. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (4), 926.
30. Choi W.G., Miller G., Wallace I., Harper J., Mittler R., Gilroy S. 2017. Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca^{2+} , ROS and electrical signals. *Plant J.* **90** (4), 698–707.
31. Kim D.S., Kim J.B., Goh E.I., Kim W.I., Kim S.H., Seob Y.W., Jang C.S., Kang S.Y. 2011. Antioxidant response of *Arabidopsis* plants to gamma irradiation: Genome-wide expression profiling of the ROS scavenging and signal transduction pathways. *J. Plant Physiol.* **168** (16), 1960–1971.
32. Qi W., Zhang L., Feng W., Xu H., Wang L., Jiao Z. 2015. ROS and ABA signaling are involved in the growth stimulation induced by low-dose gamma irradiation in *Arabidopsis* seedling. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175** (3), 1490–506.
33. Biermans G., Horemans N., Vanhoudt N., Vandenhove H., Saenen E., Hees M., Wannijn J., Vangronsveld J., Cuypers A. 2015. Biological effects of α -radiation exposure by ^{241}Am in *Arabidopsis thaliana* seedlings are determined both by dose rate and ^{241}Am distribution. *J. Environ. Radioact.* **149**, 51–63.
34. Sevriukova O., Kanapeckaitė A., Lapeikaite I., Kisnieriene V., Ladygiene R., Sakalauskas V. 2014. Charophyte electrogenesis as a biomarker for assessing the risk from low-dose ionizing radiation to a single plant cell. *J. Environ. Radioact.* **136**, 10–15.
35. Schmittgen T.D., Livak K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols.* **3** (6), 1101–1108.
36. Vandenhove H., Vanhoudt N., Cuypers A., Hees M., Wannijn J., Horemans N. 2010. Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways. *Plant Physiol. Biochem.* **48** (9), 778–786.
37. Kim S.H., Song M., Lee K.I., Hwang S.G., Jang C.S., Kim J.B., Kim S.H., Ha B.K., Kang S.Y., Kim D.S. 2012. Genome-wide transcriptome profiling of ROS scavenging and signal transduction pathways in rice (*Oryza sativa* L.) in response to different types of ionizing radiation. *Mol. Biol. Rep.* **39** (12), 11231–11248.
38. Goh E.J., Kim J.B., Kim W.J., Ha B.K., Kim S.H., Kang S.Y., Seo Y.W., Kim D.S. 2014. Physiological changes and anti-oxidative responses of *Arabidopsis* plants after acute and chronic γ -irradiation. *Radiat. Environ. Biophys.* **53** (4), 677–693.
39. Kang G., Yan D., Chen X., Yang L., Zeng R. 2021. HbWRKY82, a novel IIc WRKY transcription factor from *Hevea brasiliensis* associated with abiotic stress tolerance and leaf senescence in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* **171** (1), 151–160.
40. Garcia-Mata C., Wang J., Gajdanowicz P., Gonzalez W., Hills A., Donald N., Riedelsberger J., Amtmann A., Dreyer I., Blatt M.R. 2010. A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K^+ channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H_2O_2 . *J. Biol. Chem.* **285** (38), 29286–29294.
41. Adem G.D., Chen G., Shabala L., Chen Z.H., Shabala S. 2020. GORK Channel: A Master Switch of Plant Metabolism? *Trends Plant Sci.* **25** (5), 434–445.
42. Lacombe B., Pilot G., Gaymard F., Sentenac H., Thibaud J.B. 2000. pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. *FEBS Lett.* **466** (2–3), 351–354.
43. Grinberg M., Nemtsova Y., Ageyeva M., Brilkina A., Vodeneev V. 2023. Effect of low-dose ionizing radiation on spatiotemporal parameters of functional responses induced by electrical signals in tobacco plants. *Photosynth. Res.* **157** (2–3), 119–132.
44. Falhof J., Pedersen J.T., Fuglsand A.T., Palmgren M. 2016. Plasma membrane H^+ -ATPase regulation in the center of plant physiology. *Mol. Plant.* **9** (3), 323–337.
45. Röttinger E.M., Hug O. 1972. The effects of low energy X-rays on membrane potential, membrane resistance and action potential of *Nitella flexilis*. *Radiat. Res.* **50** (3), 491–503.
46. Marčiulionienė D., Lukšienė B., Montvydienė D., Sakalauskas V., Sevriukova O., Druteikienė R., Jefanova O., Žukauskaitė Z. 2017. Radiocesium phytotoxicity to single cell and higher plants. In: *Impact of cesium on plants and the environment*. Eds Gupta D.K., Walther C. Cham: Springer, p. 209–230.

Analysis of Molecular Mechanisms of Chronic Irradiation Effects on Electrical Signals in Wheat Plants

© 2024 г. П. А. Pirogova¹, Т. А. Zdobnova¹, А. V. Ivanova¹, М. А. Grinberg¹, V. А. Vodeneev^{1, *}
¹National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603022 Russia
*e-mail: v.vodeneev@mail.ru

The effect of ionizing radiation (IR) on plants is mainly realized by altering the status of signaling systems and modifying stress signals. Variation potential (VP) is one of the types of electrical signals in plants. IR contributes to an increase in the amplitude of the VP, but the mechanisms of such influence are practically unknown. A possible way to implement changes arising from the action of IR is the regulation of gene expression. In the present work, the changes in the gene expression of participants in the generation and propagation of VP in irradiated plants are investigated. The experiments were performed on 14–15-day-old soft wheat plants (*Triticum aestivum* L.) grown under chronic irradiation (source ⁹⁰Sr-⁹⁰Y) with a dose rate of 31.3 µGy/h. The maximum accumulated dose was about 11.3 mGy. The irradiated plants showed no changes in the expression of calcium (*TPCI*), anionic (*ALMT1* and *CLCI*), potassium (*AKT1*) channels, H⁺-ATPase (*HAI*), and NADPH oxidase (*RBOHs*) genes. A decrease in the expression of the SKOR potassium channel gene was revealed. The potassium channel blocker, tetraethylammonium chloride, caused an increase in response amplitude in control plants comparable to the increase in amplitude in the irradiated group. The obtained results indicate that one of the ways IR influences the electrical signals of plants is to inhibit the expression of the potassium channel.

Keywords: ionizing radiation, long-distance electrical signals, variation potential, potassium channels, SKOR, *Triticum aestivum*

УДК 617.713

НАРУШЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ПРИ КЕРАТОКОНУСЕ

© 2024 г. И. М. Кузеина^а, Л. Е. Каткова^б, Г. С. Батурина^{а, б}, И. Г. Пальчикова^{а, с},
И. А. Искаков^е, Е. И. Соленов^{а, б, д, *}

^аНовосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск,
630090 Россия

^бФедеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
РАН, Новосибирск, 630090 Россия

^сКонструкторско-технологический институт научного приборостроения СО РАН, Новосибирск,
630058 Россия

^дНовосибирский государственный технический университет, Новосибирск, 630087 Россия

^еНациональный медицинский исследовательский центр “Межотраслевой научно-технический
комплекс “Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова” Минздрава России, Новосибирский филиал,
Новосибирск, 630096 Россия

* e-mail: eugsol@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 12.12.2023

После доработки 15.01.2024

Принята к публикации 18.01.2024

В работе проведено исследование проницаемости для воды и мочевины плазматических мембран клеток эндотелия нормальной роговицы и роговицы с выраженной формой кератоконуса. Клетки эндотелия роговицы человека, получали из операционного материала. Определение осмотической водной проницаемости (P_f) клеток эндотелия в норме и при кератоконусе не выявило значительных различий этого показателя в обеих группах, где клетки имеют близкую по величине осмотическую водную проницаемость (контроль $P_f = 0.53 \pm 0.045$ см/с; кератоконус $P_f = 0.63 \pm 0.041$ см/с) ($n = 25$; $p \geq 0.05$). Коэффициенты проницаемости для мочевины в обеих группах также не имели статистически значимых различий (контроль $P_u = 0.049 \pm 0.003$ см/с; кератоконус $P_u = 0.056 \pm 0.003$ см/с) ($n = 25$; $p \geq 0.05$). Анализ динамики клеточного объема на основе экспоненциальной аппроксимации показал, что клетки эндотелия роговицы с кератоконусом снижают свой объем в гипертонической среде в большей степени по сравнению с клетками здоровой роговицы. Увеличение клеточного объема в результате изотонического входа мочевины в гипертонической среде также происходило до существенно более высоких значений по сравнению с нормальными клетками. Делается заключение о значительных изменениях в механизме регуляции объема клеток эндотелия роговицы при кератоконусе.

Ключевые слова: эндотелий роговицы, кератоконус, транспорт мочевины, водная проницаемость

DOI: 10.31857/S0233475524030042, **EDN:** csqpnk

ВВЕДЕНИЕ

Кератоконус – болезнь, связанная с ухудшением зрения в результате развития неправильно-го астигматизма, вызываемого прогрессивным истончением и деформацией роговицы. В зависимости от региона болезнь может появляться с частотой от 1.5 до 25 случаев на 100 000 человек в год в возрасте около 20 лет у обоих полов и прогрессировать в более позднем возрасте. В настоящее время умеренные проявления кератоконуса компенсируют с помощью очков и контактных линз, а в более выраженных случаях применяют

хирургическое лечение. Результаты исследований изменений роговицы, возникающих при кератоконусе, носят противоречивый характер, отклонения от нормы описаны в эпителии, боуменовой мембране и строме, а в десцеметовой мембране и эндотелии нарушения наблюдают значительно реже [1]. Гистопатологические исследования показали, что болезнь затрагивает все слои роговицы. В эпителии роговицы при кератоконусе происходят дегенеративные процессы. Клетки увеличиваются в размерах, теряют нормальную форму, плотность базального слоя клеток эпителия снижается [2, 3].

Значительные изменения, происходящие в строме и влияющие на оптические свойства роговицы, не затрагивают размер клеток эндотелия и, по-видимому, могут быть связаны с изменениями во внутриклеточных механизмах [4–6]. Вопрос об изменении количества клеток эндотелия при кератоконусе остается дискуссионным: в работах одних исследователей этот параметр оставался неизменным [7–9], другие авторы отмечали снижение этого показателя [10–12]. Изучение экспрессии белков роговицы выявило, что болезнь оказывает влияние на экспрессию более 100 белков, на содержание коллагена в строме, на процессы апоптоза и некроза кератоцитов [13–15]. Плотность коллагеновых фибрилл стромы и содержание протеогликанов в матриксе, отмечаемые при кератоконусе, зависят от осмотического равновесия роговицы. Так, в случаях нарушения целостности монослоя эндотелия происходит гипергидратация матрикса – гидропс роговицы (corneal hydrops), который требует хирургического лечения [16, 17]. Высказывают предположение, что нарушения фибриллярной структуры стромы могут быть связаны с наблюдаемыми изменениями градиента осмотического давления, что указывает на повреждение в механизме регуляции осмотического равновесия матрикса [18]. Известно, что в регуляции осмотического баланса стромы роговицы определяющая роль принадлежит транспортной функции клеток эндотелия, которую часто описывают в терминах модели “насос-утечка” (pump-leak) [19]. Насосная функция клеток эндотелия определяется интенсивностью процессов активного транспорта и проницаемостью плазматической мембраны для воды и осмолитов. При этом поток ионов и воды через мембрану этих клеток, необходимый для поддержания осмотического баланса матрикса роговицы, не должен нарушать собственный водно-электролитный гомеостаз клетки, определяющий постоянство ее объема. Поддержание клеточного объема у теплокровных животных осуществляется исключительно регуляцией потоков через плазматическую мембрану неорганических ионов и низкомолекулярных органических осмолитов [20–22]. Органические осмолиты условно разделяют на совместимые, которые минимально влияют на функционирование молекулярных механизмов клетки, и такие как мочевины, которые способны влиять на конформацию функциональных макромолекул, влиять на функции ферментов и приводить к дезадаптации клеток [21, 23]. Роль транспорта мочевины в функционировании клеток эндотелия роговицы может быть значительна, поскольку есть данные о связи экспрессии генов семейства SLC (SLC4A11, SLC14A1) с нарушениями

зрения. Показано, что в клетках эндотелия роговицы интенсивно экспрессируется ген SLC14A1, который кодирует транспортер мочевины UT-A [24]. Изучение транспортеров мочевины и их функции осложняется тем, что в результате альтернативного сплайсинга в клетке может существовать множество изоформ этих белков [25, 26]. Изучение общего транспорта мочевины, осуществляемого не только изоформами UT-A, но и менее изученными транспортерами, представляется необходимым для понимания роли этого осмолита в регуляторной функции клеток эндотелия роговицы.

В настоящей работе мы поставили задачу исследовать транспорт мочевины в клетках эндотелия методом, который независим от того, какие изоформы транспортера UT-A экспрессируются в этих клетках, включая транспорт другими путями. Мы провели сравнительное исследование проницаемости для воды и мочевины плазматических мембран клеток эндотелия нормальной роговицы и роговицы с выраженной формой кератоконуса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на клетках эндотелия роговицы человека, полученных из роговичных дисков, иссеченных у пациентов с кератоконусом в ходе сквозной кератопластики.

Препарат переживающих клеток. Эндотелий наносили на покровное стекло, покрытое полилизинном методом отпечатка. С этой целью фрагмент роговицы инкубировали в растворе 1 мг/мл коллагеназы (Sigma, США) в PBS (138 мМ NaCl, 4.7 мМ Na₂HPO₄, 2.7 мМ KCl, 1.5 мМ KH₂PO₄, 0.5 мМ MgCl₂, 5.5 мМ глюкоза, 1.0 мМ CaCl₂) при 37°C 30 мин, затем методом отпечатка переносили клетки эндотелия на покровное стекло, покрытое 0.1% (w/v) раствором полилизина (Sigma) в воде. Стекло с клетками эндотелия, ориентированными базолатеральной поверхностью в сторону омывающей среды, помещали в проточную камеру микроскопа. Затем загружали клетки Calcein AM (10⁻⁵М, 20 мин, 37°C). Изменения клеточного объема определяли с помощью метода, основанного на эффекте гашения флуоресцентного красителя Calcein белками цитоплазмы [27, 28]. Для определения водной проницаемости клетки уравнивали в нормотонической среде с осмотической концентрацией 280 мОсм/кг H₂O и записывали профиль флуоресценции, отражающий снижение объема при быстрой (<100 мс) смене среды на гипертоническую (560 мОсм/кг H₂O). Гипертоническую среду создавали маннитолом (280 мМ, Sigma). Водную проницаемость рассчитывали исходя из уравнения потока [29]. Площадь поверхности,

через которую идет поток, мы принимали равной площади изображения клетки, учитывая, что клетки лежат на стекле и только открытая часть их поверхности доступна для обмена.

$$dV/dt = -S V_w P_f \text{grad}\Phi,$$

где P_f – коэффициент осмотической проницаемости (см/с), S – площадь поверхности, V_w – молярный объем воды, Φ – осмотическое давление.

Флуоресцентный профиль (F) аппроксимировали функцией $y = y_0 + Ae^{(-t/\tau)}$. С учетом того, что, как нами показано ранее, $V/V_0 = F/F_0$ [22], где V_0 – начальный объем клетки, а F_0 – начальный уровень флуоресцентного сигнала.

P_f – коэффициент осмотической проницаемости рассчитывали исходя из соотношения:

$$dV/dt = V_0 Kr = P_f S V_w \Delta C, \\ P_f = V_0 Kr / (S V_w \Delta C),$$

где Kr – коэффициент линейной регрессии начального участка профиля относительной флуоресценции (F/F_0), ΔC – разность осмотических концентраций (Осм/кг H_2O) на плазматической мембране клетки.

Коэффициент проницаемости для мочевины определяли, анализируя кинетику увеличения объема клетки в гипертонической среде при изотоническом входе мочевины. Увеличение клеточного объема в такой системе приближенно можно описать уравнением:

$$V/V_0 \approx 1 + C_u / \Pi_{out} \approx 1 + [(SP_u \Delta C) / (V_0 \Pi_{out})] t;$$

тогда

$$\Delta C = C_{out} - C_u; \\ (V/V_0 - 1) / t \Rightarrow (F/F_0) / t = Kr_u; \\ P_u \approx Kr_u (V_0 \Pi_{out}) / (S C_{out}),$$

где: Kr_u – коэффициент регрессии объема клетки в присутствии мочевины. C_u – концентрация мочевины в клетке. C_{out} – концентрация мочевины в среде. Π_{out} – осмотическая концентрация среды. V_0 – начальный объем клетки. P_u – коэффициент проницаемости для мочевины.

Протокол эксперимента. Клетки уравнивали в среде PBS (280 мОсм/кг H_2O), меняли среду на PBS+маннитол (560 мОсм/кг H_2O) и уравнивали клетки в этой гипертонической среде, изотонически меняли среду на PBS+мочевина (560 мОсм/кг H_2O), записывали возрастание флуоресценции в течение 20–30 с, возвращали в среду PBS (280 мОсм/кг H_2O) (рис. 1).

Микроскопия. Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом Observer-Z1 (объектив Fluor 25×/0.8 M27, Zeiss, Германия). Конструкция проточной камеры описана нами ранее [29]. Объем камеры составлял ~50 мкл, скорость протекания раствора 25 мл/мин, поддерживаемая температура $36.8 \pm 0.2^\circ C$. Флуоресцентные сигналы клеток записывали с помощью фотосенсора Hamamtsu H7827, используя набор фильтров и дихроическое зеркало #009 (Zeiss, Германия).

Статистический анализ. Анализ профилей флуоресценции проводили с помощью пакета Origin 5.0. Статистические расчеты производили с использованием пакета программ Statistica 6.0 для Windows. Полученные данные были проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты представлены как $M \pm SEM$. Результаты считали значимыми при $p < 0.05$. Проверку нормальности распределения проводили в тесте Shapiro–Wilk в программе Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 приведены усредненные профили флуоресценции красителя Calcein с применением экспоненциальной аппроксимации, отражающие изменения клеточного объема эндотелиоцитов роговицы в гипертонической среде. Анализ профилей показал, что клетки роговицы с кератоконусом снижают объем до более низких значений по сравнению с клетками здоровой роговицы. Очевидно осмотическое равновесие эндотелиоцитов роговицы с патологией достигается при меньшем клеточном объеме по сравнению с нормой.

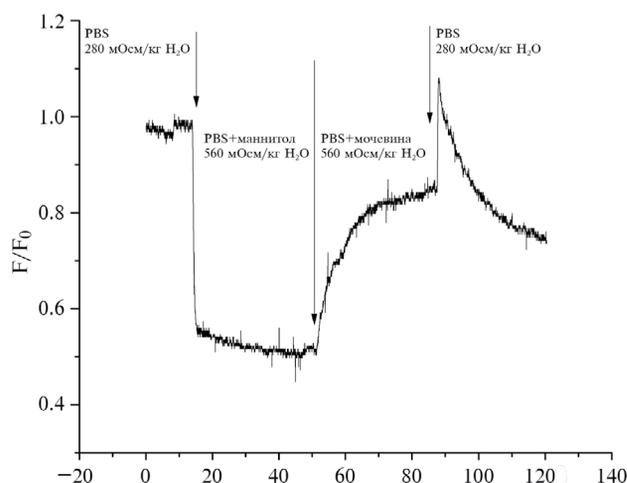


Рис. 1. Схема эксперимента. По оси ординат – относительная флуоресценция (F/F_0).

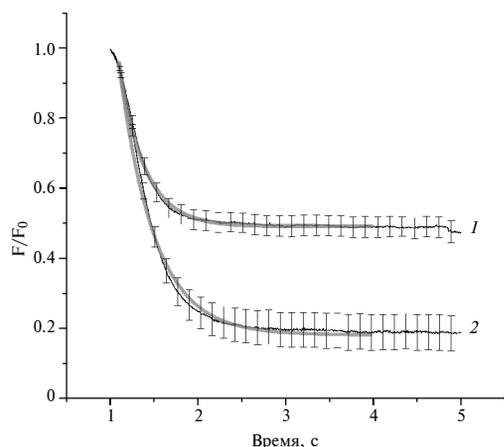


Рис. 2. Усредненные профили динамики относительной флуоресценции красителя Calcein в гипертонической среде, отражающие изменения объема клеток эндотелия роговицы. 1 – Контроль ($n = 25$); 2 – кератоконус ($n = 21$). Линией серого цвета приведена экспоненциальная аппроксимация профилей ($y = y_0 + Ae^{(-t/\tau)}$).

Анализ экспоненциальной аппроксимации профилей динамики клеточного объема показал, что клетки нормального эндотелия достигают осмотического равновесия в гипертонической среде быстрее (характерное время (τ) контроль $0.29 \pm \pm 0.004$; кератоконус 0.38 ± 0.005 с, $p < 0.0001$ ($n = 25$, $t = 14$)) и при меньшем снижении объема (параметр “амплитуда” контроль 0.57 ± 0.004 ; кератоконус 0.92 ± 0.006 , $p < 0.0001$ ($n = 25$, $t = 48$) (F/F_0)). При кератоконусе более выраженное снижение объема в таких условиях отражает, по-видимому, меньшее содержание осмолитов в клетках эндотелия, что может быть связано с вызванными патологией нарушениями в механизме регуляции клеточного объема.

Графики линейной аппроксимации начальных участков усредненных профилей снижения клеточного объема в гипертонической среде приведены на рис. 3. Сравнение величин осмотической водной проницаемости (P_f) клеток эндотелия в норме и при кератоконусе, рассчитанных с учетом коэффициентов регрессии начальных участков профилей флуоресценции, не выявило достоверных различий этого показателя (контроль $P_f = 0.53 \pm \pm 0.045$ см/с; кератоконус $P_f = 0.63 \pm \pm 0.041$ см/с) ($n = 25$; $p \geq 0.05$).

Проницаемость плазматической мембраны эндотелиальных клеток роговицы для мочевины изучали в экспериментах с регистрацией изменений клеточного объема, который увеличивался в результате входа в клетку мочевины в соответствии с ее градиентом концентрации при отсутствии градиента осмотического давления. Согласно

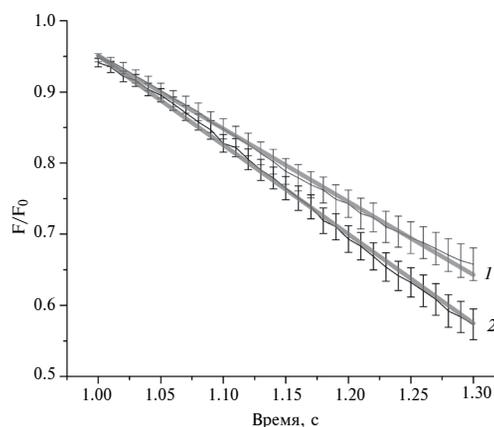


Рис. 3. Начальные участки усредненных профилей динамики относительной флуоресценции красителя Calcein в гипертонической среде, отражающие снижение объема клеток эндотелия роговицы. 1 – Контроль ($n = 25$); 2 – кератоконус ($n = 21$). Линией серого цвета приведена линейная аппроксимация профилей.

полученным результатам при этих условиях в клетках роговицы с патологией кератоконуса объем возрастал до значительно более высоких значений по сравнению с контролем (рис. 4).

На основе экспоненциальной аппроксимации профилей изотонического изменения клеточного объема в гипертонической среде мочевины (рис. 4) были определены значения амплитуды и характерного времени (τ), что выявило различие динамики объема клеток эндотелия контрольных образцов и роговицы с кератоконусом. По сравнению с контрольными образцами клетки эндотелия роговицы с кератоконусом увеличивали объем дольше (характерное время (τ) контроль 4.27 ± 0.024 с; кератоконус 8.45 ± 0.033 с, $p < 0.0001$ ($n = 25$, $t = 102$)) и до больших значений (“амплитуда” контроль 0.31 ± 0.0006 ; кератоконус 0.67 ± 0.001 , $p < 0.0001$ ($n = 25$, $t = 308$) (F/F_0)).

Более выраженное увеличение объема клеток роговицы с кератоконусом в гипертонической мочеvine позволяет предположить, что этот эффект также обусловлен нарушениями в механизме регуляции клеточного объема. Значения коэффициентов проницаемости для мочевины (P_u) в обеих группах не имели между собой статистически значимых различий (контроль $P_u = 0.049 \pm 0.003$ см/с; кератоконус $P_u = 0.056 \pm 0.003$ см/с) ($n = 25$; $p \geq 0.05$), как следует из графиков линейной аппроксимации начальных участков профилей изотонического увеличения объема клеток эндотелия роговицы в гипертонической среде мочевины, приведенных на рис. 5.

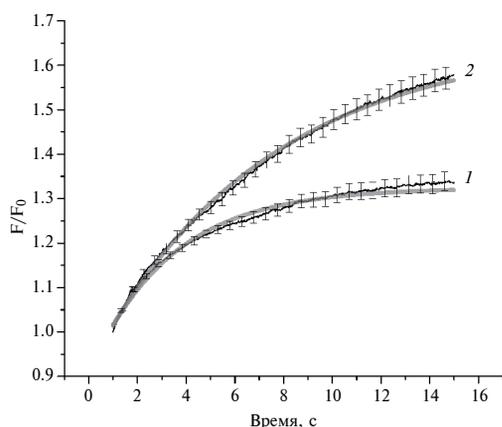


Рис. 4. Усредненные профили динамики относительной флуоресценции красителя Calcein в гипертонической среде мочевины, отражающие изотоническое увеличение объема клеток эндотелия роговицы. 1 – Контроль ($n = 26$); 2 – кератоконус ($n = 20$). Линией серого цвета приведена экспоненциальная аппроксимация профилей ($y = y_0 + Ae^{(-t/\tau)}$).

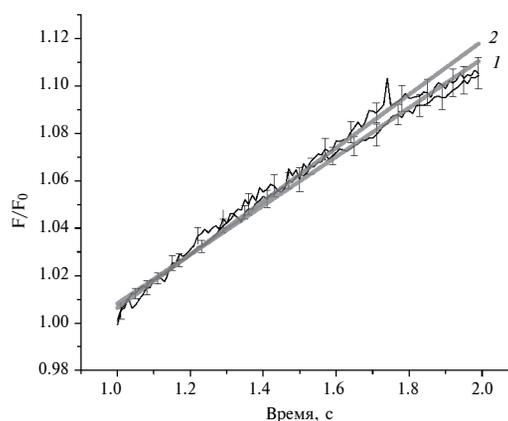


Рис. 5. Начальные участки усредненных профилей динамики относительной флуоресценции красителя Calcein, отражающие повышение объема клеток эндотелия роговицы в гипертонической среде мочевины. 1 – Контроль ($n = 26$); 2 – кератоконус ($n = 20$). Линией серого цвета приведена линейная аппроксимация профилей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прозрачность матрикса роговицы обусловлена упорядоченной структурой коллагеновых волокон, расстояния между которыми определяются наличием протеогликанов и степенью гидратации матрикса, что нарушается при кератоконусе [4]. Согласно принятой модели механизма регуляции осмотического баланса матрикса роговицы “насос-утечка”, степень гидратации матрикса определяется соотношением потоков ионов и воды, обусловленных активным транспортом, и потоков, движущей силой которых является градиент осмотического давления. Наши наблюдения указывают на возможные нарушения насосной функции клеток эндотелия. Поток воды и ионов, определяющих осмотическое давление среды в матриксе роговицы, зависит от активности ионных насосов клетки и водной проницаемости ее плазматической мембраны. Потоки воды и ионов, проходящих через клетку эндотелия, не только определяют осмотическую концентрацию матрикса, но и представляют собой риск для осмотического баланса собственно клетки. Способность регулировать свой осмотический гомеостаз, что эквивалентно регуляции объема клетки, является ее жизненно важной функцией.

Постоянство клеточного объема поддерживается главным образом за счет регуляции содержания в клетке низкомолекулярных органических осмолитов [22]. Таким образом, увеличение амплитуды снижения относительной флуоресценции Calcein

в клетках эндотелия в гипертонической среде, что соответствует снижению объема этих клеток, может означать меньшее по сравнению с нормой содержание низкомолекулярных органических осмолитов при кератоконусе. Такое заключение можно сделать и на основании результатов по увеличению объема клеток эндотелия в гипертонической среде, создаваемой маннитолом, при изотонической замене маннитола на мочевины. Профили флуоресценции, наблюдаемые в наших экспериментах, также указывают на значительные изменения в механизме регуляции объема этих клеток при кератоконусе. Следует отметить, что предполагаемые сдвиги регуляции клеточного объема происходят без значительных изменений проницаемости плазматической мембраны клеток как для воды, так и для мочевины. Поскольку объем клетки в состоянии осмотического равновесия в значительной мере определяется содержанием в клетке органических осмотически активных молекул, изменения, обнаруживаемые в регуляции объема клеток эндотелия роговицы в состоянии кератоконуса, связаны, вероятно, с изменениями их метаболизма и, возможно, состава. Исследование состава и метаболизма органических осмолитов в клетках эндотелия роговицы, находящейся в состоянии кератоконуса, возможно, является необходимым этапом изучения механизма этого заболевания. В этой связи, полученные нами высокие показатели проницаемости для мочевины в клетках эндотелия также ставят вопрос о возможной связи уровня мочевины в крови с патологическими изменениями в этих клетках, поскольку,

в отличие от клеток почки, эндотелий роговицы не функционирует в условиях высокой концентрации мочевины и ее градиента. Клетки почечного эпителия, резистентные к потокам мочевины, возможно, обладают защитным механизмом от денатурирующего действия мочевины. Насколько развит защитный механизм у клеток эндотелия роговицы, в настоящее время не ясно, но то, что проницаемость этих клеток для мочевины высока, делает исследование такого механизма актуальным. Вопрос о влиянии интенсивности потока мочевины через клетки эндотелия роговицы на функционирование этих клеток в настоящее время не решен и требует специального исследования. Величины осмотической проницаемости плазматической мембраны клеток эндотелия роговицы человека для воды, полученные в нашем исследовании, больше, чем полученные для клеток у крыс как эндотелия роговицы ($P_f = 0.029-0.035$ см/с) [29], так и главных клеток собирательных трубок эпителия почки ($P_f = 0.024-0.012$ см/с), как показано нами ранее [29, 30]. Можно предположить, что более высокие значения водной проницаемости у клеток эндотелия роговицы человека по сравнению с крысой могут означать и более эффективный транспорт, а также то, что функции этих клеток по эффективности транспорта могут быть сравнимы с клетками эпителия почки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование не выявило различий проницаемости плазматической мембраны клеток эндотелия роговицы для воды и мочевины в норме и при кератоконусе. Анализ динамики клеточного объема в условиях осмотического шока показал, что клетки эндотелия роговицы с кератоконусом изменяют свой объем в значительно более выраженной степени по сравнению с клетками эндотелия здоровой роговицы. Увеличение клеточного объема в результате изотонического входа мочевины в гипертонической среде также происходило до значительно более высоких значений по сравнению с нормальными клетками. Значительные изменения в механизме регуляции объема клеток эндотелия роговицы при кератоконусе, возможно, связаны с нарушениями в метаболизме органических осмолитов этих клеток при патологии.

Вклад авторов. Идея работы и планирование эксперимента (Е.И. Соленов, И.А. Исаков), сбор данных (Г.С. Батурина, Л.Е. Каткова, И.М. Кузеина, Е.И. Соленов), обработка данных и написание манускрипта (Г.С. Батурина, Л.Е. Каткова, И.М. Кузеина, Е.И. Соленов), обсуждение и редактирование манускрипта (Г.С. Батурина,

Л.Е. Каткова, Е.И. Соленов, И.Г. Пальчикова, И.А. Исаков).

Финансирование. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0019.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека”, Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323 ФЗ “Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации”, а также требованиями Федерального закона от 27.07.2006 № 152-ФЗ (ред. от 21.07.2014) “О персональных данных” (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.09.2015). Забор материала осуществляли сотрудники Новосибирского филиала ФГАУ НМИЦ “МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова” Минздрава России. На проведение исследования получено разрешение Биоэтического комитета Новосибирского филиала ФГАУ НМИЦ “МНТК “Микрохирургия глаза”. Все пациенты дали письменное информированное согласие на исследование биологического материала и использование полученных данных в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Santodomingo-Rubido J., Carracedo G., Suzaki A., Villa-Collar C., Vincen S.J., Wolffsohn J.S. 2022. Keratoconus: An updated review. *Cont. Lens Anterior Eye*. **45**(3), 101559.
2. Scroggs M.W., Proia A.D. 1992. Histopathological variation in keratoconus. *Cornea* **11** (6), 553–559.
3. Bitirgen G., Ozkagnici A., Bozkurt B., Malik R.A. 2015. *In vivo* corneal confocal microscopic analysis in patients with keratoconus. *Int. J. Ophthalmol.* **8**, 534–539.
4. Khaled M.L., Helwa I., Drewry M., Seremwe M., Estes A., Liu Y. 2017. Molecular and histopathological changes associated with keratoconus. *Biomed. Res. Int.* **2017**, 7803029.
5. Rabinowitz Y.S. 1998. Keratoconus. *Surv. Ophthalmol.* **42**, 297–319.
6. Ghosh S., Mutalib H.A., Kaur S., Ghoshal R., Retnasabapathy S. 2017. Corneal cell morphology in keratoconus: A confocal microscopic observation. *Malays J. Med. Sci.* **24** (2), 44–54.
7. Weed K.H., MacEwen C.J., Cox A., McGhee C.N.J. 2007. Quantitative analysis of corneal microstructure in keratoconus utilising *in vivo* confocal microscopy. *Eye*. **21** (5), 614–623.

8. Efron N., Hollingsworth J.G. 2008. New perspectives on keratoconus as revealed by corneal confocal microscopy. *Clin. Exp. Optom.* **91** (1), 34–55.
9. El-Agha M.S.H., Sayed Y.M.E., Harhara R.M., Essam H.M. 2014. Correlation of corneal endothelial changes with different stages of keratoconus. *Cornea.* **33** (7), 707–711.
10. Marianne O.P., Jodhbir S.M., Ula V.J., Francis W.P. 2021. Corneal endothelial dysfunction: Evolving understanding and treatment options. *Progr. Retinal Eye Res.* **82**, 100904.
11. Fernandes B.F., Logan P., Zajdenweber M.E., Santos L.N., Cheema D.P., Burnier M.N. 2008. Histopathological study of 49 cases of keratoconus. *Pathology.* **40** (6), 623–626.
12. Mocan M.C., Yilmaz P.T., Irkeç M., Orhan M. 2008. *In vivo* confocal microscopy for the evaluation of corneal microstructure in keratoconus. *Curr. Eye Res.* **33** (11), 933–939.
13. Loukovitis E., Kozeis N., Gatziofias Z., Kozei A., Tsoitridou E., Stoila M., Koronis S., Sfakianakis K., Tranos P., Balidis M., Zachariadis Z., Mikropoulos D.G., Anogeianakis G., Katsanos A., Konstas A.G. 2019. The proteins of keratoconus: A literature review exploring their contribution to the pathophysiology of the disease. *Adv. Ther.* **36** (9), 2205–2222.
14. Yam G.H.F., Fuest M., Zhou L., Liu Y.C., Deng L., Chan A.S., Ong H.S., Khor W.B., Ang M., Mehta J.S. 2019. Differential epithelial and stromal protein profiles in cone and non-cone regions of keratoconus corneas. *Sci. Rep.* **9** (1), 2965
15. Srivastava O.P., Chandrasekaran D., Pfister R.R. 2006. Molecular changes in selected epithelial proteins in human keratoconus corneas compared to normal corneas. *Mol. Vis.* **12**, 1615–1625.
16. Fan Gaskin J.C., Patel D.V., McGhee C.N.J. 2014. Acute corneal hydrops in keratoconus – new perspectives. *Am.J. Ophthalmol.* **157** (5), 921–928.
17. Yahia Chérif H., Gueudry J., Afriat M., Delcampe A., Attal P., Gross H., Muraine M. 2015. Efficacy and safety of pre-Descemet's membrane sutures for the management of acute corneal hydrops in keratoconus. *Br.J. Ophthalmol.* **99** (6), 773–777.
18. Mathew J.H., Goosey J.D., Söderberg P.G., Bergman J.P.G. 2015. Lamellar changes in the keratoconic cornea. *Acta Ophthalmol.* **93** (8), 767–773.
19. Bonanno J.A. 2012. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp. Eye Res.* **95** (1), 2–7.
20. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**, 247–306.
21. O'Neill W.C. 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am.J. Physiol. Cell Physiol.* **276**, C995–C1011.
22. Strange K. 2004. Cellular volume homeostasis. *Adv. Physiol. Educ.* **28** (1–4), 155–159.
23. Gulotta M., Qiu L., Desamero R., Rösger J., Bollen D.W., Callender R. 2007. Effects of cell volume regulating osmolytes on glycerol 3-phosphate binding to triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* **46** (35), 10055–10062.
24. Alvarez B.V., Piché M., Aizouki C., Rahman F., Derry J.M.J., Brunette I., Casey J.R. 2021. Altered gene expression in slc4a11^{-/-} mouse cornea highlights SLC4A11 roles. *Sci. Rep.* **11** (1), 20885. doi 10.1038/s41598-021-98921-w.
25. Nakayama Y., Naruse M., Karakashian A., Peng T., Sands J.M., Bagnasco S.M. 2001. Cloning of the rat Slc14a2 gene and genomic organization of the UT-A urea transporter. *Biochim. Biophys. Acta.* **1518** (1–2), 19–26
26. Bagnasco S.M., Peng T., Janech M.G., Karakashian A., Sands J.M. 2001. Cloning and characterization of the human urea transporter UT-A1 and mapping of the human Slc14a2 gene. *Am.J. Physiol. Renal Physiol.* **281** (3), F400–6.
27. Solenov E., Watanabe H., Manley G.T., Verkman A.S. 2004. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am.J. Physiol. Cell Physiol.* **286** (2), 426–432.
28. Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Колосова Н.Г., Соленов Е.И. 2017. Изменение транспорта воды клетками эндотелия роговицы у крыс при старении. *Успехи геронтол.* **30** (5), 659–664.
29. Zarogiannis S.G., Ilyaskin A.V., Baturina G.S., Katkova L.E., Medvedev D.A., Karpov D.I., Ershov A.P., Solenov E.I. 2013. Regulatory volume decrease of rat kidney principal cells after successive hypo-osmotic shocks. *Math. Biosci.* **244** (2), 176–187.
30. Solenov E.I., Baturina G.S., Ilyaskin A.V., Katkova L.Y., Ivanova L.N. 2011. Cell volume regulation of rat kidney collecting duct epithelial cells in hypotonic medium. *Dokl. Biol. Sci.* **436**, 13–55.

Cell Volume Regulation of Endothelial Cells Is Impaired in Keratoconus Cornea

© 2024 г. I. M. Kuseina¹, L. E. Katkova², G. S. Baturina^{1, 2}, I. G. Palchikova^{1, 3}, I. A. Iskakov⁵, E. I. Solenov^{1, 2, 4, *}

¹Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

²Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

³Tecnological Design Institute of Scientific Instrument Engineering of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630058 Russia

⁴Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, 630087 Russia

⁵Fedorov Eye Microsurgery Clinic (Novosibirsk Department), Novosibirsk, 630096 Russia

*e-mail: eugsol@bionet.nsc.ru

In this work the permeability to water and urea of plasma membranes of endothelial cells of normal corneas and corneas with keratoconus was investigated. The endothelial cells were obtained from surgery material. Measurements of osmotic aqueous permeability (P_f) of endothelial cells in normal and in keratoconus did not reveal significant differences of this parameter in the two studied groups. The control cells and the cells from keratoconus cornea have similar osmotic water permeability (control cells, $P_f = 0.53 \pm 0.045$ cm/s; keratoconus cells, $P_f = 0.63 \pm 0.041$ cm/s; $n = 25$; $p \geq 0.05$). Neither coefficient of urea permeability differed significantly in these groups (control, $P_u = 0.049 \pm 0.003$ cm/s; keratoconus, $P_u = 0.056 \pm 0.003$ cm/s; $n = 25$; $p \geq 0.05$). Analysis of cell volume dynamics based on exponential approximation showed a more pronounced decrease of the cell volume of endothelial cells from keratoconus cornea in hypertonic medium in comparison with the cells from normal cornea. The increase of cell volume caused by isotonic entering of urea into the cells in hypertonic medium also was more pronounced in these cells in comparison with the normal ones. We conclude that there are significant changes in cell volume regulating mechanism in keratoconus cornea endothelial cells.

Keywords: corneal endothelium, keratoconus, urea transport, water permeability.

УДК 576.38

ИЗМЕНЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ГИСТОНОВОГО КОДА ПРИ ИНИЦИИИ ПАРАПТОЗОПОДОБНОЙ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК HEp-2 ОКИСЛЕННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ДИСУЛЬФИРАМА

© 2024 г. М. Е. Соловьева^{а, *}, Ю. В. Шаталин^а, В. С. Акатов^а

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

*e-mail: m_solvieva@iteb.ru

Поступила в редакцию 11.11.2023

После доработки 11.01.2024

Принята к публикации 24.01.2024

Дисульфирам (ДСФ) и его окисленные производные (ДСФокси) рассматриваются в качестве возможных противоопухолевых средств. Ранее нами было установлено, что ДСФокси инициируют параптозоподобную гибель опухолевых клеток, что представляет потенциальный интерес для лечения опухолей, устойчивых к инициации апоптоза. На основе биоинформатического анализа масс-спектрометрических данных убиквитинирования белков нами было сформулировано представление о важной роли нарушения ретроградного транспорта поврежденных белков из эндоплазматического ретикулума в цитозоль в механизме инициации параптозоподобной гибели клеток. В настоящей работе обнаружено, что ДСФокси в процессе инициации параптозоподобной гибели клеток аденокарциномы человека HEp-2 также усиливают убиквитинирование гистонов и ферментов гистоновой системы. В частности, это относится к убиквитинированию гистона H2BC12, гистон-метилтрансфераз, отвечающих за транскрипцию и репарацию поврежденных участков ДНК, а также ацетилирующих и убиквитин-конъюгирующих белков. Биоинформатический анализ изменений убиквитинирования белков клеточного ядра с использованием базы данных STRING выявил в ходе этого процесса увеличение встречаемости убиквитинированных белков (функциональное обогащение) регуляции клеточного цикла, ответа клетки на повреждение ДНК и репарации ДНК, регулирование которых также зависит от гистоновой системы. Это непосредственно указывает на повреждение ядра клетки и согласуется с данными конфокальной микроскопии. Полученные результаты свидетельствуют, что при инициации параптозоподобной гибели клеток посредством ДСФокси наряду с нарушением ретроградного транспорта и стрессом эндоплазматического ретикулума происходит также изменение регуляции гистоновой системы, что указывает на плеiotропный характер механизма инициации этой гибели клеток.

Ключевые слова: гистоновый код, гистоны, убиквитинирование гистонов, метилирование гистонов, параптоз, дисульфирам

DOI: 10.31857/S0233475524030052, **EDN:** csfgqn

ВВЕДЕНИЕ

Среди белков клеточного ядра основную часть (по массе) составляют гистоны. Их роль в упаковке хроматина и регуляции связанных с ним процессов общеизвестна. Генетический код данных белков очень консервативен и различается у организмов разной таксономии всего лишь на несколько аминокислот (классический пример — горох и бык, последовательность для гистона H4 различается по двум аминокислотам). В последнее время большое внимание уделяется представлению о гистоновом коде, которое состоит в том,

что хроматин-ДНК-взаимодействия и вовлечение ДНК в различные внутриклеточные процессы управляются комбинациями посттрансляционных модификаций (ПТМ) гистонов, такими как деметилирование лизина и аргинина, деацетилирование и деубиквитинирование лизина, фосфорилирование серина, а также сумоилирование, поли-ADP-рибозилирование и другими [1–6]. Данные модификации гистонов меняют их заряд, гидрофобность, сродство к определенным молекулам, силу взаимодействия с ДНК, время существования и многие другие свойства, но не затрагивают генетическую информацию, зашифрованную в ДНК,

т.е. гистоновый код является эпигенетическим. Этот код позволяет узнающим белкам связываться с поверхностью гистонов и осуществлять регуляцию репликации, транскрипции, трансляции и репарации ДНК, организации и ремоделирования хроматина. Осуществление этой регуляции зависит от набора ПТМ модификаций и белков-регуляторов. Нарушения гистонного кода выявлены при ряде заболеваний, включая аутизм, шизофрению и другие расстройства [1, 5–7]. Предполагается, что изменения гистонного кода, дисбаланс между процессами его модификаций являются одним из этапов канцерогенеза [1, 2, 8].

Ранее мы обнаружили, что в процессе инициации параптозоподобной клеточной гибели (параптоза) окисленными производными дисульфирама (ДСФокси) происходит усиление убиквитинирования белков клетки [9]. В осуществляемой в настоящее время программе расширения области применения известных препаратов дитиокарбаматы (ДСФ и его производные) были выделены как перспективные лекарственные средства для нескольких направлений, например, психиатрии, противовоспалительной, противопаразитарной, противовирусной и противоопухолевой терапии [10–18]. Изучение неапоптотических видов программируемой клеточной гибели, стимулируемое приобретением лекарственной устойчивости к апоптоз-индуцирующим агентам, в настоящее время активно ведется, и в этой связи ДСФ также привлекает интерес [19]. Такие свойства ДСФ, как влияние на убиквитин-протеасомную систему (УПС) клетки – на убиквитинирование лигазы E3 и ингибирование 26S протеасомы [20–24] – позволяют уточнить механизмы этих процессов [25]. Мы установили тесную связь параптозоподобной гибели, индуцированной ДСФокси, с увеличением общего количества полиубиквитинированных белков и убиквитинированием многих регуляторов клеточных функций. В частности, было обнаружено убиквитинирование, ведущее к протеасомной деградации ряда белков, участвующих в работе УПС клетки. К числу этих белков относятся многие E3-убиквитинлигазы и деубиквитиназы, а также белки эндоплазматического ретикулума (ЭПР). На основании этих данных была сформулирована гипотеза о ключевой роли ингибирования процессов ретроградного транспорта поврежденных белков из ЭПР в цитозоль в инициации стресса ЭПР и параптоза. Однако наряду с выявленными нарушениями ЭПР мы также обнаружили указания на изменения клеточного ядра в процессе инициации гибели клеток. В связи с этим в данной работе была поставлена цель оценить изменения регуляции гистонного кода при запуске

параптоза. Для этого мы исследовали изменение состава убиквитинированных (Ub) белков, регулирующих гистоновый код, и биологические процессы, протекающие с их участием, при запуске параптозоподобной гибели клеток HEp-2 под действием оксипроизводных ДСФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы эмбриональная телячья сыворотка (Gibco, США), краситель Hoechst 33342 (Molecular Probes Inc., США), диэтилдитиокарбамат (DDC, MP Biomedicals, США). Все остальные реактивы были получены из фирмы Sigma (США).

Клетки аденокарциномы человека HEp-2 (Российская коллекция клеточных культур, г. С.-Петербург) выращивали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2.2 г/л бикарбоната натрия, 80 мкг/мл гентамицина при 37°C. Для открепления клеток от поверхности флакона использовали 0.25% раствор трипсина.

Для анализа убиквитома клетки культивировали в культуральных флаконах T25 (SPL Life Science, Korea) в стандартных условиях (37°C, pH 7.2–7.4, 5% CO₂), при плотности посева 60 тыс. клеток/см². Через сутки после посева клеток в ростовую среду добавляли исследуемые вещества: DDC (1 мМ) и DDC в сочетании с витамином B_{12b} (1 мМ и 25 мкМ соответственно). Образцы представляли собой белки необработанных клеток (контроль), клеток после 4-ч инкубации с 1 мМ DDC (D4h) и клеток после 1-ч и 4-ч инкубации с DDC+B12 (DB1h, DB4h), подготовленные по протоколу, представленному в работе [26]. Для получения образцов было проведено три независимых эксперимента, каждый образец в каждом опыте содержал 1.5 млн клеток. Все белки соответствующих образцов, идентифицированные в этих трех опытах, объединяли в соответствующую пробу. Полученные при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения результаты анализа протеома и убиквитома клеток HEp-2 в пробах контроль, D4h, DB1h и DB4h были депонированы [27].

Биоинформатический анализ Ub-белков клеток карциномы человека HEp-2 выполняли по протоколу, представленному ранее [9]. Ub-белки были проанализированы и сгруппированы по ключевым словам базы UniProtKB (релиз 2023–01), описывающим основные биологические процессы/молекулярные функции/клеточные компоненты, относящиеся к гистонам и модифицирующим их белкам (Histone, Histone-lysine N-methyltransferase, Histone lysine demethylase, Histone de/acetylase,

Histone de/ubiquitination, Histone ADP-ribosylation, Histone Phosphorylation). Все группы Ub-белков были проверены по базе данных STRING версии 11.5 [28] на предмет взаимодействий с использованием идентификатора UniProt, коэффициент достоверности (confidence, отражает степень подкрепленности межбелковой связи имеющимися фактами) 0.4 (средний) и 0.7 – высокий.

Размер клеточных ядер оценивали про помощи конфокальной микроскопии. Клетки высевали в чашки Петри диаметром 35 мм, после описанной выше обработки исследуемыми веществами проводили прижизненное окрашивание красителем Hoechst 33342 (1 мкг/мл, 5 мин) и получали изображения при помощи конфокального микроскопа TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Затем их анализировали при помощи программы ImageJ для определения площади клеточных ядер. Обсчитывали не менее 30 клеток в каждом из трех независимых препаратов. Достоверность различий определяли при помощи теста Стьюдента, $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы установили, что при аэробном окислении диэтилдитиокарбамата (DDC, 1 мМ), катализируемом гидроксиклобаламином (витамин В12, 25 мкМ), в среде накапливаются окисленные производные ДСФ, сульфоны и сульфоксиды (ДСФокси). В клетках НЕР-2 под воздействием ДСФокси в течение 4 ч накапливаются полиубиквитинированные белки и индуцируется параптозоподобная клеточная гибель, что было описано нами ранее [9, 19, 29, 30]. Как известно, этот тип гибели определяется в первую очередь по морфологическому критерию – вакуолизации ЭПР вследствие несовершенного синтеза белка, а также по отсутствию признаков других типов программируемой клеточной гибели. При этом по отдельности эти вещества не вызывали цитотоксического эффекта [29, 30]: витамин В12 был нетоксичен вплоть до 2 мМ, а 1 мМ DDC вызывал слабый цитостатический эффект, т.е. число живых клеток относительно контроля уменьшалось до 60–70% за 48 ч, без увеличения количества погибших клеток. В настоящей работе был выполнен анализ убиквитома четырех проб: контроль – клетки, не подвергшиеся обработке; D4h – клетки после 4-ч инкубации с 1 мМ DDC, где не происходит стимуляция клеточной гибели; DB1h – клетки, где повреждающий эффект был полностью обратим при удалении из среды DDC и В12 после 1 ч инкубации с ними, и DB4h – клетки, в которых необратимые повреждения в течение 4 ч воздействия ДСФокси

приводят к гибели более 60% популяции в течение последующих 24 ч [9, 29, 30].

Мы установили, что в контрольных клетках, а также в клетках DB1h и D4h, в которых не происходило стимуляции гибели, ядра морфологически не различались. В клетках DB4h в процессе инициации параптозоподобной клеточной гибели оксипроизводными ДСФ происходят морфологические изменения ядра, а именно уменьшение размеров (до 50% от контрольного значения) и формы ядра, выявляемое при помощи окраски ядерным красителем (рис. 1а-1д).

Количество Ub-белков клеточного ядра в пробах показано на рис. 1е. Так, в контроле было обнаружено 109 белков, в пробе D4h – 105, в пробе DB1h – 85 Ub-белков клеточного ядра. Видно, что для пробы DB4h характерно увеличение этого параметра более чем в 1.5 раза по сравнению с остальными (173 белка).

Во всех анализируемых пробах большую часть убиквитинированных ядерных белков составляли регуляторы модификации гистонов (рис. 2, табл. 1). Наибольшее количество Ub-белков гистонного кода выявлено в пробе DB4h. Отметим, что в табл. 1 включены только ферменты гистонного кода, непосредственно регулирующие ПТМ гистонов как по отдельности, так и в составе комплексов. Так, в контроле и DB4h мы обнаружили белок REST, действие которого на гистоны опосредованно, поэтому в таблицу он не включен. Обнаруженный в контроле HCFC1, связывающий хроматин-модифицирующие ферментные комплексы, также не вошел в табл. 1. Анализируя убиквитинирование белков и ПТМ гистонов через убиквитинирование/ деубиквитинирование, следует отметить, что моноубиквитинирование гистонов играет важную роль в регуляции стабильности генома и транскрипции и не ведет к их деградации. Деубиквитинирование гистонов регулирует транскрипцию и необходимо для эффективного сплайсинга ряда экзонов. Специфическое деубиквитинирование Lys-14 и Lys-16 гистона H2A регулирует ответ на повреждение ДНК в местах двойных разрывов [31]. Динамическое регулирование моно- и полиубиквитинирования гистонов в зависимости от места также является частью гистонного кода репарации разрывов ДНК, однако полиубиквитинирование по K48 приводит к протеосомной деградации гистонов [5, 6, 32]. В контрольной группе мы обнаружили убиквитинированные коровые гистоны H3 и H4. Как сказано выше, этот вид ПТМ может являться регуляторным. При помощи базы

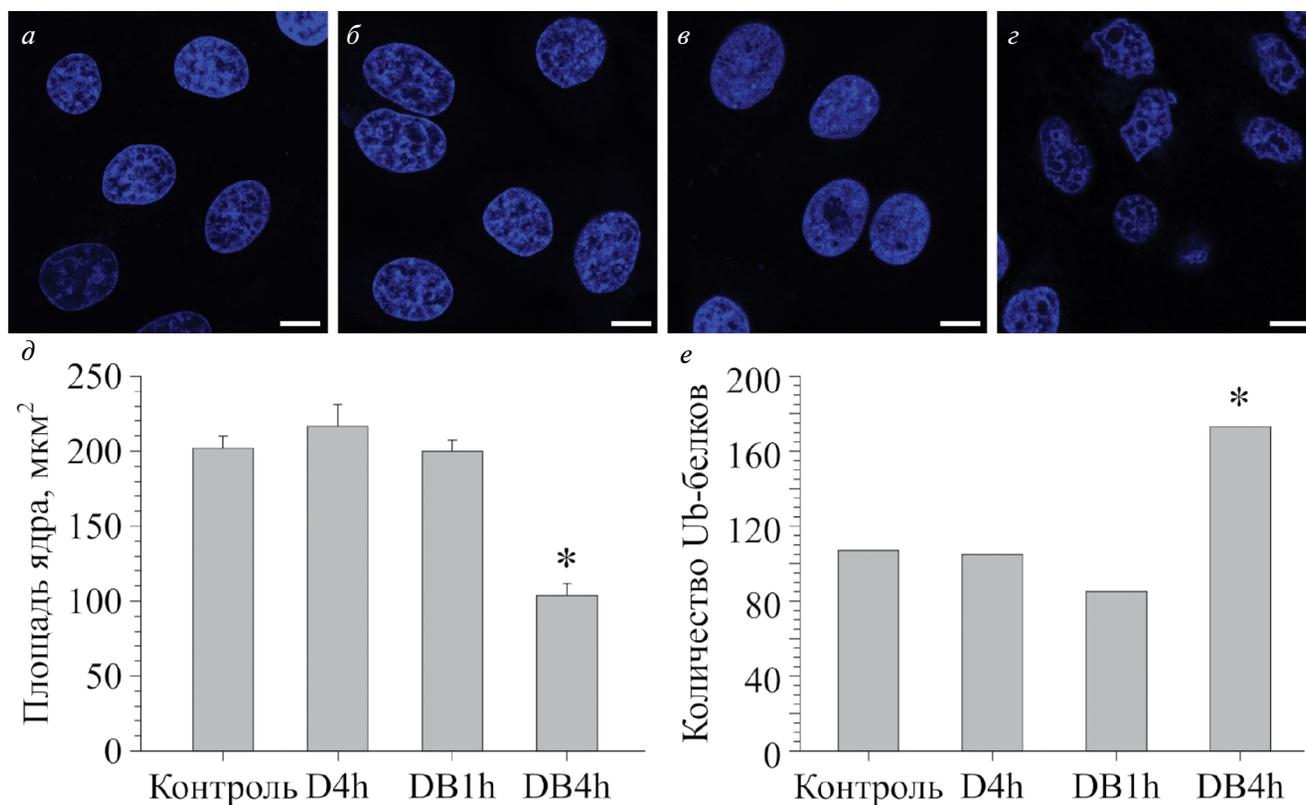


Рис. 1. Изменения формы (*a* – контроль, *б* – D4h, *в* – DB1h, *г* – DB4h), площади клеточного ядра (*д* – усредненные данные по трем экспериментам) и количества Ub-белков клеточного ядра (*е* – данные, суммированные по трем экспериментам). Линейка – 10 $\mu\text{м}$.

данных STRING мы установили, что в контроле между выявленными Ub-белками и гистонами H3 и H4 имеется большое количество связей высокой достоверности (несвязанные белки вошли в группу на основании данных UniProt об их взаимодействии с гистонами). Модификация гистонов, как известно, необходима для регуляции клеточного цикла, ответа на стресс и репарации ДНК, и в контроле данные процессы, наряду с транскрипцией, трансляцией и т.д., также были обнаружены (рис. 2*д*). Из рис. 2 видно, что при нетоксичном действии DDC Ub-белки не образуют хорошо координированной сети, и для гистон-ассоциированных Ub-белков пробы D4h были характерны в основном связи со средней и низкой степенью достоверности (confidence 0.4 и ниже), при этом около 30% белков было не связано с основной группой. По сравнению с контролем, убиквитинирование регуляторов ответа клетки на повреждение ДНК и репарации ДНК в пробе D4h было несколько повышено, что может указывать на активацию этих процессов с целью восстановления полученных повреждений. Убиквитинированных гистонов в этой пробе не было найдено. Начальные нелетальные повреждения клетки оксипроизводными ДСФ

(проба DB1h) приводят к убиквитинированию гистона H4, с которым достоверные связи (confidence 0.7) образуют большинство найденных в пробе регуляторов кода. Это может указывать на его участие в регуляции транскрипции и стабильности генома на начальном этапе повреждающего действия оксипроизводных ДСФ, подобно тому как полиубиквитинирование H4 облегчало репарацию ДНК клеток после УФ-облучения [33]. В обеих пробах, связанных с инициацией параптоза (DB1h и DB4h), заметно увеличивалось убиквитинирование белков, связанных с регуляцией клеточного цикла. В пробе DB4h, согласно базе данных STRING, вместе с процессами модификации гистонов среди достоверно функционально обогащенных биологических процессов был ответ на стресс, клеточный ответ на повреждение ДНК и репарация ДНК. Как видно из рис. 2, инициация параптоза приводит к хорошо интегрированному ответу в пробе DB4h, где отмечено большое число связей с высокой достоверностью между Ub-белками, участвующими в регуляции генового кода. Большинство этих белков было связано с убиквитинированным гистонами H2BC12 (Histone H2B type 1-K), что может указывать

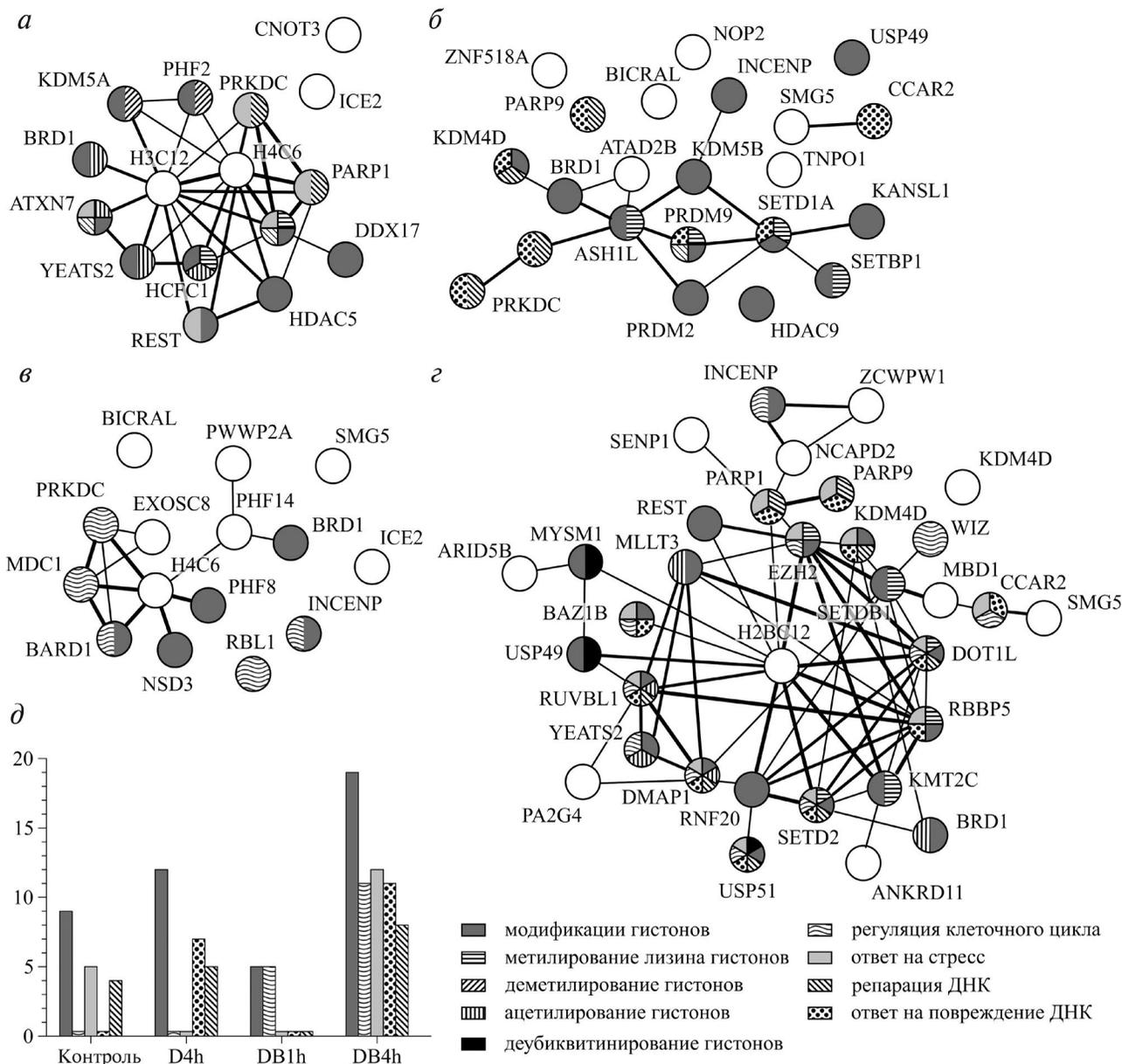


Рис. 2. Ub-белки, связанные с гистонами и регуляцией гистонного кода. *a* – Контроль, *б* – D4h, *в* – DB1h, *г* – DB4h, *д* – количество взаимодействующих с гистонами Ub-белков, участвующих в некоторых функционально обогащенных биологических процессах, в соответствии с базой STRING. Толщина линий указывает на степень достоверности, 0,4 – средняя, 0,7 – высокая, 0,9 – очень высокая. Все полученные группы были достоверно обогащены функциональными связями между белками по сравнению со случайным набором белков аналогичного размера (PPI enrichment *p*-value: 1.01×10^{-8} , 2.1×10^{-7} , 6.65×10^{-5} и 1.0×10^{-16} для контроля, D4h, DB1h и DB4h соответственно).

на его ключевую роль в регуляции гистонного кода при инициации паратоза. H2BC12 моноубиквитинируется при активации транскрипции; его деубиквитинирование гидролазой USP49 необходимо для эффективного сплайсинга ряда экзонов (данные UniProt). Однако, по данным литературы, H2BC12 характерен для старения фибробластов, вызванного персистирующими повреждениями ДНК, и может являться новым

биомаркером этого процесса [34]. Очень показательно, что H2BC12 в наших исследованиях был обнаружен при инициации паратоза. Возможно, убиквитинирование и другие модификации этого гистона является одним из маркеров паратозоподобной клеточной гибели, но этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Мы проанализировали обнаруженные нами в клетках HEp-2 белки, регулирующие гистонный

код через конъюгацию убиквитина (Ubl conjugation pathway). В контроле был обнаружен белок BRCA1, действующий как E3 лигаза, а в пробе DB1h – E3-убиквитин протеинлигаза BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1). В составе BRCA1-BARD1 комплекса они участвуют в моноубиквитинировании гистонов H2A, H2B, H3 и H4 и ответе на повреждение ДНК [6]. BRCA1 самоубиквитинируется в процессе ПТМ, что не ведет к деградации. Убиквитинирование BARD1 лигазой RNF19A ведет к выходу из гетеродимера BRCA1-BARD1 и последующему перемещению из ядра в цитоплазму [35]. BARD1 процессируется, в частности, при апоптозе и в таком виде более чувствителен к расщеплению. Вероятно, убиквитинирование этого белка означает, что при параптозе его протеолиз также может происходить, т.к. ни гетеродимера, ни BRCA1 в пробе DB1h не было обнаружено. Отметим, что этот белок был окислен, что может указывать на его повреждение оксипроизводными ДСФ. Воздействие неокисленных дитиокарбаматов (1 mM DDC) не вызвало увеличения количества Ubl-конъюгирующих ферментов: в пробе D4h мы обнаружили лишь убиквитин-карбоксилтерминальную гидролазу USP49, участвующую в деубиквитинировании остатка Lys-120 гистона H2B, которое, по данным UniProt, необходимо для эффективного сплайсинга экзонов. Эта же гидролаза, а также гидролаза USP51, белки RNF20 и MYSM1 были найдены при инициации параптоза в пробе DB4h. RNF20, главная H2B-убиквитинирующая E3-убиквитин протеинлигаза BRE1A, играет ведущую роль в регуляции гистонов и экспрессии генов; она моноубиквитинирует гистон H2B по Lys-120, что является эпигенетической меткой для активации транскрипции и метилирования гистона H3 [6]. Деубиквитиназа MYSM1 удаляет убиквитин с гистона H2A, что является меткой для подавления транскрипции и отщепления гистона H1 от нуклеосомы. Убиквитин-карбоксилтерминальная гидролаза USP51 деубиквитинирует гистон H2A по Lys-14 и Lys-16, давая метку для восстановления поврежденной ДНК в местах двойных разрывов и регулируя ассоциацию/диссоциацию TP53BP1 и BRCA1. Убиквитинирование этих белков, согласно UniProt, не является их ПТМ. Возможно, в убиквитинированном состоянии они направлялись к протеасомам вследствие повреждения/неулучшения, так же, как и остальные модификаторы гистонов, о которых речь пойдет далее.

Для ферментов гистонов и убиквитинирование, по данным литературы, может являться не только их ПТМ, но и сигналом к протеолизу [8, 52]. Мы проанализировали состав важнейших

регуляторов гистонов (табл. 1) и роль убиквитинирования в их функционировании. Обнаруженные белки гистонов (де)метилирование и (де)ацетилование. Как известно, влияние ПТМ гистонов на их функции зависит от типа и места расположения. Так, ацетилование лизина, повышающее отрицательный заряд молекулы гистона, облегчает доступ к ДНК и приводит к усилению транскрипции [1, 3, 8]. Метилирование по Lys-4 (H3K4), H3K36 и H3K79 в целом связано с активацией транскрипции [8], кроме того, метилированные H3K79 и H4K20 участвуют, как считается, в процессе репарации ДНК [1, 8]. Напротив, метилирование H3K9 или H3K27 гистона H3 ведет к более сильному взаимодействию с молекулой ДНК и, в частности, к более плотной упаковке гетерохроматина. Это приводит к подавлению экспрессии генов [1, 8, 53]; в то же время метилирование аргинина активирует этот процесс. Таким образом, конечный результат метилирования лизина, как и остальные ПТМ, зависит не только от изменения заряда молекулы, но и от наличия рядом других модификаций или белков-регуляторов, а также от самого местоположения данной ПТМ. Метилирование может происходить по одному, двум или трем остаткам лизина, что еще больше повышает вариативность гистонов. Отметим, что деметилирование лизина было открыто сравнительно недавно, что опровергло гипотезу о необратимости метилирования лизинов [54].

В контроле не было найдено убиквитинированных гистон-лизин-N-метилтрансфераз, но были обнаружены лизин-специфические деметилазы – RNF2, для которых роль убиквитинирования пока окончательно не ясна, и один из главных регуляторов гистонов KDM5A, специфически деметилирующий H3K4. Убиквитинирование этого фермента сопровождается его протеолизом [37]. В пробе D4h, где не происходит никаких морфологических изменений ядра (рис. 1б), но отмечается слабый цитостатический эффект [30], были обнаружены убиквитинированные гистон-лизин-N-метилтрансферазы: ASH1L, метилирующая H3K36 и H3K9 и ингибирующая NF-κB и MAPK сигнальные пути [55], PRDM9 с активностью в отношении H3K4, H3K36, H3K9 и H3K20, и SETD1A, который через метилирование H3K4 и H3K36 регулирует активность гистона H3, ремоделирование хроматина, транскрипцию и репарацию сайтов повреждения ДНК. Метилирование гистонов выполнял также белок SETBP1 (H3K4 и H3K36) и, по данным UniProt, которые не совпадают с данными STRING (рис. 2 д), – белок

Таблица 1. Убиквитинированные белки, связанные с регуляцией гистоновомого кода клеток HEp-2 в контроле, пробах DB1h, D4h и пробе DB4h (при инициации параптоза)

| Проба | Идентификатор | Название белка, <i>ген</i> | Назначение убиквитинирования | Ссылки |
|----------|---------------|--|------------------------------|---------------|
| Контроль | P38398 | Белок восприимчивости к раку молочной железы 1 типа, <i>BRCA1</i> | ПТМ | UniProt |
| >> | Q9UQL6 | Гистоновая деацетилаза 5, <i>HDAC5</i> | Протеолиз | [36, 37] |
| >> | O75151 | Лизин-специфическая деметилаза PHF2, <i>PHF2</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | P29375 | Лизин-специфическая деметилаза 5A, <i>KDM5A</i> | Протеолиз | [37] |
| >> | Q9ULM3 | Белок 2, содержащий домен YEATS, <i>YEATS2</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | P78527 | Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы, <i>PRKDC</i> | Протеолиз | [38] |
| >> | P09874 | Поли(ADP-рибозо)полимераза 1, <i>PARP1</i> | Протеолиз, ПТМ | [39, 40] |
| >> | O15265 | Атаксин-7, <i>ATXN7</i> | Протеолиз, ПТМ | [41], UniProt |
| D4h | Q70CQ1 | Убиквитин-карбоксиконцевая гидролаза 49, <i>USP49</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q9NR48 | Гистон-лизин-N-метилтрансфераза ASH1L, <i>ASH1L</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q9NQV7 | Гистон-лизин-N-метилтрансфераза PRDM9, <i>PRDM9</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | O15047 | Гистон-лизин-N-метилтрансфераза SETD1A, <i>SETD1A</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q9Y6X0 | SET-связывающий белок, <i>SETBP1</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q13029 | PR-домен белка цинковых пальцев 2, <i>PRDM2</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q6B0I6 | Лизин-специфическая деметилаза 4D, <i>KDM4D</i> | Протеолиз | [42] |
| >> | Q9UGL1 | Лизин-специфическая деметилаза 5B, <i>KDM5B</i> | Протеолиз | [43] |
| >> | Q9UKV0 | Гистоновая деацетилаза 9, <i>HDAC9</i> | роль Ub неясна | [36] |
| >> | Q7Z3B3 | Субъединица 1 регуляторного комплекса NSL KAT8, <i>KANSL1</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | P78527 | Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы, <i>PRKDC</i> | Протеолиз | [38] |
| >> | Q8IXQ6 | Белковая моно-ADP-рибозилтрансфераза PARP9, <i>PARP9</i> | Не ПТМ | UniProt |
| DB1h | Q99728 | Белок 1 домена RING, связанный с BRCA1, <i>BARD1</i> | Протеолиз | [35] |
| >> | Q9BZ95 | Гистон-лизин-N-метилтрансфераза NSD3, <i>NSD3</i> | Протеолиз | [44] |
| >> | Q9UPP1 | Гистон-лизин-деметилаза PHF8, <i>PHF8</i> | Протеолиз | [45] |
| >> | O94880 | PHD пальцевый белок 14, <i>PHF14</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | P28749 | Ретинобластомоподобный белок 1, <i>RBL1</i> | Протеолиз, ПТМ | [46] |
| >> | Q96N64 | Белок 2A, содержащий домен PWWP, <i>PWWP2A</i> | Не ПТМ | UniProt |

| | | | | |
|------|--------|---|---------------------------------|----------|
| >> | P78527 | Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы, <i>PRKDC</i> | Протеолиз | [38] |
| DB4h | Q5VTR2 | Е3 убиквитин-белковая лигаза BRE1A, <i>RNF20</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q5VVJ2 | Деубиквитиназа MYSM1, <i>MYSM1</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q70CQ1 | Убиквитин-карбоксиконцевая гидролаза 49, <i>USP49</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q70EK9 | Убиквитин-карбоксиконцевая гидролаза 51, <i>USP51</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q8TEK3 | Гистон-лизин-N-метилтрансфераза, специфичная к лизину 79 гистона H3, <i>DOT1L</i> | Протеолиз | [47] |
| >> | Q15910 | Гистон-лизин-N-метилтрансфераза EZH2, <i>EZH2</i> | Протеолиз | [8] |
| >> | Q15047 | Гистон-лизин-N-метилтрансфераза SETDB1, <i>SETDB1</i> | Регуляция активности, протеолиз | [48, 49] |
| >> | Q9BYW2 | Гистон-лизин-N-метилтрансфераза SETD2, <i>SETD2</i> | Протеолиз | [8] |
| >> | Q8NEZ4 | Гистон-лизин-N-метилтрансфераза 2C, <i>KMT2C</i> | Протеолиз | [50] |
| >> | Q15291 | Ретинобластома-связывающий белок 5, <i>RBBP5</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q9H0M4 | Белок 1 домена PWWP типа CW с цинковым пальцем, <i>ZCWPW1</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | P42568 | Protein AF-9, <i>MLLT3</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q6B0I6 | Лизин-специфическая деметилаза 4D, <i>KDM4D</i> | Протеолиз | [42] |
| >> | Q9NPF5 | Белок 1, ассоциированный с ДНК-метилтрансферазой 1, <i>DMAP1</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q9ULM3 | Белок 2, содержащий домен YEATS, <i>YEATS2</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q9Y265 | RuvB-подобный 1, <i>RUVBL1</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q6UB99 | Белок 11, содержащий домен повторов анкирина, <i>ANKRD11</i> | Протеолиз | [51] |
| >> | Q9UQ80 | Белок 2G4, связанный с пролиферацией, <i>PA2G4</i> | Протеолиз | UniProt |
| >> | P09874 | Поли(ADP-рибозо)полимераза 1, <i>PARP1</i> | ПТМ, Протеолиз | [39, 40] |
| >> | Q8IXQ6 | Белковая моно-ADP-рибозилтрансфераза PARP9, <i>PARP9</i> | Не ПТМ | UniProt |
| >> | Q9UIG0 | Тирозин-протеинкиназа BAZ1B, <i>BAZ1B</i> | Не ПТМ | UniProt |

Примечание. Представлены суммированные данные трех независимых экспериментов.

PRDM2 (H3K9), не входящие в семейство гистон-лизин-N-метилтрансфераз. Роль убиквитинирования в регуляции работы этих ферментов не установлена, но UniProt не содержит указаний, что убиквитинирование является их ПТМ (табл. 1). KDM5B и KDM4D, лизин-специфические деметилазы 5B и 4D, регулируют деметилирование H3K4

и H3K9, тем самым играя главную роль в гистоновом коде, согласно UniProt. Их уровень в клетке регулируется убиквитинированием [42, 43].

В пробе DB1h обнаружены убиквитинированные гистон-лизин-N-метилтрансфераза NSD3, гистон-лизин-деметилаза PHF8, белки PHF14

и RBL1. NSD3 диметилирует гистон H3 и в зависимости от локализации или активирует (H3K4), или подавляет (H3K27) транскрипцию. RNF8 деметилирует H3K9, а также диметилирует H3K27 и монометилирует гистон H4, таким образом, в зависимости от местоположения лизинового остатка являясь активатором транскрипции или же репрессором, контролирующим G1-S переход клеточного цикла. RBL1 контролирует работу метилтрансфераз и триметилирование H4K20. Убиквитинирование этих белков ведет к их расщеплению [44–46]. Для RNF14, снижающего уровень триметилированного H3K4, убиквитинирование не является ПТМ, но данных о его роли в протеасомной деградации на настоящий момент нет.

В клетках с необратимыми повреждениями, ведущими к близкой параптозоподобной гибели (проба DB4h), обнаружено несколько представителей семейства гистон-лизин-N-метилтрансфераз: EZH2, SETDB1, SETD2, KMT2C, DOT1L, а также компонент метилтрансферазных комплексов RBBP5, стимулирующий метилирование H3K4 и регулирующий активность KMT2C и SETDB1. EZH2 и SETDB1 метилируют Lys-9 и Lys-27 гистона H3, подавляя транскрипцию. SETD2, KMT2C, DOT1L метилируют Lys-36, Lys-4 и Lys-70 гистона H3, являясь регуляторами ремоделирования хроматина, транскрипции и репарации ДНК. ZCWPW1, ридер двойного метилирования гистонов H3K4 и H3K36, также был найден при инициации параптоза; роль убиквитинирования этого фермента пока не установлена, но оно не относится к ПТМ. Отметим, что моноубиквитинирование SETDB1 является его ПТМ, необходимой для осуществления основной энзиматической функции [48]. Лизин-специфическая деметилаза 4D (KDM4D), деметилирующая H3K9, что означает активацию транскрипции, также относится к главным регуляторам гистонового кода. Установлено, что полиубиквитинирование большинства белков данной пробы, связанных с метилированием гистонов (SETD2, DOT1L, SETDB1, EZH2, KDM4D, KMT2C), приводит к их деградации [8, 42, 47, 49, 50].

Таким образом, метилирование гистонов, обнаруженное в клетках HEp-2, направлено как на стимуляцию, так и на подавление экспрессии генов, а убиквитинирование белков, участвующих в этом процессе, во многих случаях сопровождается последующим расщеплением протеасомой.

Среди регуляторов гистонового кода, убиквитинированных в клетках HEp-2, мы также обнаружили де- и ацетилирующие ферменты. В контроле это гистон-деацетилаза HDAC5, активная в отношении гистонов H2A, H2B, H3 и H4 и выполняющая роль

в регуляции транскрипции и регуляции клеточного цикла, и YEATS2, белок-ридер в составе комплекса, деацетилирующего гистоны H3 и H4. Результатом убиквитинирования HDAC5 является его протеолиз [36, 37], в отношении YEATS2 таких данных не опубликовано. Для найденного в контроле ATXN7, выполняющего функцию ацетилирования гистона H3, убиквитинирование может быть и ПТМ (согласно UniProt), и направлением на деградацию [41]. В пробе D4h также были обнаружены регуляторы де- и ацетилирования гистона H3: ацетилаза KANSL1, регулирующая транскрипцию через ацетилирование гистона H3, и деацетилаза HDAC9, активная в отношении коровых гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Как видно из табл. 1, роль убиквитинирования в судьбе этих и многих других белков группы D4h пока окончательно не установлена. Так, в работе [36] не смогли обнаружить деградацию HDAC9, хотя остальные изученные белки HDAC1–8 и 10 после убиквитинирования подвергались расщеплению. В пробе DB1h регуляцию транскрипции через ацетилирование гистонов осуществлял PWWP2A; убиквитинирование не является его ПТМ. В пробе DB4h мы также обнаружили убиквитинированный белок-ридер YEATS2 (см. выше). Деацетилирование выполнял и ANKRD11, чье убиквитинирование указывает на деградацию молекулы [51]. Ридер хроматина MLLT3, компоненты NuA4 гистон-ацетилтрансферазного комплекса RUVBL1 и DMAP1, связанный с пролиферацией белок PA2G4, найденные в этой пробе, также через ацетилирование гистонов участвуют в регуляции транскрипции. Их убиквитинирование не является ПТМ, а для PA2G4 прямо указывает на последующую деградацию (UniProt). В этой пробе были также обнаружены Ub-белки, служащие основой для ацетилтрансферазных и метилтрансферазных комплексов, и ингибиторы ферментов гистонового кода (не включены в табл. 1) – REST, CCAR2, WIZ, MBD1, ARID5B; для всех этих белков убиквитинирование не является ПТМ, а для REST является указанием на протеолиз. Белок REST был найден также в контроле, а CCAR2 – в пробе D4h. Отметим, что во всех пробах был обнаружен убиквитинированный BRD1 с функцией ридера гистонов (histone reader activity), являющийся основой для гистон-ацетилтрансферазных комплексов; убиквитинирование является его ПТМ (UniProt).

Помимо убиквитинирования, ацетилирования и метилирования, гистоны могут также подвергаться другим ковалентным модификациям – фосфорилироваться, сумоилироваться, кротонилироваться, биотинилироваться, бутирилироваться, N-формилироваться, деиминироваться

и поли-ADP-рибозилироваться [1, 2, 4]. Роль фосфорилирования гистонов (например, по серину-9 и -14) в гистоновом коде заключается как в активации транскрипции, так и в конденсации и фрагментации хроматина при апоптозе [1, 56]. PRKDC, фосфорилирующая гистон H2 в ответ на повреждение ДНК, была обнаружена в контроле, пробе D4h и DB1h. Убиквитинирование PRKDC ведет к протеасомной деградации [38]. Тирозин-протеинкиназа BAZ1B, обнаруженная при инициации параптоза (DB4h), является главным регулятором перестройки хроматина и участвует в ответе на повреждение ДНК путем фосфорилирования Туг-142 гистона H2AX. Ее убиквитинирование, согласно UniProt, не является ПТМ.

В восстановлении поврежденной ДНК клеток большую роль играет также такая ПТМ, как ADP-рибозилирование. Поли(ADP-рибозо)полимераза 1 (PARP1), инициатор репарации разрывов ДНК, была обнаружена в контроле и пробе DB4h. В последней также были найдены протеин-моно-ADP-рибозилтрансфераза PARP15, не связанная с гистоновым кодом, и PARP9, неактивная в свободном состоянии. PARP1-зависимый комплекс PARP9 с E3 лигазой DTX3L (PARP9-DTX3L) быстро и специфически доставляется к местам повреждения ДНК, что необходимо для эффективного негомологичного соединения ее концов в местах двухцепочечных разрывов (NHEJ), а также связывается с убиквитином и препятствует убиквитинированию субстратов, в том числе и гистонов. Обнаружение PARP1 в убиквитинированном состоянии может указывать на последующую деградацию, а также в некоторых случаях является ПТМ [39, 40]. Для PARP9, не связанной с DTX3L, данные о роли убиквитинирования отсутствуют, однако в базе UniProt оно не относится к ПТМ. PARP9, не связанная с другими белками, была также обнаружена в пробе D4h.

Таким образом, при инициации параптозоподобной клеточной гибели (проба DB4h), наряду с повреждениями ЭПР и ретроградного транспорта [9] происходит увеличение убиквитинирования белков-регуляторов гистонового кода, которое свидетельствует о наличии повреждений ДНК и ядра. Протеасомная деградация убиквитинированных белков – рутинная процедура удаления поврежденных или ставших ненужными белков клетки, а активация этого процесса является индикатором массового повреждения и указанием на возможную клеточную гибель, в случае действия ДСФокси – на инициацию параптоза. Среди убиквитинированных гистон-лизинметилтрансфераз, обнаруженных при инициации параптозоподобной гибели, большинство составляли активаторы

транскрипции. Однако, как указано выше, посредством полиубиквитинирования эти белки направляются на деградацию [8, 42, 47, 49, 50]. Деметилаза KDM4D, участвующая в регуляции транскрипции, также после убиквитинирования расщепляется протеасомами. Деградация может быть результатом убиквитинирования и остальных регуляторов метилирования, обнаруженных в этой пробе, так как убиквитинирование не является их ПТМ [8, 42, 47, 49, 50]. То есть при инициации параптозоподобной гибели происходит протеасомная деградация регуляторов метилирования гистонов, отвечающих за инициацию транскрипции и репарацию поврежденных участков ДНК. Для найденных в этой пробе гистон-ацетилирующих ферментов и фосфорилазы гистонов BAZ1B, активирующих транскрипцию и репарацию ДНК, роль убиквитинирования также состоит в подготовке к деградации (ANKRD11) или пока еще не установлена, но не связана с ферментативной активностью (компоненты NuA4, YEATS2, BAZ1B). В этой пробе в повышенном по сравнению с остальными белками количестве представлены и Ubl-конъюгирующие ферменты. Их роль в основном состоит в регуляции транскрипции и репарации повреждений ДНК. Обнаружение их в убиквитинированном состоянии не является однозначным указанием на последующую протеасомную деградацию вследствие повреждения молекулы, но этот вариант возможен. В частности, ранее мы установили, что деубиквитиназа UCHL5, участвующая в репарации ДНК и отвечающая за отщепление убиквитина перед протеасомной деградацией несобранных /поврежденных белков, была окислена и убиквитинирована при инициации параптоза посредством ДСФокси [9], что, по данным UniProt, не является ее ПТМ и может быть указанием на дальнейшую деградацию.

В остальных пробах было обнаружено слишком малое количество ферментов гистонового кода, чтобы можно было делать выводы о характере идущих в них процессов, однако речь может идти о балансе процессов, характерном для обычной жизнедеятельности или нелетального повреждения.

Таким образом, повреждение ядра и нарушение регуляции гистонового кода при инициации параптозоподобной гибели клеток Нер-2 посредством ДСФокси происходит одновременно с развитием несовершенного белкового ответа, ингибированием ретроградного транспорта белков и стрессом ЭПР, обнаруженными нами ранее, что указывает на плейотропный характер механизма запуска этой гибели, наличие множественных внутриклеточных мишеней, повреждающихся при действии этих агентов.

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

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-01025-23-01 на 2023 г.). Исследование проводилось с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (<http://skp-rf.ru/skp/3037/>).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cohen I., Poręba E., Kamieniarz K., Schneider R. 2011. Histone modifiers in cancer: Friends or foes? *Genes Cancer*. **2** (6), 631–647. doi 10.1177/1947601911417176.
- Audia J.E., Campbell R.M. Histone modifications and cancer. 2016. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8** (4), a019521. doi 10.1101/cshperspect.a019521.
- Карпенко Д.В., Петинати Н.А., Дризе Н.И., Бигильдеев А.Е. Роль эпигенетических модификаций ДНК и гистонов в лечении онкогематологических заболеваний. 2021. *Гематол. и трансфузиол.* **66** (2), 263–279. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-2-263-279>
- Oss-Ronen L., Sarusi T., Cohen I. 2022. Histone mono-ubiquitination in transcriptional regulation and its mark on life: Emerging roles in tissue development and disease. *Cells*. **11** (15), 2404. <https://doi.org/10.3390/cells11152404>.
- Кудряева А.А., Липкин В.М., Белогуров А.А. 2020. Топологические особенности моноубиквитинирования гистона H2A. *Докл. РАН. Науки о жизни.* **493** (1), 367–372. doi 10.31857/S2686738920040125.
- Бачева А.В., Готманова Н.Н., Белогуров А.А., Кудряева А.А. 2021. Контроль генома через призму вариативности гистон-модифицирующих убиквитин-лигаз. *Успехи биол. химии.* **61**, 155–202. doi 10.1134/S0006297921140066.
- Shen E., Shulha H., Weng Z., Akbarian S. 2014. Regulation of histone H3K4 methylation in brain development and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **369** (1652). 20130514 doi 10.1098/rstb.2013.0514.
- Wang J., Qiu Z., Wu Y. 2018. Ubiquitin regulation: The histone modifying enzyme's story. *Cells*. **7** (9), 118. <https://doi.org/10.3390/cells7090118>
- Solovieva M., Shatalin Y., Odinkova I., Krestinina O., Baburina Y., Lomovskaya Y., Pankratov A., Pankratova N., Buneeva O., Kopylov A., Medvedev A., Akatov V. 2022. Disulfiram oxy-derivatives suppress protein retrotranslocation across the ER membrane to the cytosol and initiate paraptosis-like cell death. *Membranes*. **12** (9), 845. <https://doi.org/10.3390/membranes12090845>.
- Shimazu S., Takahata K., Tamashiro A., Yoneda F., Iida Y., Saji H. 2003. Recovery of motor function and dopaminergic parameters in a mouse model of Parkinson's disease induced by co-administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and diethyldithiocarbamate. *J. Neural. Transm.* **110**, 871–883. doi 10.1007/s00702-003-0002-1.
- Yang C.-H., Fang I.-M., Lin C.-P., Yang C.-M., Chen M.-S. 2005. Effects of the NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate on experimentally induced autoimmune anterior uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 1339–1347. doi 10.1167/iovs.04-0640.
- Castillo-Villanueva A., Rufino-González Y., Méndez S.T., Torres-Arroyo A., Ponce-Macotela M., Martínez-Gordillo M.N., Reyes-Vivas H., Oria-Hernández J. 2017. Disulfiram as a novel inactivator of Giardia lamblia triosephosphate isomerase with anti-giardial potential. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **7** (3), 425–432. doi 10.1016/j.ijpddr.2017.11.003.
- Liegner K.B. 2019. Disulfiram (tetraethylthiuram disulfide) in the treatment of Lyme disease and babesiosis: report of experience in three cases. *Antibiotics*. **8** (2), 72. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020072>.
- Xing S., Bullen C.K., Shroff N.S., Shan L., Yang H.C., Manucci J.L., Bhat S., Zhang H., Margolick J.B., Quinn T.C., Margolis D.M., Siliciano J.D., Siliciano R.F. 2011. Disulfiram reactivates latent HIV-1 in a Bcl-2-transduced primary CD4+ T cell model without inducing global T cell activation. *J. Virol.* **85**, 6060–6064. <https://doi.org/10.1128/jvi.02033-10>.
- Liu T., Wang P., Cong M., Zhao X., Zhang D., Xu H., Liu L., Jia J., You H. 2018. Diethyldithiocarbamate, an anti-abuse drug, alleviates steatohepatitis and fibrosis in rodents through modulating lipid metabolism and oxidative stress. *Br.J. Pharmacol.* **175**, 4480–4495. doi 10.1111/bph.14503.
- Jakola A.S., Werlenius K., Mudaisi M., Hylin S., Kinhult S., Bartek J. Jr, Salvesen Ø., Carlsen S.M., Strandéus M., Lindskog M., Löfgren D., Rydenhag B., Carstam L., Gulati S., Solheim O., Bartek J., Solheim T. 2018. Disulfiram repurposing combined with nutritional copper supplement as add-on to chemotherapy in recurrent glioblastoma (DIRECT): Study protocol for a randomized controlled trial. *F1000Res.* **15**, 1797. doi 10.12688/f1000research.16786.
- Kita Y., Hamada A., Saito R., Teramoto Y., Tanaka R., Takano K., Nakayama K., Murakami K., Matsumoto K., Akamatsu S., Yamasaki T., Inoue T., Tabata Y., Okuno Y., Ogawa O., Kobayashi T. 2019. Systematic chemical screening identifies disulfiram as a repurposed drug that enhances sensitivity to cisplatin in bladder cancer: A summary of preclinical studies. *Br.J. Cancer.* **121**, 1027–1038. Doi 10.1038/s41416-019-0609-0.
- Ekinci E., Rohondia S., Khan R., Dou Q.P. 2019. Repurposing disulfiram as an anti-cancer agent: Updated review on literature and patents. *Recent Pat. Anticancer*

- Drug Discov.* **14**, 113–132. doi 10.2174/1574892814666190514104035.
19. Solovieva M., Shatalin Y., Odinkova I., Krestinina O., Baburina Y., Mishukov A., Lomovskaya Y., Pavlik L., Mikheeva I., Holmuhamedov E., Akatov V. 2022. Disulfiram oxy-derivatives induce entosis or paraptosis-like death in breast cancer MCF-7 cells depending on the duration of treatment. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1866**, 130184. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130184>.
 20. Burger A., Amemiya Y., Kitching R., Seth A.K. 2006. Novel RING E3 ubiquitin ligases in breast cancer. *Neoplasia*. **8**, 689–695. <https://doi.org/10.1593/neo.06469>.
 21. Kona F.R., Buac D., Burger A.M. 2011. Disulfiram, and disulfiram derivatives as novel potential anticancer drugs targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. *Curr. Cancer Drug Targets*. **11**, 338–346. doi 10.2174/156800911794519798.
 22. Chen D., Cui Q.C., Yang H., Dou Q.P. 2006. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.* **66**, 10425–10433. doi 10.1158/0008-5472.CAN-06-2126.
 23. Huang H., Liao Y., Liu N., Hua X., Cai J., Yang C., Long H., Zhao C., Chen X., Lan X. et al. 2016. Two clinical drugs deubiquitinase inhibitor auranofin and aldehyde dehydrogenase inhibitor disulfiram trigger synergistic anti-tumor effects in vitro and in vivo. *Oncotarget*. **19**, 2796–2808. doi 10.18632/oncotarget.6425.
 24. Lövborg H., Oberg F., Rickardson L., Gullbo J., Nygren P., Larsson R. 2006. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor- κ B translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int. J. Cancer*. **118** (6), 1577–1580. doi 10.1002/ijc.21534.
 25. Kumari N., Jaynes P.W., Saei A., Iyengar P.V., Richard J.L.C., Eichhorn P.J.A. 2017. The roles of ubiquitin modifying enzymes in neoplastic disease. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. **1868**, 456–483. doi 10.1016/j.bbcan.2017.09.002.
 26. Buneeva O., Kopylov A., Kapitsa I., Ivanova E., Zgoda V., Medvedev A. 2018. The Effect of neurotoxin MPTP and neuroprotector isatin on the profile of ubiquitinated brain mitochondrial proteins. *Cells*. **7** (8), 91. <https://doi.org/10.3390/cells7080091>.
 27. Shatalin Y. 2022. Analysis of human carcinoma HEp-2 cell ubiquitome during the initiation of paraptosis-like death by disulfiram oxy-derivatives. *Mendeley Data*, V1. doi 10.17632/fjjtrfv5rv.1 <https://data.mendeley.com/datasets/fjjtrfv5rv/1>
 28. Szklarczyk D., Gable A.L., Nastou K.C., Lyon D., Kirsch R., Pyysalo S., Doncheva N.T., Legeay M., Fang T., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. 2021. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucl. Acids Res.* **49** (D1), D605–D612. doi 10.1093/nar/gkaa1074.
 29. Solovieva M.E., Shatalin Y.V., Solovyev V.V., Sazonov A.V., Kutysenko V.P., Akatov V.S. 2019. Hydroxycobalamin catalyzes the oxidation of diethyldithiocarbamate and increases its cytotoxicity independently of copper ions. *Redox Biol.* **20**, 28–37. doi 10.1016/j.redox.2018.09.016.
 30. Solovieva M., Shatalin Y., Fadeev R., Krestinina O., Baburina Y., Kruglov A., Kharechkina E., Kobayakova M., Rogachevsky V., Shishkova E., Akatov V.S. 2020. Vitamin B_{12b} enhances the cytotoxicity of diethyldithiocarbamate in a synergistic manner, inducing the paraptosis-like death of human larynx carcinoma cells. *Biomolecules*. **10** (1), 69. <https://doi.org/10.3390/biom10010069>.
 31. Wang Z., Zhang H., Liu J., Cheruiyot A., Lee J.H., Ordog T., Lou Z., You Z., Zhang Z. 2016. USP51 deubiquitylates H2AK13,15ub and regulates DNA damage response. *Genes Dev.* **30** (8), 946–959. doi 10.1101/gad.271841.115.
 32. Cao J., Yan Q. 2012. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front. Oncol.* **2**:26. doi 10.3389/fonc.2012.00026.
 33. Wang H., Zhai L., Xu J., Joo H.Y., Jackson S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Xiong Y., Zhang Y. 2006. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol. Cell*. **22**, 383–394. doi 10.1016/j.molcel.2006.03.035.
 34. Contrepois K., Mann C., Fenaille F. 2021. H2B type 1-K accumulates in senescent fibroblasts with persistent DNA damage along with methylated and phosphorylated forms of HMGAI. *Proteomes*. **9** (2), 30. doi 10.3390/proteomes9020030.
 35. Zhu Q., Huang J., Huang H., Li H., Yi P., Kloeber J.A., Yuan J., Chen Y., Deng M., Luo K., Gao M., Guo G., Tu X., Yin P., Zhang Y., Su J., Chen J., Lou Z. 2021. RNF19A-mediated ubiquitination of BARD1 prevents BRCA1/BARD1-dependent homologous recombination. *Nat. Commun.* **12**, 6653. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27048-3>.
 36. Xiong Y., Donovan K.A., Eleuteri N.A., Kirmani N., Yue H., Razov A., Krupnick N.M., Nowak R.P., Fischer E.S. 2021. Chemo-proteomics exploration of HDAC degradability by small molecule degraders. *Cell Chem. Biol.* **28** (10), 1514–1527. doi 10.1016/j.chembiol.2021.07.002.
 37. Li S., He J., Liao X., He Y., Chen R., Chen J., Hu S., Sun J. 2023. FBXO22 inhibits metastasis in triple-negative breast cancer through ubiquitin modification of KDM5A and regulation of H3K4me3 demethylation. *Cell Biol. Toxicol.* **39** (4), 1641–1655. doi 10.1007/s10565-022-09754-w.
 38. Ho S.R., Mahanic C.S., Lee Y.J., Lin W.C. 2014. RNF144A, an E3 ubiquitin ligase for DNA-PKcs, promotes apoptosis during DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111** (26), E2646–E2655. doi 10.1073/pnas.1323107111

39. Zhang N., Zhang Y., Qian H., Wu S., Cao L., Sun Y. 2020. Selective targeting of ubiquitination and degradation of PARP1 by E3 ubiquitin ligase WWP2 regulates isoproterenol-induced cardiac remodeling. *Cell Death Differ.* **27** (9), 2605–2619. doi 10.1038/s41418-020-0523-2.
40. Krastev D.B., Li S., Sun Y., Wicks A.J., Hoslett G., Weekes D., Badder L.M., Knight E.G., Marlow R., Pardo M.C., Yu L., Talele T.T., Bartek J., Choudhary J.S., Pommier Y., Pettitt S.J., Tutt A.N.J., Ramadan K., Lord C.J. 2022. The ubiquitin-dependent ATPase p97 removes cytotoxic trapped PARP1 from chromatin. *Nat. Cell Biol.* **24**, 62–73. doi 10.1038/s41556-021-00807-6.
41. Barman P., Kaja A., Chakraborty P., Guha S., Roy A., Ferdoush J., Bhaumik S.R. 2023. A novel ubiquitin-proteasome system regulation of Sgf73/ataxin-7 that maintains the integrity of the coactivator SAGA in orchestrating transcription. *Genetics.* **224** (3), iyad071. doi 10.1093/genetics/iyad071.
42. Liu D., Zhao Z., She Y., Zhang L., Chen X., Ma L., Cui J. 2022. TRIM14 inhibits OPTN-mediated autophagic degradation of KDM4D to epigenetically regulate inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **119** (7), e2113454119. doi 10.1073/pnas.2113454119.
43. Liu Y., Zhou Y. 2022. Circ_0087960 stabilizes KDM5B by reducing SKP2 mediated ubiquitination degradation and promotes osteogenic differentiation in periodontal ligament stem cells. *Regen. Ther.* **19**, 122–130. doi 10.1016/j.reth.2022.01.003.
44. Xu C., Meng F., Park K.S., Storey A.J., Gong W., Tsai Y.H., Gibson E., Byrum S.D., Li D., Edmondson R.D., Mackintosh S.G., Vedadi M., Cai L., Tackett A.J., Kaniskan H.Ü., Jin J., Wang G.G. 2022. A NSD3-targeted PROTAC suppresses NSD3 and cMyc oncogenic nodes in cancer cells. *Cell Chem. Biol.* **29** (3), 386–397. doi 10.1016/j.chembiol.2021.08.004
45. Lim H.J., Dimova N.V., Tan M.K., Sigoillot F.D., King R.W., Shi Y. 2013. The G2/M regulator histone demethylase PHF8 is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex containing CDC20. *Mol. Cell Biol.* **33** (21), 4166–4180. doi 10.1128/MCB.00689–13.
46. Macdonald J.I., Dick F.A. 2012. Posttranslational modifications of the retinoblastoma tumor suppressor protein as determinants of function. *Genes Cancer.* **3** (11–12), 619–633. doi 10.1177/1947601912473305.
47. Liu C., Yang Q., Zhu Q., Lu X., Li M., Hou T., Li Z., Tang M., Li Y., Wang H., Yang Y., Wang H., Zhao Y., Wen H., Liu X., Mao Z., Zhu W.G. 2020. CBP mediated DOT1L acetylation confers DOT1L stability and promotes cancer metastasis. *Theranostics.* **10** (4), 1758–1776. doi 10.7150/thno.39013.
48. Ishimoto K., Kawamata N., Uchihara Y., Okubo M., Fujimoto R., Gotoh E., Kakinouchi K., Mizohata E., Hino N., Okada Y., Mochizuki Y., Tanaka T., Hamakubo T., Sakai J., Kodama T., Inoue T., Tachibana K., Doi T. 2016. Ubiquitination of lysine 867 of the human SETDB1 protein upregulates its histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase activity. *PLoS One.* **11** (10), e0165766. doi 10.1371/journal.pone.0165766.
49. Timms R.T., Tchasovnikarova I.A., Antrobus R., Dougan G., Lehner P.J. 2016. ATF7IP-mediated stabilization of the histone methyltransferase SETDB1 is essential for heterochromatin formation by the HUSH complex. *Cell Rep.* **17** (3), 653–659. doi 10.1016/j.celrep.2016.09.050.
50. Xu W., Zhang X., Liu G., Zhu M., Wu Y., Jie Z., Xie Z., Wang S., Ma Q., Fan S., Fang X. 2020. Oxidative stress abrogates the degradation of KMT2D to promote degeneration in nucleus pulposus. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1866** (10), 165888. doi 10.1016/j.bbadis.2020.165888.
51. de Boer E., Ockeloen C.W., Kampen R.A., Hampstead J.E., Dingemans A.J.M., Rots D., Lütje L., Ashraf T., Baker R., Barat-Houari M., Angle B., Chattron N., Denommé-Pichon A.S., Devinsky O., Dubourg C., Elmslie F., Elloumi H.Z., Faivre L., Fitzgerald-Butt S., Geneviève D., Goos J.A.C., Helm B.M., Kini U., Lasa-Aranzasti A., Lesca G., Lynch S.A., Mathijssen I.M.J., McGowan R., Monaghan K.G., Odent S., Pfundt R., Putoux A., van Reeuwijk J., Santen G.W.E., Sasaki E., Sorlin A., van der Spek P.J., Stegmann A.P.A., Swagemakers S.M.A., Valenzuela I., Viora-Dupont E., Vitobello A., Ware S.M., Wéber M., Gilissen C., Low K.J., Fisher S.E., Vissers L.E.L.M., Wong M.M.K., Kleefstra T. 2022. Missense variants in ANKRD11 cause KBG syndrome by impairment of stability or transcriptional activity of the encoded protein. *Genet Med.* **24** (10), 2051–2064. doi 10.1016/j.gim.2022.06.007.
52. Fukuura K., Inoue Y., Miyajima C., Watanabe S., Tokugawa M., Morishita D., Ohoka N., Komada M., Hayashi H. 2019. The ubiquitin-specific protease USP17 prevents cellular senescence by stabilizing the methyltransferase SET8 and transcriptionally repressing *p21*. *J. Biol. Chem.* **294** (44), 16429–16439. doi 10.1074/jbc.RA119.009006.
53. Butler J.S., Dent S.Y. 2013. The role of chromatin modifiers in normal and malignant hematopoiesis. *Blood.* **121** (16), 3076–3084. doi 10.1182/blood-2012-10-451237.
54. Shi Y., Lan R., Matson C., Mulligan P., Whetstine J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* **119**, 941–953. doi 10.1016/j.cell.2004.12.012.
55. Xia M., Liu J., Wu X., Liu S., Li G., Han C., Song L., Li Z., Wang Q., Wang J., Xu T., Cao X. 2013. Histone methyltransferase Ash1l suppresses interleukin-6 production and inflammatory autoimmune diseases by inducing the ubiquitin-editing enzyme A20. *Immunity.* **39** (3), 470–481. doi 10.1016/j.immuni.2013.08.016.
56. Nowak S.J., Corces V.G. 2004. Phosphorylation of histone H3: A balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet.* **20**, 214–220. doi 10.1016/j.tig.2004.02.007.

Changes in Histone Code Regulation during the Initiation of Paraptosis-Like Death of HEp-2 Tumor Cells by Oxidized Disulfiram Derivatives

© 2024 г. М. Е. Solovieva^{1, *}, Yu. V. Shatalin¹, V. S. Akatov¹

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Russia*

**e-mail: m_solovieva@iteb.ru*

Disulfiram (DSF) and its oxidized derivatives (DSFoxy) are currently being investigated as possible anti-cancer agents. We previously found that DSFoxy initiate paraptosis-like death of tumor cells, which is of potential interest for the treatment of tumors resistant to the initiation of apoptosis. Based on bioinformatics analysis of mass spectrometric data on protein ubiquitination, we formulated a conception about the important role of disruption of the retrograde transport of damaged proteins from the endoplasmic reticulum to the cytosol in the mechanism of initiation of paraptosis-like cell death. In the present work, it was found that DSFoxy, in the process of initiating paraptosis-like death of human adenocarcinoma HEp-2 cells, also enhances the ubiquitination of histones and histone code enzymes. In particular, this applies to the ubiquitination of histone H2BC12, histone methyltransferases responsible for transcription and repair of damaged DNA, as well as acetylating and ubiquitin-conjugating proteins. Bioinformatics analysis of changes in ubiquitination of cell nuclear proteins using the STRING database revealed during this process an increase in the occurrence of ubiquitinated proteins (functional enrichment) of cell cycle regulation, cell response to DNA damage and DNA repair, the regulation of which also depends on the histone code. This directly indicates damage to the cell nucleus and is consistent with confocal microscopy data. These results indicate that when paraptosis-like death is initiated by DSFoxy, along with impairment of retrograde transport and ER stress, there is also a change in the regulation of the histone code, which points to a pleotropic mechanism of cell death induction.

Keywords: histone code, histones, histone ubiquitination, histone methylation, paraptosis, disulfiram

УДК 577.23

ВЛИЯНИЕ 20-ГИДРОКСИЭКДИЗОНА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МЫШЕЙ

© 2024 г. А. А. Семенова^{а, *}, А. Д. Игошкина^а, Н. В. Микина^а, Р. Г. Савченко^б,

Л. В. Парфенова^б, М. В. Дубинин^а

^аМарийский государственный университет, Йошкар-Ола, Республика Марий Эл, 424000 Россия

^бИнститут нефтехимии и катализа УФИЦ РАН, Уфа, 450075 Россия

Поступила в редакцию 16.03.2024

После доработки 01.04.2024

Принята к публикации 02.04.2024

В работе исследовано влияние фитостероида 20-гидроксиэкдизона (20E) на функционирование митохондрий скелетных мышц мышей. Показано, что 20E в концентрации 100 мкМ и более подавляет дыхание митохондрий, энергизованных глутаматом и малатом (субстраты комплекса I дыхательной цепи) или сукцинатом (субстрат комплекса II дыхательной цепи). Такое действие 20E сопровождается снижением мембранного потенциала органелл и связано с ингибированием активности комплекса III, а также суммарной активности комплексов I+III и II+III дыхательной цепи митохондрий. Нами отмечен проокислительный эффект 20E, который проявляется в увеличении продукции перекиси водорода митохондриями скелетных мышц. Кроме того, 20E снижает способность митохондрий поглощать и накапливать ионы кальция в матриксе. В работе обсуждаются механизмы возможного токсического действия 20E на функционирование митохондрий скелетных мышц.

Ключевые слова: митохондрии, 20-гидроксиэкдизон, окислительное фосфорилирование, дыхательная цепь, кальций, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S0233475524030067, **EDN:** csbitx

ВВЕДЕНИЕ

Экдистероиды представляют собой большое семейство полигидроксилированных стероидных гормонов беспозвоночных, которые регулируют линьку, метаморфозы и размножение членистоногих [1]. Эти вещества также синтезируются у 5–6% видов растений (фитостероиды), возможно, в качестве защиты от насекомых-фитофагов [2]. В природе было идентифицировано более 570 различных экдистероидов [3], однако наиболее изученным является 20-гидроксиэкдизон (20E, рис. 1). Исследования *in vivo* и *in vitro* выявили благотворное влияние 20E на млекопитающих: анаболическое, гиполипидемическое, антидиабетическое, противовоспалительное, гепатопротекторное и др. [3, 4].

Хотя экдистероиды не связываются со стероидными рецепторами позвоночных и механизм их действия до сих пор неизвестен, им приписывают многие полезные фармакологические свойства [5–7]. Сообщалось об увеличении массы тела, органов и мышечной массы, а также синтеза белка

при пероральном или внутрибрюшинном введении экдистероидов нескольким видам животных: японским перепелам [8], мышам [9], крысам [10] и свиньям [11]. Недавние исследования [12] показали, что 20E также обладает противоопухолевой активностью в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого. Кроме того, экдистерон может ингибировать рост клеток рака молочной железы

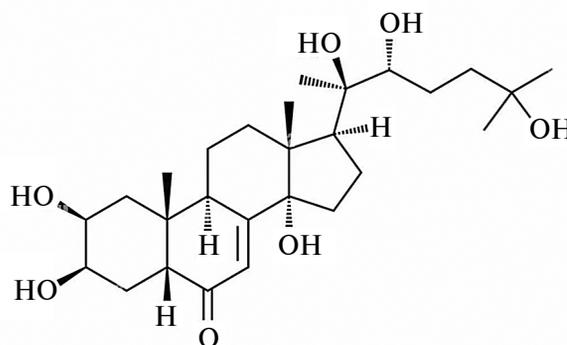


Рис. 1. Структурная формула 20E

Таблица 1. Влияние 20-гидроксиэкидизона на дыхание митохондрий скелетных мышц мышей в разных функциональных состояниях в присутствии глутамата/малата или сукцината

| 20E, мкМ | Состояние 2 | Состояние 3 | Состояние 4 | Состояние 3U _{ДНФ} | ДК | ADP /O |
|------------------------------|---|--------------|-------------|--------------------------------|------------|------------|
| | нмоль O ₂ /мин на 1 мг белка | | | | отн. ед. | |
| 2.5 мМ глутамат+2.5 мМ малат | | | | | | |
| 0 | 23.78±0.65 | 132.56±4.56 | 28.52±0.14 | 163.0±10.37 | 4.65±0.15 | 2.71±0.06 |
| 20 | 23.64±0.49 | 133.78±4.75 | 29.54±0.43 | 178.92±0.82 | 4.53±0.08 | 2.88±0.04 |
| 30 | 24.68±0.73 | 127.84±0.13 | 28.18±0.52 | 177.68±0.06 | 4.54±0.11 | 2.63±0.09 |
| 50 | 24.88±0.18 | 123.94±3.1 | 28.90±0.19 | 177.72±7.13 | 4.29±0.11 | 2.67±0.01 |
| 100 | 24.62±0.25 | 111.40±0.10* | 27.84±0.07 | 156.92±0.36 | 4.01±0.08* | 2.58±0.08 |
| 150 | 25.34±0.49 | 108.47±0.88* | 28.40±0.20 | 158.87±2.34 | 3.89±0.16* | 2.59±0.55 |
| 200 | 26.28±0.65 | 103.05±1.35* | 26.92±0.54 | 159.92±3.21 | 3.83±0.21* | 2.47±0.37* |
| 250 | 23.42±0.98 | 102.97±0.71* | 30.07±0.29 | 151.13±1.01* | 3.48±0.15* | 2.46±0.11* |
| 5 мМ сукцинат | | | | | | |
| 0 | 43.36±0.39 | 121.14±4.23 | 46.28±0.86 | 110.4±4.36 | 2.62±0.06 | 1.60±0.04 |
| 20 | 44.06±1.27 | 117.88±1.14 | 42.78±1.97 | 111.84±2.41 | 2.76±0.14 | 1.54±0.03 |
| 50 | 45.02±1.76 | 116.92±3.18 | 46.26±1.8 | 104.88±3.84 | 2.53±0.04 | 1.50±0.01 |
| 100 | 44.76±0.97 | 109.84±1.11* | 47.18±0.62 | 98.68±2.15 | 2.33±0.08* | 1.53±0.09 |
| 150 | 47.46±0.29 | 100.95±2.25* | 45.56±0.43 | 90.14±0.12* | 2.26±0.24* | 1.52±0.17 |
| 200 | 46.66±0.52 | 96.14±1.42* | 47.35±1.25 | 91.50±1.21* | 2.23±0.15* | 1.50±0.20 |
| 250 | 47.72±1.06 | 97.69±3.31* | 46.74±1.11 | 88.6±2.33* | 2.09±0.21* | 1.51±0.34 |

Примечание. Дыхание митохондрий в состоянии 3 индуцировали добавлением 200 мкМ ADP. Скорость разоб-щенного дыхания измеряли в присутствии 50 мкМ ДНФ (состояние 3U_{ДНФ}). Дыхательный контроль (ДК) рас-считан как отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 4$). * $p < 0.05$ против контроля (отсутствие 20E).

путем подавления гликолиза и митохондриальной биоэнергетики и индукции клеточной аутофагии и апоптоза раковых клеток, без влияния на здо-ровые клетки [13].

Ряд исследований свидетельствует о том, что мишенью 20E могут быть митохондрии млекопита-ющих. Было показано, что экидистерон оказывает терапевтическое действие при патологиях, связан-ных с митохондриальной дисфункцией и окисли-тельным стрессом [14–16]. Более того, положи-тельные эффекты 20E часто связаны с модуляцией

функций митохондрий посредством изменения различных клеточных процессов, однако неяс-но, являются ли его митохондриальные эффекты прямыми или опосредованы активацией других клеточных процессов. Можно предположить, что 20E способен влиять и на клеточную биоэнергетику и функционирование митохондрий, что могло бы оказать влияние и на работу клеток и организма в целом. В 2015 г. Парр и др. показали, что 20E проявляет свое действие в клетках млекопитаю-щих посредством взаимодействия с рецептором

эстрогена бета (ER- β) [17]. Хорошо известно, что активация эстрогенных рецепторов положительно влияет на функцию митохондрий. Так, активация эстрогенных рецепторов 17 β -эстрадиолом может защитить клетки нейробластомы человека от истощения АТФ, снижения мембранного потенциала митохондрий и образования активных форм кислорода [18]. Нильсен и др. показали, что применение 17 β -эстрадиола защищает первичные нейроны гиппокампа от эксайтотоксичности глутамата, стимулируя экспрессию Bcl-2 и способствуя толерантности митохондрий к кальциевой перегрузке [19]. Бурштейн и др. в 2018 г. показали, что ER- β также может модулировать открытие митохондриальной поры (MPT-поры), что оказывает важное влияние на способность этих органелл аккумулировать ионы кальция [20].

Ранее в нашей лаборатории было исследовано действие широкого круга природных полициклических соединений и, в частности, схожих с фитостероидами тритерпеноидов лупанового, фузиданового и олеананового ряда на функционирование изолированных митохондрий [21–23]. Установлено, что в зависимости от структуры и степени гидрофобности эти соединения с различной эффективностью подавляют дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий, ингибируя активность комплексов дыхательной цепи, обладают протонофорным и прооксидантным эффектом [21–23]. Эти митохондриально-направленные эффекты, по-видимому, лежат в основе цитотоксичности этих соединений.

Можно предположить, что 20E, будучи гидрофобным, также способен взаимодействовать с мембранами митохондрий и влиять на функциональную активность органелл. Поэтому в настоящей работе нами изучено влияние 20E на функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышей линии C57BL/10. Установлено, что 20E дозозависимо снижает параметры окислительного фосфорилирования митохондрий и мембранный потенциал органелл, что обусловлено ингибированием активности комплексов дыхательной цепи органелл. Это сопровождается увеличением продукции перекиси водорода митохондриями, а также подавлением способности органелл поглощать и аккумулировать ионы кальция в матриксе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий скелетных мышц мышей. Митохондрии из скелетных мышц мышей линии C57BL/10 (масса животных 25–28 г) выделяли методом дифференциального центрифугирования [24]. Мышцы (четырёхглавые мышцы обеих

задних конечностей) быстро извлекали и погружали в 5 мл ледяного фосфатно-солевого буфера (2.7 мМ KCl, 1.5 мМ KH_2PO_4 , 136.9 мМ NaCl, 8.9 мМ Na_2HPO_4 , pH 7.4) с добавлением 10 мМ EDTA. Затем мышцы разрезали на мелкие кусочки с удалением видимой жировой ткани, связок и соединительной ткани. Рассеченные мышцы ресуспендировали в 5 мл ледяного фосфатно-солевого буфера с добавлением 10 мМ EDTA и 0.05% трипсина в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 5 мин при 200g. Суспензию гомогенизировали в среде, содержащей 67 мМ сахарозы, 50 мМ KCl, 10 мМ EDTA, 0.2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 50 мМ буфера Трис–HCl (pH 7.4), используя ротационный гомогенизатор Ultra-Turrax T 10 basic (IKA, Япония) и переносили в гомогенизатор Поттера (соотношение массы ткани к среднему объему 1 : 8). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 700g. Митохондрии из надосадочной жидкости осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 8000g, ресуспендировали в 5 мл среды, содержащей 250 мМ сахарозы и 10 мМ буфера Трис–HCl (pH 7.4) и снова центрифугировали в течение 10 мин при 8000g. Концентрацию белка митохондрий определяли методом Бредфорд. Во время проведения эксперимента суспензию митохондрий (20–30 мг митохондриального белка в 1 мл) хранили на льду.

Оценка дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом с помощью кислородного электрода типа Кларк и установки Oxygraph+ (Hansatech Instruments, Великобритания) при 25°C и непрерывном перемешивании [25]. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 0.5 мМ EGTA, 5 мМ KH_2PO_4 и 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малата калия, 2.5 мМ глутамата калия, 5 мМ янтарной кислоты, 0.2 мМ ADP, 50 мкМ 2,4-динитрофенола (ДНФ) и 1 мкМ ротенона. Скорости окисления субстрата выражали в нмоль O_2 /мин/мг митохондриального белка. Оценивали дыхание митохондрий в основном метаболическом состоянии (т.е. в присутствии экзогенных субстратов или состояние 2), в состоянии 3 – дыхание, стимулированное ADP; состояние 4 – состояние митохондрий после того, как весь добавленный ADP был израсходован в процессе синтеза АТФ; скорость дыхания митохондрий в состоянии 3U_{ДНФ} – дыхание митохондрий в присутствии разбавителя 2,4-динитрофенола в концентрации 50 мкМ, вызывающей максимальную стимуляцию дыхания. Дыхательный контроль (ДК = состояние 3/состояние 4) и отношение ADP/O определяли в соответствии

с [26]. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.5 мг/мл.

Оценка активности комплексов дыхательной цепи митохондрий мышц. Влияние 20Е на активность комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий скелетных мышц оценивали с помощью специфических окислительно-восстановительных реакций по протоколу [27] с использованием планшетного спектрофотометра “Multiskan GO” (Thermo Fisher Scientific, США). Измерения проводили на разрушенных митохондриях, подвергнутых трем циклам замораживания/оттаивания при температуре $-20/+30^{\circ}\text{C}$ в гипотоническом буфере, содержащем 10 мМ Трис–HCl, pH 7.6. Влияние 20Е на активность комплексов дыхательной цепи выражали в процентах от средней активности, регистрируемой в серии контрольных экспериментов. Концентрация митохондриального белка составляла 20 мкг/мл.

Измерение мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$). Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению флуоресцентного зонда сафранина О через внутреннюю мембрану ($\lambda_{\text{ex}} = 520$ нм; $\lambda_{\text{em}} = 580$ нм) с использованием планшетного спектрофлуориметра Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) [28]. Митохондрии (0.5 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ сафранина О, 10 мкМ EGTA и 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ глутамата калия, 2.5 мМ малата калия, 5 мМ янтарной кислоты, 1 мкМ ротенона. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.5 мг/мл.

Оценка кальциевой емкости митохондрий скелетных мышц. Транспорт Ca^{2+} через внутреннюю митохондриальную мембрану оценивали спектрофотометрически с помощью индикатора арсеназо III (3,6-бис-[(2-арсонофенил)азо]-4,5-дигидрокси-2,7-нафталиндисульфокислота) при 675–685 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo, США) при 25°C и постоянном перемешивании [29]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 50 мкМ арсеназо III, 10 мкМ EGTA, 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малата калия, 2.5 мМ глутамата калия, 5 мМ янтарной кислоты, 1 мкМ ротенона. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла ~ 0.25 мг/мл. Для определения способности митохондрий удерживать Ca^{2+} , 20 мкМ CaCl_2 последовательно добавлялись в реакционную

среду. После нескольких добавлений происходило увеличение внешней $[\text{Ca}^{2+}]$, что указывало на массивное высвобождение иона из органелл вследствие открытия кальций-зависимой МРТ-поры. Способность Ca^{2+} индуцировать открытие поры в митохондриях выражалась количественно как кальциевая емкость (КЕ) митохондрий, т.е. то максимальное количество Ca^{2+} , которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры.

Определение скорости образования перекиси водорода митохондриями скелетных мышц мышцей. Скорость образования H_2O_2 в митохондриях измеряли с помощью тест-системы, включающей в себя флуоресцентный индикатор Amplex Red и пероксидазу хрена на планшетном флуориметре Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) при длинах волн возбуждения и флуоресценции 560 и 590 нм соответственно [23]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ EGTA и 10 мМ HEPES–KOH (pH 7.4), 10 мкМ Amplex Red и пероксидазу хрена (акт. 1 ед/мл). Концентрация митохондриального белка составляла 0.1 мг/мл. Измерения проводились при 37°C и постоянном перемешивании. Количество образованной перекиси водорода рассчитывалось по калибровочной кривой. Стандартный раствор H_2O_2 был приготовлен непосредственно в день проведения эксперимента; его концентрацию определяли с использованием коэффициента молярной экстинкции $\varepsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Статистическая обработка результатов. Данные были проанализированы с использованием программ Graph Pad Prizm 5 и Microsoft Excel и представлены как среднее \pm стандартная ошибка средней. Полученные данные были обработаны статистически с помощью U-критерия Манна–Уитни (достоверность различий принималась при $p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что длительная (в течение часа) инкубация изолированных митохондрий печени крыс с 20Е приводит к угнетению дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий печени крыс, энергизованных глутаматом и малатом [16]. Из данных табл. 1 можно видеть, что в наших условиях 20Е также дозозависимо снижает скорости дыхания митохондрий скелетных мышц мышцей в состоянии 3, однако достоверный эффект наблюдается лишь при концентрации этого агента 100 мкМ. В этом случае нами отмечено снижение скорости дыхания в состоянии 3 в 1.2 раза при энергизации органелл глутаматом и малатом (субстраты комплекса I дыхательной цепи) и в 1.1 раза при энергизации

митохондрий сукцинатом (субстрат комплекса II дыхательной цепи) в присутствии ротенона. Это сопровождается снижением дыхательного контроля митохондрий, отражающим эффективность сопряжения дыхания и фосфорилирования в органеллах, в 1.1 раза при энергизации органелл как субстратами комплекса I, так и комплекса II. Также можно отметить тенденцию к снижению скорости дыхания в присутствии протонофорного разобщителя ДНФ и параметра ADP/O, отражающего эффективность синтеза АТФ. Дальнейшее увеличение концентрации 20Е не приводит к существенным изменениям определяемых параметров. Наблюдается тенденция к последующему снижению скорости дыхания митохондрий в состоянии 3 и уменьшению коэффициента дыхательного контроля, однако при добавке 200 мкМ агента, по-видимому, наступает “фаза насыщения”, при которой дальнейшее увеличение концентрации не приводит к усилению эффекта.

Известно, что подавление дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях сопровождается снижением мембранного потенциала ($\Delta\psi$) органелл. Из рис. 2 можно видеть, что в концентрации 10 мкМ 20Е не оказывает влияния на $\Delta\psi$ органелл как при использовании глутамата и малата, так и сукцината в качестве субстратов дыхания. Однако увеличение его концентрации суммарно до 20 мкМ и далее сопровождается дозозависимым выходом потенциал-зависимого флуоресцентного зонда сафранина О из митохондрий,

что свидетельствует о снижении мембранного потенциала органелл. Полученные результаты отличаются от данных, полученных Баевым и соавторами [16], где показано, что длительная преинкубация изолированных митохондрий печени крыс с 20Е увеличивает мембранный потенциал органелл на 6–12% в зависимости от концентрации и условий эксперимента. Однако важно отметить, что такой вывод сделан на основе расчетов, учитывающих последующую деполяризацию органелл разобщителем СССР. При этом внесение 20Е непосредственно к изолированным митохондриям не оказывало существенного влияния на флуоресценцию родамина 123, использованного для измерения $\Delta\psi$, что свидетельствует об отсутствии действия 20Е на мембранный потенциал митохондрий печени.

Одной из причин снижения эффективности окислительного фосфорилирования и мембранного потенциала митохондрий под действием 20Е может быть подавление активности комплексов дыхательной цепи органелл и ее мобильных компонентов (кофермента Q и цитохрома c), что характерно для широкого круга стероидных соединений. Поэтому в следующей части работы мы изучили влияние 20Е на активность индивидуальных комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышей, а также суммарную активность комплексов I+III и II+III, позволяющую оценить мобильность кофермента Q между указанными индивидуальными комплексами. Из данных рис. 3 видно, что 20Е не оказывает влияния на активность

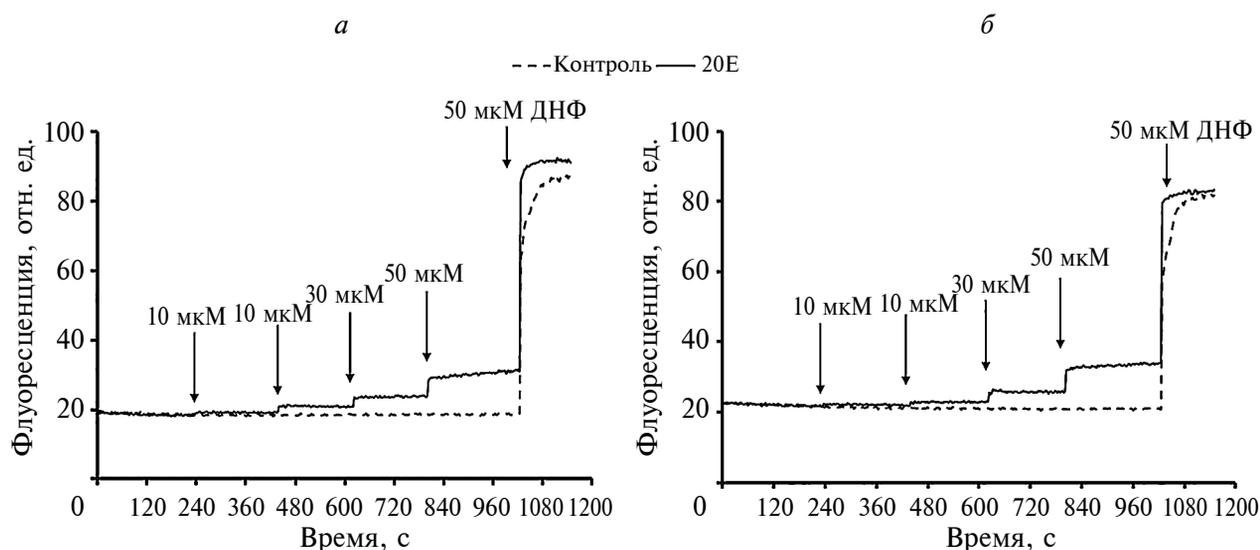


Рис. 2. Влияние 20Е на мембранный потенциал митохондрий скелетных мышц мышей, энергизованных глутамат/малатом (а) или сукцинатом (б). Субстраты и реагенты: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия (а), 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон (б). На каждом из рисунков представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

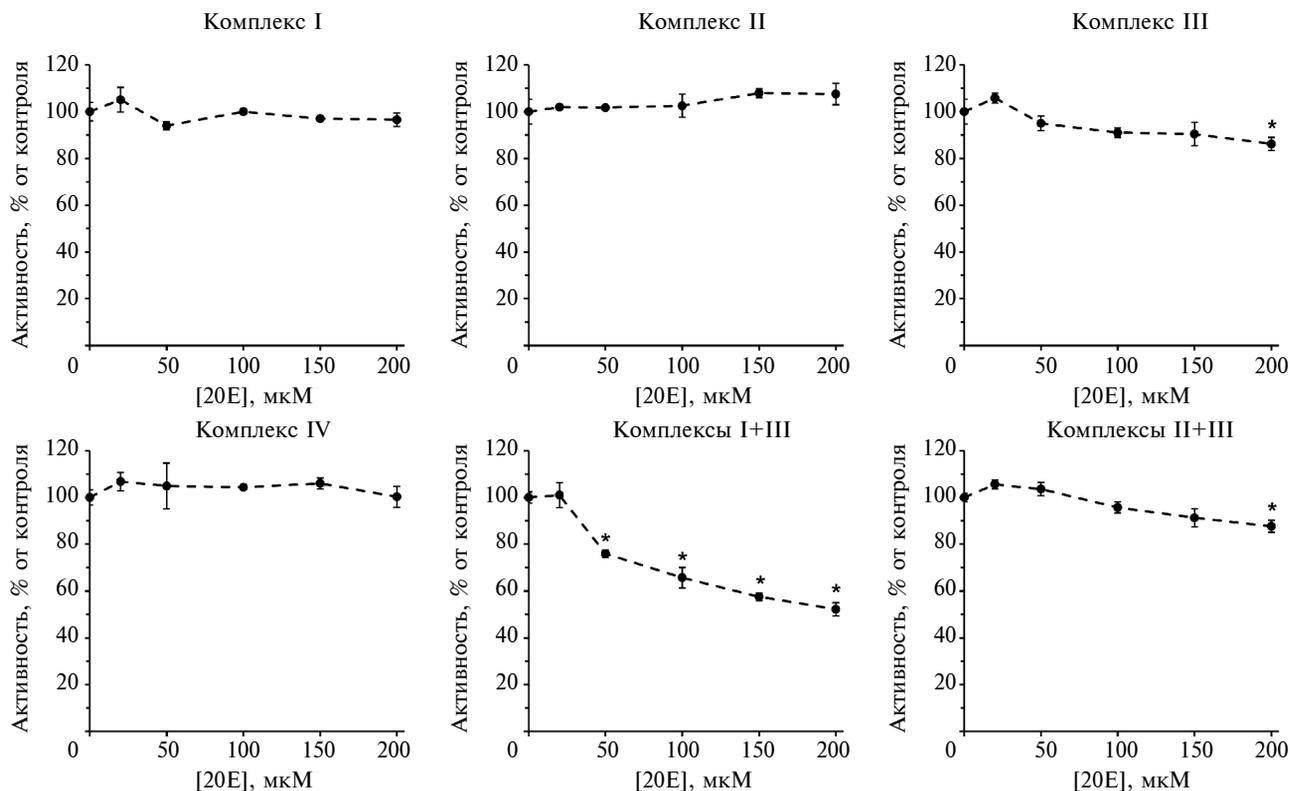


Рис. 3. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий в отсутствие и в присутствии различных концентраций 20-гидроксиэктона (значения в% активности по сравнению с контролем). Активность комплексов в отсутствие 20E принята за 100%. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$). * $p < 0.05$ против контроля (отсутствие 20E).

I, II и IV комплексов дыхательной цепи, но дозозависимо снижает активность комплекса III и II+III комплексов дыхательной цепи митохондрий (на 14 и 13% соответственно в максимальной концентрации 200 мкМ). Наибольшая эффективность 20E отмечена по отношению к суммарной активности комплексов I+III, уже 50 мкМ этого агента вызвало снижение активности на 24%. В этом случае полумаксимальное ингибирование активности комплексов I+III достигалось при концентрации 20E, равной 200 мкМ. Наблюдаемый эффект может свидетельствовать о том, что 20E способен снижать подвижность кофермента Q между комплексами I и III дыхательной цепи, а также менее эффективно между комплексами II и III. Кроме того, эктистерон также оказывает ингибирующее действие на активность комплекса III дыхательной цепи митохондрий, тем самым снижая эффективность переноса электронов от кофермента Q на цитохром c. Эктистероиды являются липофильными молекулами и, по некоторым данным [30], могут включаться в мембранный бислой и таким образом оказывать влияние на функцию мембранных белков. Вероятно, добавление 20E напрямую

к митохондриям позволяет этим молекулам воздействовать на их внутреннюю мембрану и подавлять активность локализованных в ней комплексов дыхательной цепи митохондрий.

Митохондрии являются одними из основных продуцентов АФК в клетках [31]. При этом ингибирование комплексов дыхательной цепи, реализуемое посредством различных механизмов, значительно влияет на интенсивность генерации АФК. В настоящей работе мы также оценили влияние 20E на скорость продукции H_2O_2 митохондриями скелетных мышц мышей. Можно видеть, что в случае энергизации органелл глутаматом и малатом 20E в максимальной концентрации 100 мкМ вызывает увеличение продукции перекиси водорода (рис. 4а), в то время как в условиях сукцинат-зависимого дыхания такого эффекта не наблюдалось (рис. 4б). Можно предположить, что прооксидантный эффект 20E связан как со снижением подвижности кофермента Q между комплексами I и III, II и III, так и ингибированием активности комплекса III дыхательной цепи. Известно, что эти участки дыхательной цепи митохондрий задействованы в генерации АФК, и ингибирование их активности

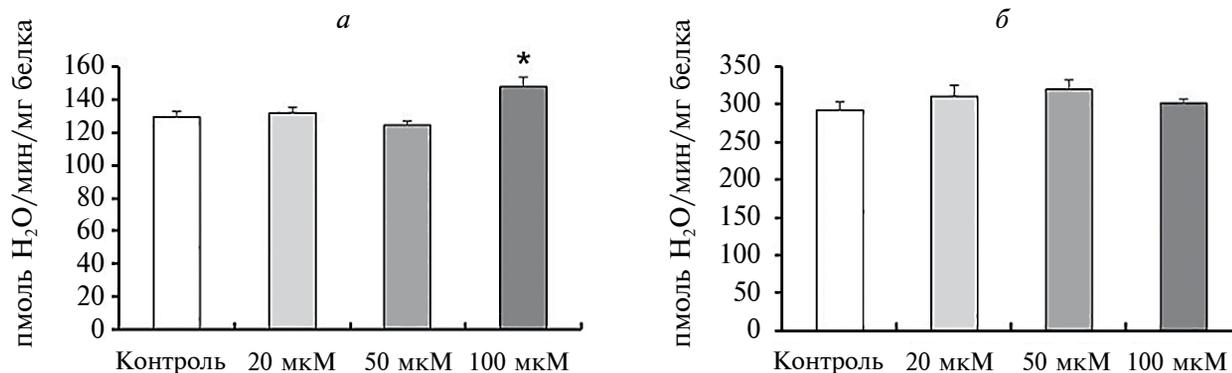


Рис. 4. Скорость образования H_2O_2 митохондриями скелетных мышц мышей, энергизованными глутаматом/малатом (а) или сукцинатом (б) в присутствии различных концентраций 20Е. Приведены средние значения \pm ошибка среднего ($n = 4$). * $p < 0.05$ (по сравнению с контролем).

способствует усилению их продукции. Это согласуется с данными, свидетельствующими о генерации супероксидного радикала в условиях *in vitro* в присутствии фитоэкдистероидов [32]. С другой стороны, важно отметить, что во многих работах, напротив, описаны антиоксидантные свойства экдистероидов [33–36]. В частности, исследовано антиоксидантное действие 20Е в нескольких системах *in vitro* [33]: показано уменьшение интенсивности перекисного окисления липидов в митохондриях печени крыс под действием этого агента. Наши результаты позволяют полагать, что антиоксидантное действие 20Е не связано с его прямым влиянием на митохондриальные мишени.

20Е известен как модулятор гомеостаза Ca^{2+} в клетках насекомых [37]. Митохондрии млекопитающих играют важную роль в регуляции внутриклеточного кальция [38, 39], и изменение их функциональной активности оказывает существенное влияние на митохондриальный Ca^{2+} -гомеостаз. В настоящей работе мы оценили влияние 20Е на способность митохондрий скелетных мышц поглощать и удерживать ионы кальция в матриксе. На рис. 5 представлены результаты сравнительного изучения кинетики поглощения Ca^{2+} митохондриями скелетных мышц мышей, энергизованными глутамат/малатом (рис. 5а) или сукцинатом (рис. 5б), инкубируемых в отсутствие и в присутствии 20-гидроксиэкдизона. Можно видеть, что митохондрии скелетных мышц мышей, энергизованные глутамат/малатом, полностью поглощают Ca^{2+} при условии добавления CaCl_2 4 раза по 20 мкМ (рис. 5а). В этом случае только после пятой добавки CaCl_2 наблюдается выход Ca^{2+} из митохондрий (рис. 5а), свидетельствующий об индукции кальций-зависимой МРТ-поры во внутренней мембране органелл. Предварительная инкубация митохондрий в присутствии 20Е в концентрациях 20, 50 и 100 мкМ не оказывает существенного

влияния на способность митохондрий поглощать ионы кальция (рис. 5а). В митохондриях, энергизованных сукцинатом, предварительная инкубация органелл со 100 мкМ 20Е приводит к снижению способности митохондрий поглощать ионы кальция, тогда как 20 и 50 мкМ 20Е не имеют подобного эффекта (рис. 5б). Способность Ca^{2+} индуцировать открытие поры в митохондриях можно выразить, используя параметр кальциевой емкости митохондрий, т.е. то максимальное количество Ca^{2+} , которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры [40]. Как показано на рис. 5в, 20Е не оказывает влияния на этот параметр митохондрий при энергизации органелл глутаматом и малатом во всех изученных концентрациях. В то же время при сукцинат-зависимом дыхании 100 мкМ 20Е вызывают достоверное снижение кальциевой емкости митохондрий скелетных мышц мышей по сравнению с контролем (рис. 5г). Полученные результаты свидетельствуют о том, что подавление функциональной активности митохондрий под действием 20Е также способствует снижению способности митохондрий эффективно аккумулировать ионы кальция в матриксе.

Таким образом, результаты исследования позволяют полагать, что потенциальные терапевтические эффекты фитоэкдистероидов и, в частности, 20Е скорее осуществляются через специфические рецепторы стероидов, в то время как цитотоксические эффекты могут проявляться при более высоких концентрациях 20Е, в том числе путем прямого воздействия на функциональную активность митохондрий. 20Е способен подавлять функционирование комплексов дыхательной цепи митохондрий и способствовать уменьшению эффективности окислительного фосфорилирования. Кроме того, это сопровождается снижением мембранного потенциала митохондрий, увеличением продукции АФК, а также угнетением способности органелл

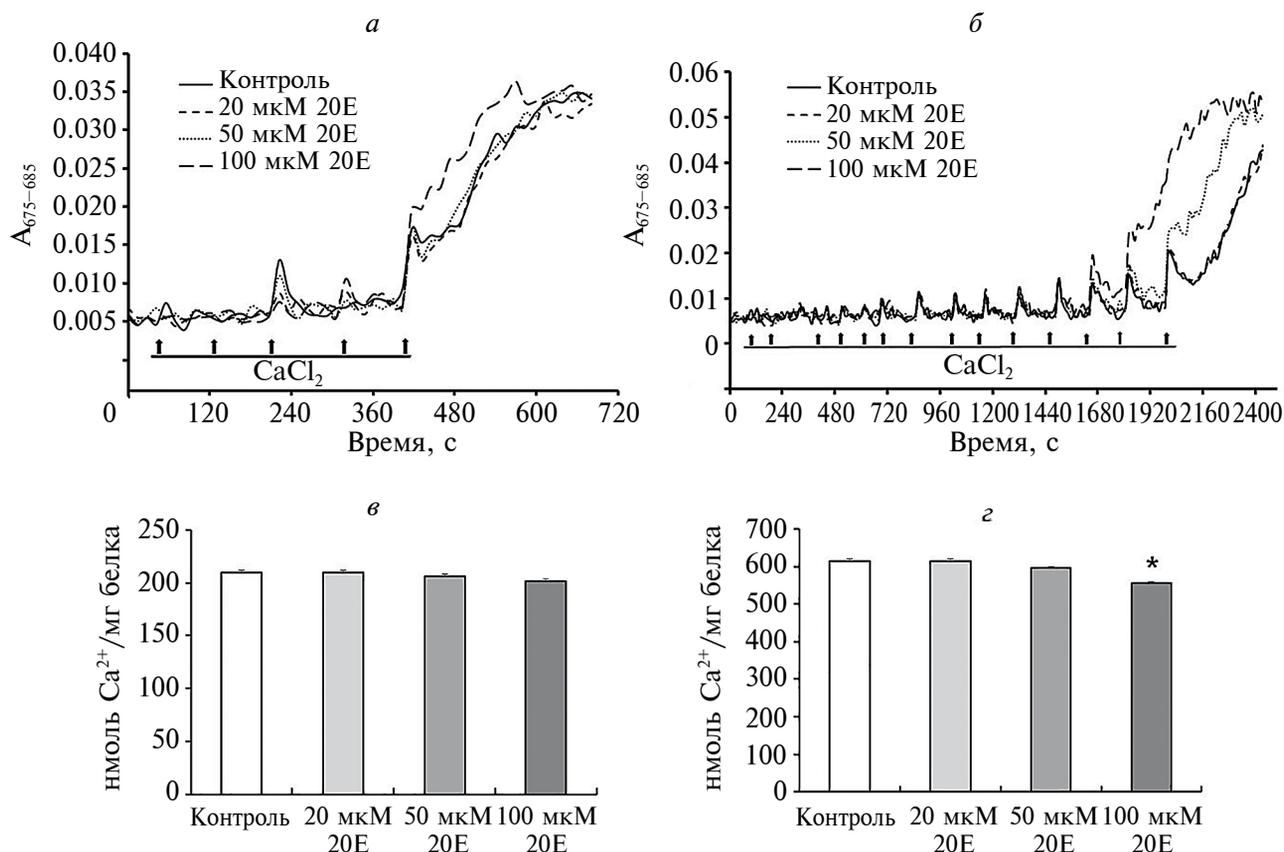


Рис. 5. Влияние 20Е на транспорт кальция в митохондриях скелетных мышц мышей. Поглощение добавок Ca^{2+} (пульсы по 20 μM) митохондриями скелетных мышц, энергизованными глутамат/малатом (а) и сукцинатом (б) в отсутствие (контроль) и в присутствии добавок. Кальциевая емкость митохондрий скелетных мышц мышей в отсутствие (контроль) и в присутствии различных концентраций 20Е, энергизованных глутамат/малатом (в) и сукцинатом (г). * $p < 0.05$ (по сравнению с контролем).

аккумулировать ионы кальция. В условиях *in vivo* такие эффекты 20Е на митохондрии скелетных мышц могут повлиять на способность органелл синтезировать АТФ, необходимый, прежде всего, для сокращения скелетной мускулатуры, а также на кальциевый гомеостаз, играющий важную роль в корректной регуляции циклов сокращения и расслабления мышечных волокон. Полученные данные следует учитывать при интерпретации результатов *in vivo* экспериментов.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-75-01061.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koolman J. 1989. *Ecdysone: From chemistry of mode of action*. Stuttgart: Thieme Verlag, 482 p.
2. Toth N., Szabo A., Kacsala P., Heger J., Zador E. 2008. 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomedicine*. **15** (9), 691–698.
3. Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I.D. 2002. *The ecdysone handbook*. 3rd ed. Prague: Cybersales.
4. Savchenko R.G., Veskina N.A., Odinkov V.N., Benkovskaya G.V., Parfenova L.V. 2022. Ecdysteroids: Isolation, chemical transformations, and biological activity. *Phytochem. Rev.* **21**, 1445–1486. doi 10.1007/s11101-021-09792-y.
5. Bathori M., Toth N., Hunyadi A., Marki A., Zador E. 2008. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids – structure and effects on humans. *Curr. Med. Chem.* **15**, 75–91.
6. Slama K., Lafont R. 1995. Insect hormones – ecdysteroids: Their presence and actions in vertebrates. *Eur. J. Entomol.* **92**, 355–377.

7. Dinan L., Lafont R. 2006. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J. Endocrinol.* **191** (1), 1–8. doi 10.1677/joe.1.06900.
8. Slama K., Koudela K., Tenora J., Mathova A. 1996. Insect hormones in vertebrates: Anabolic effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese quails. *Experientia.* **52**, 702–706.
9. Stopka P., Stancl J., Slama K. 1999. Effect of insect hormone, 20-hydroxyecdysone on growth and reproduction in mice. *Acta Soc. Zool. Bohemicae.* **63**, 367–378.
10. Syrov V.N. 2000. Comparative experimental investigations of the anabolic activity of phytoecdysteroids and steranabols. *Pharm. Chem. J.* **34**, 193–197.
11. Kratky F., Opletal L., Hejhalek J., Kucharova S. 1997. Effect of 20-hydroxyecdysone on the protein synthesis of pigs. *Zivocisna Vyroba.* **42**, 445–451.
12. Shuvalov O., Kirdeeva Y., Fefilova E., Netsvetay S., Zorin M., Vlasova Y., Fedorova O., Daks A., Parfenyev S., Barlev N. 2023. 20-Hydroxyecdysone Confers antioxidant and antineoplastic properties in human non-small cell lung cancer cells. *Metabolites.* **13**, 656. <https://doi.org/10.3390/metabo13050656>
13. Romaniuk-Drapała A., Lisiak N., Toton E., Matysiak A., Nawrot J., Nowak G., Kaczmarek M., Rybczyńska M., Rubiś B. 2021. Proapoptotic and proautophagic activity of 20-hydroxyecdysone in breast cancer cells in vitro. *Chem. Biol. Interact.* **342**, 109479. doi 10.1016/j.cbi.2021.109479.
14. Xia X., Zhang Q., Liu R., Wang Z., Tang N., Liu F., Huang G., Jiang X., Gui G., Wang L., Sun X. 2014. Effects of 20-hydroxyecdysone on improving memory deficits in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rat. *Eur. J. Pharmacol.* **5**, 740, 45–52. doi 10.1016/j.ejphar.2014.06.026.
15. Mallek A., Movassat J., Ameddah S., Liu J., Semiane N., Khalkhal A., Dahmani Y. 2018. Experimental diabetes induced by streptozotocin in the desert gerbil, *Gerbillus gerbillus*, and the effects of short-term 20-hydroxyecdysone administration. *Biomed. Pharmacother.* **102**, 354–361. doi 10.1016/j.biopha.2018.03.070.
16. Baev A.Y., Charishnikova O.S., Khasanov F.A., Nebesnaya K.S., Makhmudov A.R., Rakhmedova M.T., Khushbaktova Z.A., Syrov V.N., Levitskaya Y.V. 2022. Ecdysterone prevents negative effect of acute immobilization stress on energy metabolism of rat liver mitochondria. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **219**, 106066. doi 10.1016/j.jsbmb.2022.106066.
17. Parr M.K., Botre F., Nass A., Hengevoss J., Diel P., Wolber G. 2015. Ecdysteroids: A novel class of anabolic agents? *Biol. Sport.* **32**, 169–173.
18. Wang J., Green P.S., Simpkins J.W. 2001. Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* **77** (3), 804–811. doi 10.1046/j.1471-4159.2001.00271.x.
19. Nilsen J., Diaz Brinton R. 2003. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: Regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100** (5), 2842–2847. doi 10.1073/pnas.0438041100.
20. Burstein S.R., Kim H.J., Fels J.A., Qian L., Zhang S., Zhou P., Starkov A.A., Iadecola C., Manfredi G. 2018. Estrogen receptor beta modulates permeability transition in brain mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* **1859** (6), 423–433. doi 10.1016/j.bbabo.2018.03.006.
21. Dubinin M.V., Ilzorkina A.I., Salimova E.V., Landage M.S., Khoroshavina E.I., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N., Parfenova L.V. 2023. Effect of fusidic acid and some nitrogen-containing derivatives on liposomal and mitochondrial membranes. *Membranes (Basel).* **13** (10), 835. doi 10.3390/membranes13100835.
22. Dubinin M.V., Nedopekina D.A., Ilzorkina A.I., Semenova A.A., Sharapov V.A., Davletshin E.V., Mikhina N.V., Belsky Y.P., Spivak A.Y., Akatov V.S., Belosludtseva N.V., Liu J., Belosludtsev K.N. 2023. Conjugation of triterpenic acids of ursane and oleanane types with mitochondria-targeting cation F16 synergistically enhanced their cytotoxicity against tumor cells. *Membranes (Basel).* **13** (6), 563. doi 10.3390/membranes13060563.
23. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., Mikheeva I.B., Yashin V.A., Penkov N.V., Vydrina V.A., Ishmuratov G.Y., Sharapov V.A., Khoroshavina E.I., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. 2020. Effect of betulin and betulonic acid on isolated rat liver mitochondria and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1862** (10), 183383. doi 10.1016/j.bbamem.2020.183383.
24. Dubinin M.V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Sharapov M.G., Belosludtsev K.N. 2020. Duchenne muscular dystrophy is associated with the inhibition of calcium uniport in mitochondria and an increased sensitivity of the organelles to the calcium-induced permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1866** (5), 165674. doi 10.1016/j.bbadis.2020.165674.
25. Dubinin M.V., Svinin A.O., Vedernikov A.A., Starinets V.S., Tenkov K.S., Belosludtsev K.N., Samartsev V.N. 2019. Effect of hypothermia on the functional activity of liver mitochondria of grass snake (Natrix natrix): Inhibition of succinate-fueled respiration and K⁺ transport, ROS-induced activation of mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* **51** (3), 219–229.
26. Chance B., Williams G.R. 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* **217** (1), 383–393.
27. Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L., Angelini C. 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* **7** (6), 1235–1246. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058>.

28. Dubinin M.V., Sharapov V.A., Izorkina A.I., Efimov S.V., Klochkov V.V., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. 2022. Comparison of structural properties of cyclosporin A and its analogue alisporivir and their effects on mitochondrial bioenergetics and membrane behavior. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **864** (9), 183972.
29. Dubinin M.V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Belosludtsev K.N. 2020. Transport of Ca²⁺ and Ca²⁺-dependent permeability transition in heart mitochondria in the early stages of Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics.* **1861** (10), 148250.
30. Lafont R., Dinan L. 2003. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: An update. *J. Insect. Sci.* **3**, 7. doi 10.1093/jis/3.1.7.
31. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Мерфи Э.Н., Старков А.А. 2015 Митохондриальный метаболизм активных форм кислорода: десять лет спустя (обзор). *Биохимия.* **80** (5), 612–630.
32. Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Давыдов В.В., Дармограй В.Н. 2012. Исследование прямой антиоксидантной активности фитоэксдистерона *in vitro*. *Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова.* **1**, 51–57.
33. Kuzmenko A.I., Niki E., Noguchi H. 2001. New functions of 20-hydroxyecdysone in lipid peroxidation. *J. Oleo Sci.* **50** (6), 497–506.
34. Cai Y.J., Dai J.Q., Fang J.G., Ma L.P., Hou L.F., Yang L., Liu Z.L. 2002. Antioxidative and free radical scavenging effects of ecdysteroids from *Serratula stragulata*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80** (12), 1187–1194. doi 10.1139/y02–152.
35. Sahach V.F., Korkach Iu.P., Kotsiuruba A.V., Rudyk O.V., Vavilova H.L. 2008. Mitochondrial permeability transition pore opening inhibition by ecdysterone in heart mitochondria of aging rats. *J. Phys.* **54** (4), 3–10.
36. Das N., Mishra S.K., Bishayee A., Ali E.S., Bishayee A. 2021. The phytochemical, biological, and medicinal attributes of phytoecdysteroids: An updated review. *Acta. Pharm. Sin. B.* **11** (7), 1740–1766. doi 10.1016/j.apsb.2020.10.012.
37. Li Y.B., Li X.R., Yang T., Wang J.X., Zhao X.F. 2016. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes switching from autophagy to apoptosis by increasing intracellular calcium levels. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **79**, 73–86. doi 10.1016/j.ibmb.2016.10.004.
38. Дубинин М.В., Белослудцев К.Н. 2019. Таксономические особенности механизмов специфического транспорта Ca²⁺ в митохондриях. *Биол. мембраны.* **36** (4), 231–241. doi 10.1134/S0233475519040030.
39. Белослудцев К.Н., Дубинин М.В., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. 2019. Транспорт ионов Ca²⁺ митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки. *Биохимия.* **84** (6), 759–775.
40. Rasola A., Bernardi P. 2011. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* **50**, 222–233.

The Effect of 20-Hydroxyecdysone on the Functioning of Isolated Mouse Skeletal Muscle Mitochondria

© 2024 г. А. А. Semenova^{1,*}, А. D. Igoshkina¹, N. V. Mikina¹, R. G. Savchenko²,

L. V. Parfenova², M. V. Dubinin¹

¹Mari State University, Yoshkar-Ola, 424001 Russia

²Institute of Petrochemistry and Catalysis, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450075 Russia

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

This work shows the effect of the phytoecdysteroid 20-hydroxyecdysone (20E) on the functioning of mouse skeletal muscle mitochondria. It has been shown that 20E at a concentration of 100 μM or more suppresses mitochondrial respiration fueled by glutamate and malate (substrates of complex I of the respiratory chain) or succinate (substrate of complex II of the respiratory chain). This effect of 20E is accompanied by a decrease in the membrane potential of organelles and is associated with inhibition of the activity of complex III, the total activity of complexes I+III and II+III of the mitochondrial respiratory chain. We have noted the prooxidant effect of 20E, which manifests itself in an increase in the production of hydrogen peroxide by skeletal muscle mitochondria. In addition, 20E reduces the ability of mitochondria to accumulate calcium ions in the matrix. The paper discusses the mechanisms of the possible toxic effect of 20E on the functioning of skeletal muscle mitochondria.

Keywords: mitochondria, 20-hydroxyecdysone, oxidative phosphorylation, respiratory chain, calcium, reactive oxygen species

УДК 576.38, 57.085.23, 57.085.25

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА НА ОСНОВЕ АЦЕДАНА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА (H₂S) В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

© 2024 г. Р. Р. Шарипов^а, И. А. Таржанов^{б, с}, А. А. Згодова^{б, с}, З. В. Бакаева^{б, д},
А. М. Сурин^{а, *}

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

^бНациональный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Москва, 119296 Россия

^сПервый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, 119435 Россия

^дКалмыцкий 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, H₂S), который при физиологических условиях существует в клетках преимущественно в форме аниона HS⁻, рассматривают в качестве газообразного трансмиттера меж- и внутриклеточных сигналов наравне с монооксидами азота и углерода. Анализ динамики содержания H₂S 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 H₂S присоединяли сульфгидрильную группу, образуя флуоресцирующие карбоциклические соединения. По спектральным характеристикам и скорости реагирования с H₂S 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 H₂S 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 Na₂S (донора H₂S, 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 (NaHCO₃, 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 Mg²⁺) 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 H₂S чувствителен к изменению солевого состава внутриклеточной среды и может перераспределяется в клетках между водным и более гидрофобным окружением. Эти обстоятельства затрудняют интерпретацию роста флуоресценции P3 в клетках как количественного показателя наличия H₂S и требуют дополнительных исследований свойств этого и структурно родственных зондов H₂S.

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- β -синтазой и цистатионин- γ -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 α -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 плащечном 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 MgCl₂, 2 NaH₂PO₄, 1 Na₂HPO₄, 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 г, 2×5 мин, 4°C), осадок ресуспендировали до концентрации 10⁶ 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 (MatTek, США). Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C, в атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO₂, 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 Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) 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% CO₂). При выполнении флуоресцентно-микроскопических измерений нейробазальную среду замещали водно-солевым буфером, содержащим (мМ) 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 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 Na₂S 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 (Na₂S, 100 мкМ) представлена на рис. 2. Благодаря гидролизу, Na₂S служит стандартным донором SH⁻/H₂S [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⁻/H₂S (после добавления Na₂S). Измерения флуоресценции показали, что за время смешивания P3 с Na₂S, раскапывания растворов по лункам и запуска регистрации (в совокупности около 5 мин) успевало пройти около 70% реакции P3 с H₂S. Относительные изменения флуоресценции соответствуют данным работы [1] для таких же концентраций зонда и Na₂S.

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

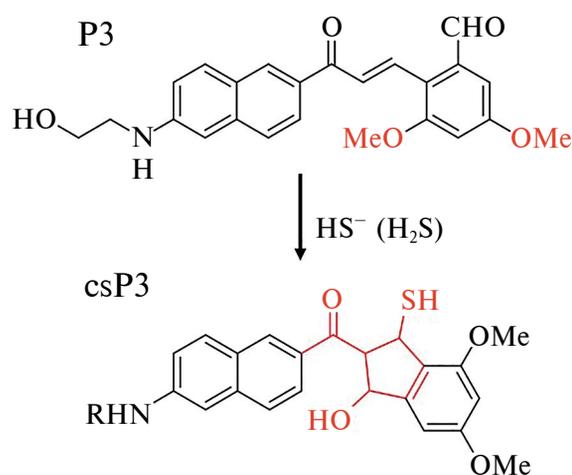


Рис. 1. Структура слабо флуоресцирующего соединения P3 и сильно флуоресцирующего продукта его взаимодействия с сульфидом водорода и сульфид-ионом в водном растворе (заимствовано с изменениями из [1]).

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 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 Na_2S (300 мкМ).

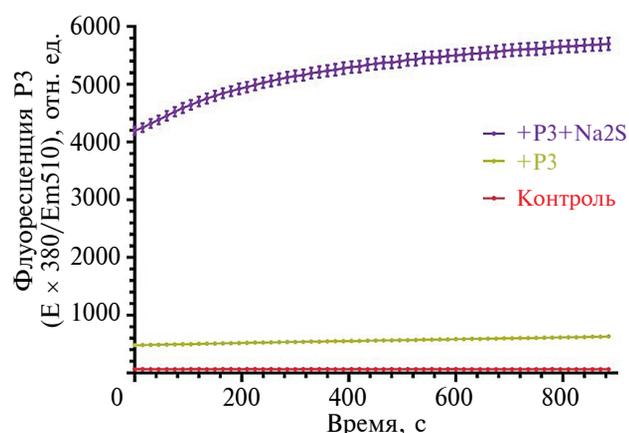


Рис. 2. Изменения флуоресценции, вызванные добавкой сульфида натрия (Na_2S , 100 мкМ), служащего донором H_2S , к раствору P3 (10 мкМ). Состав минимального солевого раствора (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 20 HEPES, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 pH 7.4. Длины волн возбуждения (E_x) и регистрации флуоресценции (E_m) соответственно 380 ± 8 и 510 ± 10 нм. Концентрации P3 и Na_2S соответственно 10 и 100 мкМ.

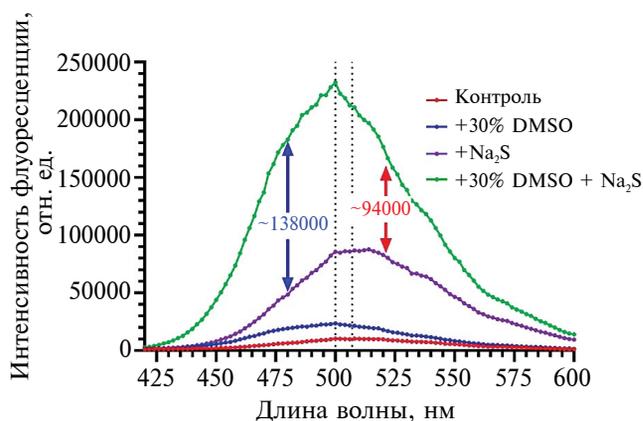


Рис. 3. Спектры флуоресценции исходного P3, его карбоциклического сульфидрильного производного (csP3), образовавшегося при добавлении Na_2S , и влияние полярности среды на флуоресценцию P3 и csP3. Спектры записаны через 20 мин после смешения P3 с Na_2S . Концентрации реагентов и состав раствора как на рис. 2. Спектры P3+DMSO и csP3+DMSO получены после добавления к соответствующим растворам DMSO (30% по объему). Длина волны возбуждения флуоресценции 380 ± 8 нм.

Оказалось, что в растворе, приближенном по солевому составу к **внутриклеточному**, добавление Na_2S 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 NaHCO_3) [26], медленно увеличивало флуоресценцию в обоих растворах в отсутствие Na_2S (рис. 4б, 4г). Наличие бикарбоната практически не влияло на сигнал csP3 в присутствии Na_2S в обоих растворах (рис. 4б, 4г). Плавный рост флуоресценции в лунках, не имевших Na_2S , но содержавших NaHCO_3 , обусловлен, возможно, абсорбцией газообразного H_2S , образовавшегося в соседних лунках, в которые добавляли Na_2S .

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

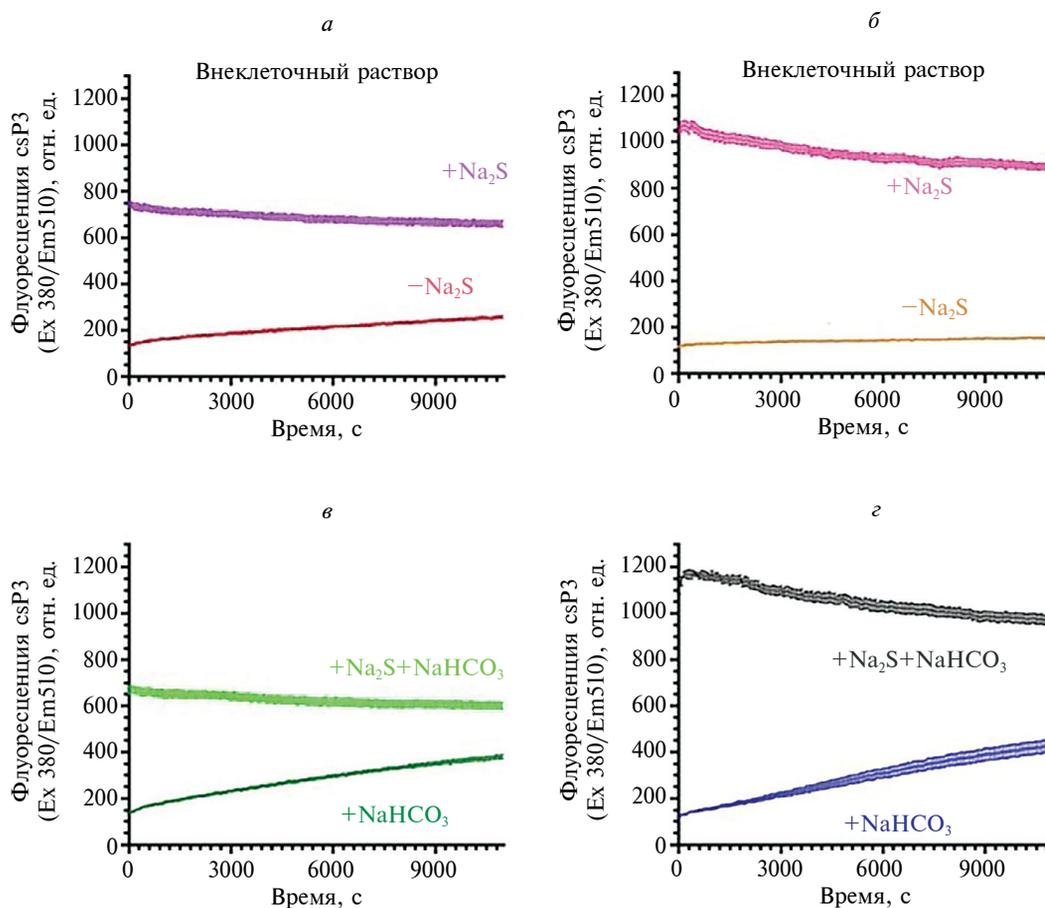


Рис. 4. Влияние солевого состава раствора на флуоресценцию H_2S -зонда csP3. Флуоресценция csP3 в растворе, приближенном по составу солей к внеклеточной среде (а) и к минимальному солевому составу цитозоля (в), и влияние бикарбоната натрия ($NaHCO_3$, 10 мМ) на флуоресценцию csP3 во внеклеточном (б) 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 ± 16 и 520 ± 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 ± 16 и 520 ± 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).

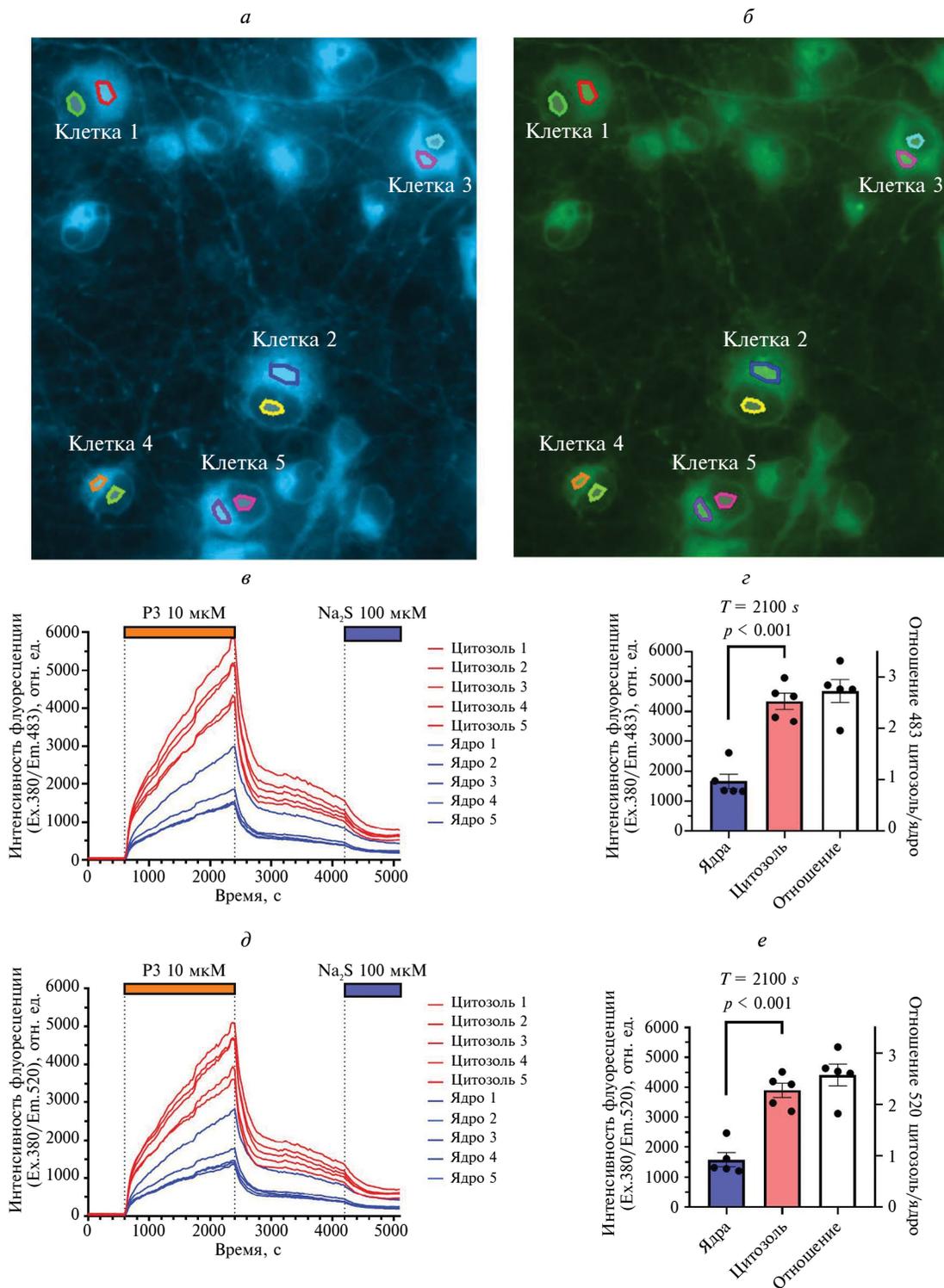


Рис. 5. Флуоресценция производного P3 в области ядра существенно ниже, чем в области цитозоля. *a, б* – Изображения нейронов при возбуждении при 387 нм и регистрации эмиссии при 483 ± 16 (*a*) и 520 ± 18 нм (*б*); получены через 23 мин после добавления P3. На изображениях выделены ROI, кинетика изменений интенсивности которых приведена на графиках *в, д*. Изменения в области ядра обозначены синим цветом, в области цитозоля – красным. На панелях *г, е* 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 P3. 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 трансммитера 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 газотрансммитера 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,

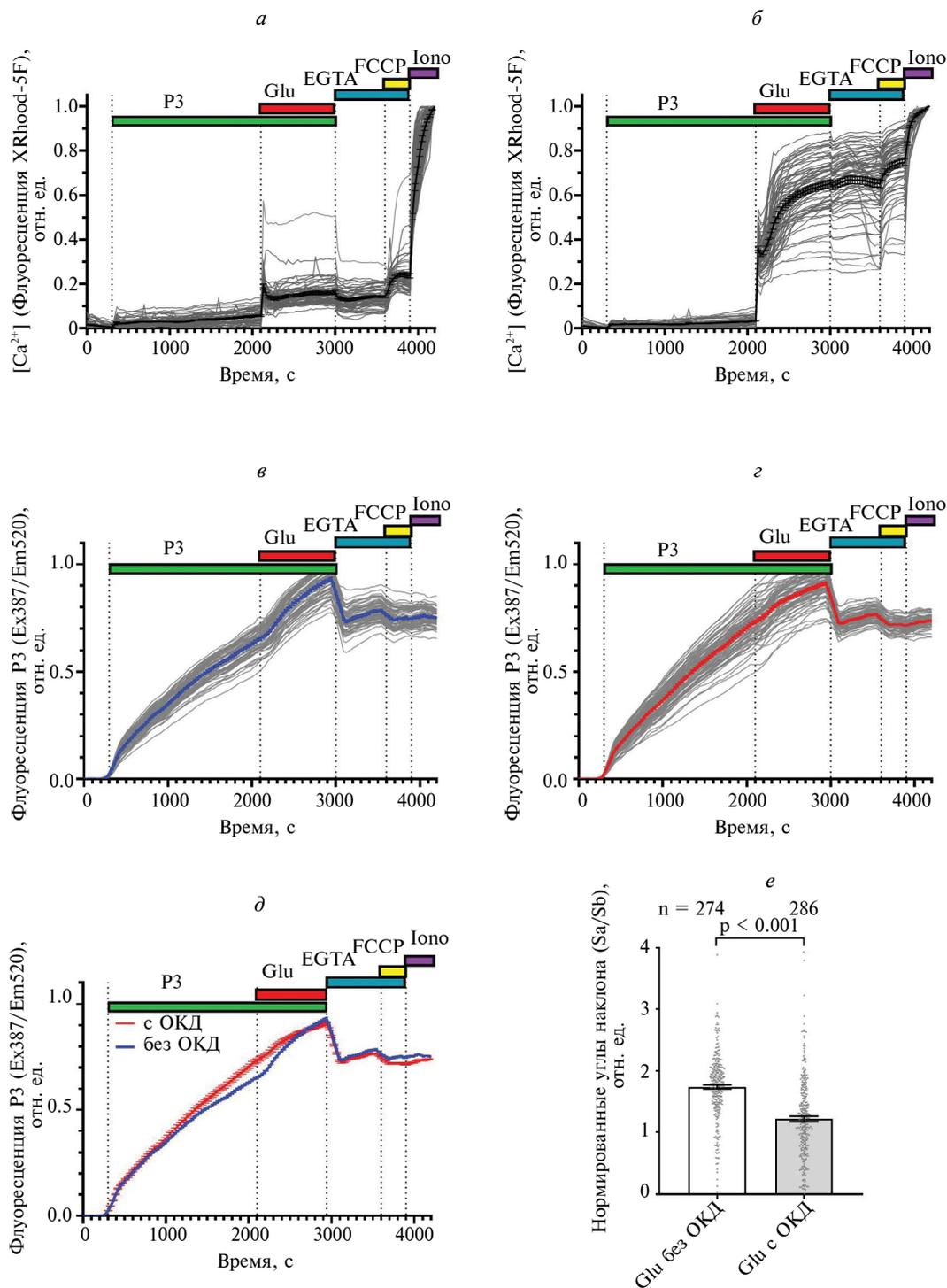


Рис. 6. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и флуоресцентных сигналов H_2S -зонда P3 в some клетках при действии глутамата (Glu). *a, б* – Изменения $[Ca^{2+}]_i$; *в, з, д* – изменения сигналов P3/csP3, *е* – изменения относительных наклонов графиков флуоресценции P3/csP3 (нормализованные углы наклона), вызванные 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 ± 10 , эмиссия 641 ± 37 нм). Глутамат (Glu, 10 мкМ) добавляли в безмагниевого раствора, 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 H₂S-зонда происходило с 1.5–2-минутной задержкой относительно индуцированного глутаматом скачка [Ca²⁺]_i (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⁺/K⁺- и Ca²⁺-АТФ-азы, поддерживающие ионный гомеостаз и, соответственно, резко активируют окислительное фосфорилирование в митохондриях, снабжающих эти насосы АТФ. В результате митохондрии значительно увеличивают продукцию CO₂ и HCO₃⁻. Наличие бикарбоната значительно влияет на кинетику взаимодействия P3 с донором H₂S и HS⁻, по крайней мере в тех случаях, когда донором служит Na₂S 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 HCO₃⁻.

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 H₂S и быстрее с ним реагирующих, продолжается [15, 35]. Появляются альтернативные сенсоры H₂S, принцип действия которых основан на отделении под действием H₂S группы, тушащей флуоресценцию, от потенциального флуорофора [17], или химической модификации тушащей группы без присоединения H₂S [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 H₂S и HS⁻, 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 H₂S и/или аниона HS⁻.

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 № FGUFU-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 H₂S 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 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 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 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. Sharipov¹, I. A. Tarzhanov^{2,3}, A. A. Zgodova^{2,3}, Z. V. Bakaeva^{2,4}, A. M. Surin^{1,*}

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

²National Medical Research Center of Children's Health, Russian Ministry of Health, Moscow, 119296 Russia

³Institute of Pharmacy, The Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Ministry of Health, Moscow, 119435 Russia,

⁴Gorodovikov Kalmyk State University, Elista, 358000 Russia

*e-mail: surin_am@mail.ru

Hydrogen sulfide (H_2S), which, under physiological conditions, exists in cells mainly in the form of anion HS^- , is considered as a gaseous transmitter of inter- and intracellular signals along with nitrogen oxide and carbon monoxide. Analysis of the dynamics of H_2S 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 H_2S 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 H_2S . In this work, we tested the suitability of csP3 to record H_2S 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 (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 μM , in the presence of 10 μM glycine, 0 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 H_2S 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 H_2S concentration. To confirm the feasibility of using P3 and structurally related probes as quantitative indicators of H_2S presence, additional studies of the properties of these compounds are needed.

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

УДК 57.053

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КАЛЬЦИЕВОГО ОТВЕТА В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

© 2024 г. Ю. Д. Коробкина^{a, *}, М. А. Пантелеев^{a, b, c}, А. Н. Свешникова^{a, b, c}

^aЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия

^bМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^cНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, 117198 Россия

*e-mail: juliajessika@gmail.com

Поступила в редакцию 09.10.2023

После доработки 10.12.2023

Принята к печати 13.12.2023

Кальциевая сигнализация – один из ключевых способов трансдукции сигнала в клетках невозбудимых тканей. Кальциевая сигнализация как в сперматозоидах мыши, так и в сперматозоидах человека индуцируется в ответ на прогестерон, реализуется в виде осцилляций или одиночных пиков, а также приводит к акросомной реакции, но молекулярные механизмы существенно отличаются между видами.

Целью данной работы является сравнительное исследование механизмов кальциевой сигнализации при физиологической активации в сперматозоидах человека и мыши. В рамках данной работы мы изучили кальциевый ответ в сперматозоидах мыши, активированных прогестероном. С помощью спектрофлуориметрии впервые было количественно оценено увеличение концентрации кальция в ответ на прогестерон в меченых Fura-2 сперматозоидах мыши в суспензии. Было показано, что сперматозоиды мышей реагируют на 50 мкМ прогестерон пиком шириной 120 ± 35 с и высотой 0.8 ± 0.3 мкМ, и этот ответ блокируется аспирином. На основе литературных данных была построена схема индукции кальциевой сигнализации, предполагающая промежуточный этап с синтезом некоторого простааноида (возможно, PGE2) и активацией сперматозоида мыши данным простаноидом через ассоциированный с G-белком рецептор. Используя полученную схему реакций были разработаны две вычислительные модели: точечная модель и трехмерная модель. Как и в случае сперматозоидов человека, точечная модель дала только качественное описание кальциевых ответов, в то время как трехмерная модель позволила получить близкие к эксперименту параметры пика и частоту осцилляций концентрации кальция в ответ на прогестерон. С помощью анализа *in silico* показано, что в сперматозоидах мыши пространственное распределение сигнальных ферментов регулирует тип и форму кальциевого ответа.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что наличие временных задержек, обусловленных диффузией и пространственным распределением ферментов сигнализации кальция, регулирует кальциевый ответ как в сперматозоидах человека, так и в сперматозоидах мыши.

Ключевые слова: кальциевая сигнализация, внутриклеточная сигнализация, компьютерное моделирование, прогестерон

DOI: 10.31857/S0233475524030086, EDN: crzabj

ВВЕДЕНИЕ

Кальциевая сигнализация – один из ключевых способов трансдукции сигнала в эукариотических клетках. Устройство кальциевой сигнализации в одних и тех же клетках многих организмов сходно [1, 2], поэтому сравнение механизмов кальциевой сигнализации между организмами может помочь определить особенности устройства данной системы.

В сперматозоидах млекопитающих динамика кальция контролирует большинство процессов

оплодотворения, например, акросомную реакцию, капацитацию и гиперактивацию [3, 4]. В сперматозоидах мыши и человека кальциевый ответ может быть индуцирован стероидным гормоном прогестероном, присутствующим в женских половых путях [5]. В человеческих сперматозоидах прогестерон опосредованно активирует расположенный в жгутике сперматозоида кальциевый канал CatSper [6], который в покое ингибирован липидом мембраны 2-арахидоноилглицеролом

(2-AG). Прогестерон активирует локализованную в жгутике гидролазу AVHD2, катализирующую расщепление 2-AG на арахидоновую кислоту и глицерин [6]. Расщепление 2-AG приводит к активации CatSper и поступлению кальция в клетку. Повышение концентрации кальция способно активировать фермент фосфолипазу C δ (PLC δ 4), имеющуюся в сперматозоидах [7, 8]. Фосфолипаза C катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата (IP $_3$) из мембранных фосфоинозитидов. IP $_3$ активирует канал-рецептор к IP $_3$ (IP $_3$ R), расположенный на мембране депо кальция в клетке, роль которого в сперматозоиде человека играет производное ядра – избыточная ядерная мембрана (RNE), и, таким образом, индуцирует высвобождение кальция в цитоплазму клетки через эти канал-рецепторы [9, 10]. Как у человека, так и у мыши кальциевые АТР-азы далее удаляют кальций из цитозоля: АТР-аза плазматической мембраны (PMCA), присутствующая в мембране жгутика [11], выкачивает кальций во внеклеточную среду, а АТР-аза секреторного пути (SPCA), присутствующая на мембране кальциевого депо, переносит кальций из цитозоля в кальциевое депо [12]. Дополнительно присутствующие кальциевые буферы, такие как кальмодулин (CaM) [13], расположенный в цитозоле, и кальретикулин (CalRet) [14], расположенный в депо, способны обратимо связывать кальций и модулировать ответ клетки. Данная сигнализация может приводить как к осцилляторному кальциевому ответу, так и к ответу типа “одиночный пик”. Ранее нами было показано [15], что тип кальциевого ответа в сперматозоидах человека на прогестерон зависит от пространственного расположения ферментов и каналов, управляющих кальциевой сигнализацией.

Несмотря на то что кальциевая сигнализация в сперматозоидах мыши обладает теми же свойствами, что и у человека, а именно, кальциевая сигнализация индуцируется в ответ на прогестерон, реализуется в виде осцилляций или одиночных пиков и индуцирует акросомную реакцию, ее молекулярные механизмы существенно отличаются [16]. Описанный выше механизм не работает так же, так как в сперматозоидах мыши содержание 2-AG недостаточно высоко для его реализации, CatSper нечувствителен к прогестерону, а AVHD2 расположена в мембране акросомы (органелла, находящаяся в передней части головки сперматозоида), а не в жгутике [6]. Также известно, что кальциевым депо в сперматозоиде мыши является акросома, а не избыточная ядерная мембрана [17]. Точный механизм прогестероновой активации сперматозоидов мыши

не установлен. Известно, что арахидоновая кислота способна индуцировать акросомную реакцию в том же объеме, что и прогестерон [18], в ходе активации генерируется простагландин E2 (PGE2) [19], который способен запускать акросомную реакцию [20], а мышинный канал CatSper, наоборот, нечувствителен к простагландинам и прогестерону [21]. При этом показано, что в индукции акросомной реакции прогестероном участвуют G-белки и некоторая изоформа фосфолипазы C [18], при этом конкретный рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR), не установлен.

В настоящей работе мы предполагаем, что активация сперматозоидов мыши прогестероном происходит по следующему механизму (рис. 1). Прогестерон, свободно проникая через плазматическую мембрану, активирует находящуюся на акросоме AVHD2 (возможен также вклад фосфолипазы A2, но с точки зрения модели это не вносит качественных изменений), что приводит к генерации арахидоновой кислоты и ее трансформации циклооксигеназным путем в PGE2 (или другой простаноид). Хотя у мыши есть активные рецепторы к PGE2, в том числе EP1 [22], данные об их наличии и локализации в сперматозоидах найдены не были. Есть данные, что на акросоме сперматозоидов мыши локализован рецептор к эстрогену (GPER), который относится к тому же классу рецепторов, что и EP1 [23]. В работе мы предполагали, что простаноид (PGE2) активирует GPCR (EP1), находящийся на плазматической мембране в районе акросомы, так как в жгутике сперматозоида мыши нет достаточного количества фосфоинозитидов для работы PLC [24]. Далее с активной α q-субъединицей G-белка ассоциируется PLC β 1 [25], и кальциевая сигнализация индуцируется по пути, описанному выше для сперматозоида человека, с тем отличием, что кальциевым депо является акросома, а не избыточная ядерная мембрана. Также учитывается, что в сперматозоидах мыши кроме PLC β 1 находится PLC δ 4 [26].

В настоящей работе мы показываем, что предложенная схема событий внутриклеточной сигнализации позволяет описать наблюдаемые кальциевые ответы сперматозоидов мыши на прогестерон.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Fura-2-AM, Fura-RED-AM (Molecular Probes, США); прогестерон, DMSO, CaCl $_2$, KCl, MgCl $_2$, NaH $_2$ PO $_4$, NaHCO $_3$, БСА, Triton, EDTA, глюкоза (Sigma-Aldrich, США), аспирин (Bayer, Германия).

Экспериментальное наблюдение кальциевой активации в сперматозоидах мыши. Данное исследование было одобрено комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова (номер заявки 109-ж от 06 марта 2022 года), и оно было проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации. У умерщвленных методом цервикальной дислокации мышей вырезался придаток яичка. Производилось несколько глубоких надрезов на придатке яичка, далее в течение 10 мин сперматозоиды выплывали наружу. С краев капли собиралось 10 мкл буфера, содержащего сперматозоиды, далее сперматозоиды разбавлялись буфером Tyrode's (134 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.05 mM MgCl₂, 417 мкМ NaH₂PO₄, 11.9 mM NaHCO₃, 5.5 mM глюкоза). После добавления Fura-2 в концентрации 2 мкМ производилась инкубация при 37°C в течение 45 мин. Далее капли буфера объемом 100 мкл наносились на чашку Петри, через 10 мин 10 мкл буфера со сперматозоидами собиралось с краю капли и ресуспендировалось в 90 мкл Tyrode's без добавления кальция на каплю.

Экспериментальное наблюдение прогестероновой активации окрашенных флуоресцентной меткой на кальций Fura-2 мышинных сперматозоидов производилось с помощью спектрофлуориметра. Возбуждение Fura-2, не связавшейся с кальцием, производилось на длине волны 380 нм, возбуждения Fura-2, связавшейся с кальцием, производилось на длине волны 340 нм. В ходе измерений в суспензию клеток добавлялся CaCl₂ до концентрации 2 мМ для определения базового уровня сигнала [27]. Далее в суспензию добавлялся прогестерон в концентрации 50 мкМ. В части экспериментов перед добавлением прогестерона сперматозоиды инкубировались с аспирином в концентрации 100 нг/мл в течение 5 мин. Аспирин в высокой дозе добавлялся для уточнения предложенной схемы активации сперматозоидов мыши прогестероном, так как в данном случае он является ингибитором обеих изоформ циклооксигеназы [28]. Для окрашенных Fura-2 клеток далее проводился пересчет относительного изменения флуоресценции в концентрации кальция по следующей формуле [29]:

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{F_{380max} - F_{380back}}{F_{380max} - F_{340back}} \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right). \quad (1)$$

Здесь K_d – константа диссоциации комплекса кальция и Fura-2, R – отношение интенсивности флуоресценции при возбуждении лазером с длиной волны $\lambda=340$ нм (связавшейся с кальцием краски)

к интенсивности флуоресценции при $\lambda=380$ нм (не связавшейся с кальцием краски). F_{max} и F_{min} – максимальная и минимальная флуоресценции при возбуждении данной длиной волны, F_{back} – флуоресценция фона, R_{min} и R_{max} – отношения интенсивностей при максимально и минимально возможных концентрациях кальция в клетке. Для определения данных коэффициентов R_{min} и R_{max} была проведена следующая калибровка: для измерения максимально возможного отношения флуоресценций R_{max} к сперматозоидам в конце каждого эксперимента добавлялся детергент Triton. Для того чтобы измерить R_{min} , после добавления Triton в среду с клетками добавлялся кальциевый хелатор EDTA. После каждого добавления подвижность и морфология сперматозоидов в суспензии проверялась на микроскопе ЛОМО Микмед-6 в режиме темного поля.

Обработка изображений проводилась с помощью Fiji (<https://imagej.net/>). Визуализация данных производилась с помощью GraphPad Prism 8 (<https://www.graphpad.com/>).

Построение математической модели. На основе литературных данных о кальциевой сигнализации в сперматозоидах млекопитающих нами построены две вычислительные модели прогестерон-индуцированной кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши, а именно точечная модель и трехмерная модель. Точечная модель представляет собой систему 23 обыкновенных дифференциальных уравнений, управляемую 49 параметрами и интегрируемую методом LSODA [30] с максимальным количеством внутренних шагов 10^4 , абсолютной погрешностью 10^{-12} , относительной погрешностью 10^{-7} , с помощью программного пакета COPASI (<https://copasi.org/>) [31]. Трехмерная модель представляет собой систему дифференциальных уравнений в частных производных и обыкновенных дифференциальных уравнений, интегрируемую методом конечных объемов с максимальным шагом по времени 0.01 с, пространственным шагом 0.1 мкм, абсолютной погрешностью 10^{-9} , относительной погрешностью 10^{-7} , реализованным в программном пакете VCell (<https://vcell.org/>) [32].

Уравнения модели, граничные условия и значения параметров приведены в Дополнении 1. Для каждого мобильного буфера рассматривается вклад двух некооперативных сайтов: сайтов С и Р для кальретикулина и С и N для кальмодулина [33]. Активацию G-белка мы описываем согласно модели Катанаева и соавт. [34]. Детали построения и валидации моделей для сперматозоида человека даны в работе [15]. Модель была разбита на два модуля.

В первом модуле описывается цепочка биохимических реакций от активации AVHD2 прогестероном до активации PLC β . Второй модуль модели описывает динамику внутриклеточного кальция и IP $_3$.

В трехмерной модели учитывается диффузия ионов кальция, IP $_3$, CaM и других веществ, и пространственная локализация ферментов и каналов. В точечной модели по сравнению с трехмерной были изменены параметр $k_{PLC} = 180 \text{ с}^{-1}$ для предотвращения самопроизвольной кальциевой активации фосфолипазы (при высоком значении константы стационарное состояние модели соответствовало опустошенному депо); для исследования режимов использовались также другие значения. С точки зрения сопоставления моделей, физический смысл уменьшения константы связан с уменьшением концентраций ряда веществ (начиная с IP $_3$) в месте их действия по сравнению с местом производства.

Предполагаемая схема модели показана на рис. 1. Первый модуль модели состоит из 11 уравнений, описывающих активацию фосфолипазы C прогестероном. В модуле были использованы значения для режима № 4 из модели Катанаева [34]. Для оценки адекватности выбора использовались экспериментальные данные [35]. Далее была использована теорема Тихонова [36] для частичной редукции модели (см. Дополнение).

Второй модуль модели состоит из 8 уравнений, описывающих кальциевую сигнализацию в сперматозоиде мыши в ответ на активацию PLC β . С целью обеспечения независимого исследования модулей на вход модели подавалась активность PLC β на мембране в головке и шейке, аппроксимированная из первого модуля модели. Несмотря на то что мы для полноты картины учли в модели фосфолипазу PLC δ_4 , также способную в принципе давать колебания через наличие положительной обратной связи, период этих колебаний слишком сильно отличается, и такая возможность не является значимой для целей данного исследования. Далее для второго модуля также была использована теорема Тихонова для частичной редукции модели (см. Дополнение).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кальциевый ответ на активацию прогестероном в сперматозоидах млекопитающих. В ходе экспериментов было показано, что мышинные сперматозоиды активируются прогестероном в суспензии в концентрации 50 мкМ с шириной кальциевого пика $120 \pm 35 \text{ с}$ (средние \pm SD) и высотой $0.8 \pm 0.3 \text{ мкМ}$

относительно базового уровня кальция, в то время как одиночные сперматозоиды человека – в концентрации 5 мкМ с шириной $160 \pm 44 \text{ с}$ и высотой $0.5 \pm 0.2 \text{ мкМ}$ или кальциевыми осцилляциями с периодом порядка сотен секунд (рис. 2). Характерная ширина определяется как ширина пика на высоте пика 10% от максимальной амплитуды. В силу усреднения ответа по всем клеткам при измерении уровня кальция в суспензии, в наших экспериментах не наблюдался осцилляционный ответ в сперматозоидах мыши, при этом в литературе присутствуют данные об осцилляционных ответах в ответ на прогестерон [35], однако характерные концентрации кальция в сперматозоидах мыши ранее не измерялись. Также произведены эксперименты с добавлением аспирина к сперматозоидам мыши. Показано, что кальциевый ответ на прогестерон отсутствует в сперматозоидах мыши при пятиминутной преинкубации с 100 нг/мл аспирина (рис. 2б). Это подтверждает предложенную схему активации сперматозоида прогестероном.

Трехмерная, но не точечная модель предоставила количественное описание кальциевого ответа, индуцированного прогестероном в сперматозоидах мыши. Для описания полученных экспериментальных результатов по индуцированной прогестероном кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши, мы использовали сначала точечную, а потом трехмерную модели (см. Материалы и методы).

Для описания экспериментально наблюдаемых откликов кальция (рис. 2) в модуле модели, описывающем кальциевый ответ, варьировалась каталитическая константа фосфолипазы C (k_{PLC}). Обоснование изменения k_{PLC} заключалось в том, что в образце спермы, инкубированном в конденсирующих условиях, присутствуют как минимум две субпопуляции сперматозоидов [37], различающиеся по своему мембранному потенциалу, влияющему на активность потенциал-чувствительной фосфатазы (VSP) [24], регулирующей концентрацию фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфата (PIP $_2$) в сперматозоидах.

Точечная модель прогестерон-индуцированной кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека была способна качественно описать как осцилляционный ответ (рис. 3д), так и одиночный пик (рис. 3б). Однако в случае сперматозоидов человека, максимальная ширина пика, описываемая одномерной моделью, составляет 40 с, а максимальный период осцилляций – 50 с (максимумы, полученные в серии запусков с варьированием параметров при условии высоты пика не более 1.5 мкМ).

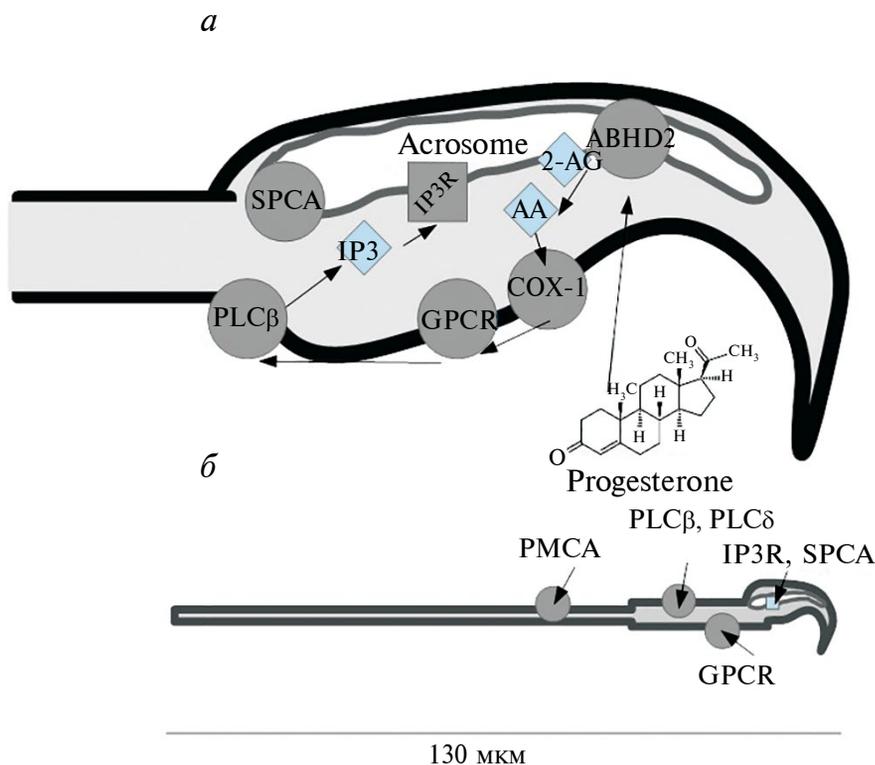


Рис. 1. Предполагаемая схема кальциевой активации сперматозоидов мыши прогестероном. *а* – Общая схема реакций. ABHD2 активируется прогестероном и расщепляет 2-арахиноилглицерол (2-AG) до арахидоновой кислоты (AA) и глицерина. Арахидоновая кислота трансформируется присутствующей в сперматозоидах мыши циклооксигеназой-1 (COX-1) в некоторый простаноид (возможно, PGE₂), активирующий ассоциированный с G-белком рецептор (GPCR). На рисунке GPCR изображен на плазматической мембране, но в модели он также мог находиться на мембране акросомы. Далее происходит активация фосфолипазы Cβ (PLCβ), катализирующей производство инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃), активирующего каналы-рецепторы к IP₃ (IP₃R), расположенные в мембране внутриклеточного хранилища кальция в сперматозоиде (акросомы). *б* – Схема пространственного распределения компонентов системы. В настоящей работе предполагалось, что АТФ-аза плазматической мембраны (PMCA) в сперматозоидах мыши активна в жгутике сперматозоида, производство IP₃ локализовано в шейке и головке сперматозоида, а IP₃R и АТФ-аза секреторного пути (SPCA) локализованы в мембране акросомы.

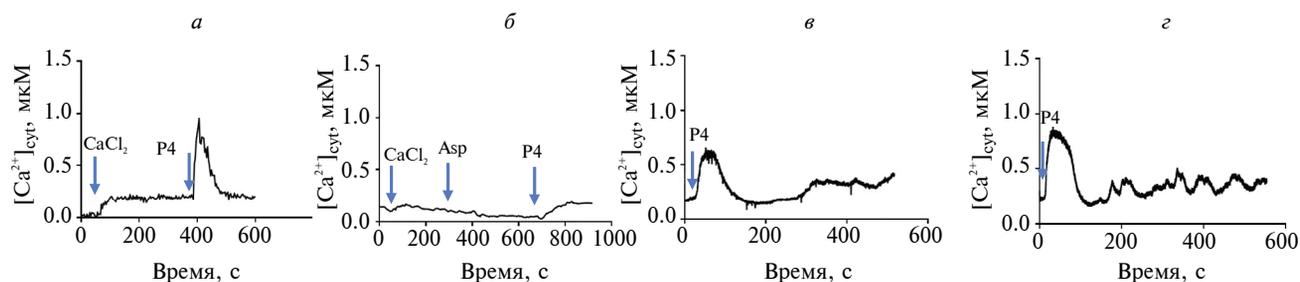


Рис. 2. Кальциевый ответ на активацию прогестероном в сперматозоидах млекопитающих. *а* – Типичный кальциевый ответ суспензии сперматозоидов мыши в ответ на активацию 50 мкМ прогестероном с характерным временем активации и ответа 120 ± 35 с (среднее \pm SD). Стрелкой указаны времена добавления CaCl₂ и прогестерона (P4). Общее количество экспериментов для P4: $N = 3$. *б* – Типичный ответ на прогестерон при преинкубации с 100 нг/мл аспирина. Стрелкой указаны времена добавления CaCl₂, прогестерона (P4) и аспирина (Asp). Общее количество экспериментов для P4 + Asp: $N = 3$. *в, з* – Типичные кальциевые ответы, наблюдаемые в одиночных сперматозоидах человека в ответ на активацию 5 мкМ прогестероном, стрелкой указано время добавления прогестерона (P4). *в* – Типичный одиночный пик с характерным временем 160 ± 44 с. Воспроизведено из работы [15]. Ответило $N_{\text{клеток}} = 36$ из 64. *з* – Типичный вид кальциевых осцилляций. Воспроизведено из работы [15]. Ответило $N_{\text{клеток}} = 18$ из 64.

В случае сперматозоидов мыши в точечной модели существует режим одиночного пика (рис. 3з), а также кальциевые осцилляции с периодом порядка сотен секунд, наблюдаемые в других работах [35]. Как и в случае сперматозоидов человека, в случае сперматозоидов мыши максимальная ширина пика, описываемая одномерной моделью, составляет 40 с (рис. 3з), максимальный период осцилляций – 70 с (рис. 3к), что значительно меньше экспериментально наблюдаемых периода осцилляций и ширины пика.

Трехмерная модель и для сперматозоидов человека, и для сперматозоидов мыши была способна количественно описать ширину пика в ~ 100 с (рис. 3в) и частоту осцилляций (100–300 с) (рис. 3е) при коэффициенте диффузии кальция меньшем, чем $20 \text{ мкм}^2/\text{с}$.

Динамика кальция в сперматозоидах мыши определяется коэффициентом диффузии кальция и пространственной конфигурацией системы. При помощи трехмерной модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши нами было проведено теоретическое исследование характера зависимости кальциевого ответа от коэффициента диффузии кальция. Было показано, что система может переключать свой тип ответа с осцилляторного на одиночный пик при изменении коэффициента диффузии кальция (рис. 4а). В сперматозоидах мыши при фиксированном коэффициенте диффузии $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$, колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии кальция менее $143 \text{ мкм}^2/\text{с}$ (рис. 4а). Наблюдалось, что период осцилляций увеличивался при увеличении коэффициента диффузии кальция (рис. 4а, красная линия). При этом ранее было показано, что в сперматозоидах человека при фиксированном коэффициенте диффузии $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$, колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии кальция менее $70 \text{ мкм}^2/\text{с}$ [15].

Также мы исследовали влияние пространственного распределения компонентов системы на тип ответа. Мы показали, что наличие осцилляций возможно только при скорости экстррузии кальция кальциевой помпой PMCA большей, чем $0.43 \text{ мкм}/\text{с}$ (рис. 4б). Также период осцилляций зависел от V_{PMCA} почти линейно (на рисунке шкала нелинейна), что аналогично сперматозоидам человека [15].

В полной модели предполагалось, что PMCA в сперматозоидах локализована в жгутике. Несмотря на то что ее присутствие в акросоме нельзя исключить, качественно это не меняет ситуацию в модели в силу того, что она в любом случае дублирует там SPCA, параметры которой подбираются; можно

считать, что SPCA в модели отражает суммарную активность SPCA и PMCA в акросоме. При этом в модели для мыши, где PMCA была равномерно распределена, кальциевые колебания исчезли, а ширина одиночного пика уменьшилась до 30 с.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе проводится исследование механизмов кальциевой сигнализации, индуцируемой прогестероном в сперматозоидах мыши. Проводится экспериментальное наблюдение кальциевого ответа суспензии клеток на прогестерон с характерной шириной пика 120 ± 35 с и предотвращение этого ответа ингибитором циклооксигеназы аспирином. Путем компьютерного моделирования доказываем, что в сперматозоидах мыши может работать схема активации прогестероном, включающая синтез промежуточного простаноида и активацию сперматозоида через ассоциированный с G-белком рецептор к данному простаноиду, что существенно отличает схему для сперматозоида мыши от сперматозоида человека. Тем не менее, в рамках данной работы было показано, что возникновение осцилляторного ответа на прогестерон в сперматозоидах мыши также управляется коэффициентом диффузии ионов кальция и распределением управляющих элементов кальциевой сигнализации, как и в сперматозоидах человека.

Наблюдаемая кальциевая сигнализация в сперматозоидах в ответ на прогестерон хорошо соответствует ранее опубликованным данным. Параметры одиночного пика, наблюдаемого в сперматозоидах мыши, также соответствуют параметрам пика, наблюдаемых другими авторами [35], однако в работе из-за того, что микроскопия одиночных клеток мыши не проводилась, кальциевые осцилляции в одиночных клетках не исследовались экспериментально.

В настоящей статье на основе полученных результатов и литературных данных мы предположили, что, хотя у мыши активность прогестерон-чувствительного кальциевого канала CatSper, в отличие от человека, не ингибируется 2-AG, расщепляемым AVHD2, при этом сам AVHD2 так же, как у человека, активируется прогестероном и катализирует производство арахидоновой кислоты [6]. Она конвертируется циклооксигеназой в некоторый простаноид, который активирует G-белковую сигнализацию, что приводит к активации фосфолипазы C и индукции кальциевой сигнализации. Данная схема подтверждается проведенными нами экспериментами с аспирином, а также способностью построенной модели описывать индуцированную

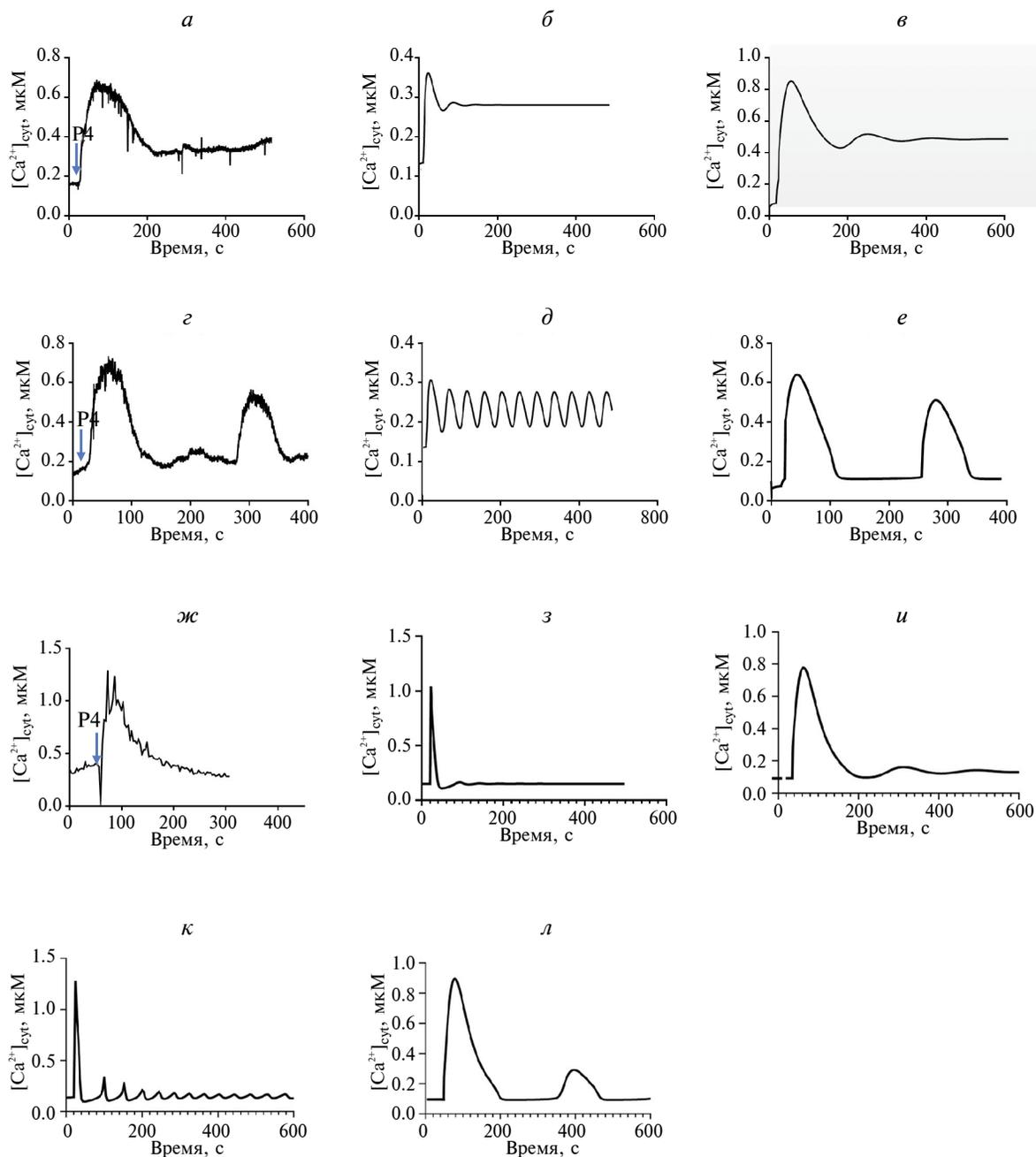


Рис. 3. Сравнение результатов моделирования с экспериментальными данными. *а* – Типичный экспериментально наблюдаемый одиночный пик в сперматозоидах человека в ответ на активацию 5 мкМ прогестерона имеет ширину ~150 с [15]. *б* – Сперматозоид человека, точечная модель. Одиночный пик в точечной модели имеет ширину ~50 с, что значительно меньше наблюдаемого экспериментально. *в* – Сперматозоид человека, трехмерная модель. Одиночный пик в распределенной модели имеет ширину ~150 с, что совпадает с наблюдаемым экспериментально. Представленные зависимости концентраций от времени для трехмерной модели являются усредненными по объему. *г* – Сперматозоид человека. Пример низкочастотных кальциевых осцилляций, наблюдаемых в сперматозоиде человека периодом ~200 с [10]. *д* – Сперматозоид человека, точечная модель. Осцилляции в точечной модели имеют порядок периода ~50 с, что значительно меньше наблюдаемых экспериментально. *е* – Сперматозоид человека, трехмерная модель. Осцилляции в распределенной модели совпадают по периоду с экспериментально наблюдаемыми. *ж* – Типичный кальциевый ответ на активацию 50 мкМ прогестероном в сперматозоидах мыши, ширина пика ~100 с. *з* – Сперматозоид мыши, точечная модель. Одиночный пик в точечной модели имеет максимальную ширину 40 с, что значительно меньше экспериментально наблюдаемой ($k_{PLC} = 180$). *и* – Сперматозоид мыши, трехмерная модель. Одиночный пик в распределенной модели имеет ширину 150 с, что совпадает с экспериментально наблюдаемой ($k_{PLC} = 5000$). *к* – Сперматозоид мыши, точечная модель, вариант осциляторного ответа при значении параметра $k_{PLC} = 90$. *л* – Сперматозоид мыши, распределенная модель, вариант осциляторного ответа при значении параметра $k_{PLC} = 2500$.

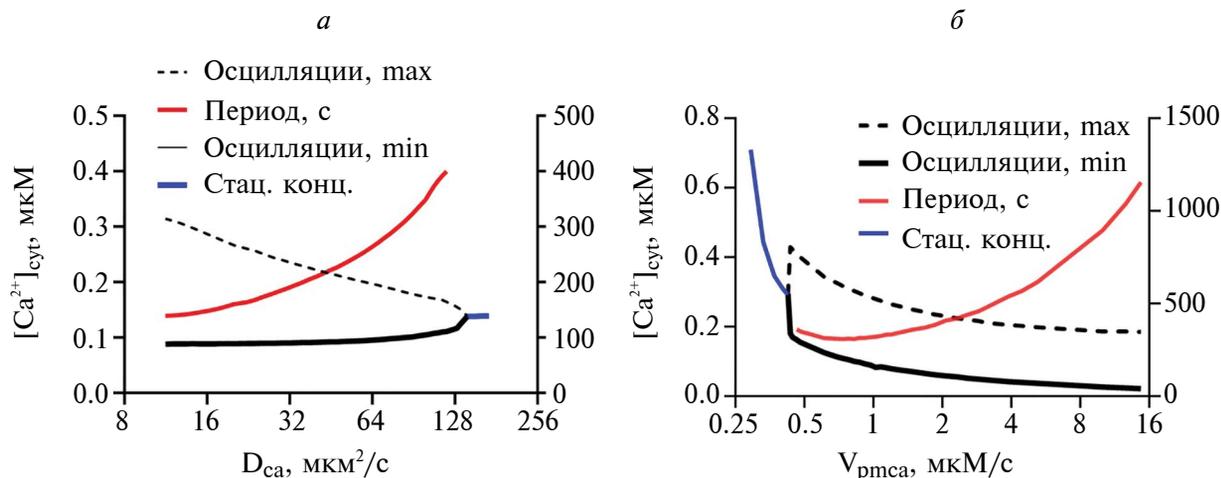


Рис. 4. Теоретическое исследование трехмерной модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши. *a* – Вариация коэффициента диффузии кальция D_{Ca} приводит к исчезновению кальциевых осцилляций для более высоких D_{Ca} . Сплошная черная линия – минимум амплитуды осцилляций. Сплошная синяя линия – стационарное значение концентрации кальция (Стац. конц.), режим пика. Штриховая линия – максимум амплитуды кальциевых осцилляций. Красная линия – период кальциевых осцилляций (ось справа). *б* – Наличие осцилляций, их амплитуда и период зависят от V_{PMCA} – максимальной скорости работы РМСА. Сплошная черная линия – минимум амплитуды осцилляций. Штриховая линия – максимум амплитуды кальциевых осцилляций. Синяя линия – стационарная концентрация кальция, режим пика. Красная линия – период кальциевых осцилляций (ось справа).

прогестероном кальциевую сигнализацию в сперматозоидах мыши. Это позволяет нам проводить исследования особенностей кальциевой сигнализации, основной из которых является показанная зависимость осцилляторного ответа от пространственного расположения ферментов и каналов.

Пространственная конфигурация системы влияет как на форму, но и на тип кальциевого ответа. Для сперматозоидов человека мы показали, что при фиксированном коэффициенте диффузии IP_3 , равном $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$, колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии ионов кальция менее $70 \text{ мкм}^2/\text{с}$. В то же время в сперматозоидах мыши колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии ионов кальция менее $143 \text{ мкм}^2/\text{с}$. Наблюдаемая разница в пороговых коэффициентах диффузии может быть объяснена разницей длин сперматозоидов мыши и человека: 50 мкм [38] у человека против 130 мкм у мыши [39].

В существующих гомогенных математических моделях кальциевого ответа в сперматозоидах человека [15, 40] также возникал осцилляторный ответ при некоторых комбинациях параметров. Однако соотношение периода осцилляций и высоты пика в этих моделях не согласовывалось с нашими и литературными данными [41].

Зависимость кальциевой сигнализации от пространственной конфигурации систем находится в соответствие с работами [42, 43], где утверждается,

что динамика кальциевой сигнализации в ацинарных клетках и яйцеклетках *Xenopus laevis* может существенно изменяться при учете диффузии кальция или потока жидкости. Геометрия системы также играет важную роль в дендритных клетках при кальциевом ответе [44].

Таким образом, как в сперматозоиде человека, так и в сперматозоидах мыши важную роль в генерации кальциевого ответа играет пространственная удаленность кальциевого депо и кальциевой АТФ-азы РМСА.

Следует учитывать ограничения использованного подхода. Закон диффузии Фика является приближением, потому что диффузия кальция в клетках носит нелинейный характер [45]. В модели связывание кальция с буферными системами учитывалось только неявно путем низкого (но постоянного) коэффициента диффузии. Ограничением работы является и то, что концентрации кальция измерены для сперматозоидов мыши усредненно, а не для отдельных клеток.

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

Источники финансирования. Работа поддержана грантом РНФ № 23-74-00057. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

Соответствие принципам этики. Данное исследование было одобрено комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (номер заявки 109-ж от 06 марта 2022 года) и проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации.

Дополнение 1. Уравнения и параметры трехмерной компьютерной модели

Д1. Принципы построения модели, выбора начальных и граничных условий и подбор параметров. Трехмерная модель была создана с использованием программного обеспечения VCell (<http://www.vcell.org/>). Соответствующая модель Virtual Cell, MouseSpermCalcium, представлена в открытом доступе на <http://www.vcell.org/> под именем пользователя Juliajessica. Детали геометрии модели представлены в табл. Д1. Геометрия трехмерной модели включает в себя цитозоль сперматозоида (56 мкм³), разделенный на жгутик сперматозоида (0.4 мкм в диаметре, 115 мкм длиной [46]), шейку (0.8 мкм в диаметре [47], 20 мкм длиной [48]) и головку сперматозоида (8 × 3 × 2.5 мкм [48]), акросому сперматозоида, служащую кальциевым депо (1.3 мкм³) [17], расположенную в головке сперматозоида (рис. Д1, табл. Д1), а также клеточную мембрану и мембрану акросомы. Граничные условия второго рода были использованы для всех веществ. Данные о локализации веществ и учете диффузии даны в табл. Д2. Все вещества, находящиеся

в акросоме, считались хорошо перемешанными. Для перевода объемных концентраций и констант диссоциации в поверхностные использовался коэффициент $\omega_q = N_a (V_q / S_q)$, где N_a – число Авогадро, V_q – объем компартмента q, S_q – площадь поверхности компартмента q. ω_{Acr} и ω_{Cyt} соответствуют акросоме и цитозолю.

Д2. Уравнения модели. Обозначения переменных модели указаны в табл. Д2. Обозначения параметров модели указаны в табл. Д4.

Первый модуль состоит из 11 уравнений:

$$\frac{\partial [Progesterone_{in}]}{\partial t} = D_{prog} ([Progesterone] - [Progesterone_{in}]) + D_{prog} \Delta [Progesterone_{in}], \quad (1)$$

$$\frac{\partial [AA]}{\partial t} = \frac{k_{catABHD} [AG][ABHD2^*]}{\omega_{Acr} K_{mABHD-AG} + [AG]} - k_{AA} [AA] - k_{COX} N_{COX} [AA] + D_{AA} \Delta [AA], \quad (2)$$

$$\frac{\partial [PGE2]}{\partial t} = k_{GPCR} [GPCRact] / \omega_{Cyt} + k_{COX} N_{COX} [AA] / \omega_{Cyt} - k_{GPCR} [GPCR][PGE2] / (\omega_{Cyt} K_{dGPCR}) - k_{degPGE} [PGE2] + D_{AA} \Delta [PGE2]$$

Таблица Д1. Геометрия модели

| Название компартмента | Уравнение, задающее границы компартмента | Обозначение, объем | Обозначение, площадь мембраны | Источник |
|-----------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|----------|
| Акросома | Полуэллипс, заданный следующим уравнением: $(((((0.7 \times x) - (0.7 \times 36.0))^2) + (2.0 \times ((y - 5.0)^2)) + (((2.0 \times z) - 10.0)^2)) < 1.21) \times (x > 34.0) \times (z < 5.0)$ | V_{acr} , 1.3 мкм ³ | S_{acr} , 9.6 мкм ² | [17] |
| Цитозоль | Жгутик сперматозоида: цилиндр, заданный уравнением $((x \geq -89.0) \times (x \leq 14.0) \times (((y - 5.0)^2) + ((z - 5.0)^2)) < (0.3^2))$ Головка сперматозоида: Полуэллипс, заданный уравнением $(((((0.4 \times x) - (0.4 \times 35.0))^2) + (((1.3 \times y) - (1.3 \times 5.0))^2) + (((2.0 \times z) - 10.0)^2)) < 3.0)$ Шейка сперматозоида: Цилиндр, заданный уравнением $((x \geq 14.0) \times (x \leq 34.0) \times (((y - 5.0)^2) + ((z - 5.0)^2)) < (0.4^2))$ | V_{cyt} , 56 мкм ³ | S_{cyt} , 283 мкм ² | [49] |

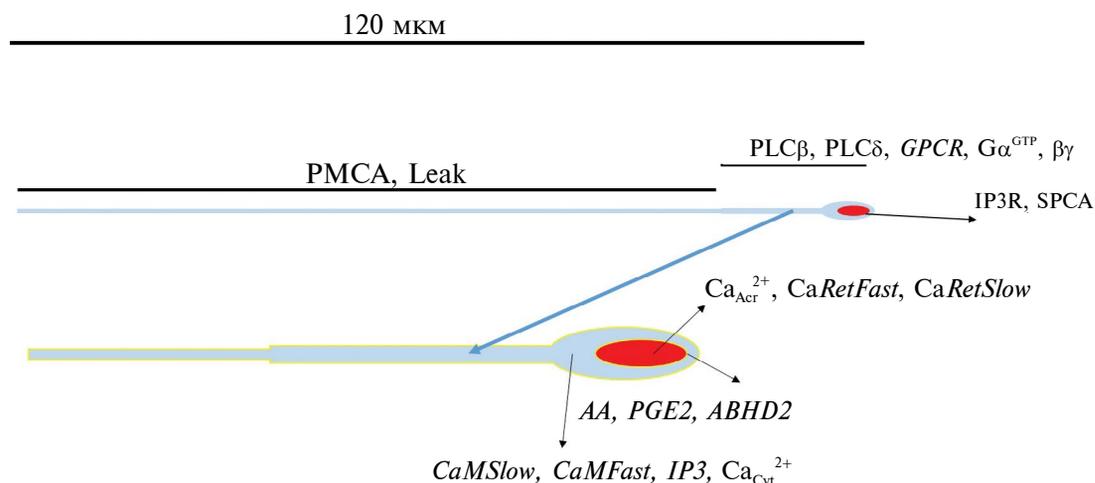


Рис. Д1. Общий вид геометрии модели. Расположение веществ. Пространственное ограничение некоторых реакций. Синяя область – цитозоль сперматозоида. Красная область – акросома сперматозоида. Желтая область – мембрана сперматозоида.

Таблица Д2. Начальные значения переменных (поверхностные концентрации для мембранных веществ, объемные концентрации для растворенных веществ; соответствуют базальным для всего, кроме кальция) и коэффициенты диффузии (для трехмерной модели)

| Название вещества | Обозначение переменной | Компартмент | Начальные значения | | Коэффициент- диффузии в 3D модели, мкм ² /с | | |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------|--|----------|----------|
| | | | Значение | Источник | Обозначение | Значение | Источник |
| Арахидоновая кислота | [AA] | Мембрана акросомы | 0 мкм ⁻² | – | D _{AA} | 1 | [15] |
| PGE2 | [PGE2] | Цитозоль | 0 мкМ | – | D _{AA} | 1 | [15] |
| Прогестерон в цитозоли | [Progesterone _{in}] | Цитозоль | 0 мкМ | – | D _{Prog} | 0.1 | Подбор |
| ABHD2, неактивная | [ABHD2] | Мембрана акросомы | 17 мкм ⁻² | [15] | D _{prot} | 2 | [15] |
| ABHD2, активная | [ABHD2*] | >> | 0 мкм ⁻² | – | D _{prot} | 2 | [15] |
| 2-AG* | [AG] | >> | 1171 мкм ⁻² | См. КОММ. | D _{AA} | 1 | [15] |
| β γ-субъединица G-белка | [βγ] | Плазматическая мембрана | 0 мкм ⁻² | – | D _{prot} | 2 | [15] |
| Активированный GPCR | [GPCRact] | >> | 0 мкм ⁻² | – | D _{prot} | 2 | [15] |
| Неактивный GPCR** | [GPCR] | >> | 111 мкм ⁻² | См. КОММ. | D _{prot} | 2 | [15] |

Таблица Д2. Окончание

| | | | | | | | |
|--|--------------------|-------------------------|-----------------------|-----------|------------|--------|--------|
| α-субъединица G-белка с GTP | $[G\alpha^{GTP}]$ | >> | 0 мкМ | – | D_{prot} | 2 | [15] |
| Кальретикулин, свободный медленный сайт*** | $[CaRetSlow]$ | Акросома | 2.8 мМ | См. КОММ. | – | – | – |
| Кальретикулин, медленный сайт с кальцием | $[CaRetSlowCa]$ | >> | 0 мкМ | – | – | – | – |
| Кальретикулин, свободный быстрый сайт**** | $[CaRetFast]$ | >> | 311 мкМ | – | – | – | – |
| Кальретикулин, быстрый сайт с кальцием | $[CaRetFastCa]$ | >> | 0 мкМ | – | – | – | – |
| Кальмодулин, свободный медленный сайт***** | $[CaMSlow]$ | Цитозоль | 4.9 мкМ | См. КОММ. | D_{ca} | 10–170 | Подбор |
| Кальмодулин, медленный сайт с кальцием | $[CaMSlowCa]$ | >> | 0 мкМ | – | D_{ca} | 10–170 | Подбор |
| Кальмодулин, свободный быстрый сайт***** | $[CaMFast]$ | >> | 4.9 мкМ | См. КОММ. | D_{ca} | 10–170 | Подбор |
| Кальмодулин, быстрый сайт с кальцием | $[CaMFastCa]$ | Цитозоль | 0 мкМ | – | D_{ca} | 10–170 | Подбор |
| IP ₃ | $[IP3]$ | >> | 0 мкМ | [50] | D_{IP3} | 10.0 | Подбор |
| Кальций в цитозоле | $[Ca_{Cyt}^{2+}]$ | >> | 0.1 мкМ | [51] | D_{ca} | 10–170 | Подбор |
| Кальций в акросоме | $[Ca_{Acr}^{2+}]$ | Акросома | 256 мкМ | [51] | – | – | – |
| Активированная PLCβ | $[PLC\beta^{act}]$ | Плазматическая мембрана | 0 мкМ ⁻² | – | D_{prot} | 2 | [15] |
| Неактивная PLCβ***** | $[PLC\beta]$ | >> | 177 мкМ ⁻² | См. КОММ | D_{prot} | 2 | [15] |

* Рассчитывается как $2AG_{Vol0} \times N_a V_{acr} / S_{acr}$. Для $2AG_{Vol0}$ см. табл. Д4.

** Рассчитывается как N_{GPCR} / S_{acr} . Для N_{GPCR} см. табл. Д4.

*** Рассчитывается как $(N_{CaRetSlow}) / (N_a \times V_{acr})$. Для $N_{CaRetSlow}$ см. табл. Д4.

**** Рассчитывается как $(N_{CaRetFast}) / (N_a \times V_{acr})$. Для $N_{CaRetFast}$ см. табл. Д4.

***** Рассчитывается как $(N_{CaMSlow}) / (N_a \times V_{cyt})$. Для $N_{CaMSlow}$ см. табл. Д4.

***** Рассчитывается как $(N_{CaMFast}) / (N_a \times V_{cyt})$. Для $N_{CaMFast}$ см. табл. Д4.

***** Рассчитывается как $N_{PLC\beta} / S_{acr}$. Для $N_{PLC\beta}$ см. табл. Д4.

$$\frac{\partial [ABHD^*]}{\partial t} = k_{+ABHDProg} [ABHD2] [Progesterone_{in}] - k_{-ABHDProg} [ABHD2^*] + D_{Prot} \Delta [ABHD2^*] \quad (4)$$

$$\frac{\partial [PLC\beta act]}{\partial t} = -[PLC\beta act] k_{DActPLC} + k_a [G\alpha^{GTP}] [PLC\beta] + D_{prot} \Delta [PLC\beta act] \quad (10)$$

$$\frac{\partial [AG]}{\partial t} = -\frac{k_{catABHD} [AG] [ABHD2^*]}{\omega_{Acr} K_{mABHD-AG} + [AG]} + k_{AA} [AA] + D_{AA} \Delta [AG] \quad (5)$$

$$\frac{\partial [PLC\beta]}{\partial t} = [PLC\beta act] k_{DActPLC} - k_a [G\alpha^{GTP}] [PLC\beta] + D_{prot} \Delta [PLC\beta] \quad (11)$$

$$\frac{\partial [GPCRact]}{\partial t} = k_{-GPCR} [GPCR] [PGE2] / K_{dGPCR} - k_{-GPCR} [GPCRact] - k_{intern} [GPCRact] + D_{Prot} \Delta [GPCRact] \quad (6)$$

Сумма скоростей в правых частях (10) и (11) дает ноль, поэтому для гомогенной системы одно из уравнений можно отбросить.

Полученная система уравнений была упрощена путем исследования иерархии характерных времен и редукции с применением теоремы Тихонова до 9 уравнений. Сначала было произведено обезразмеривание переменных:

$$\frac{\partial [GPCR]}{\partial t} = -k_{-GPCR} [GPCR] [PGE2] / K_{dGPCR} + k_{-GPCR} [GPCRact] + D_{Prot} \Delta [GPCR] \quad (7)$$

$$PLC\beta_s = \frac{[PLC\beta]}{PLC\beta_{avg}}, \quad PLC\beta_{ACTs} = \frac{[PLC\beta act]}{PLC\beta_{ACTavg}}$$

$$\frac{\partial [\beta\gamma]}{\partial t} = k_{diss} [GPCRact] \frac{\omega_{Cyt} M - [\beta\gamma]}{\omega_{Cyt} K_{G2} + (\omega_{Acr} M - [\beta\gamma])} - k_{G1} [\beta\gamma] ([\beta\gamma] - [G\alpha^{GTP}]) + D_{Prot} \Delta [\beta\gamma] \quad (8)$$

$$\beta\gamma_s = \frac{[\beta\gamma]}{\beta\gamma_{avg}}, \quad G\alpha^{GTP}_s = \frac{[G\alpha^{GTP}]}{G\alpha^{GTP}_{avg}}$$

$$GPCRact_s = \frac{[GPCRact]}{GPCRact_{avg}}, \quad GPCR_s = \frac{[GPCR]}{GPCR_{avg}}$$

$$\frac{\partial [G\alpha^{GTP}]}{\partial t} = k_{diss} [GPCRact] \frac{\omega_{Cyt} M - [\beta\gamma]}{\omega_{Cyt} K_{G2} + (\omega_{Acr} M - [\beta\gamma])} - k_{hydr} \omega_{Cyt} [GAP] \frac{[G\alpha^{GTP}]}{\omega_{Cyt} K_{G3} + [G\alpha^{GTP}]} + D_{Prot} \Delta [G\alpha^{GTP}] \quad (9)$$

$$AG_s = \frac{[AG]}{AG_{avg}}, \quad AA_s = \frac{[AA]}{AA_{avg}}, \quad PGE2_s = \frac{[PGE2]}{PGE2_{avg}}$$

$$ABHD2_s = \frac{[ABHD2]}{ABHD2_{avg}}, \quad ABHD2^*_s = \frac{[ABHD2^*]}{ABHD2^*_{avg}}$$

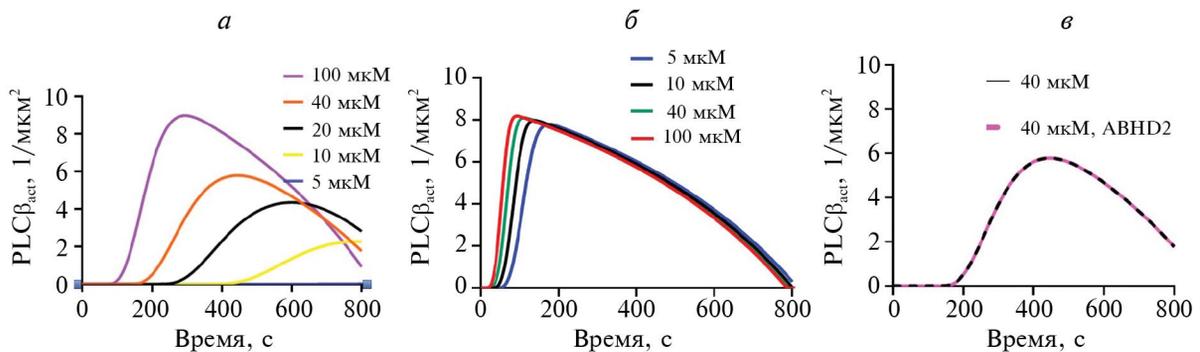


Рис. Д2. Динамика количества активированной фосфолипазы для различных параметров первого модуля модели. а – Режим 4 из [34]. б – Режим 2 из [34]. в – Сравнение полной модели и модели с примененным квазиравновесным приближением для АВНD2.

Значения с индексом $_{avg}$ соответствуют средним за период активации значениям переменных. Численные значения даны в табл. Д3.

В обезразмеренную систему были подставлены численные значения для констант, и она была переписана в виде $dp_s / dt = A^S O(1)$. Полученные значения для коэффициентов A^S соотносились следующим образом: $A^{AA} \ll A^{FG} \sim A^{G\alpha GTP} \ll A^{CaMSlow} \ll A^{GPCR} \ll A^{ABHD2}$. При применении квазистационарного приближения для ABHD2, модель полностью сохраняла свое поведение (рис. Д3в). В конечных расчетах концентрации ABHD2 и ABHD2* задавались следующими выражениями:

$$\begin{aligned} [ABHD2^*] &= [ABHD2]_0 - [ABHD2], \\ [ABHD2] &= k_{-ABHDProg} ([ABHD2]_0) / \\ &/ (k_{+ABHDProg} [Progesterone_{in}] + k_{-ABHDProg}). \end{aligned}$$

Во втором модуле на вход подавалась активность PLC следующим выражением:

$[PLC\beta_{act}] = 8e^{-\frac{(t-600)^2}{250^2}} / \text{мкМ}^2$. Активность PLC $\delta 4$ описывалась как кальций-зависимый поток IP $_3$ в цитозоль – уравнение (27). Второй модуль состоит из 8 уравнений. Обозначения переменных модели указаны в табл. Д2. Обозначения параметров модели указаны в табл. Д4.

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Ca_{Cyt}^{2+}]}{\partial t} &= J_{Acr,leak} - J_{SPCA} - J_{PMCA} + J_{IP3r} + J_{leak} + \\ &+ J_{BufCyt} + D_{Ca} \Delta [Ca_{Cyt}^{2+}], \end{aligned} \quad (12)$$

$$\frac{d[Ca_{Acr}^{2+}]}{dt} = J_{SPCA} - J_{RNE,leak} - J_{IP3r} + J_{BufER}, \quad (13)$$

$$J_{SPCA} = \begin{cases} \frac{V_{SPCA} [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}{K_{SPCA}^2 + [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}, \bar{x} \in \text{Мембрана акросомы} \\ 0, \bar{x} \notin \text{Мембрана акросомы} \end{cases}, \quad (14)$$

$$J_{PMCA} = \begin{cases} \frac{V_{PMCA} [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}{K_{PMCA}^2 + [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}, \bar{x} \in \text{Жгуттик} \\ 0, \bar{x} \notin \text{Жгуттик} \end{cases}, \quad (15)$$

$$J_{Acr,leak} = \begin{cases} k_{leak} ([Ca_{Acr}^{2+}] - [Ca_{Cyt}^{2+}]), \bar{x} \in \text{Мембрана} \\ \text{акросомы} \\ 0, \bar{x} \notin \text{Мембрана акросомы} \end{cases}, \quad (16)$$

$$J_{leak} = \begin{cases} k_{leakPP}, \bar{x} \in \text{Жгуттик} \\ 0, \bar{x} \notin \text{Жгуттик} \end{cases}, \quad (17)$$

$$J_{IP3r} = \begin{cases} N_{IP3} k_{IP3} P_0 ([Ca_{Acr}^{2+}] - [Ca_{Cyt}^{2+}]), \bar{x} \in \text{Мембрана} \\ \text{акросомы} \\ 0, \bar{x} \notin \text{Мембрана акросомы} \end{cases}, \quad (18)$$

где $P_0 = m_\infty^3 h^3$ – вероятность пребывания IP3R в открытом состоянии, определяемая согласно модели Ли-Ринзела [52], h – доля каналов, не инактивированных кальцием:

Таблица Д3. Средние по времени значения переменных при активации 50 мкМ прогестерона

| Переменная | Среднее значение | Переменная | Среднее значение | Переменная | Среднее значение |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|------------------|
| $PLC\beta_{avg}$ | 15 мкМ ⁻² | $PGE2_{avg}$ | 0.15 мкМ | $[CaRetSlow]$ | 2500 мкМ |
| $PLC\beta_{ACTavg}$ | 6 мкМ ⁻² | $ABHD2_{avg}$ | 8 мкМ ⁻² | $[CaMFast]$ | 10 мкМ |
| $\beta\gamma_{avg}$ | 33 мкМ ⁻² | $ABHD2^*_{avg}$ | 6 мкМ ⁻² | $[CaMSlow]$ | 6 мкМ |
| $G\alpha^{GTP}_{avg}$ | 200 мкМ ⁻² | $IP3_{avg}$ | 0.1 мкМ | $[CaRetFastCa]$ | 300 мкМ |
| $GPCRact_{avg}$ | 13 мкМ ⁻² | $Ca_{Cyt}^{2+}_{avg}$ | 0.25 мкМ | $[CaRetSlowCa]$ | 300 мкМ |
| $GPCR_{avg}$ | 5 мкМ ⁻² | $Ca_{Acr}^{2+}_{avg}$ | 10 мкМ | $[CaMFastCa]$ | 4.5 мкМ |
| AG_{avg} | 0.6 мкМ | $[CaRetFast]$ | 10 мкМ | $[CaMSlowCa]$ | 0.8 мкМ |

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_\infty - h}{\tau_h}, \quad (19)$$

где

$$\tau_h = \frac{1}{a_2 \left(Q_2 + [Ca_{cyt}^{2+}] \right)},$$

$$m_\infty = \left(\frac{[IP_3]}{[IP_3] + K_1} \right) \left(\frac{[Ca_{cyt}^{2+}]}{[Ca_{cyt}^{2+}] + K_5} \right), \quad h_\infty = \frac{Q_2}{Q_2 + [Ca_{cyt}^{2+}]},$$

$$Q_2 = K_2 \frac{[IP_3] + K_1}{[IP_3] + K_3},$$

$$J_{BufER} = -[CaRetSlow][Ca_{Acr}^{2+}]k_{retS}^+ + [CaRetSlowCa]k_{retS}^- - [CaRetFast][Ca_{Acr}^{2+}]k_{retF}^+ + [CaRetFast]k_{retF}^-, \quad (20)$$

$$J_{BufCyt} = -[CaMSlow][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{MS}^+ + [CaMSlowCa]k_{MS}^- - [CaMFast][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{MF}^+ + [CaMFast]k_{MF}^-, \quad (21)$$

где J_{SPCA} – это поток через SPCA, J_{PMCA} – поток через PMCA, J_{IP3r} – поток через IP3R, J_{leak} и $J_{RNE, leak}$ – утечки из внешней среды и депо.

$$\frac{d[CaRetSlow]}{dt} = -[CaRetSlow][Ca_{Acr}^{2+}]k_{+CaRetSlow} + [CaRetSlowCa] \frac{k_{+CaRetSlow}}{K_{dCaRetSlow}}, \quad (22)$$

$$\frac{d[CaRetFast]}{dt} = -[CaRetFast][Ca_{Acr}^{2+}]k_{+CaRetFast} + [CaRetFastCa] \frac{k_{+CaRetFast}}{K_{dCaRetFast}}, \quad (23)$$

$$\frac{d[CaMFast]}{dt} = -[CaMFast][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{+CaMFast} + [CaMFastCa]k_{-CaMFast}, \quad (24)$$

$$\frac{d[CaMSlow]}{dt} = -[CaMSlow][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{+CaMSlow} + [CaMSlowCa] \frac{k_{+CaMSlow}}{K_{dCaMSlow}}, \quad (25)$$

$$\frac{\partial [IP3]}{\partial t} = J_{PLC\beta} - J_{IP5pp} + J_{plcd} + D_{IP3} \Delta [IP3], \quad (26)$$

$$J_{PLC\delta} = \begin{cases} \frac{N_{PLC\delta} k_{PLC} [Ca_{Cyt}^{2+}]}{N_A V_{cyt} (K_{PLC} + [Ca_{Cyt}^{2+}])}, & \bar{x} \in \text{Головка+шейка} \\ 0, & \bar{x} \notin \text{Головка+шейка} \end{cases}$$

$$J_{PLC\beta} = \begin{cases} [PLC\beta act] k_{PLC}, & \bar{x} \in \text{Головка+шейка} \\ 0, & \bar{x} \notin \text{Головка+шейка} \end{cases}, \quad (27)$$

$$J_{IP5pp} = \frac{N_{IP5pp} k_{IP5pp} [IP3]}{N_A V_{cyt} (K_{IP5pp} + [IP3])}, \quad (29)$$

где J_{IP5pp} – скорость деградации IP3 инозитол 5-фосфатазой (IP5pp), $J_{PLC\delta}$ – скорость производства IP3 PLCδ; $J_{PLC\beta}$ – скорость производства IP3 PLCβ.

Полученная система из 8 уравнений была упрощена с помощью исследования иерархии времен путем применения теоремы Тихонова до 7 уравнений. Сначала было произведено обезразмеривание переменных:

$$IP3_s = \frac{[IP3]}{IP3_{avg}}, \quad Ca_{Cyt_s}^{2+} = \frac{[Ca_{Cyt}^{2+}]}{Ca_{Cyt_{avg}}^{2+}}, \quad Ca_{Acr_s}^{2+} = \frac{[Ca_{Acr}^{2+}]}{Ca_{Acr_{avg}}^{2+}},$$

$$CaRetSlow_s = \frac{[CaRetSlow]}{CaRetSlow_{avg}},$$

$$CaRetFast_s = \frac{[CaRetFast]}{CaRetFast_{avg}},$$

$$CaMSlow_s = \frac{[CaMSlow]}{CaMSlow_{avg}}, \quad CaMFast_s = \frac{[CaMFast]}{CaMFast_{avg}}$$

Значения с индексом *avg* соответствуют средним за период активации значениям переменных. Численные значения даны в табл. Д3. В обезразмеренную систему были подставлены численные значения для констант, и уравнения переписаны в виде $dp_s / dt = A^S O(1)$. Результирующие значения для коэффициентов A^S соотносились следующим образом:

$$A^{IP3} \sim A^{CaRetSlow} \sim A^{CaRetFast} \ll A^{CaMSlow} \ll A^{CaRNE} \sim \sim A^{CaMFast} \ll A^{CaCyt}$$

При применении квазистационарного приближения для Ca_{Cyt}^{2+} (рис. Д3а), модель расходилась. При применении квазистационарного приближения для Ca_{Acr}^{2+} (рис. Д3б), кальциевый

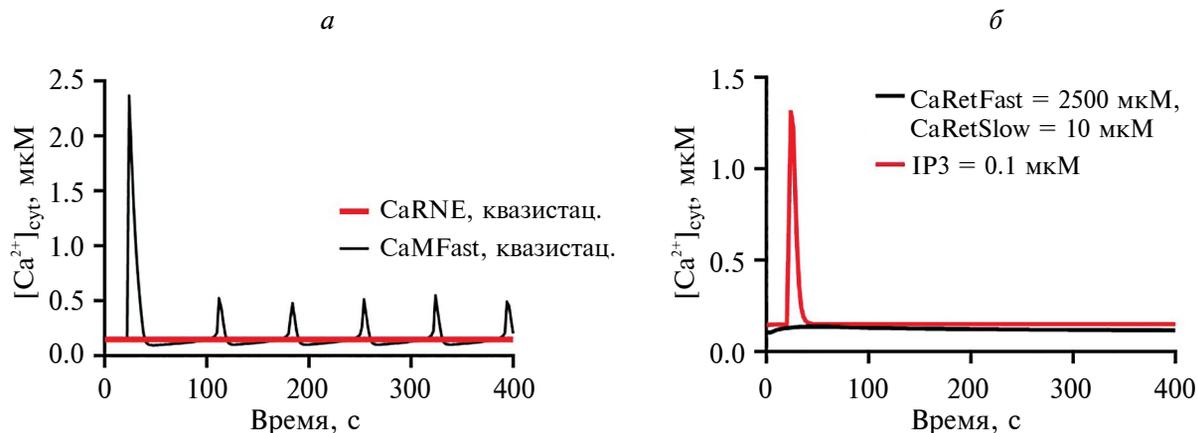


Рис. Д3. Использование квазистационарного и квазиравновесного приближений для второго модуля модели. *а* – При использовании квазистационарного (квазистац.) приближения для концентрации быстрого сайта кальмодулина, кальциевый ответ не меняется (черная кривая). Для кальция в депо при использовании квазистационарного приближения кальциевый ответ отсутствует. *б* – При использовании квазиравновесного приближения для кальретикулина, кальциевый ответ отсутствует. При использовании квазистационарного приближения для IP_3 кальциевый ответ сохраняется, но осцилляции в модели отсутствуют при любых значениях концентрации IP_3 .

Таблица Д4. Параметры модели

| | Значение | Ссылка | Комментарий |
|-------------------|--|---|---|
| Кальциевый модуль | | | |
| $K1$ | 0.13 мкМ | [53] | Параметр IP_3R |
| $K2$ | 30 мкМ | [54] | Параметр IP_3R |
| $K3$ | 0.003 мкМ | [54] | Параметр IP_3R |
| $K5$ | 0.13 мкМ | [54] | Параметр IP_3R |
| a_2 | 10^{-4} | [54] | Параметр IP_3R |
| V_{SPCA} | 2.31 мкМ/с | Подбор параметров | Максимальная скорость SPCA |
| K_{SPCA} | 0.27 мкМ | [55] | Аффинность SPCA к кальцию |
| k_{leak} | 0,01 | Подбор параметров | Коэффициент утечки из акросомы |
| k_{IP_3} | $0.00007 \text{ (мкМ} \times \text{с)}^{-1}$ | [56] | Поток через 1 открытый IP_3R |
| k_{leakPP} | 0.15 мкМ/с | [55] | Утечка кальция в цитозоль |
| K_{PLC} | 0.7 мкМ | [57] | Аффинность к кальцию PLC_δ |
| k_{PLC} | 5000 с^{-1} | [58] | Каталитическая константа PLC_δ и PLC_β |
| $N_{PLC\delta}$ | 15 | Метод оценки описан в [15] на основе [59] | Количество PLC_δ |
| $N_{PLC\beta}$ | 140 | [59] | Количество PLC_β |
| N_{IP_3} | 1850 | Метод оценки описан в [15] на основе [59] | Количество IP_3R |

Таблица Д4. Продолжение

| | | | |
|-------------------|---|---|--|
| N_{IP5pp} | 240 | Метод оценки описан в [15] на основе [59] | Количество IP5pp |
| $k_{catIp5pp}$ | 340 c^{-1} | [60] | Каталитическая константа IP5pp |
| K_{Ip5pp} | 0.7 мкМ | [61] | Аффинность IP5PP к IP ₃ |
| N_{CaRet} | 54000 | Метод оценки описан в [15] на основе [59] | Количество CaRet |
| $N_{CaRetSlow}$ | $N_{CaRetSlow} \times 18$ | [62] | Емкость сайта С кальретикулина |
| $N_{CaRetFast}$ | $N_{CaRetSlow} \times 2$ | [62] | Емкость сайта Р кальретикулина |
| $k_{+CaRetSlow}$ | $0.1 (\text{мкМ} \times \text{c})^{-1}$ | [63] | Скорость ассоциации сайта С с кальцием |
| $K_{dCaRetSlow}$ | 2000 мкМ | [63] | Константа диссоциации сайта С и кальция |
| $k_{+CaRetFast}$ | 0.05 | [15] | Скорость ассоциации сайта Р с кальцием |
| $K_{dCaRetFast}$ | 1 мкМ | [64] | Константа диссоциации сайта Р и кальция |
| N_{CaM} | 54000 | Метод оценки описан в [15] на основе [59] | Количество молекул кальмодулина |
| $N_{CaMSlow}$ | $N_{CaM} \times 2$ | [63] | Емкость сайта N кальмодулина |
| $N_{CaMFast}$ | $N_{CaM} \times 2$ | [63] | Емкость сайта С кальмодулина |
| $k_{+CaMSlow}$ | 10 c^{-1} | [65] | Скорость ассоциации сайта С кальмодулина с кальцием |
| $K_{dCaMSlow}$ | 1 мкМ | [63] | Константа диссоциации сайта С кальмодулина и кальция |
| $k_{+CaMFast}$ | $100 (\text{мкМ} \times \text{c})^{-1}$ | [65] | Скорость ассоциации сайта N кальмодулина с кальцием |
| $k_{-CaMFast}$ | 500 c^{-1} | [65] | Скорость диссоциации сайта N кальмодулина с кальцием |
| V_{PMCA} | 1 мкМ | [66] | Максимальная скорость PMCA |
| K_{PMCA} | 0.27 мкМ | [67] | Константа полуактивации PMCA |
| Модуль ABHD2–PLCβ | | | |
| $k_{cat_{ABHD}}$ | 0.35 | [68] | Каталитическая константа для ABHD2 |
| $K_{mABHD-AG}$ | 12 мкМ | [69] | Аффинность ABHD2 к 2-AG |
| $k_{+ABHDProg}$ | 3 | [15] | k_+ для связывания прогестерона и ABHD2 |
| $K_{mABHDProg}$ | 16 | [6] | Аффинность ABHD2 к прогестерону |
| k_{AA} | 0.01 | [6] | Скорость генерации 2-AG мембраной |
| N_{gpcr} | 400 | Метод оценки описан в [15] на основе [59] | Начальное количество молекул ABHD2 |
| k_{diss} | 25 c^{-1} | [34] | Параметр активации GPCR |

Таблица Д4. Окончание

| | | | |
|---------------|---|-------------------|--|
| k_{G1} | 10^{-6} с^{-1} | [34] | Параметр активации GPCR |
| M | 0.5 мкМ | [34] | Полная концентрация GPCR |
| K_{G2} | 0.5 мкМ | [34] | Параметр активации GPCR |
| K_{G3} | 0.002 мкМ | [34] | Параметр активации GPCR |
| $[GAP]$ | 0.025 мкМ | [34] | Концентрация GAP в клетке |
| k_{hydr} | 5 | [34] | Параметр активации GPCR |
| $k_{DActPLC}$ | 1 с^{-1} | Подбор параметров | Скорость деактивации PLC β |
| k_a | $5 (\text{мкМ} \times \text{с})^{-1}$ | Подбор параметров | Скорость активации PLC $\beta \alpha^{\text{GTP}}$ -субъединицей |
| k_{intern} | 0.01 с^{-1} | [34] | Скорость интернализации активированного G-белка |
| $2AG_{Vol0}$ | 0.7 мкМ | [6] | Начальная объемная концентрация 2-AG |
| k_{COX} | $5.9 (\text{мкМ} \times \text{с})^{-1}$ | [70] | Скорость конвертации АА в PGE2 циклооксигеназой |
| N_{COX} | 400 | [59] | Количество циклооксигеназы в сперматозоиде |
| k_{degPGE} | 0.006 с^{-1} | [71] | Скорость деградации PGE2 |
| k_{-GPCR} | 1 с^{-1} | Подбор параметров | Скорость диссоциации PGE2 и GPCR |
| K_{dGPCR} | 0.001 мкМ | [72] | Константа диссоциации комплекса PGE2-GPCR |

ответ на прогестерон отсутствовал. Аналогичный результат был получен для использования стационарного приближения для CaRetFast и CaRetSlow (рис. Д3б). В случае использования стационарного приближения для IP3, ответ наблюдался в полной мере, однако модель не была способна воспроизводить кальциевые осцилляции (рис. Д3б). Использование квазистационарного приближения для быстрого сайта кальмодулина не меняло вид кальциевого ответа, и далее данное приближение использовалось как для гомогенной, так и трехмерной модели.

Квазистационарное приближение для быстрого сайта кальмодулина было задано следующим образом:

$$[CaMFastCa] = [CaMFast]_0 - [CaMFast],$$

$$[CaMFast] = k_{-CaMFast} [CaMFast]_0 / \left([Ca_{Cyt}^{2+}] k_{+CaMFast} + k_{-CaMFast} \right)$$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ottolini M., Sonkusare S.K. 2021. The calcium signaling mechanisms in arterial smooth muscle and endothelial cells. *Compr. Physiol.* **11** (2), 1831–1869.
- Kalyanasundaram A., Li N., Hansen B.J., Zhao J., Fedorov V.V. 2019. Canine and human sinoatrial node: Differences and similarities in the structure, function, molecular profiles, and arrhythmia. *J. Vet. Cardiol.* **22**, 2–19.

3. Suarez S.S., Ho H.C. 2003. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **49** (3), 351–356.
4. Sanchez-Cardenas C., Servin-Vences M.R., Jose O., Trevino C.L., Hernandez-Cruz A., Darszon A. 2014. Acrosome reaction and Ca^{2+} imaging in single human spermatozoa: New regulatory roles of $[Ca^{2+}]_i$. *Biol. Reprod.* **91** (3), 67.
5. Taraborrelli S. 2015. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **94** Suppl 161, 8–16.
6. Miller M.R., Mannowetz N., Iavarone A.T., Safavi R., Gracheva E.O., Smith J.F., Hill R.Z., Bautista D.M., Kirichok Y., Lishko P.V. 2016. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science*. **352** (6285), 555–559.
7. Nakamura Y., Fukami K. 2009. Roles of phospholipase C isozymes in organogenesis and embryonic development. *Physiology (Bethesda)*. **24**, 332–341.
8. Kim Y.H., Park T.J., Lee Y.H., Baek K.J., Suh P.G., Ryu S.H., Kim K.T. 1999. Phospholipase C-delta1 is activated by capacitative calcium entry that follows phospholipase C-beta activation upon bradykinin stimulation. *J. Biol. Chem.* **274** (37), 26127–26134.
9. Finkelstein M., Etkovitz N., Breitbart H. 2020. Ca^{2+} signaling in mammalian spermatozoa. *Mol. Cell Endocrinol.* **516**, 110953.
10. Alasmari W., Barratt C.L., Publicover S.J., Whalley K.M., Foster E., Kay V., Martins da Silva S., Oxenham S.K. 2013. The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum. Reprod.* **28** (4), 866–876.
11. Schuh K., Cartwright E.J., Jankevics E., Bundschu K., Liebermann J., Williams J.C., Armesilla A.L., Emerson M., Oceandy D., Knobloch K.P., Neyses L. 2004. Plasma membrane Ca^{2+} ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J. Biol. Chem.* **279** (27), 28220–28226.
12. Harper C., Wootton L., Michelangeli F., Lefievre L., Barratt C., Publicover S. 2005. Secretory pathway Ca^{2+} -ATPase (SPCA1) Ca^{2+} pumps, not SERCAs, regulate complex $[Ca^{2+}]_i$ signals in human spermatozoa. *J. Cell Sci.* **118** (Pt 8), 1673–1685.
13. Si Y., Olds-Clarke P. 2000. Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.* **62** (5), 1231–1239.
14. Nakamura M., Oshio S., Tamura A., Okinaga S., Arai K. 1992. Antiserum to calreticulin inhibits sperm motility in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186** (2), 984–990.
15. Korobkin J., Balabin F.A., Yakovenko S.A., Simonenko E.Y., Sveshnikova A.N. 2021. Occurrence of calcium oscillations in human spermatozoa is based on spatial signaling enzymes distribution. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (15), 8018.
16. Rennhack A., Schiffer C., Brenker C., Fridman D., Nitao E.T., Cheng Y.M., Tamburrino L., Balbach M., Stolting G., Berger T.K., Kierzek M., Alvarez L., Wachten D., Zeng X.H., Baldi E., Publicover S.J., Kaupp U.B., Strunker T. 2018. A novel cross-species inhibitor to study the function of CatSper Ca^{2+} channels in sperm. *Br J Pharmacol.* **175** (15), 3144–3161.
17. Herrick S.B., Schweissinger D.L., Kim S.W., Bayan K.R., Mann S., Cardullo R.A. 2005. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cell Physiol.* **202** (3), 663–671.
18. Pietrobon E.O., Soria M., Dominguez L.A., Monclus Mde L., Fornes M.W. 2005. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol. Reprod. Dev.* **70** (1), 58–63.
19. Herrero M.B., Cebral E., Franchi A., Motta A., Gimeno M.F. 1998. Progesterone enhances prostaglandin E2 production via interaction with nitric oxide in the mouse acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252** (2), 324–328.
20. Joyce C.L., Nuzzo N.A., Wilson L., Jr., Zaneveld L.J. 1987. Evidence for a role of cyclooxygenase (prostaglandin synthetase) and prostaglandins in the sperm acrosome reaction and fertilization. *J. Androl.* **8** (2), 74–82.
21. Lishko P.V., Botchkina I.L., Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature*. **471** (7338), 387–391.
22. Breyer R.M., Bagdassarian C.K., Myers S.A., Breyer M.D. 2001. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 661–690.
23. Gao D.D., Lan C.F., Cao X.N., Chen L., Lei T.L., Peng L., Xu J.W., Qiu Z.E., Wang L.L., Sun Q., Huang Z.Y., Zhu Y.X., Zhou W.L., Zhang Y.L. 2022. G protein-coupled estrogen receptor promotes acrosome reaction via regulation of Ca^{2+} signaling in mouse spermdagger. *Biol. Reprod.* **107** (4), 1026–1034.
24. Kawai T., Miyata H., Nakanishi H., Sakata S., Morioka S., Sasaki J., Watanabe M., Sakimura K., Fujimoto T., Sasaki T., Ikawa M., Okamura Y. 2019. Polarized PtdIns(4,5) P(2) distribution mediated by a voltage-sensing phosphatase (VSP) regulates sperm motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116** (51), 26020–26028.
25. Choi D., Lee E., Hwang S., Jun K., Kim D., Yoon B.K., Shin H.S., Lee J.H. 2001. The biological significance of phospholipase C beta 1 gene mutation in mouse sperm in the acrosome reaction, fertilization, and embryo development. *J. Assist. Reprod. Genet.* **18** (5), 305–310.
26. Fukami K., Yoshida M., Inoue T., Kurokawa M., Fissore R.A., Yoshida N., Mikoshiba K., Takenawa T. 2003. Phospholipase Cdelta4 is required for Ca^{2+} mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell Biol.* **161** (1), 79–88.
27. Ohlmann P., Hechler B., Cazenave J.P., Gachet C. 2004. Measurement and manipulation of $[Ca^{2+}]_i$ in suspensions of platelets and cell cultures. *Methods Mol. Biol.* **273**, 229–250.

28. Mirabito Colafella K.M., Neuman R.I., Visser W., Danser A.H.J., Versmissen J. 2020. Aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia: A matter of COX-1 and/or COX-2 inhibition? *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **127** (2), 132–141.
29. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260** (6), 3440–3450.
30. Bergmann F.T., Hoops S., Klahn B., Kummer U., Mendes P., Pahle J., Sahle S. 2017. COPASI and its applications in biotechnology. *J. Biotechnol.* **261**, 215–220.
31. Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. 2006. COPASI—a COMplex PATHway SIMulator. *Bioinformatics.* **22** (24), 3067–3074.
32. Moraru, II, Schaff J.C., Slepchenko B.M., Blinov M.L., Morgan F., Lakshminarayana A., Gao F., Li Y., Loew L.M. 2008. Virtual Cell modelling and simulation software environment. *IET Syst. Biol.* **2** (5), 352–362.
33. Marhl M., Schuster S., Brumen M., Heinrich R. 1997. Modeling the interrelations between the calcium oscillations and ER membrane potential oscillations. *Biophys. Chem.* **63** (2–3), 221–239.
34. Katanaev V.L., Chornomorets M. 2007. Kinetic diversity in G-protein-coupled receptor signalling. *Biochem. J.* **401** (2), 485–495.
35. Romarowski A., Sanchez-Cardenas C., Ramirez-Gomez H.V., Puga Molina Ldel C., Trevino C.L., Hernandez-Cruz A., Darszon A., Buffone M.G. 2016. A specific transitory increase in intracellular calcium induced by progesterone promotes acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Biol. Reprod.* **94** (3), 63.
36. Klonowski W. 1983. Simplifying principles for chemical and enzyme reaction kinetics. *Biophys. Chem.* **18** (2), 73–87.
37. Lopez-Gonzalez I., Torres-Rodriguez P., Sanchez-Carranza O., Solis-Lopez A., Santi C.M., Darszon A., Trevino C.L. 2014. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* **20** (7), 619–629.
38. Smith D., Gaffney E., Blake J., Kirkman-Brown J. 2009. Human sperm accumulation near surfaces: a simulation study. *J. Fluid Mechanics.* **621**, 289–320.
39. Cummins J.M., Woodall P.F. 1985. On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.* **75** (1), 153–175.
40. Simons J., Fauci L. 2018. A model for the acrosome reaction in mammalian sperm. *Bull Math Biol.* **80** (9), 2481–2501.
41. Kirkman-Brown J.C., Barratt C.L., Publicover S.J. 2004. Slow calcium oscillations in human spermatozoa. *Biochem. J.* **378** (Pt 3), 827–832.
42. Lechleiter J., Girard S., Clapham D., Peralta E. 1991. Subcellular patterns of calcium release determined by G protein-specific residues of muscarinic receptors. *Nature.* **350** (6318), 505–508.
43. Vera-Siguenza E., Pages N., Rugis J., Yule D.I., Sneyd J. 2019. A mathematical model of fluid transport in an accurate reconstruction of parotid acinar cells. *Bull. Math. Biol.* **81** (3), 699–721.
44. Bell M., Bartol T., Sejnowski T., Rangamani P. 2019. Dendritic spine geometry and spine apparatus organization govern the spatiotemporal dynamics of calcium. *J. Gen. Physiol.* **151** (8), 1017–1034.
45. Zador A., Koch C. 1994. Linearized models of calcium dynamics: formal equivalence to the cable equation. *J. Neurosci.* **14** (8), 4705–4715.
46. Weber K., Waletzky A., Fendl D., Ordóñez P., Takawale P., Hein F., Riedel W., König A., Kunze M., Leoni A.L., Rivera J., Quirici R., Romano I., Paepke S., Okazaki Y., Hardisty J.F. 2014. New method for sperm evaluation by 3-dimensional laser scanning microscopy in different laboratory animal species. *Int. J. Toxicol.* **33** (5), 353–361.
47. Sunanda P., Panda B., Dash C., Padhy R.N., Routray P. 2018. An illustration of human sperm morphology and their functional ability among different group of subfertile males. *Andrology.* **6** (5), 680–689.
48. Albrechtova J., Albrecht T., Dureje L., Pallazola V.A., Pialek J. 2014. Sperm morphology in two house mouse subspecies: Do wild-derived strains and wild mice tell the same story? *PLoS One.* **9** (12), e115669.
49. Yeung C.H., Anapolski M., Cooper T.G. 2002. Measurement of volume changes in mouse spermatozoa using an electronic sizing analyzer and a flow cytometer: validation and application to an infertile mouse model. *J. Androl.* **23** (4), 522–528.
50. Dickinson G.D., Ellefsen K.L., Dawson S.P., Pearson J.E., Parker I. 2016. Hindered cytoplasmic diffusion of inositol trisphosphate restricts its cellular range of action. *Sci. Signal.* **9** (453), ra108.
51. Samtleben S., Jaepel J., Fecher C., Andreska T., Rehberg M., Blum R. 2013. Direct imaging of ER calcium with targeted-esterase induced dye loading (TED). *J. Vis. Exp.* (75), e50317.
52. Li Y.X., Rinzel J. 1994. Equations for InsP_3 receptor-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations derived from a detailed kinetic model: A Hodgkin-Huxley like formalism. *J. Theor. Biol.* **166** (4), 461–473.
53. De Young G.W., Keizer J. 1992. A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca^{2+} concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** (20), 9895–9899.
54. Cai X., Li X., Qi H., Wei F., Chen J., Shuai J. 2016. Comparison of gating dynamics of different IP(3) R channels with immune algorithm searching for channel parameter distributions. *Phys. Biol.* **13** (5), 056005.
55. Li L.F., Xiang C., Zhu Y.B., Qin K.R. 2014. Modeling of progesterone-induced intracellular calcium signaling in human spermatozoa. *J. Theor. Biol.* **351**, 58–66.
56. Vais H., Foskett J.K., Mak D.O. 2010. Unitary Ca^{2+} current through recombinant type 3 InsP_3 receptor

- channels under physiological ionic conditions. *J. Gen. Physiol.* **136** (6), 687–700.
57. Olson S.D., Suarez S.S., Fauci L.J. 2010. A model of CatSper channel mediated calcium dynamics in mammalian spermatozoa. *Bull. Math. Biol.* **72** (8), 1925–1946.
58. Kadamur G., Ross E.M. 2013. Mammalian phospholipase C. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 127–154.
59. Wang M., Weiss M., Simonovic M., Haertinger G., Schrimpf S.P., Hengartner M.O., von Mering C. 2012. PaxDb, a database of protein abundance averages across all three domains of life. *Mol. Cell. Proteomics.* **11** (8), 492–500.
60. De Pitta M., Goldberg M., Volman V., Berry H., Ben-Jacob E. 2009. Glutamate regulation of calcium and IP3 oscillating and pulsating dynamics in astrocytes. *J. Biol. Phys.* **35** (4), 383–411.
61. Sims C.E., Allbritton N.L. 1998. Metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate by the oocytes of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **273** (7), 4052–4058.
62. Baksh S., Michalak M. 1991. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J. Biol. Chem.* **266** (32), 21458–21465.
63. Means S., Smith A.J., Shepherd J., Shadid J., Fowler J., Wojcikiewicz R.J., Mazel T., Smith G.D., Wilson B.S. 2006. Reaction diffusion modeling of calcium dynamics with realistic ER geometry. *Biophys. J.* **91** (2), 537–557.
64. Michalak M., Corbett E.F., Mesaeri N., Nakamura K., Opas M. 1999. Calreticulin: One protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* **344** (Pt 2), 281–292.
65. Hoffman L., Chandrasekar A., Wang X., Putkey J.A., Waxham M.N. 2014. Neurogranin alters the structure and calcium binding properties of calmodulin. *J. Biol. Chem.* **289** (21), 14644–14655.
66. Wennemuth G., Babcock D.F., Hille B. 2003. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J. Gen. Physiol.* **122** (1), 115–128.
67. Lytton J., Westlin M., Burk S.E., Shull G.E., MacLennan D.H. 1992. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **267** (20), 14483–14489.
68. Vila A., Rosengarth A., Piomelli D., Cravatt B., Marnett L.J. 2007. Hydrolysis of prostaglandin glycerol esters by the endocannabinoid-hydrolyzing enzymes, monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase. *Biochemistry.* **46** (33), 9578–9585.
69. Tyukhtenko S., Karageorgos I., Rajarshi G., Zvonok N., Pavlopoulos S., Janero D.R., Makriyannis A. 2016. Specific inter-residue interactions as determinants of human monoacylglycerol lipase catalytic competency: A role for global conformational changes. *J. Biol. Chem.* **291** (6), 2556–2565.
70. Liu Y., Roth J.P. 2016. A revised mechanism for human cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **291** (2), 948–958.
71. Hwa J., Martin K. 2017. The Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes, & Related Compounds. In: *Basic & Clinical Pharmacology*. 14th ed. Ed. Katzung B.G. New York: McGraw-Hill Education.
72. Marshall F.H., Patel K., Lundstrom K., Camacho J., Foord S.M., Lee M.G. 1997. Characterization of [³H]-prostaglandin E₂ binding to prostaglandin EP₄ receptors expressed with Semliki Forest virus. *Br.J. Pharmacol.* **121** (8), 1673–1678.

Comparative Investigation of the Mechanisms of Calcium Response in Human and Murine Spermatozoa

© 2024 г. J. D. Korobkina^{1,*}, M. A. Pantelev^{1–3}, A. N. Sveshnikova^{1–3}

¹Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: juliajessika@gmail.com

Calcium signaling is a principal method of signal transduction in cells of non-excitabile tissues. In both mouse and human sperm, it can be induced in response to progesterone, manifesting as oscillations or single peaks and followed by the acrosomal reaction. However, the molecular mechanisms of progesterone activation may vary between species. In this study, we aim to compare the calcium signaling mechanisms in human and mouse spermatozoa. We investigated the calcium response in mouse sperm activated by

progesterone. We employed spectrofluorometry to quantify the rise in calcium concentration in response to progesterone in Fura-2 loaded mouse sperm cells in suspension. Our experiments demonstrated that mouse sperm cells respond to 50 μM progesterone with a peak 120 ± 35 s wide and 0.8 ± 0.3 μM high. Based on literature data, a scheme for the induction of calcium signaling was constructed, suggesting an intermediate stage with the synthesis of a certain prostanoid (possibly PGE₂) and activation of mouse sperm by this prostanoid through a G-protein-coupled receptor. Based on the obtained reaction scheme, two computational models were developed: a point model and a three-dimensional model. As with human sperm, the point model provided only a qualitative description of calcium responses, whereas the three-dimensional model produced the shape of the calcium peak and the frequency of calcium oscillations in response to progesterone that were similar to the experimentally obtained values. Using *in silico* analysis, it was shown that in mouse sperm, the spatial distribution of signaling enzymes regulates the type and form of the calcium response. We conclude that the presence of time delays due to the diffusion and spatial distribution of calcium signaling enzymes regulates the calcium response in both human and mouse sperm.

Keywords: calcium signaling, intracellular signaling, computer modeling, progesterone

УДК 577.352:577.115

ОСОБЕННОСТИ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ИОНАМИ МЕДИ

© 2024 г. И. С. Капустина^а, В. В. Гурина^{а, *}, Н. В. Озолина^а, Е. В. Спиридонова^а

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

*e-mail: nichka.g@bk.ru

Поступила в редакцию 03.10.2023

После доработки 27.11.2023

Принята к печати 28.11.2023

Исследовано влияние ионов меди на жирнокислотный состав липидов вакуолярной мембраны тканей корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) Показано, что в зависимости от применяемой концентрации (100 и 500 мкМ) ионы меди (Cu^{2+}) оказывали разное действие на вакуолярную мембрану тканей корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Действие 100 мкМ Cu^{2+} приводило к увеличению суммы жирных кислот (ЖК) на 57 мкг/мг общих липидов по сравнению с контролем. Активность стеароил-десатуразы (SDR) снижалась с 0.87 в контроле до 0.77 при 100 мкМ Cu^{2+} . При концентрации 500 мкМ Cu^{2+} увеличивалась активность SDR до 0.93 и снижалась сумма ЖК на 50 мкг/мг общих липидов по сравнению с воздействием 100 мкМ Cu^{2+} . Кроме этого, происходило увеличение насыщенности липидов тонопласта до 44 и 40 % при 100 и 500 мкМ Cu^{2+} соответственно. По результатам исследования можно предположить, что ЖК липидов тонопласта задействованы в ответных механизмах на стресс, вызванный избыточными концентрациями Cu^{2+} .

Ключевые слова: вакуолярная мембрана, липиды, жирные кислоты, стресс, ионы меди

DOI: 10.31857/S0233475524030096, **EDN:** crxemw

ВВЕДЕНИЕ

В силу прикрепленного образа жизни растения чувствительны к токсическому действию тяжелых металлов (ТМ). Токсическая доза зависит от типа иона, концентрации ионов, вида растения и стадии его роста. Известно, что незаменимые металлы Cu, Fe, Mn, Zn, Mo и Ni поглощаются и накапливаются растениями. Однако чрезмерное накопление этих металлов может быть токсичным для большинства растений [1]. Среди микроэлементов, необходимых растениям, медь (Cu) имеет жизненно важное значение. Cu-ассоциированные белки играют существенную роль в цепи переноса электронов хлоропластов и митохондрий. Ионы меди (Cu^{2+}) участвуют в фотосинтетической реакции фотосистемы II (ФС II) независимо от пластоцианина и стимулируют кислород-выделяющую активность ФС II *in vitro*. Кроме того, Cu^{2+} являются кофактором многих ферментов, таких как полифенолоксидаза, лакказы, цитохром *c*-оксидаза, супероксиддисмутаза меди/цинка (Cu/Zn-SOD), аминоксидаза. Аминоксидазы, которые связаны с клеточными стенками, катализируют

окисление путресцина с образованием перекиси водорода, необходимой для лигнификации, поперечного связывания белка клеточной стенки и запрограммированной гибели клеток [2]. Cu^{2+} связаны с окислительным фосфорилированием, транспортировкой белков, регуляцией сигналов, а также метаболизмом липидов и железа [3]. Как избыток, так и недостаток меди может привести к аномалиям или дисфункции развития и роста растений, серьезно нарушая критически важные физиологические процессы [4]. Исследования показали, что Cu^{2+} могут изменять скорость пролиферации клеток корневой меристемы, регулируя гормоны, такие как абсцизовая кислота, мелатонин и ауксин [2]. Избыток Cu^{2+} нарушает состав мембран хлоропластов и тилакоидов, что может вызывать окислительный стресс в растительных клетках и уменьшать содержание фотосинтетических пигментов. Следовательно, избыточное количество Cu^{2+} может снижать фотосинтез растений, подавляя биосинтез хлорофилла и ФС II, тем самым отрицательно влияя на растения [5]. Кроме этого, избыточные концентрации Cu^{2+} влияют на

функции некоторых ключевых клеточных компонентов, таких как белки, липиды, ДНК и РНК [2].

Толерантность растений к ТМ основана на нескольких механизмах, к которым относятся связывание с клеточной стенкой, активный транспорт ионов в вакуоль и образование комплексов с органическими кислотами или пептидами [1].

Вакуолярная компартментализация является главным механизмом изолирования ТМ, который в свою очередь зависит от работы двух вакуолярных насосов (H^+ -АТФ-азы, H^+ -пирофосфатазы) и ряда тонопластных транспортеров. Структура и функции вакуолярной мембраны реагируют на ионы ТМ и во многом зависят от изменений, которые происходят в составе липидов тонопласта [6, 7]. Известно, что действие стрессового фактора приводит к значительным изменениям в составе жирных кислот (ЖК) липидов вакуолярной мембраны [8]. В настоящее время мало изучены изменения в составе ЖК вакуолярной мембраны, происходящие в ответ на токсическое действие Cu^{2+} . В связи с этим целью нашего исследования заключалась в анализе изменений жирнокислотного состава тонопласта в условиях стресса, вызванного Cu^{2+} .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Для оценки влияния Cu^{2+} на ЖК липидов тонопласта, кусочки корнеплодов (1 см³) замачивали в растворе $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ на 16 ч при комнатной температуре. Для контроля использовали дистиллированную воду. Cu^{2+} вносили в концентрациях 100 и 500 мкМ в пересчете на ионы металла. Вакуолярные мембраны получали описанным ранее методом [9].

Общие липиды экстрагировали модифицированным методом Фолча [10]. Для контроля экстрагируемости липидов использовали 10 мкг нонадекановой кислоты (C19:0). Метилловые эфиры ЖК получали по методу Christie [11]. Анализ метиловых эфиров ЖК тонопласта проводили с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent Technology 5973N/6890N MSD/DS (США). Для идентификации пиков метиловых эфиров ЖК использовали стандарты метиловых эфиров (Sigma, США) и данные библиотеки масс-спектров NIST 05. Дополнительно рассчитывали сумму ненасыщенных жирных кислот (Σ ННЖК), сумму насыщенных жирных кислот (Σ НЖК). Для характеристики степени ненасыщенности липидов использовали индекс двойной связи (ИДС) [12]:

$$ИДС = \sum P_j n_j / 100,$$

где P_j — содержание кислоты, %; n_j — количество двойных связей в каждой кислоте.

Активность ацил-липидных мембранных $\omega 9$ -, $\omega 6$ - и $\omega 3$ -десатураз, отвечающих за введение двойных связей в углеводородные цепи олеиновой (C18:1(n-9)), линолевой (C18:2(n-6)) и α -линоленовой (C18:3(n-3)) ЖК, рассчитывали как стеариол- (SDR), олеил- (ODR) и линолеил- (LDR) десатуразные отношения по формулам [12]:

$$SDR = (\%C18:1) / (\%C18:0 + \%C18:1),$$

$$ODR = (\%C18:2 + \%C18:3) / (\%C18:1 + \%C18:2 + \%C18:3),$$

$$LDR = (\%C18:3) / (\%C18:2 + \%C18:3).$$

Для статистической обработки данных использовали программные пакеты Microsoft Excel и SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили в 3–5 независимых повторностях. Полученные данные представляли в виде средней арифметической (M) или медианы (Me), а разброс значений — в виде стандартной ошибки (\pm S.E.) или интерквартильной широты [25 перцентиль; 75% перцентиль]. С помощью критерия Шапиро–Уилка проверяли нормальность распределения (ГОСТ Р ИСО 5479–2002) [13]. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что токсические концентрации ТМ запускают процессы окислительного стресса в клетках растений. В результате чего происходит выход из клетки различных веществ, а также изменения в составе липидов и белков, вызванные перекисным окислением мембранных липидов [14]. Поэтому подбор токсических концентраций Cu^{2+} осуществляли при помощи измерения выхода электролитов и содержания диеновых конъюгатов. Согласно полученным данным, наиболее значимое увеличение выхода электролитов было отмечено при концентрации 500 мкМ Cu^{2+} , в то время как увеличение содержания диеновых конъюгатов наблюдали при 100 мкМ. Возможно, такое разное действие Cu^{2+} отразится на составе ЖК липидов тонопласта, поскольку вакуоль и ее мембрана принимает активное участие в ответе клетки на стресс. В связи с этим было интересно выявить участие ЖК липидов тонопласта в условиях стресса, вызванного Cu^{2+} .

Проведенные исследования показали, что в липидах тонопласта в условиях токсического действия

меди увеличивалась сумма абсолютного содержания ЖК. Отмечено, что при 100 мкМ Cu^{2+} это увеличение было на 57 мкг больше по сравнению с контролем. Интересно, что при 500 мкМ Cu^{2+} сумма ЖК снижалась по сравнению с 100 мкМ (табл. 1). Известно, что абиотические стрессы активируют ферменты, которые участвуют в мобилизации ненасыщенных ЖК для ремоделирования мембранных липидов. Ремоделирование ЖК глицеролипидов – это процесс, при котором одна или обе ЖК заменяются, образуя промежуточный лизофосфолипид. Полученные лизофосфолипиды могут быть рециклированы лизофосфолипид-ацилтрансферазами с образованием фосфолипидов с различными ЖК [15]. Ремоделирование глицеролипид-ацилов играет важную роль в удалении окисленных или поврежденных ацильных цепей и высвобождении сигнальных липидов, а также в реакциях на стресс [15]. Возможно, что используемые нами концентрации Cu^{2+} также приводили к ремоделированию мембранных липидов тонопласта для сохранения физико-химических свойств мембраны.

Предполагается, что мембраносвязанные десатуразы ЖК участвуют в ремоделировании глицеролипидов [15]. В данной работе мы использовали методику оценки активности ацил-липидных мембранных $\omega 9$ -, $\omega 6$ - и $\omega 3$ -десатураз на основании состава ЖК суммарных липидов (табл. 1). Согласно полученным данным, было отмечено существенное снижение SDR при обработке 100 мкМ Cu^{2+} , с 0.87 в контроле до 0.77, что говорит о снижении активности $\omega 9$ -десатуразы. Возможно, такое снижение происходит на фоне увеличения стеариновой кислоты (C18:0) с 2.3% в контроле до 5.9% от общего количества ЖК. Содержание олеиновой кислоты (C18:1(n-9)) оставалось на уровне контроля и составляло 19%. При обработке 100 мкМ Cu^{2+} насыщение стеариновой кислоты (C18:0) снижалось и происходило ее накопление.

В случае 500 мкМ Cu^{2+} активность $\omega 9$ -десатуразы возрастала до 0.93 по сравнению с 100 мкМ, при этом снижалось содержание стеариновой кислоты (C18:0) до 1.55% (табл. 1). Известно, что $\omega 9$ -десатуразы катализируют образование двойной связи в положении 9-го углерода в ЖК, которые превращают стеариновую кислоту (C18:0) в олеиновую (C18:1(n-9)) [16]. Можно отметить, что активность $\omega 6$ - и $\omega 3$ -десатураз снижалась в присутствии обеих концентраций Cu^{2+} , приводя к уменьшению количества линолевой (C18:2(n-6)) и линоленовой (C18:3(n-3)) ЖК.

Кроме степени десатурации ЖК, длина их ацильной цепи и их позиционное распределение на

глицериновом остове влияют на организацию и текучесть мембран [15]. Увеличение или уменьшение текучести мембран может быть триггером, запускающим трансдукцию сигналов, которая будет способствовать адаптации растений к стрессовым условиям. Известно, что индекс двойных связей (ИДС) отражает изменения текучести мембраны. Значение ИДС ЖК липидов больше 1.0 говорит о высокой доле в составе липидов ненасыщенных ЖК [17]. Анализ ИДС ЖК липидов тонопласта в условиях стресса, вызванного Cu^{2+} , показал снижение этого показателя с 1.11 в контроле до 0.89 при 100 мкМ (табл. 1). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что медь индуцировала более высокое насыщение ЖК липидов тонопласта. В связи с этим следует обратить внимание на сумму насыщенных ЖК ($\Sigma\text{НЖК}$) липидов тонопласта. Полученные данные показали, что $\Sigma\text{НЖК}$ увеличивалась на 8% при воздействии 100 мкМ Cu^{2+} .

Заметные изменения в составе ЖК липидов тонопласта отмечены при анализе абсолютного содержания ЖК (табл. 1). В ответ на действие Cu^{2+} (100 мкМ) происходило увеличение количества насыщенной пальмитиновой кислоты (C16:0) на 34% по сравнению с контролем. Известно, что содержание пальмитиновой кислоты (C16:0) увеличивалось при холодовом и окислительном стрессе [18]. Кроме того, происходило увеличение стеариновой (C18:0) насыщенной ЖК в присутствии 100 мкМ Cu^{2+} , в то время как при концентрации 500 мкМ Cu^{2+} содержание этой кислоты снижалось. В присутствии 100 мкМ Cu^{2+} также отмечено значимое увеличение содержания таких насыщенных минорных ЖК, как миристиновая (C14:0) и маргариновая (C17:0), а из ненасыщенных олеиновой ЖК (C18:1(n-9)), что не было обнаружено при воздействии 500 мкМ Cu^{2+} . Олеиновая кислота (C18:1(n-9)), как представитель полиненасыщенных ЖК, принимает участие в механизмах защиты клетки от стресса, обеспечивая поддержание текучести мембран, которая играет важную роль во многих мембранозависимых процессах, например передачи Ca^{2+} -сигнала, модулирование активности мембраносвязанных белков и т.д. Похожее увеличение содержания олеиновой кислоты (C18:1(n-9)) в присутствии 100 мкМ Cu^{2+} было отмечено и для корней кукурузы [19].

Таким образом, можно сделать вывод, что ЖК липидов тонопласта участвуют в ответных механизмах на стресс, вызванный токсическими концентрациями меди. Мы предполагаем, что при действии 100 мкМ меди в вакуолярных мембранах включался процесс ремоделирования мембранных липидов, который приводил к увеличению суммы ЖК в липидах тонопласта. Однако при 100 мкМ

Таблица 1. Содержание жирных кислот липидов тонопласта тканей корнеплодов столовой свеклы после воздействия различных концентраций ионов меди

| Жирные кислоты | Контроль | | | 100 мкМ Cu ²⁺ | | | 500 мкМ Cu ²⁺ | | |
|------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------|--|
| | мкг/мг общ.лип. | % от ΣЖК | мкг/мг общ.лип. | % от ΣЖК | мкг/мг общ.лип. | % от ΣЖК | мкг/мг общ.лип. | % от ΣЖК | |
| Миристиновая, С14:0 | 1.3 ± 0.2 | 0.48 [0.46; 0.6] | 3.2 ± 0.4 ^{а,б} | 1.1 [1.0; 1.2] ^{а,б} | 0.96 ± 0.3 ^б | 0.4 [0.3; 0.5] ^б | | | |
| Пентадекановая, С15:0 | 3.3 ± 0.1 | 1.4 [1.3; 1.5] | 4 ± 0.4 | 1.4 [1.3; 1.5] | 3.4 ± 0.7 | 1.2 [1.2; 1.5] | | | |
| Пальмитиновая, С16:0 | 78.2 ± 6.9 | 31.7 [30.8; 34.8] | 104.9 ± 13.9 ^а | 35.5 [33.3; 37.8] | 99.7 ± 18 | 36.7 [35.8; 43.8] | | | |
| Пальмитолеиновая, С16:1(n-7) | 1.7 ± 0.03 | 0.73 [0.72; 0.74] | 2.2 ± 0.3 | 0.77 [0.7; 0.8] | 2.4 ± 0.8 | 0.85 [0.71; 1.16] | | | |
| Маргаритовая, С17:0 | 0.66 ± 0.1 | 0.24 [0.24; 0.3] | 1.1 ± 0.1 ^{а,б} | 0.34 [0.34; 0.38] ^б | 0.5 ± 0.05 ^б | 0.23 [0.19; 0.23] ^б | | | |
| Стеариновая, С18:0 | 5.4 ± 0.7 | 2.3 [2.0; 2.5] | 15.7 ± 1 ^{а,б} | 5.9 [5.1; 6.1] ^{а,б} | 3.6 ± 0.4 ^{а,б} | 1.6 [1.3; 1.7] ^{а,б} | | | |
| Олеиновая, С18:1(n-9) | 42.5 ± 3.9 | 19.3 [17.2; 19.4] | 54.5 ± 0.9 ^{а,б} | 19.1 [17.9; 19.7] | 43.8 ± 2.7 ^б | 15.6 [15.6; 20.1] | | | |
| Диц-вакценовая, С18:1(n-7) | 4.8 ± 0.4 | 1.9 [1.8; 2.1] | 6.2 ± 0.5 | 2.3 [1.9; 2.4] | 4.6 ± 1.4 | 2.0 [1.4; 2.3] | | | |
| С18:1(n-5) | 2.0 ± 0.2 | 0.81 [0.78; 0.90] | — | — | — | — | | | |
| Линолевая, С18:2(n-6) | 88.5 ± 6.5 | 39.5 [35.4; 40.8] | 89.4 ± 6.6 | 30.1 [29.2; 31.7] | 74.5 ± 13.6 | 30.3 [26.8; 34.5] | | | |
| Линоленовая, С18:3(n-3) | 7.8 ± 1.2 | 3.2 [2.8; 3.7] | 9.6 ± 1.4 | 3.0 [2.8; 3.7] | 6.7 ± 1.7 | 2.3 [2.2; 3.0] | | | |
| Эйкозеновая, С20:1(n-9) | — | — | 1.6 ± 0.3 | 0.53 [0.47; 0.66] | 1.3 ± 0.23 | 0.48 [0.47; 0.56] | | | |
| Бегеновая, С22:0 | — | — | — | — | 0.86 ± 0.08 | 0.39 [0.34; 0.39] | | | |
| ΣЖК | 235.9 ± 3.8 | 100 [100; 100] | 292.4 ± 18.7 ^{а,б} | 100 [100; 100] | 242.1 ± 21.3 ^б | 100 [100; 100] | | | |
| ΣНЖК | 88.8 ± 7.8 | 36.2 [34.9; 39.6] | 128.8 ± 13.8 ^а | 44.5 [42.2; 45.9] | 108.9 ± 19 | 40.6 [39.4; 47.9] | | | |
| ΣННЖК | 147.1 ± 5.5 | 63.8 [60.4; 65.1] | 163.6 ± 6.8 | 55.5 [54.2; 57.8] | 133.2 ± 14.7 | 59.4 [52.1; 60.6] | | | |
| ИДС | | 1.1 [1.03; 1.1] | | 0.89 [0.89; 0.96] | | 0.94 [0.83; 1.01] | | | |
| SDR | | 0.87 [0.87; 0.89] | | 0.77 [0.76; 0.79] ^{а,б} | | 0.93 [0.92; 0.93] ^б | | | |
| ODR | | 0.69 [0.67; 0.72] | | 0.66 [0.63; 0.66] | | 0.62 [0.59; 0.67] | | | |
| LDR | | 0.09 [0.07; 0.09] | | 0.09 [0.09; 0.1] | | 0.08 [0.08; 0.09] | | | |

Примечание: n = 3–5. Отличия значимы (p < 0.05);^а – между вариантами Контроль и 100 мкМ Cu²⁺, ^б – между вариантами 100 мкМ Cu²⁺ и 500 мкМ Cu²⁺. Для доказательства наличия значимых различий между средними M ± S.E. применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних по методу LSD (Least Significant Difference) Фишера – метод группирования выборок с наименьшей значимой разностью. Для доказательства наличия значимых различий между медианами Me [25 процентиль; 75 процентиль] использовали N-критерий Краскела–Уоллиса, и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента–Ньюмена–Кеулса.

Cu^{2+} десатуразы ЖК не вовлекались в процесс ремоделирования, так как снижалась их активность. В результате этого увеличивалась насыщенность ЖК мембранных липидов тонопласта, что делало мембрану менее жидкой, тем самым снижая ее проницаемость для Cu^{2+} и выступая в роли механизма адаптации. Выявлено, что при 500 мкМ Cu^{2+} увеличивалась активность SDR и снижалась сумма ЖК по сравнению с 100 мкМ. Возможно, данная концентрация Cu^{2+} является более токсичной, в связи с чем происходит удаление избытка Cu^{2+} в вакуоль. В этом процессе задействованы специфические белки тонопласта, для работы которых необходима более жидкая фаза мембраны.

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

Источники финансирования. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-26-00208, <https://rscf.ru/project/23-26-00208/> на оборудовании Центра коллективного пользования “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

- Memon A.R., Schröder P. 2009. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **16**, 162–175.
- Chen G., Li J., Han H., Du R., Wang X. 2022. Physiological and molecular mechanisms of plant responses to copper stress. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 12950.
- Leng X., Mu Q., Wang X., Li X., Zhu X., Shanguan L., Fang J. 2015. Transporters, chaperones, and P-type ATPases controlling grapevine copper homeostasis. *Funct. Integr. Genom.* **15**, 673–684.
- Mir A.R., Pichtel J., Hayat S. 2021. Copper: Uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *Biometals.* **34**, 737–759.
- González-Mendoza D., Gil F.E., Escoboza-García F., Santamaría J.M., Zapata-Perez O. 2013. Copper stress on photosynthesis of black mangle (*Avicennia germinans*). *An. Acad. Bras. Cienc.* **85**, 665–670.
- Sharma S.S., Dietz K.J., Mimura T. 2016. Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant Cell Environ.* **39** (5), 1112–1126.
- Нурминский В.Н., Ракевич А.Л., Мартынович Е.Ф., Озолина Н.В., Нестеркина И.С., Колесникова Е.В., Пилипченко А.А., Салаяев Р.К., Чернышов М.Ю. 2015. Особенности структуры вакуоли растительной клетки, выявленные с помощью конфокальной микроскопии. *Цитология.* **57** (6), 443–451.
- Ozolina N.V., Gurina V.V., Nesterkina I.S., Nurminsky V.N. 2020. Variations in the content of tonoplast lipids under abiotic stress. *Planta.* **251** (6), 107.
- Салаяев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. 1981. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений. *Физиол. растений.* **28**, 1295–1305.
- Folch J., Sloan Stanley G.H., Lees M. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.
- Christie W.W. 1993. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Adv. Lipid Methodol.* **2**, 69–111.
- Нохсорова В.В., Дударева Л.В., Петров К.А. 2020. Сезонная динамика липидов и их жирных кислот в почка *Betula pendula* Roth и *Alnus alnobetula* subsp. *fruticosa* (Rupr.) Raus в условиях криолитозоны. *Физиол. раст.* **67** (3), 319–328.
- Гланц С. 1999. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 459 с.
- Shahid M., Pourrut B., Dumat C., Nadeem M., Aslam M., Pinelli E. 2014. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: Phytotoxicity and physiochemical changes in plants. *Rev. Environ. Contamin. Toxicol.* **232**, 1–44.
- Yu L., Zhou C., Fan J., Shanklin J., Xu C. 2021. Mechanisms and functions of membrane lipid remodeling in plants. *Plant J.* **107** (1), 37–53.
- Halim N.F.A.A., Ali M.S.M., Leow A.T.C., Rahman R.N.Z.R.A. 2022. Membrane fatty acid desaturase: Biosynthesis, mechanism, and architecture. *App. Microbiol. Biotechnol.* **106** (18), 5957–5972.
- Ковалевская Н.П. 2023. Влияние ауксина на жирнокислотный состав и активность ацил-липидных десатураз в проростках яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. *Биол. мембраны.* **40** (1), 71–80.
- Жуков А.В. 2015. Пальмитиновая кислота и ее роль в строении и функциях мембран растительной клетки. *Физиол. раст.* **62** (5), 751–760.
- Chaffai R., Seybou T.N., Marzouk B., Ferjani E.El. 2009. A comparative analysis of fatty acid composition of root and shoot lipids in *Zea mays* under copper and cadmium stress. *Acta Biol. Hungar.* **60** (1), 109–125.

Characteristics of the Fatty Acid Composition of the Vacuolar Membrane Lipids Under the Conditions of Stress Induced by Copper Ions

© 2024 г. I. S. Kapustina¹, V. V. Gurina^{1,*}, N. V. Ozolina¹, E. V. Spiridonova¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: nichka.g@bk.ru

The effect of different concentrations of copper ions (100 and 500 μM) on the fatty acid composition of the vacuolar membrane lipids of beet root tissues (*Beta vulgaris* L.) was studied. Exposure to 100 μM copper led to an increase in the content of FAs by 57 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of total lipids as compared to the control. Stearoyl desaturase (SDR) activity decreased from 0.87 in the control to 0.77 at 100 μM copper. Exposure to 500 μM copper caused an increase in the SDR activity up to 0.93, but the proportion of FAs decreased by 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of total lipids compared with 100 μM copper. In addition, there was an increase in the saturation of tonoplast lipids to 44 and 40% at 100 and 500 μM Cu^{2+} , respectively. The results suggest that FAs of tonoplast lipids are involved in the stress response mechanisms induced by excessive Cu^{2+} concentrations.

Keywords: vacuolar membrane, lipids, fatty acids, stress, copper ions