

Том 89, Номер 10

ISSN 0320-9725

Октябрь 2024



БИОХИМИЯ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 10, 2024

Метаболизм аминокислот в норме и при патологии (специальный выпуск)

Приглашённые редакторы: В.И. Буник, В.С. Покровский

- От редакции. К 100-летию со дня рождения академика Т.Т. Берёзова 1607
- Совместное введение крысам метформина и ампролиума влияет на метаболизм свободных аминокислот в мозге, изменяя поведение и частоту сердечных сокращений
А.В. Граф, А.В. Артюхов, О.Н. Соловьева, А.Л. Ксенофонтов, В.И. Буник 1609
- Транспорт аминокислот в плаценте крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной метиониновой нагрузкой
Ю.П. Милютин, Г.О. Керкешко, Д.С. Васильев, Н.Л. Туманова, И.В. Залозная, С.К. Бочковский, А.Д. Щербицкая, А.В. Михель, Г.Х. Толибова, А.В. Арутюнян 1630
- Композит бактериальной целлюлозы и хитозана для пролонгированного действия L-аспарагиназы на клетки меланомы
А.Н. Шишпарёнок, Е.Р. Петряев, С.А. Королёва, Н.В. Добрякова, И.Д. Злотников, Е.Н. Комедчикова, О.А. Колесникова, Е.В. Кудряшова, Д.Д. Жданов 1649
- Сенсибилизация глиобластомы к терапевтическим воздействиям путём депривации глутамината зависит от клеточного фенотипа и метаболизма
А.А. Исакова, И.Н. Дружкова, А.М. Можеров, Д.В. Мазур, Н.В. Антипова, К.С. Краснов, Р.С. Фадеев, М.Э. Гаспарян, А.В. Яголович 1668

РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

- Миогенные классические эндоканнабиноиды, их мишени и активность (обзор)
О.П. Балежина, Е.О. Тарасова, П.О. Богачева 1684
- Анализ экспрессии генов *GRIPAP1*, *DLG4*, *KIF1B*, *NGFRAP1* и *NRF1* в периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона на ранних клинических стадиях заболевания
М.В. Лукашевич, М.М. Руденок, Е.И. Семенова, С.А. Партевян, А.В. Карабанов, Е.Ю. Федотова, С.Н. Иллариошкин, П.А. Сломинский, М.И. Шадрин, А.Х. Алиева 1705
- Сравнительное изучение спектральных и функциональных свойств реакционных центров дикого типа и двойного мутанта H(L173)L/I(L177)H пурпурной бактерии *Cereibacter sphaeroides*
Т.Ю. Фуфина, А.А. Забелин, Р.А. Хатыпов, А.М. Христин, А.Я. Шкуропатов, Л.Г. Васильева 1716
- Астаксантин снижает кардиотоксичность, вызванную H₂O₂ и доксорубицином в клетках кардиомиоцитов линии H9c2
Р.Р. Крестинин, М.И. Кобякова, Ю.Л. Бабурина, Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина 1731
- Накопление ионов Li⁺ в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC), обработанных LiCl, вызывает изменение транскрипции *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *MYC*
О.Е. Квитко, Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко, О.Д. Лопина, Е.А. Климанова 1744
- Исследование кинетики переноса электронов между редокс-кофакторами в фотосистеме 1 методами высокочастотной ЭПР-спектроскопии
А.А. Суханов, Г.Е. Милановский, Л.А. Витухновская, М.Д. Мамедов, К.М. Салихов, А.Ю. Семенов 1752

CONTENTS

Vol. 89, Issue 10, 2024

Amino Acid Metabolism in Human Health and Disease (Special Issue)

Guest Editors: Victoria I. Bunik and Vadim S. Pokrovsky

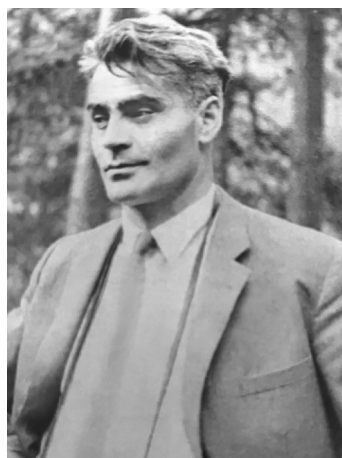
- On the 100th Anniversary of the Birth of Academician Temirbolat T. Berezov 1607
- Combined Administration of Metformin and Amprolium to Rats Affects Metabolism of Free Amino Acids in the Brain, Altering Behavior, and Heart Rate 1609
A. V. Graf, A. V. Artiukhov, O. N. Solovjeva, A. L. Ksenofontov, and V. I. Bunik
- Amino Acid Transport in the Rat Placenta in Methionine-Induced Hyperhomocysteinemia 1630
Yu. P. Milyutina, G. O. Kerkeshko, D. S. Vasiliev, N. L. Tumanova, I. V. Zalozniaia, S. K. Bochkovskii, A. D. Shcherbitskaia, A. V. Mikhel, G. H. Tolibova, and A. V. Arutjunyan
- Bacterial Cellulose and Chitosan Composite for Prolonged Action of L-Asparaginase on Melanoma Cells 1649
A. N. Shishparenok, E. R. Petryaev, S. A. Koroleva, N. V. Dobryakova, I. D. Zlotnikov, E. N. Komedchikova, O. A. Kolesnikova, E. V. Kudryashova, and D. D. Zhdanov
- Glioblastoma Sensitization to Therapeutic Effects by Glutamine Deprivation Depends on Cellular Phenotype and Metabolism 1668
A. A. Isakova, I. N. Druzhkova, A. M. Mozherov, D. V. Mazur, N. V. Antipova, K. S. Krasnov, R. S. Fadeev, M. E. Gasparian, and A. V. Yagolovich

REGULAR ARTICLES

- Myogenic Classical Endocannabinoids, Their Targets and Activity (Review) 1684
O. P. Balezina, E. O. Tarasova, and P. O. Bogacheva
- Analysis of the Expression of the *GRIPAP1*, *DLG4*, *KIF1B*, *NGFRAP1*, and *NRF1* Genes in the Peripheral Blood of Patients with Parkinson's Disease in the Early Clinical Stages 1705
M. V. Lukashevich, M. M. Rudenok, E. I. Semenova, S. A. Partezyan, A. V. Karabanov, E. Yu. Fedotova, S. N. Illarioshkin, P. A. Slominsky, M. I. Shadrina, and A. Kh. Alieva
- Comparative Study of Spectral and Functional Properties of Reaction Centers of Wild Type and Double Mutant H(L173)L/I(L177)H of the Purple Bacterium *Cereibacter sphaeroides* 1716
T. Yu. Fufina, A. A. Zabelin, R. A. Khatypov, A. M. Khristin, A. Ya. Shkuropatov, and L. G. Vasilieva
- Astaxanthin Reduces H₂O₂- and Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in H9c2 Cardiomyocyte Cells 1731
R. R. Krestinin, M. I. Kobyakova, Yu. L. Baburina, L. D. Sotnikova, and O. V. Krestinina
- Li⁺ Ions Accumulation Triggers *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *MYC* Transcription Alteration in LiCl-Treated Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) 1744
O. E. Kvitko, D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko, O. D. Lopina, and E. A. Klimanova
- Kinetics of Electron Transfer between Redox Cofactors in Photosystem I Measured by High-Frequency EPR Spectroscopy 1752
A. A. Sukhanov, G. E. Milanovsky, L. A. Vitukhnovskaya, M. D. Mamedov, K. M. Salikhov and A. Yu. Semenov

ОТ РЕДАКЦИИ

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА Т.Т. БЕРЁЗОВА



Темирболат Темболатович Берёзов (1924–2014)*

19 октября 2024 года исполняется 100 лет со дня рождения академика Темирболата Темболатовича Берёзова, создателя кафедры биохимии РУДН. Им была основана учебная студенческая лаборатория в РУДН, собрана первая команда преподавателей и написан учебник, по которому более 30 лет учились все советские студенты-медики. Научные исследования Темирболата Берёзова в основном были связаны с изучением особенностей обмена аминокислот и полиаминов в клетках злокачественных опухолей и при различных других заболеваниях человека. Этот выпуск журнала «Биохимия» продолжает знакомить читателей с исследованиями в этой области, делая особый акцент на метаболизме аминокислот в норме и при патологии.

Как учёный, педагог и общественный деятель Темирболат Берёзов опирался на лучшие традиции мастеров отечественной школы биохимии: А.Е. Браунштейна, Б.И. Збарского, С.Р. Мардашёва и С.Е. Северина. Это позволило ему обеспечить преемственность поколений и создать собственную научную школу. Большая работа была проведена Берёзовым по созданию учебно-методической литературы, результатом чего стало написание совместно с проф. Б.Ф. Коровкиным фундаментального учебника «Биологическая химия», рекомендованного Минздравом СССР в качестве базового учебника для студентов медицинских вузов,

выдержавшего три издания. Второе издание было переведено на английский язык (1992).

Научные интересы Темирболата Берёзова были связаны с исследованием молекулярных основ злокачественного роста, в частности, особенностей азотистого обмена опухолевой клетки, определением молекулярных механизмов регуляции активности и синтеза ферментов в процессе канцерогенеза, изучением возможностей использования ферментов для лечения рака. Академиком Берёзовым была выдвинута и экспериментально обоснована гипотеза об обратной зависимости между скоростью роста клеток опухоли и активностью ключевых ферментов, участвующих в распаде незаменимых биомолекул: аминокислот и витаминов. Уточнены особенности регуляции синтеза и активности ряда важных ферментов азотистого обмена в разнообразных типах опухолей человека и животных.

Темирболатом Берёзовым опубликованы более 700 научных работ, 4 монографии, 20 учебников и учебных пособий; оригинальные методы диагностики и способы очистки ферментов защищены 34 авторскими свидетельствами и патентами на изобретения. Наряду с этим Темирболат Берёзов в течение нескольких десятилетий был председателем диссертационного совета, председателем комиссии РУДН по этике, бессменным вице-президентом Биохимического общества СССР и РФ,

* Фотография публикуется с разрешения семьи Т.Т. Берёзова.

а также членом редколлегий двух международных журналов (*Biochemical Education* и *Eastern Medical Journal*) и пяти отечественных («Биомедицинская химия», «Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии», «Вестник РАМН», «Вестник ВНИЦ РАН и Республики Северная Осетия – Алания», «Вестник новых медицинских технологий»). Под его руководством защитились 27 докторов и 50 кандидатов наук.

Лично знакомые с Темирболатом Берёзовым люди – его друзья, коллеги и ученики – неизменно отмечали его организованность, трудолюбие, деликатность и внимание к деталям. Признанием научной школы, созданной Темирболатом Берёзовым на кафедре биохимии РУДН, стали престижные научные премии: 1987 г. – премия им. В.С. Гулевича за цикл работ в области энзимотерапии опухолей;

1989 г. – премия Министерства высшего образования СССР за лучшую научно-исследовательскую работу в области медицинской энзимологии; 1994 г. – премия и медаль им. Н.И. Пирогова за второе издание учебника «Биологическая химия»; 2001 г. – премия Правительства России в области науки и техники; 2002 г. – премия Президиума РАМН; 2016 г. – серебряная медаль на международном конкурсе «Архимед-2016»; 2023 г. – премия Правительства Москвы за цикл работ, посвящённых исследованию механизмов действия и противоопухолевой активности ферментов, разрушающих аминокислоты. Опыт, накопленный ветеранами кафедры, бережно перенимают молодые преподаватели. Они сохраняют и продолжают традиции, сложившиеся в коллективе кафедры, которая с 2014 года носит имя Темирболата Темболатовича Берёзова.

*Ответственный редактор выпуска
проф. В.С. Покровский*

СОВМЕСТНОЕ ВВЕДЕНИЕ КРЫСАМ МЕТФОРМИНА И АМПРОЛИУМА ВЛИЯЕТ НА МЕТАБОЛИЗМ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МОЗГЕ, ИЗМЕНЯЯ ПОВЕДЕНИЕ И ЧАСТОТУ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

© 2024 А.В. Граф^{1,2}, А.В. Артюхов^{1,3}, О.Н. Соловьева¹,
А.Л. Ксенофонтов¹, В.И. Буник^{1,3,4,*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119234 Москва, Россия; электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

³ Сеченовский университет, кафедра биохимии, 105043 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.05.2024

После доработки 30.07.2024

Принята к публикации 06.08.2024

Риск развития диабета и кардиометаболических расстройств связан с повышенным содержанием альфа-аминоадипиновой кислоты и нарушением метаболизма аминокислот с разветвлённой цепью. В то же время побочные эффекты широко используемого противодиабетического препарата метформина включают нарушение деградации аминокислот с разветвлённой цепью и угнетение внутриклеточного транспорта тиамина. Эти эффекты могут быть взаимосвязаны, поскольку дефицит тиамина ухудшает функционирование тиаминдифосфат (ТДФ)-зависимых дегидрогеназ 2-оксокислот, участвующих в деградации аминокислот, в то время как диабет часто связан с нарушением тиаминового статуса. В данной работе мы исследуем действие метформина у крыс с нарушенной доступностью тиамина. Снижение абсорбции тиамина вызывается одновременным введением ингибиторов тиаминовых транспортеров, метформина и ампролиума. Спустя 24 дня совместного приёма метформина/ампролиума не наблюдается существенных изменений в общем содержании ТДФ в мозге, как и в активностях ТДФ-зависимых ферментов центрального метаболизма, но увеличивается сродство транскетолазы и 2-оксоглутаратдегидрогеназы к ТДФ. Введение также значительно повышает уровни свободных аминокислот и аммиака в мозге, снижает антиоксидантную защиту и влияет на симпатическую/парасимпатическую регуляцию, о чём свидетельствуют изменения параметров ЭКГ и поведения. У крыс, получавших метформин/ампролиум, обнаружены сильные положительные корреляции между содержанием ТДФ и аммиака, дисульфида глутатиона, альфа-аминоадипата, глицина, цитруллина и этаноламина в мозге, чего не наблюдается у контрольных животных. Анализ полученных данных указывает на переключение метаболического действия ТДФ с антиоксидантного и азотсберегающего у контрольных крыс на прооксидантное и гипераммониемическое у крыс, получавших метформин/ампролиум. В результате введение метформина на фоне ингибирования ампролиумом внутриклеточного транспорта тиамина существенно нарушает метаболизм аминокислот в мозге крыс, изменяя поведение и параметры ЭКГ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: витамин В1, метаболизм аминокислот мозга, 2-оксоглутаратдегидрогеназа, 2-оксоадипатдегидрогеназа, пируватдегидрогеназа, поведение, тиаминдифосфат, транскетолаза, цикл трикарбоновых кислот, ЭКГ.

DOI: 10.31857/S0320972524100017 EDN: IQKVWY

Принятые сокращения: ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс; ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс; ТДФ – тиаминдифосфат; ТКТ – транскетолаза; ФЭА – фосфоэтаноламин; ВСАА – аминокислоты с разветвлённой цепью; GSH – глутатион; GSSG – окисленный глутатион.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Давно известно, что ожирение и инсулино-резистентность сопровождаются нарушениями метаболизма аминокислот и изменением их уровней в крови [1, 2]. В частности, диабет связан с повышенным содержанием α -аминоадипата в плазме крови [3]. Известно также, что терапевтический потенциал противодиабетического препарата метформина может быть увеличен путём преодоления вызываемых метформином нарушений деградации аминокислот с разветвлённой цепью (ВСАА), опосредованных АМР-активируемой протеинкиназой (АМРК) [4, 5]. Аминокислоты деградируют через митохондриальный цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), в основном в результате их трансаминирования в пируват, 2-оксоглутарат или 2-оксокислоты с разветвлённой цепью, подвергающиеся дальнейшему окислению соответствующими тиаминдифосфат (ТДФ)-зависимыми комплексами дегидрогеназ 2-оксокислот. Недостаточность окисления глюкозы обычно вызывает усиление деградации аминокислот в качестве альтернативного источника энергии.

ТДФ является дифосфорилированным производным тиамина (витамина В1). Поскольку в качестве кофермента ТДФ участвует в путях деградации аминокислот, дефицит тиамина нарушает метаболизм аминокислот. В частности, известно, что блокада биосинтеза ТДФ и, следовательно, нарушение катализа ТДФ-зависимыми ферментами вызывают изменения содержания ряда аминокислот в мозге экспериментальных животных [6, 7]. С другой стороны, улучшение метаболизма мозга в результате введения тиамина сопровождается снижением окисления аминокислот [8].

Хотя долгое время считалось, что дефицит тиамина больше не является проблемой в развитых странах, растёт число случаев, когда патогенез нейродегенеративных расстройств связан с нарушением тиаминового статуса пациента [9]. Употребление тиамин не рекомендуется производить одновременно с приёмом противодиабетического препарата метформина, поскольку тиамин и метформин конкурируют за одни и те же клеточные транспортеры. В связи с этим рекомендации учитывают, что тиамин может снижать фармакологический эффект метформина. Однако возможность противоположного эффекта, то есть снижения внутриклеточного содержания тиамин в результате конкуренции метформина и тиамин за одни и те же переносчики, при назначении метформина рассматривается на удивление редко. Это ещё более поразительно ввиду неоднократно наблюдаемого нарушения тиаминового статуса у пациентов с сахарным диабетом второго типа, свидетельствующего об уменьшении кишечного

всасывания и/или внутриклеточного транспорта тиамин [10]. Несмотря на эти факты, насколько нам известно, связь между дефицитом тиамин и приёмом метформин не изучалась. Существование такой связи подтверждается рядом клинических наблюдений. Так, лактатный ацидоз является как известным эффектом тиаминового дефицита, так и распространённым побочным эффектом метформинотерапии. Некоторые исследования клинических случаев продемонстрировали, что тиамин устраняет вызванный метформином лактатный ацидоз [11, 12]. Известно также, что дефицит тиамин ухудшает окисление 2-оксокислот с разветвлённой цепью [6], что может лежать в основе нарушения деградации ВСАА метформином [4]. Однако, подобно лактатному ацидозу, связь этого побочного эффекта метформин с другим его побочным эффектом – блокированием транспорта тиамин – не анализировалась.

В данной работе мы изучали эффекты хронического введения метформин крысам, тиаминотатус которых одновременно нарушался введением ампролиума. Ампролиум является кокцидиостатиком, используемым в птицеводстве. Он блокирует всасывание тиамин в кишечнике, а также замедляет его транспорт через гематоэнцефалический барьер и внутрь клеток [13–15]. Благодаря этим свойствам данный препарат также используется в фундаментальных исследованиях для создания животных моделей дефицита тиамин [16]. Введение ампролиума может вызывать тиамин-чувствительный цереброкортикальный некроз и полиоэнцефаломалицию у сельскохозяйственных и домашних животных [17–21], тем самым ставя под сомнение безопасность использования животных, обработанных ампролиумом, для пищевого потребления [22]. Хроническое введение ампролиума мышам вызывает поведенческие изменения наряду с нарушением клеточных процессов [23]. Поэтому мы использовали комбинированное введение метформин и ампролиума крысам для моделирования эффектов противодиабетических препаратов из группы бигуанидов (метформин) на фоне такой типичной для пациентов с диабетом сопутствующей патологии, как недиагностированный дефицит тиамин. Принимая во внимание, что метформин и ампролиум оказывают влияние на внутриклеточные транспортеры тиамин семейств SLC19A и OCT [24–26], мы сравнивали тиамин-зависимый метаболизм у контрольных и обработанных крыс посредством: (1) оценки уровней ТДФ (коферментной формы тиамин), активностей ТДФ-зависимых ферментов и насыщения этих ферментов ТДФ в гомогенатах мозга, (2) количественного определения аминокислот и родственных соединений в экстрактах мозга и (3) проведения поведенческих

тестов и регистрации электрокардиограммы (ЭКГ) в ходе эксперимента. Мы показали, что к концу эксперимента контрольные и опытные животные различаются по насыщению ТДФ-зависимых ферментов ТДФ и по вкладу ТДФ и ТДФ-зависимых ферментов в метаболизм, но не по общему уровню ТДФ. Используемые препараты увеличивали содержание и усиливали метаболические взаимодействия свободных аминокислот и аммиака в коре головного мозга крыс, одновременно влияя на поведение животных и параметры ЭКГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты на животных. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованным Директивами Европейского Союза 86/609/ЕЕС и 2010/63/EU. Двадцать шесть самцов крыс линии Wistar были случайным образом распределены в контрольную и экспериментальную группы. На момент входа в эксперимент возраст крыс составлял от 5 до 6 недель, а масса тела – $155,3 \pm 2,7$ и $155,4 \pm 3,3$ г в контрольной и экспериментальной группах соответственно. В конце эксперимента крысы в возрасте от 9 до 10 недель весили $271,0 \pm 5,1$ и $278,3 \pm 5,4$ г в контрольной и экспериментальной группах соответственно. Ампролиум (40 мг/кг массы тела) и метформин (200 мг/кг массы тела для первых трёх инъекций и 70 мг/кг массы тела для последующих пятнадцати инъекций) вводили крысам в виде двух отдельных инъекций ($n = 14$; две крысы погибли на 3-й день). Контрольная группа ($n = 12$) получала две отдельные инъекции физиологического раствора. Животным делали инъекции утром (ZT 2 $\pm$ 1). Всего было сделано 18 двукратных инъекций в течение 24 дней по схеме, представленной на рис. 1, т.е. 5 дней с инъекциями сменялись двухдневным перерывом, вплоть до последних трёх дней с инъекциями. Дозы подбирали, основываясь на опубликованных данных [23, 27]. Ежедневно контролировали вес животных, потребление пищи и воды. Существенных различий между опытной и контрольной группами не наблюдалось. Тест «открытое поле» («OpenScience», Москва, Россия) использовали для оценки спонтанной активности животных в незнакомой обстановке [28]. Тест проводился в течение трёх минут в полной тишине; область освещалась 15-ваттной красной лампой, как описано ранее [29, 30]. Оценивали следующие параметры: локомоторная активность (по количеству пересечённых линий); количество выходов в центральную зону (по числу перемещений в центральную зону, пересекающих внешний и внут-

ренний круги); количество стоек (на задних конечностях); время и количество актов груминга, время замирания, акты дефекации. Для количественной оценки исследовательской активности и тревожности также применяли кумулятивные индексы. Индекс исследовательской активности суммировал количество стоек и выходов в центральную зону. Индекс тревожности суммировал количество актов груминга и дефекации, а также время груминга и замирания.

ЭКГ регистрировали в течение 3 минут с помощью неинвазивных электродов, как описано ранее [29]. Вегетативная регуляция сердца оценивалась по следующим параметрам ЭКГ: средний интервал R-R (мс); диапазон значений интервала R-R, т.е. разница между максимальным и минимальным значением интервалов R-R (dX, мс); среднеквадратичное значение последовательных разностей интервалов R-R (RMSSD, мс); и стресс-индекс (SI). Физиологический мониторинг проводили на 8-й, 15-й и 25-й дни эксперимента.

После проведения физиологических тестов на 25-й день животных умерщвляли путём декапитации. Мозг вырезали и переносили на лёд; кору головного мозга отделяли и замораживали в жидком азоте в течение 60–90 с после декапитации.

Приготовление гомогенатов мозга. Замороженную ткань коры гомогенизировали в 50 мМ MOPS-буфере (pH 7,0), содержащем 0,2 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ, 20% глицерина и ингибиторы протеазы (1 мМ AEBSF, 0,8 мкМ аprotинина, 50 мкМ бестатина, 10 мкМ пепстатина А, 15 мкМ E-64 и 20 мкМ лейпептина) с использованием диспергатора T10 Basic Ultra-Turax («IKA»; Штайфен, Германия), как описано ранее [29]. Один мл буфера использовали на 0,4 г веса свежей ткани. Ткань далее разрушали ультразвуком (7 циклов $\times$ 30 с озвучивания в режиме низкой интенсивности и 30 с паузы) с помощью ультразвукового аппарата Bioruptor («Diagenode»; Льеж, Бельгия) в ледяной водяной бане. Полученные гомогенаты смешивали в соотношении 3 : 1 (v/v) с буфером для солюбилизации, содержащим 40 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 600 мМ NaCl, 4 мМ ЭДТА, 1% дезоксихолата натрия и 4% NP-40, и инкубировали в течение не менее 30 мин перед анализами.

Определение активностей ферментов. Активность транскетолазы (ТКТ) оценивали спектрофотометрически по скорости окисления NADH в сопряжённой системе с триозофосфатизомеразой/глицерол-3-фосфатдегидрогеназой по известному методу [31], модифицированному для микропланшетного ридера [32]. Для расчёта скорости реакции использовали линейную часть кривой накопления продукта (30 мин) с последующим вычитанием фоновой скорости, измеренной без добавления пентозофосфатов. Активность пируват-

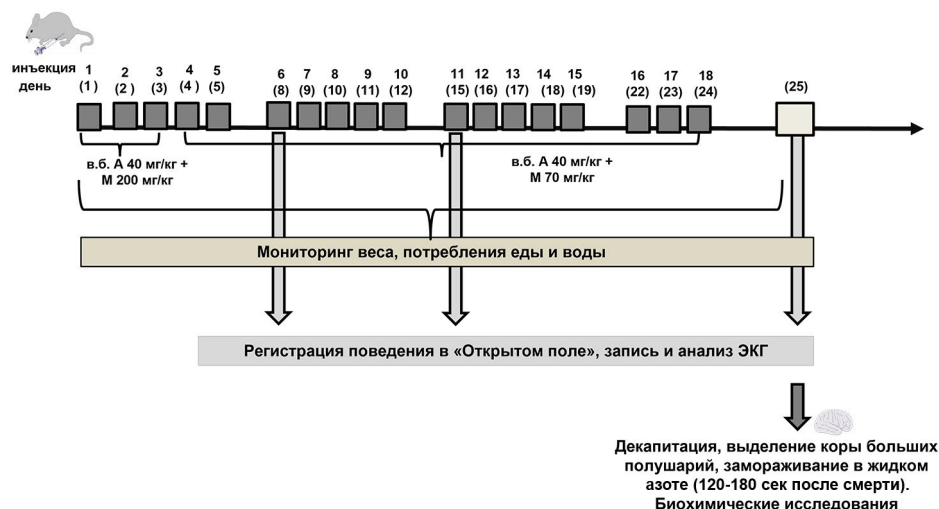


Рис. 1. Схема экспериментов на животных. В указанные дни в течение 24 дней вводили инъекции метформина (М) и ампролиума (А). За первыми тремя инъекциями метформина в дозе 200 мг/кг массы тела следовали 15 инъекций метформина в дозе 70 мг/кг массы тела. Каждая из инъекций метформина сопровождалась второй инъекцией ампролиума в дозе 40 мг/кг массы тела. Физиологические и биохимические тесты проводили в указанные дни, как описано в разделе «Материалы и методы»

дегидрогеназного комплекса (ПДК) определяли колориметрическим методом на микропланшетном ридере CLARIOstar Plus («BMG Labtech»; Ортенберг, Германия) по продукции NADH, сопряжённой с восстановлением иодонитротетразолия до формазана [33], с ранее описанными модификациями [34, 35]. Для расчёта скорости реакции использовали линейную часть кривой накопления продукта с 1 по 10 мин. Активность 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (ОГДК) оценивали по поглощению продуцируемого NADH при 340 нм, как описано ранее [8], на микропланшетном ридере Sunrise («Tecan», Австрия). Для расчёта активности использовали стационарную, т.е. после завершения лаг-периода, скорость реакции с 5 по 10 мин. Для оценки активности эндогенных холоферментов ТДФ-зависимых дегидрогеназ анализы проводили в отсутствие $MgCl_2$ и ТДФ в реакционной среде. Эндогенную холотранскетолазу определяли в среде, не содержащей ТДФ.

Количественное определение метаболитов мозга. Свободные аминокислоты и родственные аминокислоты количественно определяли в метанол-уксуснокислых экстрактах коры мозга с помощью ионообменной хроматографии в системе литиевых буферов с дериватизацией нингидрином [36]. Таурин количественно определяли в виде единого пика с фосфоэтаноломином (ФЭА). В независимых исследованиях мозга млекопитающих относительное содержание таурина, по сравнению с ФЭА, варьировало от сопоставимого до в 10 раз более обильного [37–40]. Окисленный глутатион (GSSG) и NAD^+ измеряли в чёрных 96-луночных микропланшетах с использованием

микропланшетного ридера CLARIOstar Plus с помощью опубликованных ранее флуориметрических анализов [41, 42]. ТДФ количественно определяли по ранее описанному методу активации апо-ТКТ коферментом [43], модифицированному для микропланшетного ридера [44].

Статистический анализ проводили с помощью программных пакетов STATISTICA (версия 6.0), GraphPad Prism (версия 8.4) и R (версия 4.3). Выбросы были идентифицированы с помощью итеративного теста Граббса ($\alpha = 0,01$) и исключены из статистического анализа. Учитывая нормальное распределение данных согласно тесту Д'Агостино–Пирсона, различия в содержании метаболитов между двумя группами анализировали с помощью теста Стьюдента. Различия в кумулятивных параметрах корреляций между метаболитами (сумма и средние коэффициенты корреляции, а также число значимых положительных и отрицательных корреляций) анализировали с помощью теста Манна–Уитни ввиду ненормального распределения. При анализе более двух групп использовали дисперсионный анализ (ANOVA) вместе с апостериорным сравнением средних значений в группах с помощью теста Шидака. Данные представляли как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Корреляции между исследуемыми параметрами анализировали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена, поскольку не все значения физиологических параметров были распределены нормально. Различия между группами и корреляции считали достоверными при $p < 0,05$, при $p \leq 0,1$ рассматривались как тенденции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровни ТДФ, активностей ТДФ-зависимых ферментов и редокс-активных соединений в качестве индикаторов тиамин-зависимого метаболизма в коре головного мозга крыс. Содержание ТДФ может характеризовать потенциальные изменения тиамин-зависимого метаболизма после комбинированного хронического введения ингибиторов транспорта тиамина метформина и ампролиума, поскольку ТДФ является коферментной формой и основным производным тиамина в мозге. Ввиду существенной роли ТДФ в центральном редокс-метаболизме важными индикаторами тиамин-зависимых метаболических изменений являются уровни NAD^+ , а также антиоксидантных пептидов глутатиона (GSH) и карнозина.

Как видно из рис. 2, незначительное снижение общего содержания ТДФ в мозге после обработки ингибиторами транспорта тиамина не достигает уровня статистической значимости ($p = 0,28$). Тем не менее обработка вызывает некоторый уровень окислительного стресса, известного в качестве индикатора тиаминовой недостаточности [45, 46]. Наблюдается снижение содержания антиоксиданта карнозина, который защищает мозг от повреждения пероксинитритом [47], и тенденция ($p = 0,09$) к повышению уровня GSSG (рис. 2).

Полная, т.е. определяемая в присутствии ТДФ в реакционной среде, активность ТДФ-зависимых ферментов в коре головного мозга не отличается в контрольной и обработанной группах. Однако

степень активации ферментов ТДФ, добавленным в среду, снижается после обработки. Для ТКТ это проявляется в исчезновении после обработки наблюдаемой в контрольных образцах небольшой, но статистически значимой активации ТДФ (рис. 3, а, верхняя панель). Для ОГДК наблюдается достоверное снижение фракции апо-ОГДК в обработанных образцах по сравнению с контрольными (рис. 3, в, нижняя панель). Активация ПДК ТДФ составляет ~100% как в контрольной, так и в обработанной группах, что согласуется с известной необходимостью добавления ТДФ в среду для измерения активности ПДК [34, 48]. В отличие от ТКТ и ОГДК, холофермент ПДК полностью диссоциирует в условиях анализа как в контрольной, так и в обработанной группе. Это не позволяет использовать уровни насыщения ПДГ ТДФ в качестве индикатора изменений, вызванных введением метформина/ампролиума. Однако как для ТКТ, так и для ОГДК уровни насыщения ТДФ увеличиваются после обработки по сравнению с контрольной группой.

Если бы наблюдаемые изменения в насыщении ТКТ и ОГДК были вызваны различным содержанием ТДФ в мозге крыс, то определяемые в мозге обработанных и необработанных животных уровни ТДФ (ось X) и соответствующие им активности эндогенных холоферментов либо фракций апоферментов (ось Y) занимали бы разные области пространства XY. Если же изменения в активности либо активации ферментов ТДФ (ось Y) были бы вызваны изменениями свойств фермента, а не уровнем ТДФ (ось X), то характерные

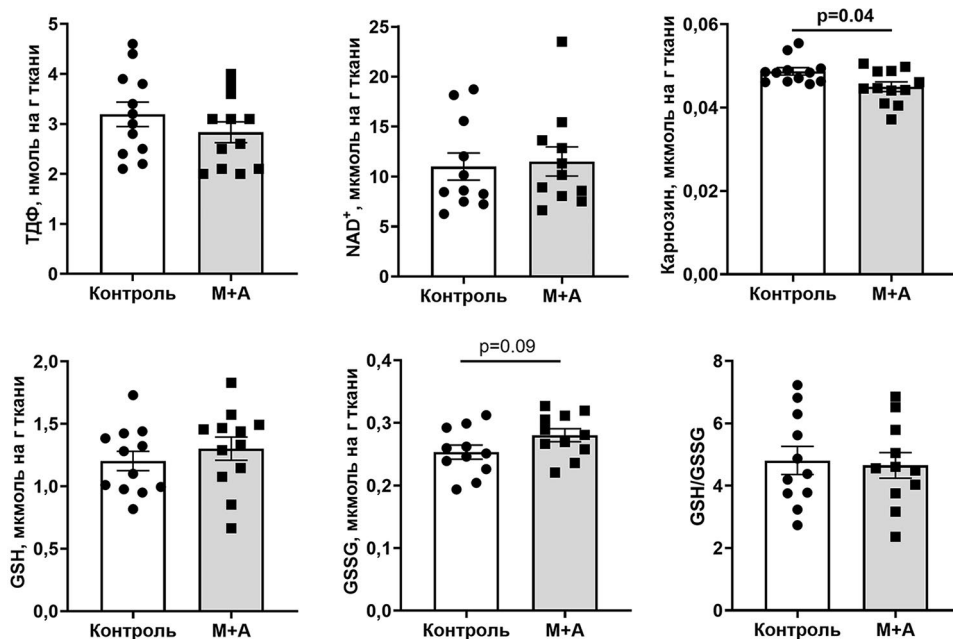


Рис. 2. Уровни ТДФ, NAD^+ , антиоксидантных пептидов карнозина и глутатиона (GSH), окисленного глутатиона (GSSG), а также соотношение восстановленного и окисленного глутатиона в коре головного мозга крыс, получавших метформин/ампролиум (M+A), по сравнению с контрольными животными

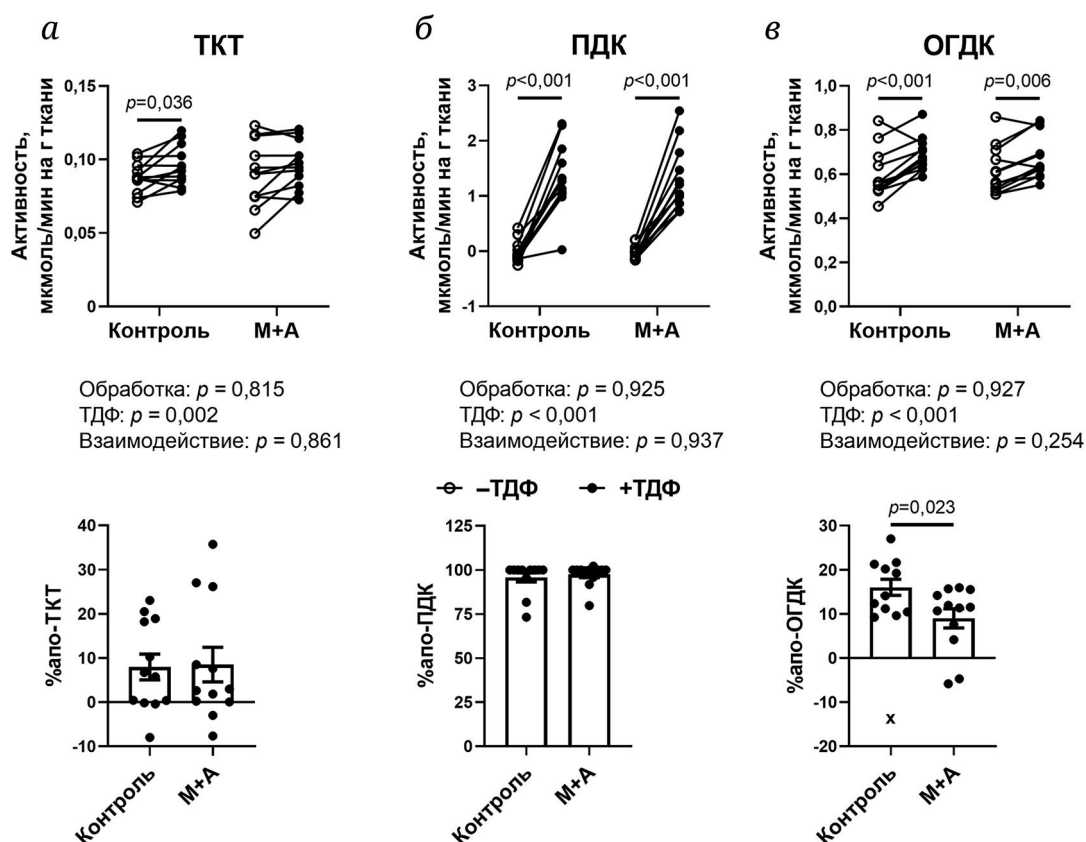


Рис. 3. Активация ТКТ (а), ПДК (б) и ОГДК (в) добавлением ТДФ в реакционную среду измерения ферментативных активностей в коре головного мозга контрольных крыс и крыс, обработанных метформином/ампролиумом (M+A). На верхней панели полые и закрашенные точки обозначают активности, измеренные без и в присутствии ТДФ соответственно (статистический анализ с помощью ANOVA с повторными измерениями). Нижняя панель показывает сравнение фракций эндогенных апоферментов ТКТ, ПДК и ОГДК в обработанных и контрольных образцах, рассчитанных как $[1 - (\text{Активность без ТДФ})/(\text{Активность в присутствии ТДФ})] \times 100\%$. Исключённый из анализа выброс обозначен символом «х»

для контрольной и опытной групп значения занимали бы одну и ту же область в пространстве XY. Корреляции между уровнем ТДФ и содержанием эндогенных холо- или апоферментов (рис. S1 Приложения) свидетельствуют в пользу второго предположения, поскольку точки для двух групп животных занимают одну и ту же область на графиках, показывающих соотношение значений активностей ТКТ или ОГДК или активации ферментов ТДФ и уровня ТДФ. Примечательно, что доля апо-ТКТ у контрольных крыс демонстрирует ожидаемую статистически значимую отрицательную корреляцию с содержанием ТДФ в мозге. Изменение параметров этой корреляции у обработанных животных дополнительно свидетельствует в пользу изменения сродства ТКТ к ТДФ после обработки. Активация митохондриального ОГДК ТДФ, добавленным в реакционную среду, достоверно не коррелирует с общим уровнем ТДФ в тканях ни у обработанных, ни у контрольных животных.

Таким образом, введение метформином/ампролиума не приводит к статистически значимому снижению общего уровня ТДФ в мозге крыс,

но увеличивает сродство ТКТ и ОГДК мозга к коферменту ТДФ.

Изменения профилей свободных аминокислот и родственных соединений в мозге крыс после хронического введения метформина и ампролиума. По сравнению с контрольной группой хроническое введение метформином/ампролиума вызывает статистически значимое увеличение содержания метиллизина, триптофана, серина, глутамата, аспартата и бета-аланина, снижая содержание карнозина (рис. 4). Кроме того, наблюдаются тенденции ($0,05 < p \leq 0,1$) к увеличению уровней цистатинина, лейцина, бета-аминоизобутирата и аланина. Содержание свободных аминокислот мозга, включая ВСАА, в основном увеличивается. Это сопровождается достоверным повышением уровня аммиака в мозге (рис. 4). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что хроническое введение метформином и ампролиума приводит к гипераммониемии мозга, возникающей в результате повышенной деградации накапливающихся аминокислот. Таким образом, в дополнение к падению уровня антиоксиданта

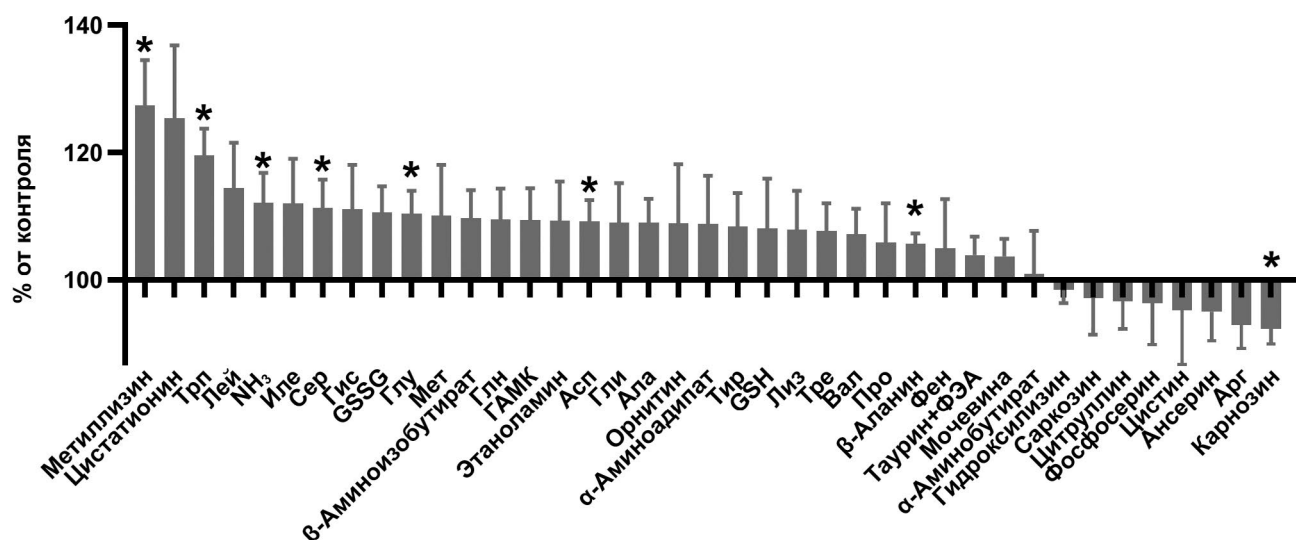


Рис. 4. Изменения (в %) содержания аминокислот и родственных соединений в коре головного мозга крыс, получавших метформин/ампролиум, по сравнению с контрольными животными ($n = 12$ в каждой группе). Исключённые из статистического анализа выбросы не показаны, поскольку находятся за пределами диапазона оси Y. * Достоверное отличие от контрольных значений, принятых за 100%

карнозина и росту содержания GSSG (рис. 2), общее нарушение метаболизма аминокислот, ассоциированное с гипераммониемией, представляет собой маркер патологических изменений в мозге крыс, получавших метформин/ампролиум.

Анализ корреляций между уровнями ТДФ или активностями ТДФ-зависимых ферментов и содержанием метаболитов мозга. Средние уровни ТДФ или активности ТДФ-зависимых ферментов в тканях (рис. 2 и 3) позволяют оценивать изменения в тиаминовом статусе, но не возникающие в результате потенциальных адаптаций различия в метаболических сетях контрольных и обработанных животных. Поэтому в дополнение к средним значениям параметров тиаминового статуса, парные корреляции между этими параметрами и содержанием метаболитов ТДФ-зависимой сети реакций полезны для характеристики метаболических изменений, вызванных введением исследуемых препаратов. Как показано в табл. 1, введение метформина/ампролиума сильно влияет на корреляции между содержанием ТДФ или активностями ТДФ-зависимых ферментов и уровнями редокс-индикаторов либо аминокислот. В частности, обработка метформином и ампролиумом приводит к достоверным положительным корреляциям между уровнями ТДФ и патологических маркеров, таких как GSSG, α-аминоадипат и аммиак. Кроме того, уровень ТДФ в мозге обработанных крыс положительно коррелирует с содержанием цитруллина, этаноламина, глицина и объединённым уровнем таурина и ФЭА, что не наблюдается у контрольных крыс. Достоверности положительной корреляции между уровнями ТДФ и лизина и отрицательной корреляции между

уровнями ТДФ и триптофана у контрольных животных, напротив, пропадают после обработки. В совокупности эти данные указывают на изменение метаболического вклада ТДФ в редокс-состояние клеток и метаболизм аминокислот после хронического введения ингибиторов транспорта тиамин.

Схожим образом под действием метформина и ампролиума меняется и значимость корреляций между уровнями активностей ТДФ-зависимых ферментов и редокс-индикаторов или аминокислот в мозге (табл. 1). В частности, после обработки уровень активности ОГДК отрицательно коррелирует с уровнями NAD^+ и редокс-потенциалом глутатиона (GSH/GSSG), в то время как у контрольных животных активность ОГДК имеет сильную положительную корреляцию с содержанием NAD^+ . Уровень активности ТКТ мозга после обработки, но не в контрольной группе, положительно коррелирует с уровнями общего глутатиона ($GSH + 2 \cdot GSSG$) и α-аминобутирата и отрицательно – с уровнем карнозина. Кроме того, достоверные положительные корреляции уровней активности ТКТ и ВСАА, наблюдаемые в контрольной группе, исчезают после обработки. В целом, корреляционный анализ показывает, что метаболические взаимосвязи ТДФ или ТДФ-зависимых ферментов со свободными аминокислотами или родственными соединениями различаются в мозге обработанных и контрольных крыс.

Влияние обработки метформином и ампролиумом на поведение крыс в тесте «открытое поле» и ЭКГ. Проведение физиологических тестов в ходе эксперимента помогает понять, как наблюдаемые изменения метаболизма аминокислот

Таблица 1. Корреляции между уровнями ТДФ или активностями ТДФ-зависимых ферментов и содержанием NAD⁺, антиоксидантных пептидов, свободных аминокислот или родственных метаболитов в коре головного мозга контрольных крыс (контроль) и крыс, обработанных метформин/ампролиумом (М+А)

Параметр	ТДФ		ПДК -ТДФ		ПДК +ТДФ		ОГДК -ТДФ		ОГДК +ТДФ		ТКТ -ТДФ		ТКТ +ТДФ	
	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А
NAD ⁺	0,34	-0,47	-0,21	-0,11	-0,05	0,10	0,66	-0,70	0,77	-0,60	0,36	0,30	-0,15	0,55
Карнозин	0,29	-0,33	-0,31	0,33	0,12	0,50	-0,08	0,08	0,21	0,38	0,27	-0,62	-0,07	-0,43
GSH	0,06	-0,07	-0,16	-0,01	-0,73	0,10	0,27	-0,13	-0,03	-0,01	-0,18	0,02	-0,45	0,15
GSSG	-0,05	0,76	0,38	-0,15	0,25	-0,60	-0,02	0,38	0,08	0,26	-0,03	0,31	0,11	0,11
GSH/GSSG	-0,14	-0,54	-0,17	-0,16	-0,04	0,46	-0,11	-0,70	-0,11	-0,61	0,00	0,19	-0,23	0,38
GSH + 2*GSSG	-0,04	0,36	0,14	-0,52	0,02	-0,28	0,04	-0,27	0,16	-0,24	-0,16	0,70	-0,39	0,69
α-Амино- адипат	-0,18	0,75	0,08	-0,01	0,10	-0,61	0,36	0,61	0,16	0,45	-0,07	0,15	-0,12	-0,01
α-Амино- бутират	0,15	0,01	-0,08	-0,57	-0,08	-0,28	0,34	-0,31	0,20	-0,45	0,09	0,59	-0,03	0,71
Арг	-0,45	0,26	0,31	0,37	0,29	0,11	-0,65	-0,05	-0,45	0,04	0,17	-0,10	0,34	0,01
β-Амино- изобутират	0,07	0,37	-0,12	-0,57	-0,69	-0,58	0,10	0,32	-0,30	0,06	-0,28	0,34	-0,36	0,21
Цитруллин	-0,16	0,60	0,21	-0,10	-0,07	-0,36	0,50	-0,03	0,52	-0,20	-0,04	0,31	-0,28	0,22
Цистатионин	0,31	-0,17	-0,10	0,75	-0,15	0,45	-0,21	-0,27	-0,08	-0,09	0,47	-0,36	0,29	-0,26
Этаноламин	0,52	0,60	-0,22	0,06	0,00	-0,31	0,38	0,26	0,51	0,41	0,35	0,23	-0,03	0,22
Гли	-0,24	0,57	0,01	0,07	0,42	-0,06	-0,29	0,01	-0,11	0,24	0,37	0,08	0,55	0,15
Гидрокси- лизин	0,11	0,30	-0,08	0,26	0,11	0,40	-0,60	0,06	-0,17	0,27	0,48	-0,49	0,37	-0,48
Иле	0,02	0,57	-0,03	0,15	0,35	-0,24	-0,54	0,01	-0,03	0,11	0,73	0,14	0,73	0,21
Лей	-0,13	0,52	0,07	0,21	0,52	-0,20	-0,61	0,04	-0,13	0,19	0,58	0,10	0,69	0,18
Лиз	0,76	0,53	-0,65	0,02	-0,21	-0,11	-0,04	0,11	0,27	0,32	0,52	0,03	0,10	0,06
Мет	-0,19	0,47	0,08	0,20	0,43	0,10	-0,76	-0,22	-0,23	-0,03	0,59	-0,02	0,65	-0,02
NH ₃	0,19	0,66	-0,01	-0,01	-0,26	-0,26	-0,37	0,08	-0,49	0,31	0,20	0,30	0,40	0,29
Фен	-0,47	0,43	0,44	0,27	0,57	0,21	-0,57	0,01	-0,32	0,30	0,15	-0,24	0,50	-0,19
Фосфосерин	0,10	0,31	-0,15	-0,55	0,29	-0,22	0,33	0,59	0,61	0,76	0,32	0,08	0,07	-0,03
Таурин + ФЭА	0,19	0,79	-0,22	-0,31	-0,29	-0,48	0,34	0,42	0,33	0,38	0,30	0,34	-0,13	0,00
Тре	0,57	0,49	-0,38	-0,13	0,01	0,06	-0,24	-0,19	0,03	0,18	0,88	0,20	0,64	0,29

Таблица 1 (окончание)

Параметр	ТДФ		ПДК -ТДФ		ПДК +ТДФ		ОГДК -ТДФ		ОГДК +ТДФ		ТКТ -ТДФ		ТКТ +ТДФ	
	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А
Трп	-0,79	-0,33	0,73	0,56	0,20	0,25	-0,49	-0,59	-0,66	-0,36	-0,08	0,03	0,35	0,29
Мочевина	0,33	0,43	-0,15	0,17	0,24	-0,13	0,07	-0,25	0,35	-0,02	0,63	0,46	0,28	0,54
Вал	-0,21	0,44	0,28	0,27	0,70	-0,02	-0,20	-0,19	0,17	0,12	0,56	0,15	0,67	0,29

Примечание. В таблице приведены метаболиты, содержание которых имеет хотя бы одну достоверную корреляцию с уровнем ТДФ или активностями ТДФ-зависимых ферментов. Каждая ячейка показывает ранговый коэффициент корреляции Спирмена для данной пары параметров. Коэффициенты корреляций, меняющихся в результате обработки от достоверных ($p < 0,05$) до недостоверных или наоборот, показаны красным цветом на сером фоне. Коэффициенты достоверных корреляций выделены жирным шрифтом.

кислот мозга влияют на поведение животных и ЭКГ. В отличие от биохимической характеристики мозговой ткани, физиологическое тестирование может повторяться в ходе эксперимента, что даёт представление о динамике изменений, вызванных введением метформина и ампролиума. Согласно ANOVA, фактор «обработки» значимо влияет на количество выходов в центральную зону (рис. 5, а) и связанную с ним локомоторную активность (рис. 5, б). Кумулятивные индексы исследовательской активности и тревожности также показывают значимый вклад фактора «обработки» (рис. 5, б). Значимое взаимодействие между количеством выходов в центральную зону и длительностью эксперимента (рис. 5, а) проявляется в увеличении выходов в центральную зону после 15-го дня только у обработанных крыс. В результате на 25-й день количество выходов в центральную зону у обработанных животных значительно выше, чем у контрольных. Очевидно, что эта разница вносит наибольший вклад в более высокий кумулятивный индекс исследовательской активности у обработанных крыс по сравнению с контрольными. Несмотря на достоверность влияния фактора «обработки» на локомоторную активность ($p = 0,046$) и кумулятивный индекс тревожности ($p = 0,03$), рассчитанную по всем тестированиям каждой из групп сравнения, достоверные различия между отдельными группами, протестированными в выбранные дни эксперимента, не выявляются (рис. 5, б).

Ввиду того, что введение метформина и ампролиума не влияет на количество стоек, но оказывает значимое влияние на количество выходов в центральную зону ($p = 0,02$) и локомоторную активность ($p = 0,046$), наблюдаемое увеличение количества выходов в центральную зону и сопутствующее увеличение исследовательской активности ($p = 0,02$), по-видимому, связано с общим

повышением локомоторной активности, вызванным обработкой (рис. 5, а, б). Эти поведенческие изменения у обработанных крыс связаны с увеличением частоты сердечных сокращений, поскольку в ходе эксперимента R-R интервал ЭКГ снижается только у крыс, получавших метформин и ампролиум (рис. 5, в).

Таким образом, хроническое введение метформина и ампролиума влияет на определённые параметры поведения и ЭКГ в зависимости от продолжительности обработки. Наиболее существенные различия между контрольными и обработанными животными наблюдаются к концу эксперимента, что проявляется в увеличении количества выходов в центральную зону и связанного с этим кумулятивного индекса исследовательской активности у получавших метформин и ампролиум крыс по сравнению с контрольными.

Анализ корреляций между уровнями ТДФ или активностей ТДФ-зависимых ферментов и параметрами поведения или ЭКГ. Чтобы понять, насколько велик вклад тиаминового статуса и его взаимодействия с содержанием метаболитов в мозге (табл. 1) в индуцируемые метформином/ампролиумом изменения поведения и ЭКГ крыс, были проанализированы корреляции тиамин-зависимых биохимических параметров с физиологическими. Результаты анализа (табл. 2) выявляют интересную временную зависимость эффектов введения метформина/ампролиума на корреляции. Уровни ТДФ, определённые в мозге на 25-й, последний, день эксперимента, более достоверно коррелируют с поведенческими параметрами, определёнными не на 25-й, а на 15-й день. Так, у контрольных животных уровень ТДФ в мозге на 25-й день положительно коррелирует с кумулятивным индексом тревожности на 15-й день и отрицательно – с кумулятивным индексом исследовательской активности

Таблица 2. Корреляции уровней ТДФ или активностей ТДФ-зависимых ферментов мозга, измеренных в присутствии (+) или отсутствии (-) ТДФ в реакционной среде, с параметрами ЭКГ или поведения у контрольных (Контроль) и обработанных метформином/ампролиумом (М+А) крыс

Параметр	ТДФ		ПДК -ТДФ		ПДК +ТДФ		ОГДК -ТДФ		ОГДК +ТДФ		ТКТ -ТДФ		ТКТ +ТДФ	
	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А
R-R интервал	-0,24	-0,19	0,03	-0,08	0,65	0,06	0,02	-0,19	-0,01	-0,15	-0,22	0,13	-0,09	0,24
dX	-0,37	0,05	0,27	-0,23	0,04	-0,08	0,18	0,02	-0,10	-0,02	-0,75	0,48	-0,50	0,42
RMSSD	-0,10	-0,18	0,02	0,09	0,11	-0,21	0,13	0,29	0,03	0,20	-0,34	0,04	-0,35	-0,01
SI	0,36	-0,06	-0,08	0,34	-0,27	0,21	-0,06	0,03	0,21	0,03	0,60	-0,40	0,38	-0,43
Тревожность, день 8	0,04	-0,02	0,20	0,41	-0,52	0,02	-0,14	-0,20	-0,45	-0,30	-0,37	-0,05	-0,10	-0,06
Тревожность, день 15	0,57	0,02	-0,53	-0,10	0,05	0,27	0,30	-0,05	0,45	-0,01	0,29	-0,38	0,01	-0,24
Тревожность, день 25	-0,16	0,08	0,01	-0,11	0,36	0,14	0,44	0,08	0,14	0,02	-0,59	0,21	-0,39	0,03
Время груминга	-0,04	0,52	-0,15	-0,09	-0,14	-0,40	0,00	0,21	0,10	-0,04	-0,28	0,42	-0,30	0,01
Время замирания	-0,31	-0,19	0,28	-0,14	0,38	0,36	0,47	-0,19	0,15	-0,14	-0,65	0,09	-0,37	0,23
Акты дефекации	-0,44	-0,11	0,14	-0,37	0,28	0,23	0,05	-0,43	-0,07	-0,01	-0,45	0,03	-0,07	0,24
Акты груминга	-0,25	-0,17	0,22	0,04	0,05	-0,05	-0,24	0,18	-0,06	-0,05	-0,27	0,23	-0,19	0,09
Исследо- вательская активность, день 8	-0,33	-0,46	0,04	-0,28	0,61	0,13	-0,06	0,00	0,15	0,23	0,39	0,07	0,32	0,22
Исследо- вательская активность, день 15	-0,60	-0,25	0,43	-0,22	0,19	-0,13	-0,34	-0,23	-0,47	-0,22	-0,10	0,22	0,03	0,22
Исследо- вательская активность, день 25	-0,10	-0,33	0,11	0,21	0,07	0,02	-0,43	-0,25	-0,01	-0,32	0,58	-0,29	0,49	-0,15
Количество стоек	-0,06	0,03	0,25	0,13	0,18	-0,27	-0,45	-0,27	0,01	-0,32	0,63	0,03	0,57	0,09
Количество выходов в централь- ную зону	-0,38	-0,80	0,09	0,39	0,03	0,55	-0,43	-0,10	-0,34	-0,08	0,12	-0,69	0,20	-0,39
Локомоторная активность, день 8	-0,40	-0,52	0,05	0,20	0,41	0,31	0,08	0,04	0,22	0,16	0,15	-0,32	0,06	-0,06

Таблица 2 (окончание)

Параметр	ТДФ		ПДК -ТДФ		ПДК +ТДФ		ОГДК -ТДФ		ОГДК +ТДФ		ТКТ -ТДФ		ТКТ +ТДФ	
	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А	Кон- троль	М+А
Локомоторная активность, день 15	-0,26	-0,58	0,21	0,22	-0,36	-0,02	0,02	-0,18	-0,25	-0,34	-0,18	0,16	-0,30	0,23
Локомоторная активность, день 25	-0,05	0,10	0,07	0,00	-0,12	-0,30	-0,61	0,12	-0,24	0,06	0,60	-0,15	0,52	-0,18

Примечание. Каждая ячейка показывает ранговый коэффициент корреляции Спирмена для данной пары параметров. Корреляции, которые достоверны ($p < 0,05$) лишь в контрольной или обработанной группе, показаны красным цветом на сером фоне. Коэффициенты достоверных корреляций выделены жирным шрифтом. Корреляции с «Локомоторной активностью» и кумулятивными индексами «Тревожность» или «Исследовательская активность» построены по данным, полученным на 8-й, 15-й или 25-й дни; корреляции с другими физиологическими параметрами показаны только для данных, полученных на 25-й день.

В конце эксперимента активности ТДФ-зависимых ферментов в основном достоверно коррелируют с параметрами поведения или ЭКГ у контрольных животных, причём эти корреляции пропадают у обработанных животных (табл. 2). То же самое наблюдается и для корреляции между активностью ПДК и исследовательской активностью на 8-й день. У обработанных животных возникает лишь отрицательная корреляция между активностью ТКТ и количеством выходов в центральную зону, отсутствующая у контрольных животных.

В целом, активность эндогенного холофермента ТКТ показывает наибольшее количество достоверных корреляций, как положительных, так и отрицательных, с параметрами поведения или ЭКГ, в основном у контрольных животных (табл. 2).

Изменения метаболической сети мозга крыс после хронического введения метформина/ампролиума, детектируемые по корреляциям биохимических и физиологических параметров. На рис. 6 и 7 показаны паттерны взаимодействия между содержанием метаболитов, активностями ферментов и физиологическими параметрами у контрольных и обработанных крыс. В целом, корреляционные матрицы для контрольных и обработанных животных показывают рост положительных взаимосвязей между содержанием аминокислот мозга и родственных им соединений (группа 5 на рис. 6 и 7) после обработки метформином/ампролиумом. По сравнению с контрольными животными у обработанных наблюдается более чем двукратное увеличение суммарных и средних коэффициентов корреляций, а также количества положительных корреляций между содержанием этих метаболитов (табл. S1

Приложения). Одновременно растёт содержание свободных аминокислот и аммиака в мозге (рис. 4). В совокупности эти результаты свидетельствуют в пользу общей причины повышения содержания различных аминокислот, такой как превалирование деградации белков над их биосинтезом.

Значимые сдвиги в корреляциях между уровнями метаболитов и активностями ТДФ-зависимых ферментов, вызванные введением метформина и ампролиума (табл. 1 и обсуждение выше), сопровождаются изменениями в корреляциях между связанными с ТДФ маркерами патологических состояний. В частности, индуцированное обработкой изменение знака корреляции между содержанием NAD^+ и активностью ОГДК сопровождается изменениями достоверности других корреляций с уровнем NAD^+ . У контрольных животных уровень NAD^+ положительно коррелирует с содержанием мочевины и объединёнными уровнями таурина (антиоксиданта) и ФЭА. После обработки эти корреляции замещаются положительными корреляциями между уровнями NAD^+ и триптофана либо редокс-потенциала глутатиона (GSH/GSSG), а также достоверной отрицательной корреляцией между уровнями NAD^+ и α -аминоадипата. Примечательно, что введение животным метформина/ампролиума вызывает отрицательную корреляцию уровней α -аминоадипата и GSH/GSSG и положительную корреляцию уровней α -аминоадипата и GSSG, при этом обе корреляции отсутствуют у контрольных животных. У контрольных животных наблюдаются достоверные корреляции между содержанием антиоксиданта карнозина и уровнями аммиака (отрицательная), аланина (положительная) или гистидина (положительная). У обработанных животных эти корреляции

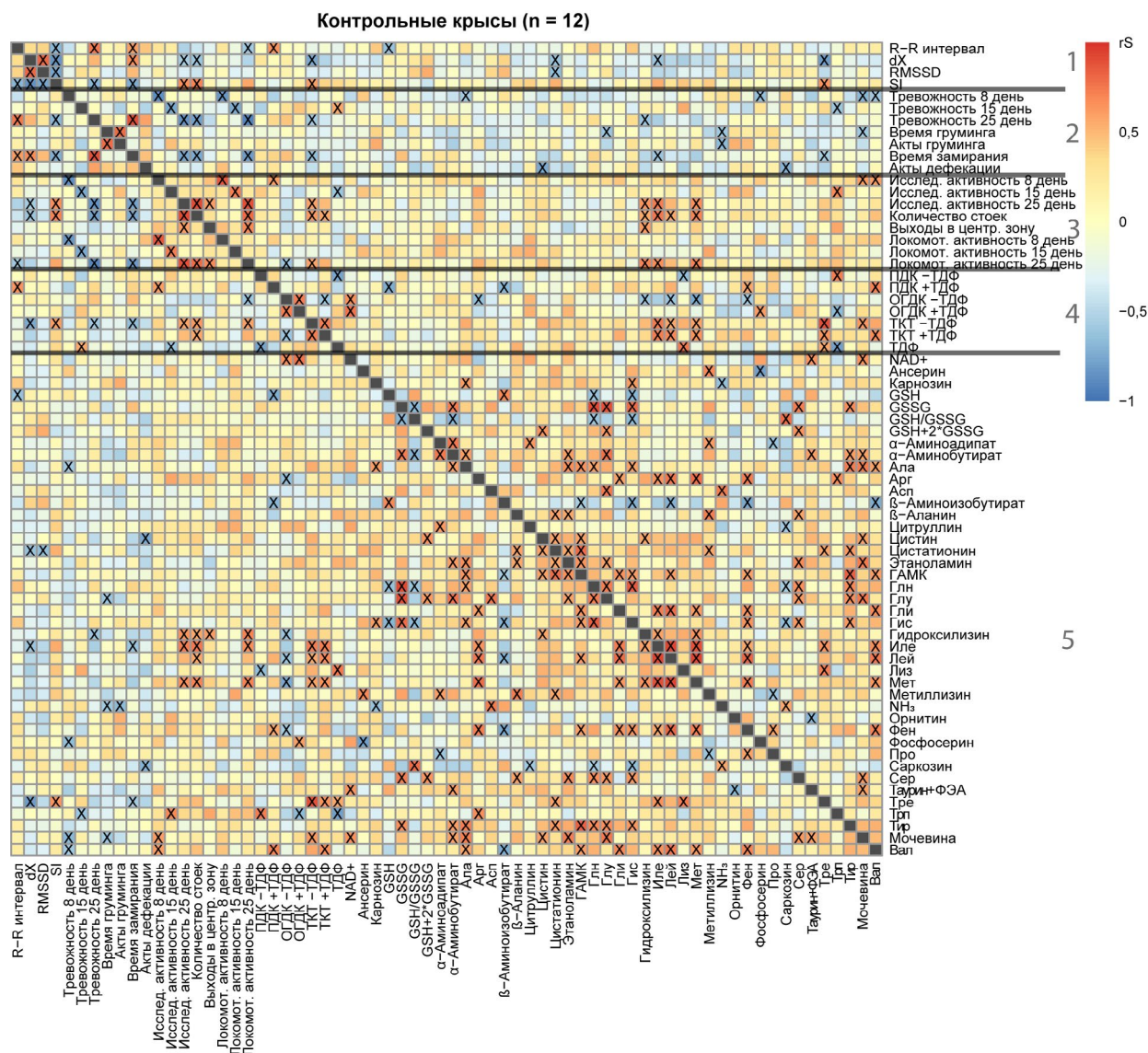


Рис. 6. Матрицы корреляций физиологических и биохимических параметров у контрольных крыс. Выделенные горизонтальные линии делят параметры на пять групп: (1) параметры ЭКГ, (2) параметры тревожности, (3) параметры исследовательской и локомоторной активностей, (4) активности ТДФ-зависимых ферментов вместе с уровнем ТДФ и (5) уровни NAD⁺, аминокислот и родственных соединений

замещаются достоверными отрицательными корреляциями между уровнем карнозина и уровнем общего глутатиона или активностью ТКТ, а также достоверными положительными корреляциями между содержаниями карнозина и пролина либо цистина. Таким образом, одновременно с изменением взаимосвязей уровней ТДФ или активностей ТДФ-зависимых ферментов с другими параметрами введение метформина/ампролиума изменяет взаимосвязи различных патологических маркеров, таких как маркер окислительного стресса GSSG или маркер диабета α-аминоадипат [3].

Что касается изменений в корреляциях между биохимическими и физиологическими параметрами, обработка метформином/ампролиумом изменяет знак корреляций между содержанием

аминокислот и поведенческими параметрами групп 2 и 3. Преимущественно отрицательные корреляции между параметрами тревожности и содержанием аминокислот у контрольных животных становятся преимущественно положительными у обработанных животных. Противоположная ситуация наблюдается для корреляций между содержанием аминокислот и параметрами исследовательской и локомоторной активностей (рис. 6 и 7). Тот факт, что взаимосвязи между аминокислотами мозга и поведенческими параметрами различаются у крыс в разных состояниях, согласуется с необязательностью наличия причинно-следственных связей между коррелирующими параметрами. Тем не менее важно, что соотношения между содержанием аминокис-

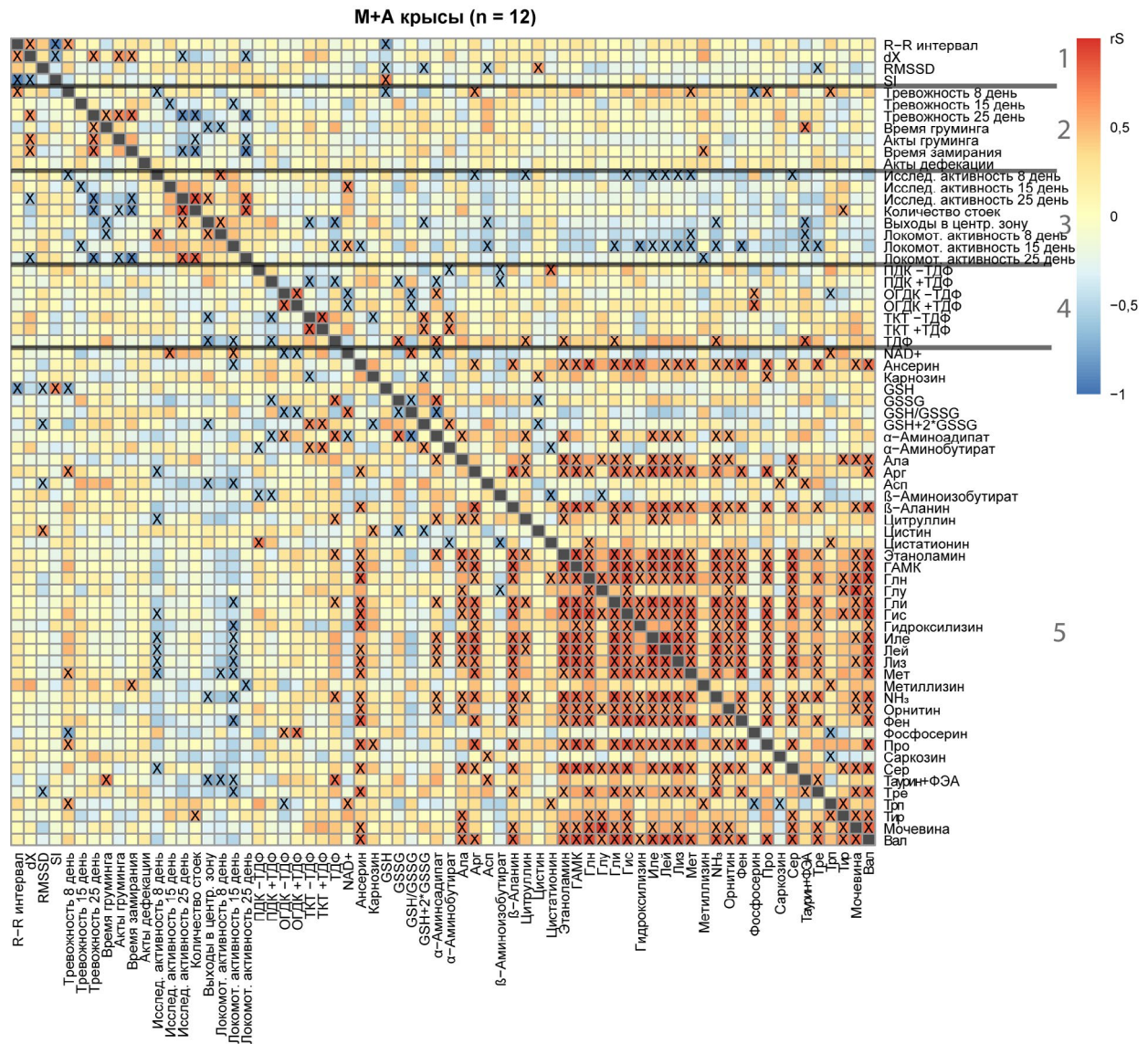


Рис. 7. Матрицы корреляций физиологических и биохимических параметров после хронического введения метформина/ампролиума. Выделенные горизонтальные линии делят параметры на пять групп: (1) параметры ЭКГ, (2) параметры тревожности, (3) параметры исследовательской и локомоторной активностей, (4) активности ТДФ-зависимых ферментов вместе с уровнем ТДФ и (5) уровни NAD⁺, аминокислот и родственных соединений

лот и поведенческими параметрами групп 2 и 3 противоположны. Это наблюдение соответствует отрицательной взаимосвязи между тревожностью и исследовательской или локомоторной активностями: тревожное животное не склонно ни к движению, ни к исследованию.

Отрицательные корреляции SI (индикатора симпатической активности) с длительностью R-R интервалов и их вариабельностью (dX) демонстрируют базовую физиологическую зависимость: чем ниже симпатическая активность, тем длиннее интервал R-R и выше его вариабельность. Поэтому достоверность этих корреляций сохраняется и после введения метформина и ампролиума. Однако отрицательная корреляция SI с RMSSD, наблюдае-

мая в контрольной группе, после обработки исчезает. Одновременно положительная корреляция dX с RMSSD у контрольных крыс замещается положительной корреляцией dX с R-R интервалом. Таким образом, хроническое введение метформина/ампролиума влияет на баланс между симпатической и парасимпатической регуляцией, проявляющийся в корреляциях между отдельными параметрами ЭКГ. Эти изменения сопровождаются изменениями корреляций между параметрами ЭКГ и содержанием метаболитов мозга, участвующих в клеточной редокс-регуляции (восстановленный, окисленный и общий глутатион, цистин, цистатионин, таурин + ФЭА), или некоторых других аминокислот (изолейцин, аспартат и трео-

нин) (рис. 6 и 7). Единственная достоверная корреляция R-R интервала с содержанием изучаемых метаболитов – отрицательная корреляция с уровнем восстановленного глутатиона – не меняется под действием метформина и ампролиума.

Таким образом, введение метформина/ампролиума влияет на баланс между симпатической и парасимпатической регуляцией, что связано с изменением взаимных корреляций между параметрами ЭКГ, а также корреляций параметров ЭКГ с уровнями аминокислот в мозге. В свою очередь, изменение баланса симпатической и парасимпатической регуляции проявляется в изменении показателей тревожности. У грызунов замирание (форма поведенческого торможения, также являющаяся показателем тревожности) сопровождается снижением частоты сердечных сокращений [49]. У контрольных животных в нашем исследовании это иллюстрируют положительные корреляции времени замирания с длительностью R-R интервалов и dX, а также отрицательная корреляция времени замирания с SI. Однако только положительная корреляция между временем замирания и dX остаётся достоверной после обработки метформином и ампролиумом. Исчезновение двух других указанных корреляций служит дополнительным подтверждением индуцируемых обработкой изменений в балансе симпатической и парасимпатической регуляции.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе показано, что хроническое введение ингибиторов поступления тиамина в клетку, метформина и ампролиума, нарушает метаболизм аминокислот в мозге крыс. Известно, что дефицит тиамина нарушает окисление ВСАА и вызывает другие изменения в метаболизме аминокислот в мозге [6, 7]. Известным, но недооцененным побочным эффектом метформина – широко используемого противодиабетического препарата – является ингибирование транспортеров тиамина. Ампролиум является применяемым в ветеринарии противопаразитарным препаратом, действие которого основано на блокаде транспорта тиамина. Хотя паразиты имеют более высокую чувствительность к такой блокаде, чем их хозяева [50], тиаминовый транспорт животных клеток также может быть затронут в зависимости от дозы. Так, ампролиум используется для моделирования дефицита тиамина у животных и в животных клетках [16, 25]. Поскольку нарушение тиаминового статуса является распространённым сопутствующим заболеванием при диабете, хроническое комбинированное введение метформина и ампролиума в нашей животной модели

имитирует эффекты метформина у тех пациентов-диабетиков, у которых имеется недиагностированная тиаминовая недостаточность. Высокая чувствительность нервной системы к нарушениям тиаминового статуса обусловлена, в частности, зависимостью метаболизма аминокислотных нейромедиаторов или их предшественников от тиамина [30, 35, 41, 51]. Эти последствия нарушенного тиаминового статуса в мозге могут влиять на параметры поведения и ЭКГ, обосновывая наш интерес к изучению влияния ингибиторов переносчиков тиамина на метаболизм мозга.

Мы показали, что хроническое введение метформина/ампролиума повышает содержание ВСАА в мозге (рис. 4), что согласуется с результатами независимых исследований, показавших нарушение деградации ВСАА метформином [4]. Исчезновение достоверных корреляций между уровнями этих аминокислот и активностями ТДФ-зависимых ферментов (табл. 1) у обработанных животных связывает изменения содержания ВСАА с перестройками в тиамин-зависимом метаболизме. Тем не менее достоверные изменения измеряемого нами ТДФ при снижении поступления в клетки тиамина под действием метформина и ампролиума не детектируются (рис. 2). Возможно, что отсутствие изменений ТДФ в мозге при снижении поступления тиамина связано с буферной функцией сильного ингибирования тиаминдифосфокиназы её продуктом ТДФ в отношении тканевого содержания ТДФ [52]. Увеличение насыщения ТКТ и ОГДК коферментом на 25-й день эксперимента (рис. 3) предполагает компенсаторную адаптацию ТДФ-связывающих ферментов в ответ на хроническое введение ингибиторов транспорта тиамина. Такие адаптации подтверждаются немонокотонными изменениями физиологических параметров в течение эксперимента (рис. 5) и корреляциями этих зависящих от времени параметров с конечными уровнями ТДФ и активностями ТДФ-зависимых ферментов (табл. 2). Помимо содержания ТДФ в тканях, насыщение ТДФ-зависимых ферментов ТДФ может также зависеть от аллостерической регуляции [53] или пост-трансляционных модификаций ферментов [32, 44]. Более высокую степень насыщения ТКТ ТДФ наблюдали и в ряде независимых исследований тиаминового метаболизма при различных патологических состояниях (см. работу Artiukhov et al. [44] и упомянутые там ссылки). Независимо от конкретных молекулярных механизмов, увеличение насыщения ТКТ и ОГДК мозга ТДФ после хронического введения метформина/ампролиума указывает на то, что данные препараты влияют на центральный метаболизм глюкозы как в цитоплазме, так и в митохондриях. Хотя вызванные обработкой изменения средних уровней редокс-индикаторов (рис. 2)

и активностей ТДФ-зависимых ферментов (рис. 3) кажутся незначительными, они ассоциированы с индикаторами окислительного стресса (снижение содержания антиоксиданта карнозина и тенденция к повышению содержания GSSG, рис. 2), повышением уровня аммиака и значительными нарушениями метаболизма аминокислот (рис. 4). В результате метформина и ампролиума вызывают изменения в поведении и ЭКГ животных (рис. 5).

Эффекты хронического введения метформина и ампролиума на уровни аминокислот в мозге и их взаимовлияние (рис. 4; табл. S1 Приложения) поразительно похожи на те, которые наблюдаются после острой гипоксии [54]. Оба воздействия повышают содержания свободных аминокислот в мозге и усиливают их положительные корреляции друг с другом. Сходство эффектов этих очень разных воздействий на метаболизм аминокислот в мозге подразумевает сильное нарушение окислительного энергетического обмена не только в случае острой гипоксии, но и после хронического приёма метформина и ампролиума. Поскольку тиамин необходим для окислительного метаболизма, наблюдаемое сходство свидетельствует в пользу зависимости нарушенного метаболизма аминокислот от тиамина после хронического введения метформина и ампролиума, ингибирующего внутриклеточный транспорт тиамина.

Повышенные уровни свободных аминокислот и аммиака, среди которых наибольшее увеличение наблюдается для уровня продукта протеолитической деградации – свободного метиллизина (рис. 4) – указывают на нарушенный гомеостаз белков по окончании введения метформина и ампролиума. Хорошо известный медиатор действия метформина, АМРК, индуцирует аутофагию при нехватке питательных веществ [55–57]. Активирующим аутофагию стресс-сигналом вполне может служить снижение внутриклеточного уровня тиамина на ранних стадиях введения метформина и ампролиума.

Гипераммониемия при нарушениях метаболизма аминокислот и гомеостаза белков часто сопровождается окислительным стрессом [58, 59]. Известно, что пониженная активность ТДФ-зависимых ферментов индуцирует гипераммониемию вследствие недостаточной активности цикла мочевины при дефиците ацетил-КоА и АТР [60]. Вклад ТДФ-зависимого метаболизма в мозговую гипераммониемию, вызванную хроническим введением метформина/ампролиума, подтверждается сильной корреляцией между уровнями ТДФ и NH_3 в мозге животных в конце эксперимента, что не наблюдается у контрольных животных (табл. 1). Увеличение насыщения ОГДК ТДФ в качестве адаптации к пониженному содержанию тиамина может способствовать гипераммониемии, акти-

вируя деградацию аминокислот в ЦТК, поскольку ОГДК катализирует скорость-лимитирующий этап цикла. Вызываемые введением метформина/ампролиума изменения взаимосвязей уровней аминокислот в мозге не только с уровнем ТДФ, но и с активностями ТДФ-зависимых ферментов (табл. 1) могут быть результатом «гиперактивации» ОГДК при росте её насыщения коферментом.

Ввиду значимости α -аминоадипата в качестве маркера диабета [3] и деградации этого соединения через метаболический путь, опосредованный ТДФ-зависимой 2-оксоадипатдегидрогеназой [61], следует отметить корреляции между уровнями α -аминоадипата и ТДФ или активностями ТДФ-зависимых дегидрогеназ, индуцированные введением метформина и ампролиума (табл. 1). Активность митохондриального 2-оксоадипатдегидрогеназного комплекса не определяется в присутствии ОГДК по причине гораздо более высокой экспрессии 2-оксоглутаратдегидрогеназы по сравнению с 2-оксоадипатдегидрогеназой в гомогенатах мозга и трансформации обоими комплексами как 2-оксоглутарата, так и 2-оксоадипата [8, 51, 62]. Однако ингибирование 2-оксоадипатдегидрогеназы *in vivo* соединениями, селективно связывающимися с её активным центром, снижало содержание карнозина и увеличивало содержание β -аланина в мозге крысы [51]. Поскольку те же изменения наблюдаются и после хронического введения метформина/ампролиума (рис. 1 и 4), это позволяет предположить, что индуцированный этими препаратами дефицит тиамина ингибирует 2-оксоадипатдегидрогеназу из-за сниженной доступности ТДФ для насыщения фермента. Такое снижение доступности ТДФ для 2-оксоадипатдегидрогеназы может быть вызвано увеличением сродства ОГДК к ТДФ (рис. 2). Неспособность 2-оксоадипатдегидрогеназы успешно конкурировать с ОГДК за ТДФ подтверждается наличием положительной корреляции между уровнем эндогенной холо-ОГДК и содержанием α -аминоадипата, предшественника субстрата 2-оксоадипатдегидрогеназы, у обработанных, но не у контрольных животных (табл. 1). Эта корреляция показывает, что чем выше активность ОГДК, эндогенно насыщенного ТДФ, тем выше уровень α -аминоадипата в мозге. Другими словами, чем выше активность ОГДК, тем менее эффективно 2-оксоадипатдегидрогеназа катализирует расщепление продукта трансаминирования α -аминоадипата – 2-оксоадипата. Дополнительным свидетельством ингибирования 2-оксоадипатдегидрогеназы после хронического введения метформина/ампролиума могут служить положительная корреляция между уровнями NAD^+ и триптофана и отрицательная корреляция между уровнями NAD^+ и α -аминоадипата у обработанных, но не у контрольных крыс

(рис. 6 и 7). Возникновение данных корреляций хорошо соответствует метаболической роли 2-оксоадипатдегидрогеназы в биосинтезе NAD^+ из триптофана [62]. Снижая деградацию триптофана через α -аминоадипат, ингибирование 2-оксоадипатдегидрогеназы должно способствовать альтернативному превращению триптофана в хинолиновую кислоту, которая является интермедиатом биосинтеза NAD^+ из триптофана. Таким образом, прямая корреляция уровней NAD^+ и триптофана и обратная – между уровнями NAD^+ и α -аминоадипата свидетельствуют о том, что хроническое введение метформина/ампролиума увеличивает связанный с уровнями α -аминоадипата и триптофана биосинтез NAD^+ в мозге крыс – эффект, согласующийся с ингибированием ТДФ-зависимой 2-оксоадипатдегидрогеназы. Индукция метаболических маркеров дисфункции 2-оксоадипатдегидрогеназы и накопление α -аминоадипата в мозге заслуживает особого внимания ввиду известной связи между уровнями α -аминоадипата в крови или дисфункцией 2-оксоадипатдегидрогеназы и диабетом, ожирением и сердечно-сосудистыми заболеваниями [51].

Изменения биохимии мозга крыс, индуцированные метформином/ампролиумом, связаны с изменениями в их поведении и параметрах ЭКГ. Введение метформина/ампролиума нарушает баланс между симпатической и парасимпатической регуляцией, что очевидно из корреляций между параметрами ЭКГ и временем замирания.

Известно, что ампролиум снижает исследовательскую активность [23], тогда как метформин оказывает анксиолитические и антидепрессивные эффекты [63, 64]. В нашем исследовании комбинированное введение метформина и ампролиума вызывает пограничное снижение тревожности ($p = 0,05$ для фактора «обработки», рис. 5), сопровождающееся увеличением локомоторной активности, что способствует увеличению числа выходов в центральную зону и кумулятивного индекса исследовательской активности у обработанных животных по сравнению с контрольными. Эти эффекты связаны с зависящим от времени эксперимента ростом числа выходов в центральную зону и частоты сердечных сокращений, наблюдаемым только у обработанных животных (рис. 5). Отсутствие таких изменений у контрольных крыс может свидетельствовать об их лучшей, по сравнению с обработанными крысами, адаптации к повторяющемуся тестированию.

Помимо ингибирования транспорта тиамина, другие механизмы действия метформина, в частности активация АМРК-зависимых сигнальных путей, могут вносить вклад в комплекс биохимических и физиологических эффектов комбинированного введения метформина и ампролиума.

Наше исследование подчёркивает условный характер действия метформина. Преимущества приёма метформина могут быть снижены недостаточностью тиамина, которая может развиваться у людей из-за различных сопутствующих факторов, включая проблемы с питанием и/или полиморфизмы генов, кодирующих переносчики тиамина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованная модель хронического введения ингибиторов транспорта тиамина, метформина и ампролиума не показала существенных изменений конечных уровней ТДФ и полных активностей ТДФ-зависимых ферментов у обработанных крыс по сравнению с контрольными. Однако немонотонные изменения поведения и ЭКГ обработанных крыс в ходе эксперимента, а также взаимосвязи параметров поведения или ЭКГ с уровнями ТДФ или активностей ТДФ-зависимых ферментов в конце эксперимента предполагают адаптацию к нарушенной в ходе эксперимента доступности тиамина организму животных. После хронического введения метформина/ампролиума можно наблюдать переключение метаболической роли ТДФ и ТДФ-зависимых ферментов с антиоксидантной и азотсберегающей на прооксидантную и гипераммониемическую. Такое переключение сопровождается ростом частоты сердечных сокращений у обработанных, но не контрольных животных и повышением локомоторной составляющей исследовательской активности у обработанных крыс по сравнению с контрольными.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

Вклад авторов. А.В.Г. спланировала и провела эксперименты на животных; А.В.А. измерял активность дегидрогеназ 2-оксокислот; О.Н.С. измеряла активность ТКТ и содержание ТДФ; А.Л.К. количественно определял аминокислоты; А.В.Г., А.В.А. и В.И.Б. анализировали и визуализировали результаты. В.И.Б. разработала концепцию и дизайн исследования, руководила проектом и написала текст статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной темы АААА-А19-119042590056-2.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная работа не содержит исследований с участием людей. Все эксперименты на животных были одобрены Биоэтическим комитетом МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол 137-д от 11.11.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. White, P. J., McGarrah, R. W., Herman, M. A., Bain, J. R., Shah, S. H., and Newgard, C. B. (2021) Insulin action, type 2 diabetes, and branched-chain amino acids: a two-way street, *Mol. Metab.*, **52**, 101261, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101261>.
2. Tobias, D. K., Mora, S., Verma, S., and Lawler, P. R. (2018) Altered branched chain amino acid metabolism: toward a unifying cardiometabolic hypothesis, *Curr. Opin. Cardiol.*, **33**, 558-564, <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000552>.
3. Desine, S., Gabriel, C. L., Smith, H. M., Antonetti, O. R., Wang, C., Calcutt, M. W., Doran, A. C., Silver, H. J., Nair, S., Terry, J. G., Carr, J. J., Linton, M. F., Brown, J. D., Koethe, J. R., and Ferguson, J. F. (2023) Association of alpha-aminoadipic acid with cardiometabolic risk factors in healthy and high-risk individuals, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **14**, 1122391, <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1122391>.
4. Zhao, X., Zhang, X., Pei, J., Liu, Y., Niu, W., and Sun, H. (2023) Targeting BCAA metabolism to potentiate metformin's therapeutic efficacy in the treatment of diabetes in mice, *Diabetologia*, **66**, 2139-2153, <https://doi.org/10.1007/s00125-023-05985-6>.
5. Rivera, C. N., Watne, R. M., Brown, Z. A., Mitchell, S. A., Wommack, A. J., and Vaughan, R. A. (2023) Effect of AMPK activation and glucose availability on myotube LAT1 expression and BCAA utilization, *Amino Acids*, **55**, 275-286, <https://doi.org/10.1007/s00726-022-03224-7>.
6. Navarro, D., Zwingmann, C., and Butterworth, R. F. (2008) Impaired oxidation of branched-chain amino acids in the medial thalamus of thiamine-deficient rats, *Metab. Brain Dis.*, **23**, 445-455, <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9105-6>.
7. Navarro, D., Zwingmann, C., and Butterworth, R. F. (2008) Region-selective alterations of glucose oxidation and amino acid synthesis in the thiamine-deficient rat brain: a re-evaluation using ¹H/¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Neurochem.*, **106**, 603-612, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05410.x>.
8. Tsepikova, P. M., Artiukhov, A. V., Boyko, A. I., Aleshin, V. A., Mkrtchyan, G. V., Zvyagintseva, M. A., Ryabov, S. I., Ksenofontov, A. L., Baratova, L. A., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in rat brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 723-736, <https://doi.org/10.1134/S0006297917060098>.
9. Bunik, V. I. (2023) Editorial: Experts' opinion in medicine 2022, *Front. Med. (Lausanne)*, **10**, 1296196, <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1296196>.
10. Muley, A., Fernandez, R., Green, H., and Muley, P. (2022) Effect of thiamine supplementation on glycaemic outcomes in adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *BMJ Open*, **12**, e059834, <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-059834>.
11. Tamaki, H., Tsushima, H., Kachi, N., and Jimura, F. (2022) Cardiac dysfunction due to thiamine deficiency after hemodialysis for biguanide-related lactic acidosis, *Intern. Med.*, **61**, 2905-2909, <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.8697-21>.
12. Alston, T. A. (2003) Does metformin interfere with thiamine? *Arch. Intern. Med.*, **163**, 983; author reply 983, <https://doi.org/10.1001/archinte.163.8.983>.
13. Greenwood, J., and Pratt, O. E. (1985) Comparison of the effects of some thiamine analogues upon thiamine transport across the blood-brain barrier of the rat, *J. Physiol.*, **369**, 79-91, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015889>.
14. Dudeja, P. K., Tyagi, S., Kavilaveetil, R. J., Gill, R., and Said, H. M. (2001) Mechanism of thiamine uptake by human jejunal brush-border membrane vesicles, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **281**, C786-792, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.3.C786>.
15. Bizon-Zygmanska, D., Jankowska-Kulawy, A., Bielarczyk, H., Pawelczyk, T., Ronowska, A., Marszall, M., and Szutowicz, A. (2011) Acetyl-CoA metabolism in amprolium-evoked thiamine pyrophosphate deficits in cholinergic SN56 neuroblastoma cells, *Neurochem. Int.*, **59**, 208-216, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.04.018>.
16. Bunik, V. I., Tylicki, A., and Lukashev, N. V. (2013) Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models, *FEBS J.*, **280**, 6412-6442, <https://doi.org/10.1111/febs.12512>.
17. Wernery, U., Haydn-Evans, J., and Kinne, J. (1998) Amprolium-induced cerebrocortical necrosis (CCN) in dromedary racing camels, *Zentralbl. Veterinarmed. B*, **45**, 335-343, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1998.tb00802.x>.
18. Kasahara, T., Ichijo, S., Osame, S., and Sarashina, T. (1989) Clinical and biochemical findings in bovine cerebrocortical necrosis produced by oral administration of amprolium, *Nihon Juigaku Zasshi*, **51**, 79-85, <https://doi.org/10.1292/jvms1939.51.79>.
19. Frye, T. M., Williams, S. N., and Graham, T. W. (1991) Vitamin deficiencies in cattle, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **7**, 217-275, [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30817-3](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30817-3).

20. Tanwar, R. K., Malik, K. S., and Gahlot, A. K. (1994) Polioencephalomalacia induced with amprolium in buffalo calves--clinicopathologic findings, *Zentralbl. Veterinarmed. A*, **41**, 396-404, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1994.tb00106.x>.
21. Nikov, S., Ivanov, I. T., Simeonov, S. P., Stoikov, D., and Iordanova, V. (1983) Cerebrocortical necrosis in calves, sheep and goats, *Vet. Med. Nauki*, **20**, 58-67.
22. Thornber, E. J., Elliott, L. E., Kerr, D., Marriott, J. M., and Massera, F. C. (1983) Thiamin inadequacy in infants: lack of evidence of amprolium in egg yolk, *Aust. N. Z. J. Med.*, **13**, 51-52, <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.1983.tb04549.x>.
23. Moraes, J. O., Rodrigues, S. D. C., Pereira, L. M., Medeiros, R. C. N., de Cordova, C. A. S., and de Cordova, F. M. (2018) Amprolium exposure alters mice behavior and metabolism in vivo, *Animal Model Exp. Med.*, **1**, 272-281, <https://doi.org/10.1002/ame2.12040>.
24. Lemos, C., Faria, A., Meireles, M., Martel, F., Monteiro, R., and Calhau, C. (2012) Thiamine is a substrate of organic cation transporters in Caco-2 cells, *Eur. J. Pharmacol.*, **682**, 37-42, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.02.028>.
25. Aleshin, V. A., Mkrtchyan, G. V., and Bunik, V. I. (2019) Mechanisms of non-coenzyme action of thiamine: protein targets and medical significance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 829-850, <https://doi.org/10.1134/S0006297919080017>.
26. Liang, X., Chien, H. C., Yee, S. W., Giacomini, M. M., Chen, E. C., Piao, M., Hao, J., Twelves, J., Lepist, E. I., Ray, A. S., and Giacomini, K. M. (2015) Metformin is a substrate and inhibitor of the human thiamine transporter, THTR-2 (SLC19A3), *Mol. Pharm.*, **12**, 4301-4310, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00501>.
27. Oliveira, W. H., Nunes, A. K., Franca, M. E., Santos, L. A., Los, D. B., Rocha, S. W., Barbosa, K. P., Rodrigues, G. B., and Peixoto, C. A. (2016) Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice, *Brain Res.*, **1644**, 149-160, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.013>.
28. Gould, T. D., Dao, D. T., and Kovacsics, C. E. (2009) The Open Field Test, in *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (Gould, T. D., ed.) Humana Press/Springer Nature, pp. 1-20, https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1.
29. Aleshin, V. A., Graf, A. V., Artiukhov, A. V., Boyko, A. I., Ksenofontov, A. L., Maslova, M. V., Nogues, I., di Salvo, M. L., and Bunik, V. I. (2021) Physiological and biochemical markers of the sex-specific sensitivity to epileptogenic factors, delayed consequences of seizures and their response to vitamins B1 and B6 in a rat model, *Pharmaceuticals (Basel)*, **14**, 737, <https://doi.org/10.3390/ph14080737>.
30. Graf, A. V., Maslova, M. V., Artiukhov, A. V., Ksenofontov, A. L., Aleshin, V. A., and Bunik, V. I. (2022) Acute pre-natal hypoxia in rats affects physiology and brain metabolism in the offspring, dependent on sex and gestational age, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 2579, <https://doi.org/10.3390/ijms23052579>.
31. De La Haba, G., Leder, I. G., and Racker, E. (1955) Crystalline transketolase from bakers' yeast: isolation and properties, *J. Biol. Chem.*, **214**, 409-426.
32. Aleshin, V. A., Kaehne, T., Maslova, M. V., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2024) Posttranslational acylations of the rat brain transketolase discriminate the enzyme responses to inhibitors of ThDP-dependent enzymes or thiamine transport, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 917, <https://doi.org/10.3390/ijms25020917>.
33. Hinman, L. M., and Blass, J. P. (1981) An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crude tissue homogenates, *J. Biol. Chem.*, **256**, 6583-6586.
34. Schwab, M. A., Kolker, S., van den Heuvel, L. P., Sauer, S., Wolf, N. I., Rating, D., Hoffmann, G. F., Smeitink, J. A., and Okun, J. G. (2005) Optimized spectrophotometric assay for the completely activated pyruvate dehydrogenase complex in fibroblasts, *Clin. Chem.*, **51**, 151-160, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.033852>.
35. Artiukhov, A. V., Graf, A. V., Kazantsev, A. V., Boyko, A. I., Aleshin, V. A., Ksenofontov, A. L., and Bunik, V. I. (2022) Increasing inhibition of the rat brain 2-oxoglutarate dehydrogenase decreases glutathione redox state, elevating anxiety and perturbing stress adaptation, *Pharmaceuticals (Basel)*, **15**, 182, <https://doi.org/10.3390/ph15020182>.
36. Ksenofontov, A. L., Boyko, A. I., Mkrtchyan, G. V., Tashlitsky, V. N., Timofeeva, A. V., Graf, A. V., Bunik, V. I., and Baratova, L. A. (2017) Analysis of free amino acids in mammalian brain extracts, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1183-1192, <https://doi.org/10.1134/S000629791710011X>.
37. Hagberg, H., Lehmann, A., Sandberg, M., Nystrom, B., Jacobson, I., and Hamberger, A. V. (1985) Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **5**, 413-419, <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1985.56>.
38. Ellison, D. W., Beal, M. F., and Martin, J. B. (1987) Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease, *Brain Res.*, **417**, 389-392, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90471-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90471-9).
39. Suarez, L. M., Munoz, M. D., Martin Del Rio, R. and Solis, J. M. (2016) Taurine content in different brain structures during ageing: effect on hippocampal synaptic plasticity, *Amino Acids*, **48**, 1199-1208, <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2155-2>.
40. Turner, O., Phoenix, J., and Wray, S. (1994) Developmental and gestational changes of phosphoethanolamine and taurine in rat brain, striated and smooth muscle, *Exp. Physiol.*, **79**, 681-689, <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1994.sp003800>.

41. Artiukhov, A. V., Aleshin, V. A., Karlina, I. S., Kazantsev, A. V., Sibiryakina, D. A., Ksenofontov, A. L., Lukashev, N. V., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2022) Phosphonate inhibitors of pyruvate dehydrogenase perturb homeostasis of amino acids and protein succinylation in the brain, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 13186, <https://doi.org/10.3390/ijms232113186>.
42. Artiukhov, A. V., Pometun, A. A., Zubanova, S. A., Tishkov, V. I., and Bunik, V. I. (2020) Advantages of formate dehydrogenase reaction for efficient NAD(+) quantification in biological samples, *Anal. Biochem.*, **603**, 113797, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113797>.
43. Kochetov, G. A. (1982) Transketolase from yeast, rat liver, and pig liver, *Methods Enzymol.*, **90 Pt E**, 209-223, [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(82\)90128-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(82)90128-8).
44. Artiukhov, A. V., Solovjeva, O. N., Balashova, N. V., Sidorova, O. P., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2024) Pharmacological doses of thiamine benefit patients with the Charcot-Marie-Tooth neuropathy by changing thiamine diphosphate levels and affecting regulation of thiamine-dependent enzymes, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1-22, <https://doi.org/10.1134/S0006297924070010>.
45. Huang, H. M., Chen, H. L., and Gibson, G. E. (2010) Thiamine and oxidants interact to modify cellular calcium stores, *Neurochem. Res.*, **35**, 2107-2116, <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0242-z>.
46. Karuppagounder, S. S., Xu, H., Shi, Q., Chen, L. H., Pedrini, S., Pechman, D., Baker, H., Beal, M. F., Gandy, S. E., and Gibson, G. E. (2009) Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model, *Neurobiol. Aging*, **30**, 1587-1600, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.013>.
47. Nicoletti, V. G., Santoro, A. M., Grasso, G., Vagliasindi, L. I., Giuffrida, M. L., Cuppari, C., Purrello, V. S., Stella, A. M., and Rizzarelli, E. (2007) Carnosine interaction with nitric oxide and astroglial cell protection, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 2239-2245, <https://doi.org/10.1002/jnr.21365>.
48. Ke, C. J., He, Y. H., He, H. W., Yang, X., Li, R., and Yuan, J. (2014) A new spectrophotometric assay for measuring pyruvate dehydrogenase complex activity: a comparative evaluation, *Anal. Methods*, **6**, 6381-6388, <https://doi.org/10.1039/c4ay00804a>.
49. Roelofs, K. (2017) Freeze for action: neurobiological mechanisms in animal and human freezing, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **372**, <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0206>.
50. Page, S. W. (2008) *Antiparasitic drugs*, in *Small Animal Clinical Pharmacology* (Maddison, J. E., Page, S. W., and Church, D. B., eds) Saunders Ltd., Philadelphia, pp. 198-260.
51. Bunik, V. I., Artiukhov, A. V., Kazantsev, A. V., Aleshin, V. A., Boyko, A. I., Ksenofontov, A. L., Lukashev, N. V., and Graf, A. V. (2022) Administration of phosphonate inhibitors of dehydrogenases of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate to rats elicits target-specific metabolic and physiological responses, *Front. Chem.*, **10**, 892284, <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.892284>.
52. Sambon, M., Pavlova, O., Alhama-Riba, J., Wins, P., Brans, A., and Bettendorff, L. (2022) Product inhibition of mammalian thiamine pyrophosphokinase is an important mechanism for maintaining thiamine diphosphate homeostasis, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1866**, 130071, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.130071>.
53. Bunik, V. I., Raddatz, G., and Strumilo, S. A. (2013) Translating enzymology into metabolic regulation: the case of the 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex, *Curr. Chem. Biol.*, **7**, 74-93, <https://doi.org/10.2174/2212796811307010008>.
54. Graf, A., Trofimova, L., Ksenofontov, A., Baratova, L., and Bunik, V. (2020) Hypoxic adaptation of mitochondrial metabolism in rat cerebellum decreases in pregnancy, *Cells*, **9**, <https://doi.org/10.3390/cells9010139>.
55. Kazyken, D., Dame, S. G., Wang, C., Wadley, M., and Fingar, D. C. (2024) Unexpected roles for AMPK in the suppression of autophagy and the reactivation of MTORC1 signaling during prolonged amino acid deprivation, *Autophagy*, **20**, 2017-2040, <https://doi.org/10.1080/15548627.2024.2355074>.
56. Barnaba, C., Broadbent, D. G., Kaminsky, E. G., Perez, G. I., and Schmidt, J. C. (2024) AMPK regulates phagophore-to-autophagosome maturation, *J. Cell Biol.*, **223**, <https://doi.org/10.1083/jcb.202309145>.
57. Seliger, C., Rauer, L., Wuster, A. L., Moeckel, S., Leidgens, V., Jachnik, B., Ammer, L. M., Heckscher, S., Dettmer, K., Riemenschneider, M. J., Oefner, P. J., Proescholdt, M., Vollmann-Zwerenz, A., and Hau, P. (2023) Heterogeneity of amino acid profiles of proneural and mesenchymal brain-tumor initiating cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, <https://doi.org/10.3390/ijms24043199>.
58. Welch, N., Singh, S. S., Kumar, A., Dhruva, S. R., Mishra, S., Sekar, J., Bellar, A., Attaway, A. H., Chelluboina, A., Willard, B. B., Li, L., Huo, Z., Karnik, S. S., Esser, K., Longworth, M. S., Shah, Y. M., Davuluri, G., Pal, R., and Dasarthy, S. (2021) Integrated multiomics analysis identifies molecular landscape perturbations during hyperammonemia in skeletal muscle and myotubes, *J. Biol. Chem.*, **297**, 101023, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101023>.
59. Fitzpatrick, S. M., Hetherington, H. P., Behar, K. L., and Shulman, R. G. (1989) Effects of acute hyperammonemia on cerebral amino acid metabolism and pH_i in vivo, measured by ¹H and ³¹P nuclear magnetic resonance, *J. Neurochem.*, **52**, 741-749, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb02517.x>.

60. Haberle, J. (2013) Clinical and biochemical aspects of primary and secondary hyperammonemic disorders, *Arch. Biochem. Biophys.*, **536**, 101-108, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.04.009>.
61. Boyko, A. I., Artiukhov, A. V., Kaehne, T., di Salvo, M. L., Bonaccorsi di Patti, M. C., Contestabile, R., Tramonti, A., and Bunik, V. I. (2020) Isoforms of the DHTKD1-encoded 2-oxoadipate dehydrogenase, identified in animal tissues, are not observed upon the human DHTKD1 expression in bacterial or yeast systems, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 920-929, <https://doi.org/10.1134/S0006297920080076>.
62. Artiukhov, A. V., Grabarska, A., Gumbarewicz, E., Aleshin, V. A., Kahne, T., Obata, T., Kazantsev, A. V., Lukashev, N. V., Stepulak, A., Fernie, A. R., and Bunik, V. I. (2020) Synthetic analogues of 2-oxo acids discriminate metabolic contribution of the 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in mammalian cells and tissues, *Sci. Rep.*, **10**, 1886, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58701-4>.
63. Fan, J., Li, D., Chen, H. S., Huang, J. G., Xu, J. F., Zhu, W. W., Chen, J. G., and Wang, F. (2019) Metformin produces anxiolytic-like effects in rats by facilitating GABA(A) receptor trafficking to membrane, *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 297-316, <https://doi.org/10.1111/bph.14519>.
64. Li, G. F., Zhao, M., Zhao, T., Cheng, X., Fan, M., and Zhu, L. L. (2019) Effects of metformin on depressive behavior in chronic stress rats, *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, **35**, 245-249, <https://doi.org/10.12047/j.cjap.5775.2019.052>.

COMBINED ADMINISTRATION OF METFORMIN AND AMPROLIUM TO RATS AFFECTS METABOLISM OF FREE AMINO ACIDS IN THE BRAIN, ALTERING BEHAVIOR, AND HEART RATE

A. V. Graf^{1,2}, A. V. Artiukhov^{1,3}, O. N. Solovjeva¹,
A. L. Ksenofontov¹, and V. I. Bunik^{1,3,4,*}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: bunik@belozersky.msu.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

³ Department of Biochemistry, Sechenov Medical University, 105043 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia

The risk of developing diabetes and cardiometabolic disorders is associated with increased levels of alpha-aminoadipic acid and disturbances in the metabolism of branched-chain amino acids. The side effects of the widely used antidiabetic drug metformin include impaired degradation of branched-chain amino acids and inhibition of intracellular thiamin transport. These effects may be interconnected, as thiamine deficiency impairs the functioning of thiamine diphosphate (ThDP)-dependent dehydrogenases of 2-oxo acids involved in amino acids degradation, while diabetes is often associated with perturbed thiamine status. In this work, we investigate the action of metformin in rats with impaired thiamine availability. The reduction in the thiamine influx is induced by simultaneous administration of the thiamine transporters inhibitors metformin and amprolium. After 24 days of combined metformin/amprolium administration, no significant changes in the total brain levels of ThDP or activities of ThDP-dependent enzymes of central metabolism are observed, but the affinities of transketolase and 2-oxoglutarate dehydrogenase to ThDP increase. The treatment also significantly elevates the brain levels of free amino acids and ammonia, reduces the antioxidant defense, and alters the sympathetic/parasympathetic regulation, which is evident from changes in the ECG and behavioral parameters. Strong positive correlations between brain ThDP levels and contents of ammonia, glutathione disulfide, alpha-aminoadipate, glycine, citrulline, and ethanolamine are observed in the metformin/amprolium-treated rats, but not in the control animals. Analysis of the obtained data points to a switch in the metabolic impact of ThDP from the antioxidant and nitrogen-sparing in the control rats to the pro-oxidant and hyperammonemic in the metformin/amprolium-treated rats. As a result, metformin administration along with the amprolium-reduced thiamine supply significantly perturb the metabolism of amino acids in the rat brain, altering behavioral and ECG parameters.

Keywords: behavior, metabolism of brain amino acids, ECG, 2-oxoglutarate dehydrogenase, 2-oxoadipate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase, tricarboxylic acid cycle, thiamine diphosphate, transketolase, vitamin B1

ТРАНСПОРТ АМИНОКИСЛОТ В ПЛАЦЕНТЕ КРЫС ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ МЕТИОНИНОВОЙ НАГРУЗКОЙ

© 2024 Ю.П. Милютин^{1*}, Г.О. Керкешко¹, Д.С. Васильев^{1,2}, Н.Л. Туманова²,
И.В. Залозная¹, С.К. Бочковский¹, А.Д. Щербицкая¹, А.В. Михель¹,
Г.Х. Толибова¹, А.В. Арутюнян¹

¹ ФГБУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: milyutina1010@mail.ru

² ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 02.12.2023

После доработки 11.04.2024

Принята к публикации 02.05.2024

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) в период беременности связана с риском развития задержки роста плода, одним из предполагаемых механизмов которой является снижение плацентарного транспорта питательных веществ. В настоящей работе исследовано влияние экспериментальной ГГЦ, вызванной ежедневным введением метионина беременным крысам, на содержание свободных аминокислот в крови матери и плода. Наряду с этим, изучены морфологические и биохимические показатели, от которых зависит интенсивность транспорта аминокислот через плаценту. Под влиянием ГГЦ на 20-й день беременности в крови матерей наблюдалось повышение уровня большинства свободных аминокислот, при этом в крови плодов концентрация ряда аминокислот снижалась. В лабиринтной области плаценты, где происходит обмен между кровеносными системами матери и плода, при ГГЦ наблюдалось сужение материнских синусов, сопровождавшееся застоем крови и агрегацией эритроцитов. В зоне лабиринта также отмечалось повышение уровня белка транспортеров нейтральных аминокислот (LAT1, SNAT2), а также активация нижележащего эффектора комплекса mTORC1 белка 4E-BP1, являющегося положительным регулятором экспрессии плацентарных транспортеров. Материнская ГГЦ вызывала увеличение проницаемости плацентарного барьера, о чем свидетельствует усиление переноса красителя Эванса голубого от матери к плоду. Дисбаланс уровней аминокислот в крови матери и плода в условиях ГГЦ может быть обусловлен конкуренцией гомоцистеина с другими аминокислотами за общие транспортеры, а также уменьшением площади поверхности зоны обмена и снижением скорости кровотока в лабиринтной области плаценты. Повышение экспрессии транспортеров аминокислот в лабиринтной части плаценты, возможно, является компенсаторным ответом на недостаточное поступление аминокислот к плоду и снижение его роста.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: материнская гипергомоцистеинемия, плацента, плацентарный транспорт, плацентарный барьер, аминокислоты, mTOR, транспортеры аминокислот.

DOI: 10.31857/S0320972524100027 EDN: IQKNEH

ВВЕДЕНИЕ

Одним из последствий повышенного содержания метаболита метионина непротеиногенной аминокислоты гомоцистеина (ГЦ) в крови матери во время беременности является задержка роста плода и снижение массы новорожденного [1–3]. Причины негативного влияния материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на рост и развитие

плода, вероятно, связанные с токсическими эффектами высокого уровня ГЦ, до сих пор остаются недостаточно изученными.

Важнейшую роль в регулировании распределения питательных ресурсов между матерью и плодом во время беременности играет плацента, которая интегрирует сигналы об уровне доступных питательных веществ со стороны матери и плода [4]. Основным плацентарным датчиком, распознающим уровень питательных веществ в крови матери, является комплекс mTORC1, катали-

* Адресат для корреспонденции.

тической основой которого служит киназа mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) [5, 6]. Недостаточное питание матери, стресс и плацентарная гипоксия приводят к уменьшению активности комплекса mTORC1 в плаценте и соответствующему снижению экспрессии плацентарных переносчиков питательных веществ [7]. Избыток питательных веществ в крови матери, напротив, вызывает активацию плацентарного mTORC1, сопровождаемую увеличением числа плацентарных транспортеров [8]. Предполагают, что, помимо сигналов со стороны матери, транспортная функция плаценты может также регулироваться сигналами о потребностях плода, что позволяет скомпенсировать снижение доступных питательных веществ в крови плода за счет повышения экспрессии и активности плацентарных транспортеров [7, 9].

Адекватный плацентарный транспорт аминокислот (АК) от матери к плоду критически важен для роста плода [10]. Скорость транспорта АК через плаценту определяется скоростью маточно-плацентарного кровотока, площадью зоны обмена между кровеносными системами матери и плода, а также активностью и количеством расположенных в этой зоне транспортеров АК [10]. У грызунов, так же как и у человека, такой зоной обмена и одновременно плацентарным барьером служит непрерывный слой синцитиотрофобласта (СТБ), выстилающий заполненные материнской кровью лакуны в лабиринтной области плаценты. Важную роль в транспорте АК от матери к плоду играют транспортеры нейтральных АК систем А и L, уровень экспрессии и активности которых на мембранах СТБ регулируется комплексом mTORC1 [11].

Экспериментальные данные свидетельствуют об изменениях профиля свободных АК в крови взрослых животных и их плодов под влиянием ГГЦ [12–16]. Высказано предположение, что ГГЦ может затруднять транспорт АК от матери к плоду, конкурируя с ними за общие транспортеры АК в плаценте [17, 18]. В последние годы получены данные о влиянии повышенного уровня ГЦ на активность комплекса mTORC1, при этом в различных экспериментальных условиях отмечалась как активация [19–21], так и ингибирование этого комплекса [22, 23]. Отмечено, что метионин и, возможно, ГЦ способны модулировать активность mTORC1 через изменение внутриклеточного уров-

ня производного метионина S-аденозилметионина [24, 25]. Вместе с тем влияние материнской ГГЦ на активность mTORC1 и уровень транспортеров АК в плаценте остается малоизученным. В опытах *in vitro* под влиянием ГЦ не было обнаружено изменения активности комплекса mTORC1 в клетках трофобласта [26], с другой стороны, введение метионина животным *in vivo* вызывало повышение активности mTORC1 и экспрессии генов транспортеров АК в ткани плаценты [27, 28].

Таким образом, состояние ГГЦ может влиять на транспорт АК от матери к плоду как через конкуренцию ГЦ с другими АК за общие плацентарные транспортеры, так и через изменение активности комплекса mTORC1 и регулируемой им экспрессии транспортеров АК на мембранах СТБ. С другой стороны, благодаря наличию обратной регуляции со стороны плода, в ответ на возможное уменьшение концентраций АК в крови плода и снижение его роста при материнской ГГЦ может происходить компенсаторное увеличение экспрессии и/или активности плацентарных транспортеров АК. При этом следует учитывать возможность непосредственного токсического воздействия высокого уровня ГЦ на клетки плаценты, приводящего к нарушению ее развития и снижению ее транспортной и барьерной функции. Для проверки этих гипотез в данной работе нами было изучено влияние ГГЦ, вызванной хронической метиониновой нагрузкой, на содержание свободных АК в крови самок крыс и их плодов, активность в плаценте зависимых от mTORC1 сигнальных путей, экспрессию переносчиков АК в ее лабиринтной области, а также на морфологические характеристики плаценты и проницаемость плацентарного барьера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперимент проводили на 33 самках крыс линии Wistar (питомник лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская обл., Россия) в возрасте 3–4 месяца с исходной массой 220–290 г и стабильным эстральным циклом, равным четырем дням. Животные содержались в виварии с искусственной вентиляцией и контролируемым 12-часовым циклом света и темноты (день 7.00–19.00; ночь 19.00–7.00) при постоянной температуре 20–21 °C и влажности 75–85%.

Принятые сокращения: АК – аминокислоты; ГГЦ – гипергомоцистеинемия; ГЦ – гомоцистеин; МЧП – материнская часть плаценты; ПЧП – плодная часть плаценты; СТБ – синцитиотрофобласт; 4E-BP1 – эукариотический фактор инициации трансляции 4E-связывающий белок 1; 5-HT – серотонин; LAT – переносчик больших нейтральных аминокислот; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; mTORC1 – комплекс 1 мишени рапамицина млекопитающих; S6 – рибосомальный белок S6; SNAT – натрий-зависимый переносчик нейтральных аминокислот.

Самки крыс получали стандартный лабораторный корм (полнорационный комбикорм рецепт ПК-120 для содержания лабораторных животных (ГОСТ 34566-2019); «Провими», Россия) и фильтрованную водопроводную воду *ad libitum*. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского Сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований.

Модель материнской ГГЦ. Для создания экспериментальной материнской ГГЦ использовали разработанный нами ранее метод, основанный на дозированной хронической метиониновой нагрузке беременным животным [29, 30]. Первым днем беременности (соответствует первому дню эмбрионального развития плодов) считали следующий день после обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. Экспериментальным животным ежедневно, начиная с 4-го дня беременности и до 19-го дня беременности, предшествующего выводу животных из эксперимента, перорально через желудочный зонд вводили 1 мл водного раствора L-метионина (AJI92, USP30 (TLC); «Химмед», Россия), приготовленного *ex tempore* из расчета 0,6 г/кг массы животного. Контрольным животным в течение того же периода тем же способом вводили 1 мл воды. Для дальнейших анализов были сформированы 2 группы беременных животных: контрольная ($n = 15$) и подопытная (ГГЦ) ($n = 18$).

Оценка общей прибавки веса самок крыс во время беременности. С целью оценки общей прибавки веса самок взвешивали перед подсадкой самцов, на 4-й, 10-й, 14-й и 20-й день беременности. Для каждого животного на основании полученных данных рассчитывалась линейная функция зависимости веса от срока беременности. В контрольной группе и группе с потреблением метионина проводили сравнение k -угловых коэффициентов (тангенс угла наклона) полученных прямых. В анализ вошли животные с общим количеством плодов от 11 до 16, при этом среднее количество плодов в помете у одной самки в группе контроля и в группе с метиониновой нагрузкой не отличалось.

Подготовка ткани к анализу. На 20-й день беременности, через 24 ч после последнего введения метионина, самок обеих групп декапитировали без анестезии при помощи гильотины для лабораторных грызунов («Open Science», Россия) и отбирали кровь, слитую из туловища. Плоды и плаценты извлекали и анализировали их массу. Плоды декапитировали, отбирали слитую из туловищ кровь, пулируя ее от помета одной самки. Плаценты, предназначенные для проведения гистологического исследования, сразу же помещали в 10%-ный нейтральный забуференный (pH 7,2)

формалин («Синтакон», Россия). Сыворотку крови отделяли путем центрифугирования (10 мин при 2300 g). Образцы сыворотки крови и ткани плаценты для биохимического анализа хранили при -80°C .

Анализ содержания свободных аминокислот методом ВЭЖХ. Для количественного определения содержания свободных АК в сыворотке крови за основу был взят метод, описанный А.Д. Аскретковым и др. [31]. Для дериватизации АК применяли набор AccQ-Fluor Reagent Kit («Waters», США). Использовали стандартный 2,5 мМ раствор 17 АК («Waters»); Asn, Gln, Trp, пептид аланил-глутамин в качестве внутреннего стандарта, ацетат натрия, фосфорную и хлористоводородную кислоты («Sigma-Aldrich», США); ацетонитрил («Panreac AppliChem», Испания). Анализ проводили при помощи хроматографической системы ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 («Thermo Fisher Scientific», Германия) с флуориметрическим детектором FLD-3100. Для анализа биологических образцов смешивали 50 мкл раствора внутреннего стандарта и 50 мкл сыворотки крови. Осаждение белков в полученном растворе осуществляли путем добавления ацетонитрила в соотношении 1/1, перемешивания и центрифугирования 5 мин при 10 000 g . Отбирали в вials 10 мкл супернатанта, добавляли 35 мкл поставляемого в составе набора для дериватизации боратного буфера AccQ-Fluor Borate Buffer («Waters») и 10 мкл 10 мМ раствора 6-аминохинолин-N-гидроксисукцинимидил карбамата (AQC; «Waters») в ацетонитриле, перемешивали; инкубировали в течение 1 мин при комнатной температуре, затем 10 мин при 50°C . Вials помещали в автосамплер хроматографа и проводили анализ на обращенно-фазовой колонке AccQ-Tag $3,9 \times 150$ мм с зернением сорбента 4 мкм («Waters») в градиентном режиме с расходом подвижной фазы 1 мл/мин, инъектируемый объем – 2 мкл, температура колонки – 37°C . Детектирование проводили флуориметрически при длинах волн возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 250$ нм и эмиссии $\lambda_{\text{em}} = 395$ нм. Хроматограммы обрабатывали в ПО Chromeleon 7.0 («Thermo Scientific», США) и Microsoft Office Excel. Определяли содержание 17 отдельных АК: His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ser, Tyr, Pro. Условия хроматографического анализа не позволяли осуществить разделение Ala и Arg, поэтому определяли их суммарное содержание Ala + Arg. Вычисляли средние величины исследуемых показателей в крови самок и пулированной крови плодов от каждой самки в каждой группе.

Иммуоблоттинг. Для исследования влияния материнской ГГЦ на содержание в плаценте транспортеров АК, а также активацию сигнальных путей, контролируемых комплексом mTORC1,

был использован метод иммуноблоттинга. От одной самки в группу для анализа отбирали 1 плаценту. Перед началом анализа замороженную ткань плаценты промывали от крови в холодном 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) и разделяли на материнскую часть плаценты (МЧП), включающую базальную часть (спонгиотрофобласт) и редуцированную децидуальную оболочку, и плодную часть плаценты (ПЧП), содержащую зону лабиринта. Ткани плаценты гомогенизировали при помощи стеклянного гомогенизатора Даунса в буфере RIPA (1/2, w/v) (50 мМ Tris-HCl (pH 8,1); 1% Triton X-100; 0,1% додецилсульфата натрия (SDS); 0,5% дезокси-холата натрия; 1 мМ ЭДТА; 150 мМ NaCl), содержащем коктейль ингибиторов протеаз (S8820; «Sigma-Aldrich») и фосфатаз (P5726; «Sigma-Aldrich»), центрифугировали 20 мин при 16 000 g и +4 °C; супернатант подвергали анализу. Концентрацию общего белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [32] на спектрофотометре NanoDrop One («Thermo Scientific»). Образцы, содержащие по 50 мкг белка, разделяли в 10%-ном ПААГ в денатурирующих условиях по Лэммли в камере для электрофореза белков Mini-Protean Tetra Cell («Bio-Rad», США) с источником питания PowerPac HC («Bio-Rad») и переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad») при помощи системы полусухого переноса белков Trans-Blot Turbo Transfer System («Bio-Rad»). Мембраны блокировали раствором 3%-ного бычьего сывороточного альбумина («Sigma-Aldrich») в буфере TBST (50 мМ Tris-HCl; 150 мМ NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20; pH 7,5). Содержание белков интереса в исследуемых образцах выявляли с помощью специфичных первичных антител к SNAT1 (SNAT1 (H-9) Mouse mAb, sc-137032; «Santa Cruz Biotechnology», США; 1 : 1000) (55 кДа); SNAT2 (SNAT2 (G-8) Mouse mAb, sc-166366; «Santa Cruz Biotechnology»; 1 : 1000) (60 кДа); LAT1 (LAT1 (D-10) Mouse mAb, sc-374232; «Santa Cruz Biotechnology», 1 : 1000) (45 кДа); LAT2 (LAT2 Rabbit Ab, ab75610; «Abcam», UK; 1 : 1000) (58 кДа); mTOR (mTOR (7C10) Rabbit mAb, 2983S; «Cell Signaling», США; 1 : 1000) (289 кДа); phospho-mTOR (phospho-mTOR (Ser2448) Rabbit Ab, 2971S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (289 кДа); 4E-BP1 (4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb, 9644S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (15–20 кДа); phospho-4E-BP1 (Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) Rabbit mAb, 2855S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (15–20 кДа); S6 (S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb, 2217S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (32 кДа); phospho-S6 (Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) Rabbit mAb, 4858S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (32 кДа). Инкубацию проводили при +4 °C в течение ночи. После инкубации с соответствующими вторичными антителами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1 : 1000; «Bio-Rad»), сигналы визуализировали, используя усиленную хемилюминес-

ценцию Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad»). Мембраны сканировали в гель-документирующей системе ChemiDoc™ Touch Imaging system («Bio-Rad»), интенсивность полос определяли при помощи программного обеспечения ImageLab 5.2.1. Полученные данные были нормализованы либо по уровню глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) (GAPDH (14C10) Rabbit mAb, 2118S; «Cell Signaling»; 1 : 1000), либо по содержанию общего белка в геле [33], определяемому с применением технологии stain-free («Bio-Rad»), согласно инструкции производителя. Вычисляли средние величины исследуемых показателей по самкам в каждой группе.

Световая микроскопия. Плаценты фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине в течение 24 ч. Гистологическую проводку тканей осуществляли с помощью гистологического процессора для вакуумной инфильтрации Histo-Tek VP1 («Sakura», Япония), формировали парафиновые блоки на приборе модульной системы заливки TES99 («Medite», Германия). Из полученных блоков изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм на микротоме Rotary 3002 («PFM», Германия). Для обзорной окраски использовали гематоксилин и эозин. При световой микроскопии оценивали: лабиринтную часть плаценты, базальную часть (спонгиотрофобласт), слой гигантских клеток трофобласта и кровяные клетки. Микрофотографии были получены при помощи системы фиксации микроскопических изображений, состоящей из светового микроскопа Olympus CX43 («Olympus», Япония), цветной цифровой камеры VideoZavr Standart VZ-18C23-B и базы данных для изображений VideoZavr Catalog («АТМ-практика», Россия). Из фотосъемки были исключены поля зрения, содержащие дефекты ткани, дефекты окрашивания и артефакты. Фотосъемку производили на увеличениях 200× и 400×. Количественный морфометрический анализ проводили с помощью программы VideoTest-Morphology 5.2 («Видеотест», Россия). При анализе площади балок трофобласта между лакунами и капиллярами в лабиринтном отделе плаценты, а также площади ядер гигантских клеток трофобласта, в каждом срезе в 5–7 полях зрения оценивали относительную площадь исследуемого компонента (отношение площади компонента к общей площади препарата) по формуле:

$$S (\%) = (S \text{ компонента} / S \text{ общая}) \times 100.$$

Анализ площади агрегатов эритроцитов в лабиринтном отделе плаценты осуществляли на участке шириной 1 мм в 3–4 полях зрения. Оценивали суммарную площадь агрегатов агглютинированных клеток, содержащих в первую очередь эритроциты. В анализ не включались отдельные

клетки крови; дифференцировка сосудов на сосуды матери и плода не проводилась. Толщину базальной части и лабиринтной области плаценты измеряли на изображениях, включающих все части плаценты в середине ее поперечного среза, сделанного на уровне крепления пуповины. Вычисляли отношение толщины базальной части к толщине лабиринтной области. Вычисляли средние величины исследуемых показателей по плацентам в каждой группе.

Электронная микроскопия. Ткань плаценты промывали физраствором для удаления крови, погружали на 2 ч в фиксатор (0,1 М PBS (рН 7,4), содержащий 1% глутаральдегида и 1% формальдегида), затем дополнительно фиксировали в 1%-ном OsO₄ в течение 1 ч. Ткань контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в эпоновую смолу по протоколу, описанному в наших предыдущих работах [34, 35]. Ультратонкие срезы толщиной 50 нм изготавливали на ультрамикротоме Leica («Leica Microsystems», Германия) и анализировали на просвечивающем электронном микроскопе FEI Tecnai Spirit V2 («FEI», США). Анализировали по 2 плаценты (каждая от отдельной самки) в контрольной и подопытной группе.

Проницаемость плацентарного барьера. Используемый протокол основан на флуориметрическом определении количества проникшего в ткани плода красителя Эванса синего [36, 37]. На 20-й день беременности, за 3 ч до декапитации, самкам контрольной и подопытной группы под золетилловым наркозом (золетил 100; «Virbac», Франция; 30 мг/кг массы тела) делали однократную инъекцию раствора Эванса синего (45 мг красителя в 0,5 мл воды) через катетер хвостовой вены. Самок декапитировали, плоды извлекали и выделяли мозг плода, а также блок органов брюшной полости плода (кишечник, желудок, поджелудочная железа и т.п., за исключением печени) для дальнейшего исследования. Выделенные образцы органов плода погружали в формамид (6 мл на 1 г массы ткани), гомогенизировали в нем и инкубировали в течение 18 ч при 60 °С для экстрагирования красителя Эванса. После этого образцы центрифугировали 30 мин при 10 000 об./мин на центрифуге Microspin12 («BioSan», Латвия) и отбирали надосадочную жидкость, содержащую формамид с экстрагированным красителем Эванса. Интенсивность флуоресценции измеряли в дублях на планшетном ридере CLARIOstar plus («BMG Labtech», Германия) с длиной волны возбуждения 620 нм и эмиссии – 670 нм. Среднее значение флуоресценции для каждого образца корректировали по холостой пробе (чистый формамид). Образец лизатов соответствующих тканей плода от матери, которой вводили 0,5 мл физиологического раствора без красителя, использо-

вали в качестве отрицательного контроля, чтобы исключить возможность ошибочного измерения автофлуоресценции тканей. Вычисляли средние величины исследуемых показателей по плацентам в каждой группе.

Статистическая обработка данных. Для выявления статистически значимых различий данные обрабатывали с помощью программ STATISTICA 10.0 и GraphPad Prism 8. Анализ выбросов проводился при помощи критерия Граббса. Данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка, для оценки однородности дисперсий использовали тест Левена. В зависимости от характера распределения признаков в выборках сравнение экспериментальной и контрольной групп проводилось с использованием *t*-критериев Стьюдента (нормальное распределение, дисперсии однородны) и Уэлча (нормальное распределение, дисперсии неоднородны) или непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни (распределение, отличное от нормального). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Результаты на рисунках и в таблицах представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$) либо как медиана и квартили ($Me (Q_1; Q_3)$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние вызванной метиониновой нагрузкой гипергомоцистеинемии на вес беременных самок крыс и массу их плацент и плодов. Метиониновая нагрузка не вызывала значительных изменений прибавки веса беременных самок крыс. В контрольной и в опытной группе животных *k*-угловые коэффициенты наклона кривой зависимости веса от срока беременности составили $5,20 \pm 1,17$ и $5,30 \pm 1,24$ соответственно.

Таблица 1. Влияние материнской гипергомоцистеинемии на массу плода и плаценты самок крыс на 20-й день беременности

Контроль	ГГЦ
Масса плода (мг)	
4182,2 ± 79,7	3491,3 ± 101,9 ***
Масса плаценты (мг)	
570,1 ± 17,4	472,1 ± 8,1 ***

Примечание. Данные представлены как $M \pm SEM$ от среднеарифметической массы всех плодов или плацент в помете каждой самки; $n = 13$ самок в контрольной группе, $n = 16$ самок в группе с гипергомоцистеинемией (ГГЦ); *** $p < 0,001$, *t*-критерий Стьюдента.

Вместе с тем материнская ГГЦ приводила к значительному снижению массы плодов и плацент на 20-й день беременности (табл. 1).

Изменение содержания свободных аминокислот в крови самок крыс и их плодов под воздействием материнской гипергомоцистеинемии, вызванной введением метионина. У самок крыс на 20-й день беременности на фоне ГГЦ, вызванной введением метионина, в сыворотке крови показано повышение содержания боль-

шинства незаменимых (His, Ile, Val, Lys, Phe, Trp) и заменимых АК (Ala + Arg, Asp, Gln, Tyr, Pro), что отражалось на их суммарном уровне, который также увеличивался (табл. 2). Снижение содержания в крови матери под влиянием ГГЦ было отмечено только для Asn. В сыворотке крови плода в условиях ГГЦ наблюдалось снижение содержания некоторых незаменимых (Met, Trp) и заменимых АК (Gln, Ser), а также повышение уровня незаменимых АК Val и Lys. Сумма неза-

Таблица 2. Концентрации свободных аминокислот в сыворотке крови самок крыс и их плодов на 20-й день беременности в норме и при материнской гипергомоцистеинемии

Аминокислота, мкмоль/литр		Мать, контроль	Мать, ГГЦ	Плод, контроль	Плод, ГГЦ
Незаменимые аминокислоты	His	27,4 ± 3,0	40,4 ± 3,7 *	69,0 ± 12,2	84,9 ± 10,1
	Ile	90,1 ± 4,5	132,1 ± 7,5 ***	255,5 ± 15,2	262,9 ± 15,2
	Leu	107,3 ± 8,6	120,3 ± 5,8	249,3 ± 14,9	295,1 ± 11,6 *
	Val	117,1 ± 9,6	153,5 ± 11,3 *	373,7 ± 19,5	445,8 ± 11,6 **
	Lys	462,1 ± 28,4	552,2 ± 24,8 *	867,2 ± 45,1	1023,4 ± 38,5 *
	Met	44,4 ± 1,6	42,9 ± 1,2	133,9 ± 5,8	102,4 ± 4,5 ***
	Thr	530,5 ± 28,2	619,0 ± 46,3	1063,4 ± 51,7	1133,1 ± 45,1
	Phe	58,0 ± 2,8	65,6 ± 2,5 *	247,6 ± 11,3	241,5 ± 10,6
	Trp	51,1 ± 6,7	74,4 ± 6,7 *	143,1 ± 9,9	102,9 ± 5,1 **
	Разветвленные (Ile + Leu + Val)	301,2 ± 17,7	405,9 ± 23,1 *	878,4 ± 43,7	1003,7 ± 31,7 *
Сумма незаменимых АК		1434,0 ± 69,7	1800,4 ± 98,8 *	3402,5 ± 86,2	3682,9 ± 105,1*
Заменимые аминокислоты	Ala + Arg	845,0 ± 28,4	993,6 ± 43,3 *	1464,0 ± 55,6	1562,2 ± 78,7
	Asp	22,2 ± 2,8	36,7 ± 3,0 **	68,6 ± 5,6	55,4 ± 3,3
	Asn	79,5 ± 2,7	50,3 ± 3,6 **	103,2 ± 6,3	123,3 ± 9,4
	Glu	120,7 ± 9,8	131,9 ± 7,0	362,4 ± 25,8	339,8 ± 21,6
	Gln	859,3 ± 31,9	1069,5 ± 54,6 **	1655,9 ± 79,1	1377,3 ± 90,9 *
	Gly	170,9 ± 11,3	201,2 ± 15,1	356,5 ± 24,2	355,1 ± 24,2
	Ser	290,1 ± 12,4	314,5 ± 4,8	441,3 ± 18,4	380,8 ± 13,2 *
	Tyr	30,2 ± 2,0	40,1 ± 2,7 *	171,7 ± 18,7	172,9 ± 7,6
	Pro	206,4 ± 9,9	317,0 ± 15,3 ***	536,4 ± 18,9	559,7 ± 25,0
	Сумма заменимых АК	2624,2 ± 68,3	3154 ± 86,5 **	5160,0 ± 163,1	4926,5 ± 205,6
Сумма всех АК		4109,7 ± 127,5	4955,1 ± 115,5 ***	8562,5 ± 203,8	8618,2 ± 245,3

Примечание. Данные представлены как М ± SEM; n = 11 самок в контрольной группе, n = 10 самок в группе с гипергомоцистеинемией (ГГЦ); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с контролем; t-критерий или U-критерий Манна-Уитни.

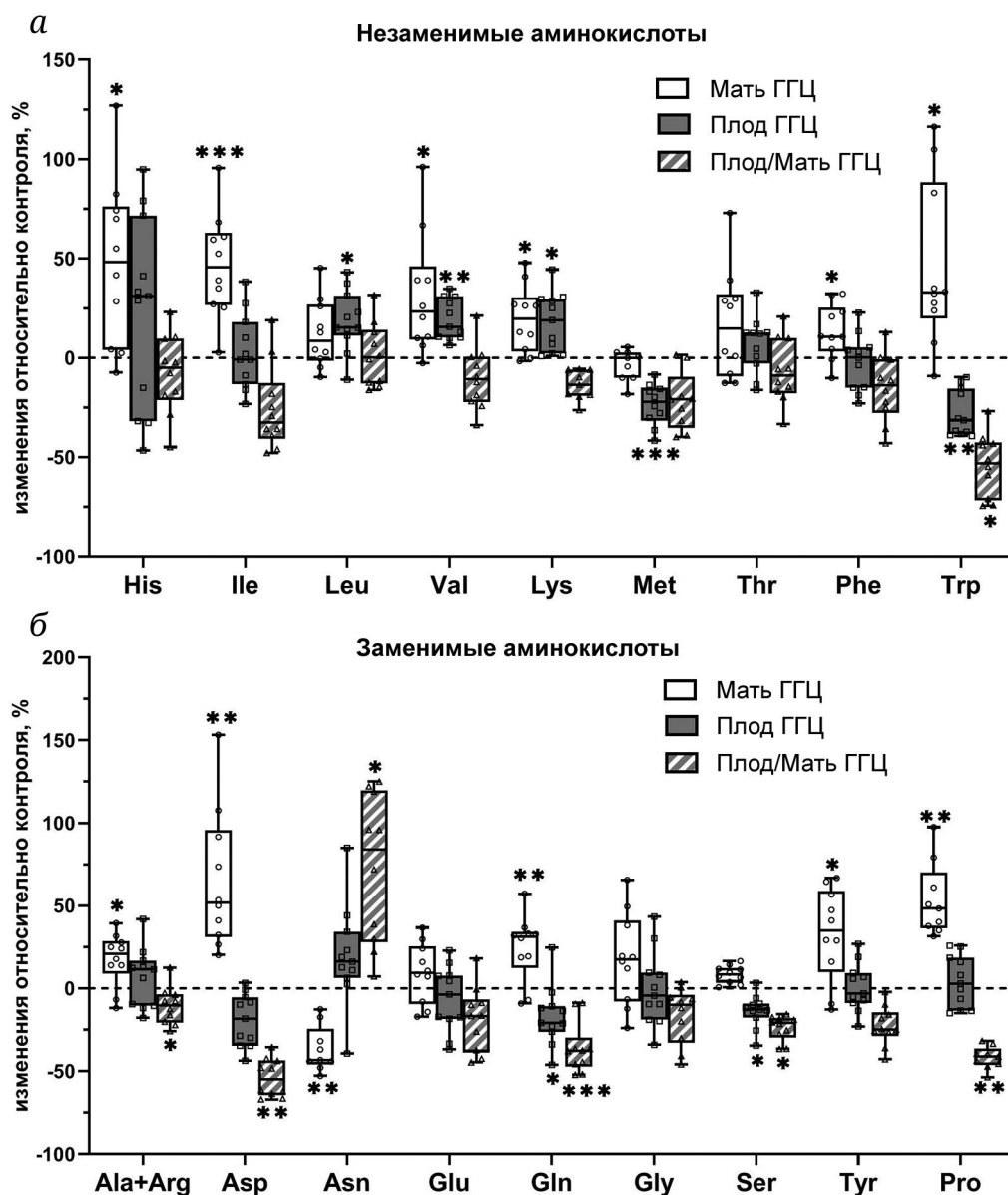


Рис. 1. Изменения под влиянием материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) содержания свободных аминокислот (АК) в сыворотке крови беременных крыс (Мать ГГЦ) и их плодов (Плод ГГЦ), а также отношения уровня АК в крови плода к содержанию в крови матери (Плод/Мать ГГЦ) на 20-й день беременности. а – Незаменимые АК; б – заменимые АК. Изменения выражены в процентах относительно уровня в контрольной группе; данные представлены как Ме (Q_1 ; Q_3); $n = 11$ самок в контрольной группе, $n = 10$ самок в группе ГГЦ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем; t -критерий или U -критерий Манна-Уитни

менимых АК в сыворотке крови плодов при ГГЦ была выше, чем в контроле, при этом суммарное содержание заменимых АК, а также общая сумма всех АК достоверно не изменялись. В условиях материнской ГГЦ наблюдалось преимущественно снижение отношения содержания АК в крови плода к уровню в крови матери (Ile, Met, Trp, Asp, Gln, Pro), исключение составил Asn, для которого установлено повышение данного показателя (рис. 1).

Изменение количества транспортеров аминокислот в лабиринтной области плаценты

крыс под влиянием материнской гипергомоцистеинемии. В условиях ГГЦ, вызванной введением метионина, у беременных крыс на 20-й день беременности в ПЧП (лабиринтная область) наблюдалось повышение содержания натрий-зависимого переносчика нейтральных АК 2 (SNAT2; $p < 0,01$), а также переносчика больших нейтральных АК 1 (LAT1; $p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными (рис. 2, а и б). При этом уровень белка транспортеров SNAT1 и LAT2 в ПЧП в подопытной и контрольной группах значительно не различался (рис. 2, а и б).

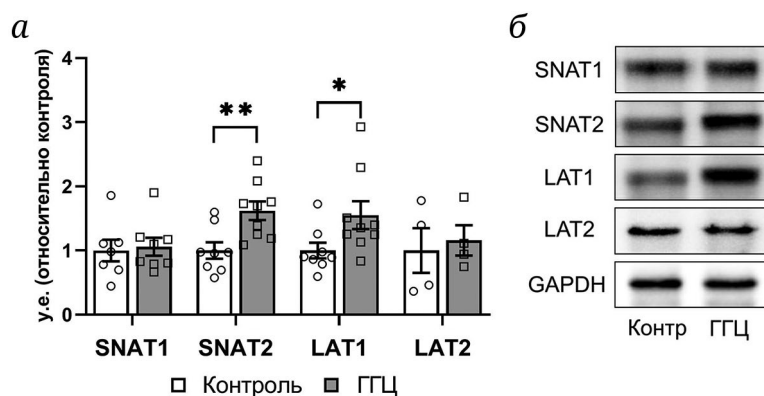


Рис. 2. Влияние экспериментальной гипергомоцистеинемии на содержание транспортеров аминокислот в лабиринтной области плаценты крыс на 20-й день беременности. Содержание (а) и репрезентативный иммуноблот (б) белков SNAT1, SNAT2, LAT1, LAT2 в плодной части плаценты крыс в контроле и под воздействием материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ); ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга; данные представлены как $M \pm SEM$; $n = 4-8$ самок в каждой группе; * $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни; ** $p < 0,01$, t-критерий Стьюдента

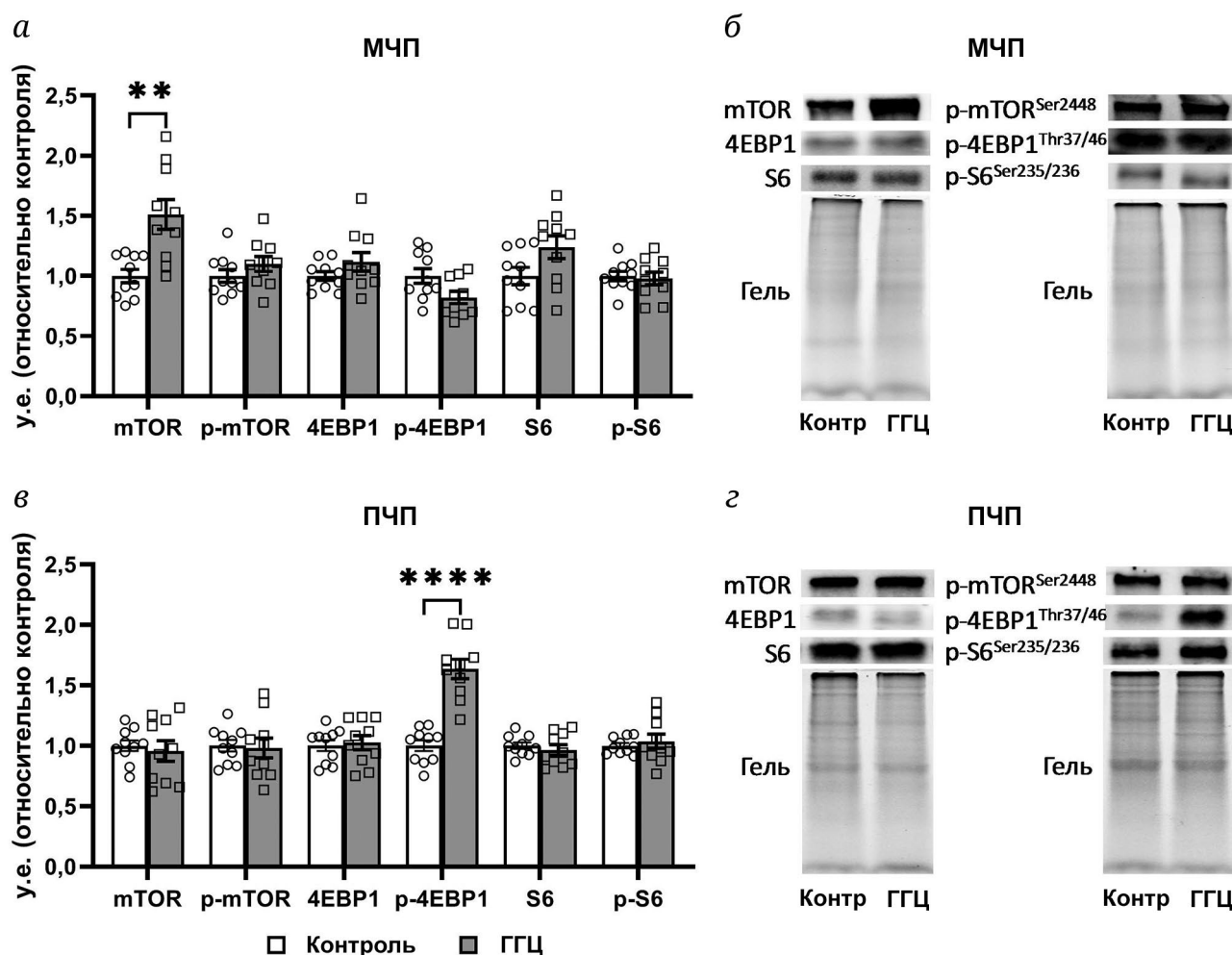


Рис. 3. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на активность киназы mTOR и нижележащих компонентов сигнальной системы mTORC1 в плаценте крыс на 20-й день беременности. Содержание и репрезентативный иммуноблот белков mTOR, 4E-BP1 и S6, а также их фосфорилированных форм p-mTOR^{Ser2448}, p-4E-BP1^{Thr37/46} и p-S6^{Ser235/236} в материнской (МЧП) (а и б) и плодной части (ПЧП) (в и г) плаценты крыс в контроле и под воздействием материнской ГГЦ; ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга; данные представлены как $M \pm SEM$; $n = 10$ самок в каждой группе; ** $p < 0,05$, t-критерий Уэлча; *** $p < 0,001$, t-критерий Стьюдента

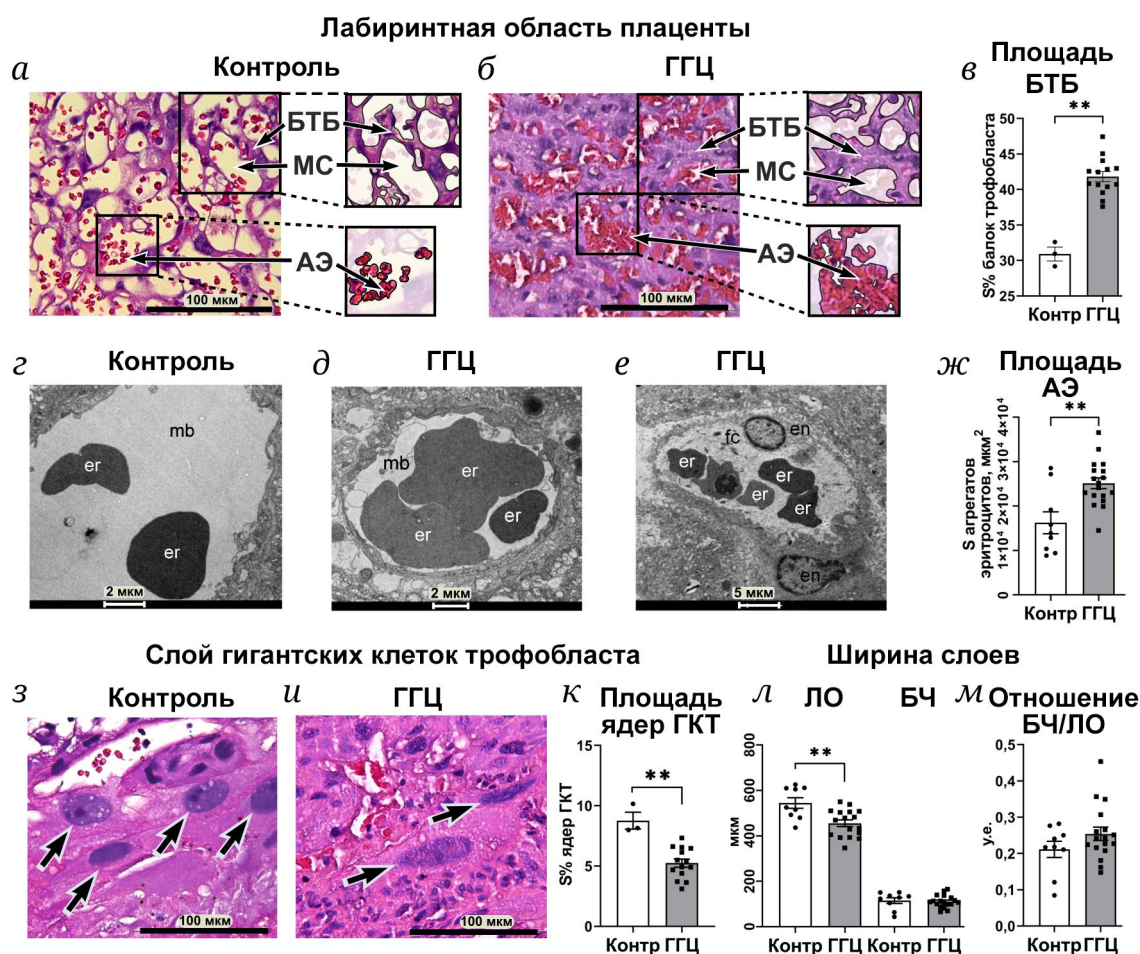


Рис. 4. Морфологические изменения в плаценте крыс на 20-й день беременности под влиянием материнской гипергонадотропиемии (ГГЦ). *а, б* – Лабиринтная область плаценты с балками трофобласта (БТБ) и материнскими синусоидами (МС) в контрольной (*а*) и подопытной (*б*) группе. В выносках обозначены области БТБ и агрегатов эритроцитов (АЭ), площадь которых количественно анализировалась; окраска гематоксилин-эозин, $\times 200$. *в* – Относительная площадь (S%) БТБ от общей площади области лабиринта. *г–е* – Электронограммы ткани плаценты контрольной (*г*) и подопытной (*д* и *е*) группы; mb – кровь матери (материнская синусоида), fc – капиллярный сосуд плода, er – эритроциты в просвете сосуда, на панелях *д* и *е* видны агрегаты эритроцитов, заполняющие просвет сосуда, en – эндотелиальные клетки стенки капилляра плода. *ж* – Площадь АЭ в лабиринтной области плаценты. *з, и* – Гигантские клетки трофобласта (ГКТ) в контрольной группе (*з*) и группе ГГЦ (*и*); окраска гематоксилин-эозин, $\times 400$; стрелками обозначены ядра ГКТ; *к* – относительная площадь (S%) ядер ГКТ от общей площади слоя ГКТ. *л* – Толщина лабиринтной области (ЛО) и базальной части (БЧ) плаценты. *м* – Отношение толщины БЧ к толщине ЛО. На всех графиках данные представлены как $M \pm SEM$. Для панелей *в* и *к*: $n = 3$ плаценты от 3 самок в контрольной группе, $n = 14$ плацент от 4 самок в группе ГГЦ; *ж, л* и *м*: $n = 9$ плацент от 5 самок в контрольной группе, $n = 18$ плацент от 6 самок в группе ГГЦ; ** $p < 0,01$, t -критерий Стьюдента

Влияние индуцированной метионином материнской гипергонадотропиемии на активность сигнальной системы mTORC1 в различных отделах плаценты крыс. При экспериментальной ГГЦ на 20-й день беременности в МЧП было отмечено повышение содержания белка mTOR ($p < 0,05$), при этом изменений содержания или степени активации нижележащих компонентов сигнальной системы mTORC1 не наблюдалось (рис. 3, *а* и *б*). В ПЧП под влиянием ГГЦ не было обнаружено изменений в содержании и уровне фосфорилирования белка mTOR, а также нижележащего эффектора комплекса mTORC1, рибосомального бел-

ка S6. Вместе с тем показана активация другой нижележащей мишени mTORC1, эукариотического фактора инициации трансляции 4E-связывающего белка 1 (4E-BP1), что выражалось в повышении уровня его фосфорилированной по Thr37/46 формы ($p < 0,001$; рис. 3, *в* и *г*).

Структурные изменения в ткани плаценты в условиях материнской гипергонадотропиемии. Лабиринтная область (соответствует ПЧП) является зоной обмена между кровеносными системами матери и плода. В норме на 20-й день беременности она состоит из перекрещивающихся между собой тонких тяжей (балок), образованных

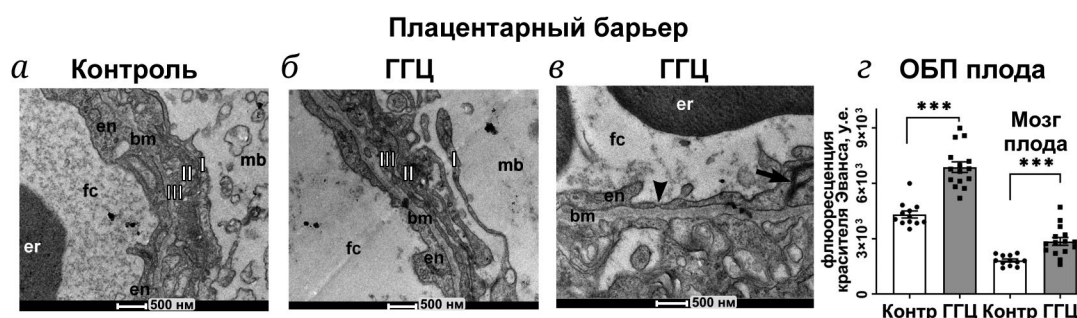


Рис. 5. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на ультраструктуру плацентарного барьера и проницаемость плаценты крыс на 20-й день беременности. а–в – Электронограммы зоны обмена между кровеносными системами матери и плода в лабиринтной области; mb – кровь матери (материнская синусоида), fc – капиллярный сосуд плода; слои плацентарного барьера: I – слой цитотрофобласта, контактирующий с материнской кровью, II и III – два слоя синцитиотрофобласта, bm – базальная мембрана, выстилающая слой клеток эндотелия (en) стенки капилляра плода, er – эритроцит в просвете сосуда, стрелка – плотный контакт между эндотелиальными клетками, наконечник стрелки – фенестра эндотелия капилляра плода. г – Уровень интенсивности флуоресценции красителя Эванса синего в тканях органов брюшной полости (ОБП) и головного мозга плодов через 3 ч после его введения самкам крыс; $n = 12$ плацент от 2 самок в контрольной группе, $n = 15$ плацент от 2 самок в группе ГГЦ; *** $p < 0,001$, t -критерий Уэлча

клетками трофобласта, внутри которых проходят выстланные эндотелием кровеносные капилляры плода (рис. 4, а и б). Широкие пространства между балками, синусоиды, заполнены материнской кровью и лишены эндотелия (рис. 4, а и б). В группе ГГЦ в лабиринтной области плаценты наблюдалось утолщение (увеличение площади) балок трофобласта по сравнению с контролем ($p < 0,01$; рис. 4, б и в); соответственно, снижалась площадь заполненного материнской кровью синусоидального пространства. Сужение материнских синусоид при ГГЦ сопровождалось нарушением циркуляции, застоем крови и агрегацией эритроцитов (рис. 4, а и б). Скопление эритроцитов в просветах мельчайших материнских синусоид и капилляров плода было отмечено и при изучении ультраструктуры лабиринтного слоя (рис. 4, г–е). Увеличение площади агрегатов эритроцитов в лабиринтной области подтверждалось данными морфометрии ($p < 0,01$; рис. 4, ж).

Базальная часть плаценты включает три вида клеток: спонгиозотрофобласт, гликогеновые клетки и гигантские клетки трофобласта, располагающиеся тонким слоем на границе базальной части и декiduальной оболочки и выполняющие эндокринную функцию. В контрольной группе гигантские клетки формировали слой толщиной в 2–3 клетки с оксифильной цитоплазмой, округло-овальным ядром и равномерным распределением хроматина (рис. 4, з). В группе с материнской ГГЦ слой гигантских клеток утончался, составляя толщину 1–2 клетки, в клетках отмечалась вакуольная дистрофия цитоплазмы (рис. 4, и). Ядра гигантских клеток в ряде образцов подопытной группы не прослеживались, в отдельных клетках отмечался кариолизис, суммарная площадь ядер гигантских клеток при ГГЦ снижалась ($p < 0,01$; рис. 4, к).

При изучении воздействия материнской ГГЦ на толщину основных частей плаценты на 20-й день беременности наблюдалось уменьшение толщины лабиринтной области ($p < 0,05$; рис. 4, л), при этом толщина базальной части, а также соотношение толщины базальной части к области лабиринта достоверно не изменялись (рис. 4, л и м).

Влияние материнской гипергомоцистеинемии на проницаемость плацентарного барьера. При изучении зоны обмена между кровеносными системами матери и плода в лабиринтной области на ультраструктурном уровне в группе ГГЦ в ряде случаев отмечалась дезинтеграция трех слоев, составляющих плацентарный барьер: I (клетки цитотрофобласта, контактирующие с материнской кровью), II (первый слой СТБ) и III (второй слой СТБ, соприкасающийся с эндотелием сосудов плода), с образованием зазоров между их мембранами (рис. 5, а и б). В эндотелии сосудов плода наблюдалось увеличение количества фенестр, закрытых диафрагмами (рис. 5, в). Проникновение через плацентарный барьер красителя Эванса синего в условиях ГГЦ было достоверно выше, чем в контроле, что подтверждается усилением флуоресценции этого красителя в тканях органов брюшной полости и головного мозга плодов в подопытной группе по сравнению с контрольной ($p < 0,001$; рис. 5, г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время введение метионина (с пищей, питьевой водой или через зонд) является одним из наиболее распространенных способов моделирования ГГЦ у животных [38, 39].

По сравнению с введением непосредственно ГЦ, введение метионина обеспечивает более высокий внутриклеточный уровень ГЦ, характерный для клинической картины ГЦ у человека [40]. Однако неизбежной особенностью данной модели является повышение, наряду с уровнем ГЦ, содержания метионина и его метаболитов в крови, что может оказывать дополнительное влияние на баланс свободных АК [41]. В нашем предыдущем исследовании была охарактеризована динамика уровня ГЦ в крови самок крыс и их плодов в используемой нами модели ГЦ, вызванной ежедневным введением через желудочный зонд метионина матерям [29]. Концентрация ГЦ в крови беременных крыс на 20-й день беременности ($5,7 \pm 0,2$ мкмоль/литр) значительно повышалась уже через 1 ч после перорального введения метионина ($87,2 \pm 24,2$ мкмоль/литр), сохранялась на сходном высоком уровне через 6 ч после его введения ($81,4 \pm 31,3$ мкмоль/литр), затем постепенно снижалась, оставаясь значительно выше контроля вплоть до 18 ч после метиониновой нагрузки ($34,1 \pm 14,7$ мкмоль/литр), и только через 24 ч к моменту повторного введения метионина достигала значений, близких к нормальным ($6,6 \pm 0,5$ мкмоль/литр) [29]. Сходная динамика уровня ГЦ после введения матерям метионина отмечалась и в крови плодов [29]. Повышению уровня ГЦ в крови при метиониновой нагрузке должно предшествовать поступление метионина в клетки, его метаболическое превращение в ГЦ и транспорт образовавшегося ГЦ в кровь. Вследствие этого уровень самого метионина достигает пика в крови и снижается до нормальных значений раньше уровня ГЦ [42]. Таким образом, наблюдаемое в настоящем исследовании отсутствие повышенного содержания метионина в крови самок крыс и их плодов через 24 ч после метиониновой нагрузки является вполне закономерным. Мы предполагаем, что в используемой нами модели воздействие на изучаемые показатели и процессы повышенного уровня ГЦ, как более длительно действующего фактора, превосходит эффект более краткого повышения уровня метионина.

Потребление с пищей ряда АК в дозах, значительно превышающих потребности в них, вызывает у животных токсический эффект [43]. При этом эффект избытка в пище метионина в крови наиболее выражен, по сравнению с влиянием избытка других АК, и проявляется в первую очередь в уменьшении потребления пищи и снижении роста организма [43]. Задержка роста наблюдалась и у плодов беременных животных, получавших пищу с избытком метионина [13, 44]. В нашем исследовании прибавка веса самками крыс, которым вводили метионин, не отличалась

от наблюдаемой у контрольных животных, что указывает на отсутствие значительных различий в потреблении пищи между группами. Вместе с тем, как и в предыдущих наших исследованиях [29, 30], токсический эффект ГЦ, вызванной метиониновой нагрузкой, проявлялся в снижении веса плодов.

Согласно полученным нами данным, после хронического введения метионина у самок крыс на 20-й день беременности наблюдалось повышение в крови содержания большинства незаменимых (His, Ile, Val, Lys, Phe, Trp) и заменимых АК (Ala + Arg, Asp, Asn, Gln, Tyr, Pro), что отражалось на суммарном уровне незаменимых и заменимых АК, который также увеличивался. Действительно, имеются свидетельства о том, что у животных с ГЦ, вызванной генетическими дефектами ферментов метаболизма ГЦ или потреблением обогащенной метионином пищи, повышаются уровни АК в крови [12, 14–16]. Диета, обогащенная метионином, вызывала в крови мышей увеличение уровня ГЦ уже при 1,6-кратном превышении содержания метионина относительно нормы, в то время как для повышения концентрации в крови самого метионина, а также других АК требовалось повышение содержания метионина в пище в 7–10 раз [16]. Данный факт говорит о наличии у организма адаптивных возможностей для устранения избытка метионина в крови, в первую очередь путем его превращения в ГЦ, и подчеркивает значение ГЦ как ключевого токсического агента при метиониновой нагрузке.

Можно предположить, что в повышении уровня свободных АК при метиониновой нагрузке играют роль метаболические механизмы. Например, катаболизм метионина через ГЦ включает ферменты (пропионил-КоА-карбоксилаза) и промежуточные продукты (пропионил-КоА), общие с разветвленными АК [45]. Избыток одного или нескольких подобных промежуточных соединений, образующихся при метаболизме метионина, может замедлять катаболизм других АК, разделяющих с метионином данный метаболический путь. Однако в нашем исследовании в крови матерей отмечалось повышение уровня не только разветвленных, но и прочих незаменимых и заменимых АК, пути метаболизма которых напрямую не связаны с метаболизмом метионина и ГЦ. Предполагается, что избыток метионина и ГЦ в крови может затруднять транспорт в клетки других АК, использующих те же транспортеры [16, 17, 46]. Гипотеза о снижении под влиянием ГЦ, вызванной метиониновой нагрузкой, транспорта АК в клетки материнского организма и/или их переноса через плаценту к плоду, следствием чего является накопление АК в материнской крови, более соответствует полученным нами данным.

В крови плода суммарный уровень всех АК при воздействии ГГЦ не изменялся. Хотя в группе ГГЦ в крови плодов отмечалось сходное с наблюдавшимся в крови матери повышение концентрации двух незаменимых АК (Val, Lys), содержание Met, Gln, Trp и Ser в крови плодов в этой группе было значительно снижено по сравнению с контролем. Кроме того, в подопытной группе наблюдалось снижение отношения уровня Pro и Ala + Arg в крови плода к содержанию в крови матери. За перенос через мембраны СТБ АК, уровень которых был снижен в крови плода, ответственны транспортеры LAT1 и LAT2 транспортной системы L (Met, Gln, Trp, Ala, Ser), транспортеры SNAT1 и SNAT2 системы A (Met, Gln, Ala, Ser, Pro) и транспортеры y^+LAT1 и y^+LAT2 системы y^+L (Arg, Gln, Met) [17, 47]. Предполагается, что ГЦ также может переноситься плацентарными переносчиками систем A, L и y^+L [17, 18], поэтому снижение в крови плода содержания АК, являющихся субстратами этих же транспортеров, согласуется с гипотезой о возможности конкурентного ингибирования их плацентарного транспорта под влиянием материнской ГГЦ.

Глутамин (Gln) и его предшественник Glu жизненно важны для роста и развития плода, концентрация Gln в крови матери и плода, а также скорость его транспорта от матери к плоду являются одними из самых высоких среди прочих АК [48, 49]. Адекватный уровень Gln и Glu в крови плода поддерживается благодаря способности этих АК к взаимопревращению и рециркуляции между плацентой и печенью плода [48]. Наблюдаемое нами снижение уровня Gln в крови плодов могло явиться следствием повышенного его расходования для компенсации задержки роста плода при материнской ГГЦ.

Отрицательно заряженные АК Asp и Glu транспортируются от матери к плоду переносчиками возбуждающих АК группы EAAT, относящимися к транспортной системе X^{AG} [47]. При метиониновой нагрузке наблюдалось повышение концентрации Asp в крови матери, которое сопровождалось снижением отношения уровня Asp в крови плода к содержанию в крови матери. Метионин и ГЦ не являются субстратами транспортеров группы EAAT, поэтому изменение уровня Asp не может быть связано с конкуренцией с этими АК за общие транспортеры. Следует предполагать, что повышение уровня Asp с одновременным снижением содержания Asn в крови матерей под воздействием ГГЦ связано со снижением синтеза Asn из Asp. Поскольку для синтеза Asn из Asp используется группа NH_2 Gln [50], уменьшение в условиях ГГЦ содержания Gln в крови плода и одновременное снижение отношения уровня Asp в крови плода к содержанию в крови матери,

сопровожаемое повышением этого отношения для Asn, могут быть взаимосвязаны.

Материнский Trp, как предшественник серотонина (5-НТ), имеет исключительно важное значение для развития нервной системы плода. У грызунов плацента начинает синтезировать 5-НТ из материнского Trp, начиная с 10-го дня беременности, и вплоть до 15-го дня эмбрионального развития плацентарный 5-НТ является основным, и, возможно, единственным источником этого нейромедиатора для мозга плода [51, 52]. Отмеченное нами снижение концентрации Trp в крови плодов могло привести к уменьшению синтеза 5-НТ в мозге плода, тем самым оказывая негативное воздействие на его развитие. Поскольку в плаценте грызунов 5-НТ синтезируется главным образом в гигантских клетках трофобласта [53], наблюдавшееся нами уменьшение количества этих клеток могло внести свой вклад в снижение уровня доступного плоду 5-НТ.

Помимо возможной конкуренции ГЦ с другими АК за общие транспортеры, важной причиной, вызывающей снижение транспорта АК от матери к плоду в условиях материнской ГГЦ, может являться морфологическое нарушение плаценты [54]. В данном исследовании нами отмечены снижение веса плацент, уменьшение толщины их лабиринтной области и относительной площади материнских синусоид в этом отделе, сопровождаемое застоем материнской крови и повышенной агрегацией эритроцитов, что является фактором риска образования микротромбов [55]. Уменьшение площади синусоид, где происходит контакт материнской крови со слоем СТБ, как и замедление плацентарного кровотока, приводят к снижению транспорта питательных веществ через расположенные на мембранах СТБ переносчики [10]. Нарушение формирования сосудистой системы области лабиринта, обеспечивающей транспорт питательных веществ от матери к плоду, часто приводит к задержке роста плода [54]. Обнаруженные в данном исследовании в зоне лабиринта морфологические изменения могут, в частности, являться следствием отмеченного нами ранее дисбаланса ангиогенных и ростовых факторов в плаценте в условиях материнской ГГЦ [30].

Как было отмечено выше, в плаценте человека и грызунов перенос нейтральных аминокислот от матери к плоду осуществляется в первую очередь транспортерами систем A и L, уровень активности и экспрессии которых на мембранах СТБ регулируется системой mTOR [7, 17, 56]. Ограничение количества питательных веществ в пище матери в период беременности приводит к снижению активности комплекса mTORC1 в плаценте, уменьшению экспрессии и активности транспортеров АК на мембранах СТБ, что сопро-

вождается снижением веса плодов [7]. С другой стороны, избыток питательных веществ в крови матери вызывает в плаценте активацию комплекса mTORC1, повышение экспрессии транспортеров АК и приводит к увеличению веса плодов [57, 58]. Влияние же состояния материнской ГЦ, характеризующейся избытком ГЦ и, возможно, других АК в крови матери, но одновременно сопровождаемой снижением роста плода [1, 44], на активность плацентарного комплекса mTORC1 до сих пор не было исследовано.

В данном исследовании впервые была предпринята попытка в модели хронической метиониновой нагрузки оценить влияние материнской ГЦ на активность комплекса mTORC1 в различных частях плаценты, используя в качестве функциональных маркеров передачи сигналов mTORC1 уровень фосфорилирования его ключевых нижележащих эффекторов, белков 4E-BP1 и S6. В МЧП, не связанной напрямую с транспортом питательных веществ к плоду, белок mTOR играет в большей степени роль стимулятора роста и функционального созревания через активацию синтеза белка [59]. Обнаруженное нами повышение под влиянием ГЦ уровня белка mTOR в МЧП, возможно, является компенсаторным ответом на снижение эндокринной функции этого отдела плаценты, требующей постоянно высокого уровня синтеза белка [60]. Основными эндокринными клетками в МЧП являются гигантские клетки трофобласта [61], количество которых снижалось при воздействии материнской ГЦ. В ПЧП, соответствующей лабиринтной области плаценты, нами было установлено повышение уровня фосфорилирования белка 4E-BP1, при этом не наблюдалось изменения экспрессии общего белка mTOR и его фосфорилированной по Ser2448 формы, а также активации другой мишени mTOR, белка S6. В настоящее время известно несколько сайтов фосфорилирования mTOR, функциональное значение которых еще недостаточно изучено [62]. Показано, что фосфорилирование mTOR по Ser2448 осуществляется лежащей ниже mTOR в сигнальном каскаде киназой S6K1, ответственной также и за фосфорилирование белка S6 [63]. Поэтому отсутствие изменения уровня p-mTOR^{Ser2448} и p-S6 может наблюдаться вследствие неизменной активности киназы S6K1. Активация 4E-BP1 могла произойти как по причине активации mTOR через другие сайты фосфорилирования, так и под воздействием другой, независимой от mTOR, киназы [64]. Следует отметить, что в многочисленных исследованиях влияния на рост плода активности системы mTOR и ее нижележащих мишеней в плаценте также не всегда наблюдались однонаправленные и одновременные изменения уровня p-mTOR, p-4E-BP1 и p-S6 [5].

Обнаруженное в ПЧП повышение экспрессии транспортеров АК LAT1 (система L) и SNAT2 (система A) могло явиться следствием активации сигнального пути 4E-BP1, приводящей к усилению синтеза соответствующих белков и их транспорта на мембраны СТБ [11]. С другой стороны, предполагается, что повышение экспрессии транспортеров АК в плаценте может служить компенсаторным ответом на уменьшение транспорта АК от матери к плоду [7]. Компенсаторное повышение экспрессии LAT1, транспортирующего Gln, отмечалось для плацент со сниженной массой и вследствие этого уменьшенной площадью зоны обмена между кровью матери и плода [48]. Однако эта адаптация не всегда может полностью возместить недостаточное поступление АК к плоду, в результате чего на фоне повышенного уровня транспортеров АК и относительного увеличения транспортной способности плаценты задержка роста плода все равно сохраняется [48].

Зона обмена между кровью матери и плода в лабиринтной области плаценты крыс состоит из трех слоев трофобласта: контактирующего с материнской кровью проникаемого слоя цитотрофобласта и двух расположенных под ним непрерывных синцитиальных слоев СТБ, которые и составляют структурную основу плацентарного барьера или «интерфейса мать–плод» [7, 56, 65]. Целостность плацентарного барьера имеет решающее значение для роста и нормального развития плода. Отмеченное нами увеличение во внутренних органах и мозге плода уровня красителя Эванса синего, переносимого в крови матери альбумином и другими белками [66], может являться следствием повышения проницаемости плаценты для макромолекул [67]. Известным индуктором проницаемости плацентарного барьера является проангиогенный фактор VEGF-A [65, 67], увеличение уровня которого в ПЧП на 20-й день беременности при воздействии ГЦ было нами показано в предыдущем исследовании [30]. Морфологической основой повышения проницаемости плацентарного барьера может являться наблюдавшаяся нами в ряде случаев дезинтеграция слоев плацентарного барьера, а также увеличение количества фенестр эндотелия. Показано, что некоторые материнские белки могут переноситься через плацентарный барьер в кровь плода путем эндоцитоза/экзоцитоза, а также параклеточным путем через поры в СТБ [68, 69]. Захваченные путем эндоцитоза белки могут катаболизироваться в лизосомах СТБ и служить дополнительным источником АК для плаценты и плода [70]. Такой метаболический путь показан в плаценте человека для захватываемого мембраной СТБ альбумина, при этом переносимые этим белком молекулы высвобождаются в СТБ и могут транспортиро-

ваться далее в кровеносную систему плода [71]. Поэтому увеличение проникновения Эванса синего в ткани плода могло также явиться следствием увеличения захвата мембраной СТБ альбумина и других белков, с которыми связывается этот краситель, для возмещения потребностей в АК плаценты и плода в условиях снижения их роста.

Настоящее исследование опиралось на гипотезу о возможном конкурентном ингибировании высокими концентрациями ГЦ транспорта АК, являющихся вместе с ГЦ общими субстратами транспортеров нейтральных АК систем А и L. За пределами проведенного исследования осталось возможное влияние ГГЦ на активность транспортеров системы y^+L , субстратом которых, как предполагают, также является ГЦ [17]. Также в данной статье не рассматривалось возможное влияние образующихся в ходе метаболизма ГЦ серосодержащих соединений на плацентарный транспорт АК. Основным метаболитом, образующимся в процессе катаболического транссульфирования ГЦ, является Cys. Отмечено, что повышение уровня общего ГЦ в крови может сопровождаться снижением содержания общего Cys [16, 72]. В крови Cys находится преимущественно в виде окисленной димерной формы – цистина, который транспортируется через обращенную в сторону матери мембрану СТБ при помощи транспортера xCT/SLC7A11 транспортной системы Xc^- [73]. В СТБ цистин восстанавливается до Cys и служит предшественником для синтеза глутатиона (GSH), таким образом, усиливая антиоксидантную защиту плаценты [73]. Хотя в процессе транссульфирования ГЦ может образовываться GSH, при ГГЦ наблюдается снижение восстановленной формы этого антиоксиданта и/или снижение отношения его восстановленной формы к окисленной в крови и мозге, что связывают с окислением GSH в условиях вызванного ГГЦ окислительного стресса [16, 74]. Снижение содержания общего Cys и восстановленной формы GSH в крови матери, сопровождающееся на уровне плаценты уменьшением уровня GSH и усилением индуцируемого ГГЦ окислительного стресса [30], может являться одним из компонентов негативного влияния материнской ГГЦ на развитие и транспортную функцию плаценты.

Полученные в работе результаты показывают, что материнская ГГЦ вызывает нарушение развития лабиринтной области плаценты крыс, снижение уровня некоторых АК в крови плода и увеличение проницаемости плацентарного барьера. К причинам снижения уровня АК в крови плода под влиянием ГГЦ можно отнести ингибирование их транспорта от матери к плоду из-за конкуренции ГЦ с другими АК за общие транспортеры, а также уменьшение площади контакта материнской крови со слоем СТБ и замедление плацентарного кровотока вследствие уменьшения площади материнских синусов. Сигналы со стороны плода о снижении его массы и уменьшении содержания некоторых АК в его крови могут являться причиной адаптивного ответа со стороны плаценты, выражающегося в активации нижележащего эффектора комплекса mTORC1, белка 4E-BP, и повышения количества аминокислотных транспортеров LAT1 и SNAT2 в лабиринтной области плаценты.

Вклад авторов. А.В. Арутюнян – руководство работой, редактирование текста; Ю.П. Милютин, Г.О. Керкешко – концепция и написание текста; Ю.П. Милютин, Г.О. Керкешко, Д.С. Васильев – обсуждение результатов исследования; И.В. Залозная, С.К. Бочковский, А.В. Михель, Г.Х. Толибова, Н.Л. Туманова, Д.С. Васильев – проведение экспериментов и сбор данных; Ю.П. Милютин, А.Д. Щербицкая, Д.С. Васильев – формальный анализ.

Финансирование. Исследование поддержано Российским научным фондом (проект № 22-15-00393).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Каденову А.Н., Горбовой А.В., Поды В.А., принимавшим участие в проводимых экспериментах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования (одобрены комитетом по этике Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, протокол № 88 от 08.12.2017), и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dai, C., Fei, Y., Li, J., Shi, Y., and Yang, X. (2021) A novel review of homocysteine and pregnancy complications, *Biomed Res. Int.*, **2021**, 6652231, <https://doi.org/10.1155/2021/6652231>.
2. Gaiday, A., Balash, L., and Tussupkaliyev, A. (2022) The role of high concentrations of homocysteine for the development of fetal growth restriction, *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, **44**, 352-359, <https://doi.org/10.1055/s-0042-1743093>.

3. Memon, S.I., Acharya, N. S., Acharya, S., Potdar, J., Karnik, M., and Mohammad, S. (2023) Maternal hyperhomocysteinemia as a predictor of placenta-mediated pregnancy complications: a two-year novel study, *Cureus*, **15**, e37461, <https://doi.org/10.7759/cureus.37461>.
4. Gaccioli, F., Lager, S., Powell, T. L., and Jansson, T. (2013) Placental transport in response to altered maternal nutrition, *J. Dev. Orig. Health Dis.*, **4**, 101-115, <https://doi.org/10.1017/S2040174412000529>.
5. Dong, J., Shin, N., Chen, S., Lei, J., Burd, I., and Wang, X. (2020) Is there a definite relationship between placental mTOR signaling and fetal growth? *Biol. Reprod.*, **103**, 471-486, <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa070>.
6. Jansson, T., Aye, I. L., and Gberghdan, D. C. (2012) The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing, *Placenta*, **33 Suppl 2**, e23-9, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.010>.
7. Chassen, S., and Jansson, T. (2020) Complex, coordinated and highly regulated changes in placental signaling and nutrient transport capacity in IUGR, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1866**, 165373, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.024>.
8. Kramer, A. C., Jansson, T., Bale, T. L., and Powell, T. L. (2023) Maternal-fetal cross-talk via the placenta: influence on offspring development and metabolism, *Development*, **150**, dev202088, <https://doi.org/10.1242/dev.202088>.
9. Sibley, C. P., Brownbill, P., Dilworth, M., and Glazier, J. D. (2010) Review: adaptation in placental nutrient supply to meet fetal growth demand: implications for programming, *Placenta*, **31**, S70-S74, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.020>.
10. Lewis, R. M., Brooks, S., Crocker, I. P., Glazier, J., Hanson, M. A., Johnstone, E. D., Panitchob, N., Please, C. P., Sibley, C. P., Widdows, K. L., and Sengers, B. G. (2013) Review: modelling placental amino acid transfer – from transporters to placental function, *Placenta*, **34 Suppl**, S46-S51, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.10.010>.
11. Rosario, F. J., Dimasuy, K. G., Kanai, Y., Powell, T. L., and Jansson, T. (2016) Regulation of amino acid transporter trafficking by mTORC1 in primary human trophoblast cells is mediated by the ubiquitin ligase Nedd4-2, *Clin. Sci. (Lond)*, **130**, 499-512, <https://doi.org/10.1042/CS20150554>.
12. Matsueda, S., and Niiyama, Y. (1982) The effects of excess amino acids on maintenance of pregnancy and fetal growth in rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **28**, 557-573, <https://doi.org/10.3177/jnsv.28.557>.
13. Mori, M., Yamashita, Y., Hiroi, Y., Shinjo, S., Asato, R., Hirai, K., Suzuki, K., and Yamamoto, S. (1999) Effect of single essential amino acid excess during pregnancy on dietary nitrogen utilization and fetal growth in rats, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **8**, 251-257, <https://doi.org/10.1046/j.1440-6047.1999.00094.x>.
14. Akahoshi, N., Kamata, S., Kubota, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Yamazaki, C., Yoshida, Y., Yamada, H., Ishizaki, Y., Suematsu, M., Kasahara, T., and Ishii, I. (2014) Neutral aminoaciduria in cystathionine beta-synthase-deficient mice; an animal model of homocystinuria, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **306**, F1462-F1476, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00623.2013>.
15. Akahoshi, N., Yokoyama, A., Nagata, T., Miura, A., Kamata, S., and Ishii, I. (2019) Abnormal amino acid profiles of blood and cerebrospinal fluid from cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model of homocystinuria, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 1054-1057, <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00127>.
16. Ishii, I., Kamata, S., Ito, S., Shimonaga, A., Koizumi, M., Tsushima, M., Miura, A., Nagata, T., Tosaka, Y., Ohtani, H., Kamichatani, W., and Akahoshi, N. (2022) A high-methionine diet for one-week induces a high accumulation of methionine in the cerebrospinal fluid and confers bipolar disorder-like behavior in mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 928, <https://doi.org/10.3390/ijms23020928>.
17. Tsitsiou, E., Sibley, C. P., D'Souza, S. W., Catanescu, O., Jacobsen, D. W., and Glazier, J. D. (2011) Homocysteine is transported by the microvillous plasma membrane of human placenta, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **34**, 57-65, <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9141-3>.
18. Tsitsiou, E., Sibley, C. P., D'Souza, S. W., Catanescu, O., Jacobsen, D. W., and Glazier, J. D. (2009) Homocysteine transport by systems L, A and y+L across the microvillous plasma membrane of human placenta, *J. Physiol.*, **587**, 4001-4013, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.173393>.
19. Tripathi, M., Zhang, C. W., Singh, B. K., Sinha, R. A., Moe, K. T., DeSilva, D. A., and Yen, P. M. (2016) Hyperhomocysteinemia causes ER stress and impaired autophagy that is reversed by Vitamin B supplementation, *Cell Death Dis.*, **7**, e2513, <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.374>.
20. Witucki, L., and Jakubowski, H. (2023) Homocysteine metabolites inhibit autophagy, elevate amyloid beta, and induce neuropathy by impairing Phf8/H4K20me1-dependent epigenetic regulation of mTOR in cystathionine beta-synthase-deficient mice, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **46**, 1114-1130, <https://doi.org/10.1002/jimd.12661>.
21. Khayati, K., Antikainen, H., Bonder, E. M., Weber, G. F., Kruger, W. D., Jakubowski, H., and Dobrowolski, R. (2017) The amino acid metabolite homocysteine activates mTORC1 to inhibit autophagy and form abnormal proteins in human neurons and mice, *FASEB J.*, **31**, 598-609, <https://doi.org/10.1096/fj.201600915R>.
22. Wang, M., Liang, X., Cheng, M., Yang, L., Liu, H., Wang, X., Sai, N., and Zhang, X. (2019) Homocysteine enhances neural stem cell autophagy in *in vivo* and *in vitro* model of ischemic stroke, *Cell Death Dis.*, **10**, 561, <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1798-4>.

23. Zhao, Y., Huang, G., Chen, S., Gou, Y., Dong, Z., and Zhang, X. (2016) Homocysteine aggravates cortical neural cell injury through neuronal autophagy overactivation following rat cerebral ischemia-reperfusion, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1196, <https://doi.org/10.3390/ijms17081196>.
24. Kitada, M., Xu, J., Ogura, Y., Monno, I., and Koya, D. (2020) Mechanism of activation of mechanistic target of rapamycin complex 1 by methionine, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 715, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00715>.
25. Ouyang, Y., Wu, Q., Li, J., Sun, S., and Sun, S. (2020) S-adenosylmethionine: a metabolite critical to the regulation of autophagy, *Cell Prolif.*, **53**, e12891, <https://doi.org/10.1111/cpr.12891>.
26. Rosario, F. J., Powell, T. L., and Jansson, T. (2017) mTOR folate sensing links folate availability to trophoblast cell function, *J. Physiol.*, **595**, 4189-4206, <https://doi.org/10.1113/JP272424>.
27. Chen, Q., Dai, W., Sun, Y., Zhao, F., Liu, J., and Liu, H. (2018) Methionine partially replaced by methionyl-methionine dipeptide improves reproductive performance over methionine alone in methionine-deficient mice, *Nutrients*, **10**, 1190, <https://doi.org/10.3390/nu10091190>.
28. Batistel, F., Alharthi, A. S., Wang, L., Parys, C., Pan, Y. X., Cardoso, F. C., and Loor, J. J. (2017) Placentome nutrient transporters and mammalian target of rapamycin signaling proteins are altered by the methionine supply during late gestation in dairy cows and are associated with newborn birth weight, *J. Nutr.*, **147**, 1640-1647, <https://doi.org/10.3945/jn.117.251876>.
29. Arutjunyan, A. V., Milyutina, Y. P., Shcherbitskaia, A. D., Kerkeshko, G. O., Zalozniaia, I. V., and Mikhel, A. V. (2020) Neurotrophins of the fetal brain and placenta in prenatal hyperhomocysteinemia, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 248-259, <https://doi.org/10.1134/S000629792002008X>.
30. Arutjunyan, A. V., Kerkeshko, G. O., Milyutina, Y. P., Shcherbitskaia, A. D., Zalozniaia, I. V., Mikhel, A. V., Inozemtseva, D. B., Vasilev, D. S., Kovalenko, A. A., and Kogan, I. Y. (2023) Imbalance of angiogenic and growth factors in placenta in maternal hyperhomocysteinemia, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 262-279, <https://doi.org/10.1134/S0006297923020098>.
31. Аскретков А. Д., Клишин А. А., Зыбин Д. И., Орлова Н. В., Холодова А. В., Лобанова Н. В., Серегин Ю. А. (2020) Определение двадцати протеиногенных аминокислот и добавок в культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, *Журнал аналитической химии*, **75**, 721-729, <https://doi.org/10.31857/S0044450220080034>.
32. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
33. Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., and Atherton, P. J. (2017) An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **27**, 4-25, <https://doi.org/10.1111/sms.12702>.
34. Shcherbitskaia, A. D., Vasilev, D. S., Milyutina, Y. P., Tumanova, N. L., Mikhel, A. V., Zalozniaia, I. V., and Arutjunyan, A. V. (2021) Prenatal hyperhomocysteinemia induces glial activation and alters neuroinflammatory marker expression in infant rat hippocampus, *Cells*, **10**, 1536, <https://doi.org/10.3390/cells10061536>.
35. Shcherbitskaia, A. D., Vasilev, D. S., Milyutina, Y. P., Tumanova, N. L., Zalozniaia, I. V., Kerkeshko, G. O., and Arutjunyan, A. V. (2020) Maternal hyperhomocysteinemia induces neuroinflammation and neuronal death in the rat offspring cortex, *Neurotox. Res.*, **38**, 408-420, <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00233-w>.
36. Wang, H. L., and Lai, T. W. (2014) Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples, *Sci. Rep.*, **4**, 6588, <https://doi.org/10.1038/srep06588>.
37. Wick, M. J., Harral, J. W., Loomis, Z. L., and Dempsey, E. C. (2018) An optimized Evans blue protocol to assess vascular leak in the mouse, *J. Vis. Exp.*, **139**, 57037, <https://doi.org/10.3791/57037>.
38. Dayal, S., and Lentz, S. R. (2008) Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1596-1605, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.166421>.
39. Nieraad, H., Pannwitz, N., Bruin, N., Geisslinger, G., and Till, U. (2021) Hyperhomocysteinemia: metabolic role and animal studies with a focus on cognitive performance and decline – a review, *Biomolecules*, **11**, 1546, <https://doi.org/10.3390/biom11101546>.
40. Sauls, D. L., Arnold, E. K., Bell, C. W., Allen, J. C., and Hoffman, M. (2007) Pro-thrombotic and pro-oxidant effects of diet-induced hyperhomocysteinemia, *Thrombosis Res.*, **120**, 117-126, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.08.001>.
41. Ditscheid, B., Funfstuck, R., Busch, M., Schubert, R., Gerth, J., and Jahreis, G. (2005) Effect of L-methionine supplementation on plasma homocysteine and other free amino acids: a placebo-controlled double-blind cross-over study, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **59**, 768-775, <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602138>.
42. Andersson, A., Brattstrom, L., Israelsson, B., Isaksson, A., and Hultberg, B. (1990) The effect of excess daily methionine intake on plasma homocysteine after a methionine loading test in humans, *Clin. Chim. Acta*, **192**, 69-76, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(90\)90273-u](https://doi.org/10.1016/0009-8981(90)90273-u).

43. Benevenga, N. J., and Steele, R. D. (1984) Adverse effects of excessive consumption of amino acids, *Annu. Rev. Nutr.*, **4**, 157-181, <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.04.070184.001105>.
44. Terstappen, F., Tol, A. J. C., Gremmels, H., Wever, K. E., Paauw, N. D., Joles, J. A., Beek, E. M. V., and Lely, A. T. (2020) Prenatal amino acid supplementation to improve fetal growth: a systematic review and meta-analysis, *Nutrients*, **12**, 2535, <https://doi.org/10.3390/nu12092535>.
45. Stanescu, S., Belanger-Quintana, A., Fernandez-Felix, B. M., Ruiz-Sala, P., Del Valle, M., Garcia, F., Arrieta, F., and Martinez-Pardo, M. (2022) Interorgan amino acid interchange in propionic acidemia: the missing key to understanding its physiopathology, *Amino Acids*, **54**, 777-786, <https://doi.org/10.1007/s00726-022-03128-6>.
46. Benevenga, N. J. (1974) Toxicities of methionine and other amino acids, *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 2-9, <https://doi.org/10.1021/jf60191a036>.
47. Cleal, J. K., Lofthouse, E. M., Sengers, B. G., and Lewis, R. M. (2018) A systems perspective on placental amino acid transport, *J. Physiol.*, **596**, 5511-5522, <https://doi.org/10.1113/JP274883>.
48. McIntyre, K. R., Hayward, C. E., Sibley, C. P., Greenwood, S. L., and Dilworth, M. R. (2019) Evidence of adaptation of maternofetal transport of glutamine relative to placental size in normal mice, and in those with fetal growth restriction, *J. Physiol.*, **597**, 4975-4990, <https://doi.org/10.1113/JP278226>.
49. Hussain, T., Tan, B., Murtaza, G., Metwally, E., Yang, H., Kalhoro, M. S., Kalhoro, D. H., Chughtai, M. I., and Yin, Y. (2020) Role of dietary amino acids and nutrient sensing system in pregnancy associated disorders, *Front. Pharmacol.*, **11**, 586979, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.586979>.
50. Huang, H., Vandekeere, S., Kalucka, J., Bierhansl, L., Zecchin, A., Bruning, U., Visnagri, A., Yuldasheva, N., Goveia, J., Cruys, B., Brepoels, K., Wyns, S., Rayport, S., Ghesquiere, B., Vinckier, S., Schoonjans, L., Cubbon, R., Dewerchin, M., Eelen, G., and Carmeliet, P. (2017) Role of glutamine and interlinked asparagine metabolism in vessel formation, *EMBO J.*, **36**, 2334-2352, <https://doi.org/10.15252/embj.201695518>.
51. Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M. L., King, J., Shih, J. C., Blakely, R. D., Deneris, E. S., and Levitt, P. (2011) A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain, *Nature*, **472**, 347-350, <https://doi.org/10.1038/nature09972>.
52. Bonnin, A., and Levitt, P. (2011) Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain, *Neuroscience*, **197**, 1-7, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.005>.
53. Mao, J., Jain, A., Denslow, N. D., Nouri, M. Z., Chen, S., Wang, T., Zhu, N., Koh, J., Sarma, S. J., Sumner, B. W., Lei, Z., Sumner, L. W., Bivens, N. J., Roberts, R. M., Tuteja, G., and Rosenfeld, C. S. (2020) Bisphenol A and bisphenol S disruptions of the mouse placenta and potential effects on the placenta-brain axis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 4642-4652, <https://doi.org/10.1073/pnas.1919563117>.
54. Woods, L., Perez-Garcia, V., and Hemberger, M. (2018) Regulation of placental development and its impact on fetal growth-new insights from mouse models, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **9**, 570, <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00570>.
55. Baskurt, O. K., and Meiselman, H. J. (2012) Iatrogenic hyperviscosity and thrombosis, *Semin. Thromb. Hemost.*, **38**, 854-864, <https://doi.org/10.1055/s-0032-1325616>.
56. Winterhager, E., and Gellhaus, A. (2017) Transplacental nutrient transport mechanisms of intrauterine growth restriction in rodent models and humans, *Front. Physiol.*, **8**, 951, <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00951>.
57. Rosario, F. J., Kanai, Y., Powell, T. L., and Jansson, T. (2015) Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth, *Obesity (Silver Spring)*, **23**, 1663-1670, <https://doi.org/10.1002/oby.21165>.
58. Aye, I. L., Rosario, F. J., Powell, T. L., and Jansson, T. (2015) Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 12858-12863, <https://doi.org/10.1073/pnas.1515484112>.
59. Huang, Z., Huang, S., Song, T., Yin, Y., and Tan, C. (2021) Placental angiogenesis in mammals: a review of the regulatory effects of signaling pathways and functional nutrients, *Adv. Nutr.*, **12**, 2415-2434, <https://doi.org/10.1093/advances/nmab070>.
60. Yung, H. W., Hemberger, M., Watson, E. D., Senner, C. E., Jones, C. P., Kaufman, R. J., Charnock-Jones, D. S., and Burton, G. J. (2012) Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction, *J. Pathol.*, **228**, 554-564, <https://doi.org/10.1002/path.4068>.
61. Cross, J. C., Hemberger, M., Lu, Y., Nozaki, T., Whiteley, K., Masutani, M., and Adamson, S. L. (2002) Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta, *Mol. Cell Endocrinol.*, **187**, 207-212, [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00703-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00703-1).
62. Wang, Y., Engel, T., and Teng, X. (2024) Post-translational regulation of the mTORC1 pathway: a switch that regulates metabolism-related gene expression, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1867**, 195005, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2024.195005>.

63. Kavitha, J. V., Rosario, F. J., Nijland, M. J., McDonald, T. J., Wu, G., Kanai, Y., Powell, T. L., Nathanielsz, P. W., and Jansson, T. (2014) Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon, *FASEB J.*, **28**, 1294-1305, <https://doi.org/10.1096/fj.13-242271>.
64. Qin, X., Jiang, B., and Zhang, Y. (2016) 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein, *Cell Cycle*, **15**, 781-786, <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1151581>.
65. Pang, V., Bates, D. O., and Leach, L. (2017) Regulation of human feto-placental endothelial barrier integrity by vascular endothelial growth factors: competitive interplay between VEGF-A(165)a, VEGF-A(165)b, PIGF and VE-cadherin, *Clin. Sci. (Lond)*, **131**, 2763-2775, <https://doi.org/10.1042/CS20171252>.
66. Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Mollgard, K., and Habgood, M. D. (2015) Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front. Neurosci.*, **9**, 385, <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00385>.
67. Haghighi Poodeh, S., Salonurmi, T., Nagy, I., Koivunen, P., Vuoristo, J., Rasanen, J., Sormunen, R., Vainio, S., and Savolainen, M. J. (2012) Alcohol-induced premature permeability in mouse placenta-yolk sac barriers *in vivo*, *Placenta*, **33**, 866-873, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.07.008>.
68. Lewis, R. M., Baskaran, H., Green, J., Tashev, S., Palaiologou, E., Lofthouse, E. M., Cleal, J. K., Page, A., Chatelet, D. S., Goggin, P., and Sengers, B. G. (2022) 3D visualization of trans-syncytial nanopores provides a pathway for paracellular diffusion across the human placental syncytiotrophoblast, *iScience*, **25**, 105453, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105453>.
69. Sibley, C. P., Brownbill, P., Glazier, J. D., and Greenwood, S. L. (2018) Knowledge needed about the exchange physiology of the placenta, *Placenta*, **64**, S9-S15, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.01.006>.
70. Shao, X., Cao, G., Chen, D., Liu, J., Yu, B., Liu, M., Li, Y. X., Cao, B., Sadovsky, Y., and Wang, Y. L. (2021) Placental trophoblast syncytialization potentiates macropinocytosis via mTOR signaling to adapt to reduced amino acid supply, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, <https://doi.org/10.1073/pnas.2017092118>.
71. Cooke, L. D. F., Tumbarello, D. A., Harvey, N. C., Sethi, J. K., Lewis, R. M., and Cleal, J. K. (2021) Endocytosis in the placenta: an undervalued mediator of placental transfer, *Placenta*, **113**, 67-73, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.04.014>.
72. Elshorbagy, A. K., Graham, I., and Refsum, H. (2020) Body mass index determines the response of plasma sulfur amino acids to methionine loading, *Biochimie*, **173**, 107-113, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.03.001>.
73. Lofthouse, E. M., Manousopoulou, A., Cleal, J. K., O'Kelly, I. M., Poore, K. R., Garbis, S. D., and Lewis, R. M. (2021) N-acetylcysteine, xCT and suppression of Maxi-chloride channel activity in human placenta, *Placenta*, **110**, 46-55, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.05.009>.
74. Da Silva, V. C., Fernandes, L., Haseyama, E. J., Agamme, A. L., Guerra Shinohara, E. M., Muniz, M. T., and D'Almeida, V. (2014) Effect of vitamin B deprivation during pregnancy and lactation on homocysteine metabolism and related metabolites in brain and plasma of mice offspring, *PLoS One*, **9**, e92683, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092683>.

AMINO ACID TRANSPORT IN THE RAT PLACENTA IN METHIONINE-INDUCED HYPERHOMOCYSTEINEMIA

**Yu. P. Milyutina^{1*}, G. O. Kerkeshko¹, D. S. Vasiliev^{1,2}, N. L. Tumanova²,
I. V. Zalozniaia¹, S. K. Bochkovskii¹, A. D. Shcherbitskaia¹, A. V. Mikhel¹,
G. H. Tolibova¹, and A. V. Arutjunyan¹**

¹ D. O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive medicine,
199034 St. Petersburg, Russia; e-mail: milyutina1010@mail.ru

² I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
194223 St. Petersburg, Russia

Maternal hyperhomocysteinemia (HHcy) is a risk factor for the development of intrauterine growth restriction, a proposed mechanism of which is a decrease in transplacental nutrient transport. In this study, we have investigated the effect of experimental HHcy caused by daily methionine administration to pregnant rats on the free amino acid content in the mother and fetal blood. The morphological and biochemical parameters on which amino acid transport through the placenta depends have also been studied. Under the influence of HHcy on the 20th day of pregnancy, an increase in the levels

of most free amino acids was observed in the mother blood, while some amino acid concentrations in the fetal blood were decreased. Under conditions of HHcy in the placental labyrinth, which is an exchange site between mother and fetal circulations, the maternal sinusoids narrowed, being accompanied by blood stagnation and red blood cell aggregation. In the labyrinth zone, we also observed an increase in the protein level of neutral amino acid transporters (LAT1, SNAT2) and an activation of the downstream effector of the mTORC1 complex, 4E-BP1, which is a positive regulator of the placental transporter expression. Maternal HHcy caused an increase in the placental barrier permeability, as evidenced by an intensification in the mother to fetus transfer of the Evans blue dye. The imbalance of the free amino acid levels in the mother and fetal blood under conditions of HHcy may be due to the competition of homocysteine with other amino acids for their common transporters, as well as a decreased exchange zone area and reduced blood flow in the placental labyrinth. An increase in the amino acid transporter expression in the labyrinth zone may be a compensatory response to an insufficient intrauterine amino acid supply and a fetal growth decrease.

Keywords: maternal hyperhomocysteinemia, placenta, placental transport, placental barrier, amino acids, mTOR, amino acid transporters

КОМПОЗИТ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ХИТОЗАНА ДЛЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ L-АСПАРАГИНАЗЫ НА КЛЕТКИ МЕЛАНОМЫ

© 2024 А.Н. Шишпарёнок¹, Е.Р. Петряев², С.А. Королёва³, Н.В. Добрякова¹,
И.Д. Злотников⁴, Е.Н. Комедчикова⁵, О.А. Колесникова⁵,
Е.В. Кудряшова⁴, Д.Д. Жданов^{1*}

¹ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: zhdanovdd@mail.ru

² Московский политехнический университет, 107023 Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы (Университет РУДН),
117198 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119192 Москва, Россия

⁵ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 30.05.2024

После доработки 12.07.2024

Принята к публикации 22.07.2024

Актуальной проблемой, связанной с терапевтическим использованием L-аспарагиназ (L-АСП) для лечения опухолевых заболеваний, является ограниченный период их действия вследствие быстрой инактивации. Одним из подходов к улучшению терапевтических свойств ферментов, в том числе L-АСП, является их иммобилизация на различных типах биосовместимых полимеров. Бактериальная целлюлоза (БЦ) является перспективным носителем для различных лекарств благодаря своей биосовместимости, нетоксичности и высокой способности сорбции биоактивных соединений. Поскольку нативная БЦ имеет ряд недостатков, связанных со структурой и стабильностью, модифицированная БЦ часто рассматривается в качестве потенциального носителя для белков. В нашем исследовании для иммобилизации L-АСП был предложен композит БЦ-хитозан, в котором хитозан сшит глутаровым альдегидом. Такая модификация увеличивала сорбционную ёмкость плёнки. Было показано, что плёнки из БЦ-хитозана обладают улучшенными физико-химическими характеристиками по сравнению с нативными плёнками БЦ, что позволило увеличить время высвобождения L-АСП с 8 до 24 ч в бесклеточной системе. Такие плёнки обладали пролонгированной токсичностью в отношении клеток меланомы до 10 ч. Предложенная стратегия иммобилизации L-АСП на плёнках БЦ-хитозан является перспективным подходом, потенциально применимым для терапии поверхностных типов рака, в частности меланомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: L-аспарагиназа, бактериальная целлюлоза, хитозан, кинетические модели, цитотоксичность, меланома.

DOI: 10.31857/S0320972524100031 EDN: IPWBDC

ВВЕДЕНИЕ

L-Аспарагиназа (L-АСП, ЕС 3.5.1.1) – фермент, который гидролизует аспарагин с образованием аммиака и L-аспарагиновой кислоты. Различные

типы фермента широко используются в фармацевтической и пищевой промышленности [1–6]. Нативная L-АСП *Escherichia coli* (ЕСАII), аспарагиназа *E. coli*, конъюгированная с полиэтиленгликолем (ПЭГ-аспарагиназа) и L-АСП *Erwinia*

Принятые сокращения: L-АСП – L-аспарагиназа (L-asparaginase); БЦ – бактериальная целлюлоза; ПЭГ – полиэтиленгликоль; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; ЕСА, ЕгА и ЕwА – терапевтические формы L-АСП.

* Адресат для корреспонденции.

chrysanthemi (ErA) успешно применяются для лечения острого лимфобластного лейкоза [7–9]. Недавние исследования показали, что L-АСП, которые используются в терапии острых лейкозов, имеют клинический потенциал для лечения нескольких агрессивных подтипов солидных опухолей, включая рак молочной железы [10], глиобластому, рак поджелудочной железы и гепатоцеллюлярную карциному [11]. Использование L-АСП связано со множественными побочными эффектами, коротким временем полувыведения и токсичностью [12]. Период инактивации циркулирующей L-АСП резко сокращается с 18–24 ч до 2,5 ч из-за системного появления нейтрализующих антител и протеолитической деградации [13]. Терапевтическая эффективность наиболее часто используемой формы L-АСП – ЕсАП [9] снижена из-за относительно высокой глутаминазной активности [14]. Глутаминазная активность является причиной развития таких побочных эффектов, как тромбоз, панкреатит, гипергликемия и токсичность [9, 15]. По сравнению с нативной ЕсАП, ПЭГ-форма данного фермента имеет более длительный период полувыведения и сниженную частоту возникновения побочных токсических эффектов [9], тем не менее у 30% пациентов возникает реакция гиперчувствительности [16, 17]. Фермент ErA и её гомолог из *Erwinia carotovora* (ЕwА) создавались как препараты второго ряда терапии при возникновении гиперчувствительности к ЕсА [17]. ErA и ЕwА обладают меньшей токсичностью за счёт меньшей специфичности к глутамину, и, как следствие, меньшим числом побочных эффектов [18, 19]. Однако ЕwА менее активна и менее стабильна по сравнению с ЕсА [19, 20]. Таким образом, разработка способов пролонгировать действие L-АСП [21, 22], в частности ЕwА, и уменьшить побочные эффекты является актуальной задачей. Одним из основных подходов для решения этой задачи является поиск новых источников L-АСП, а также создание менее иммуногенных и более стабильных вариантов L-АСП с помощью генетической инженерии [6, 23].

Иммобилизация L-АСП на различных носителях является другим подходом для увеличения стабильности, времени полувыведения и снижения токсичности [24, 25]. Иммобилизация позволяет оптимизировать каталитическую активность и минимизировать побочные эффекты [26, 27]. Для иммобилизации различных L-АСП применялись синтетические носители (ПЭГ, полиимид, полиакриламид), гибридные носители (ПЭГ–альбумин, ПЭГ–хитозан, полиметилметакрилат–крахмал, ПЭГ–полиэтиленмин), природные носители: углеводы (целлюлоза, декстран, крахмал, хитозан, хитин) и белки (альбумин, желатин, коллаген, волокна шёлка и фиброин шёлка) [12, 28, 29].

Одна из стратегий иммобилизации заключается в модификации ферментативной структуры L-АСП, например, ковалентное связывание (конъюгация) с ПЭГ [24, 25] или хитозаном [30, 31]. Другой подход направлен на захват фермента внутрь защитной структуры, или инкапсуляцию [32] – это позволяет снизить токсичность, продлить период его полужизни *in vivo*, повысить стабильность, обеспечить целевую доставку и контролируемое высвобождение фермента [12]. Для инкапсуляции L-АСП использовали эритроциты, твердые липидные наночастицы, липосомы, полимеры (поли(молочно-ко-гликолевая) кислота), полиакриламид, полианилин и др.) [12]. Преимущества обеих стратегий заключаются в том, что иммобилизация защищает ферменты от дезактивации и деградации [32]. На данный момент наиболее популярным подходом иммобилизации стала химическая модификация L-АСП путём ковалентного связывания с ПЭГ [33]. Модификация позволила увеличить период полувыведения, но, к сожалению, не снизила побочные эффекты [21, 34].

Системы доставки лекарств на основе бактериальной целлюлозы (БЦ) привлекают внимание [35] благодаря её уникальным характеристикам. БЦ обладает высокой чистотой (отсутствуют лигнины, характерные для растительной целлюлозы), механической прочностью [36], высокой пористостью, биосовместимостью, большой удельной поверхностью и высокой плотностью сетки фибрилл, т.е. характеристиками, которые влияют на адсорбцию и высвобождение лекарственного средства из матрицы [37]. БЦ не токсична [38].

Недостатком немодифицированной БЦ является низкая водоудерживающая способность, и адсорбированные на таком типе БЦ соединения со временем склонны к выщелачиванию. Поэтому для достижения пролонгированного высвобождения лекарственного средства БЦ подвергают различным химическим модификациям [39–42]. Одним из перспективных соединений для модификации БЦ является хитозан [43]. Высокая реакционная способность аминогрупп хитозана способствует сшиванию с линкерами, такими как глутаровый альдегид. Ранее было показано [44–48], что сшивка целлюлозы и хитозана повышает их сорбционную способность за счёт поверхностной доступности реакционных гидроксильных групп целлюлозы и аминогрупп хитозана [49]. Введение поперечных связей в сетку биополимера изменяет текстурные, гидратационные и механические свойства, а также химическую устойчивость к биоразложению [50]. Применимость данного подхода подтверждена работами по получению композитов хитозана и БЦ для иммобилизации липазы [51, 52], альбумина и фибронектина [53], контролируемого высвобождения

кверцетина [54], кветиапин fumarata [55] и ибупрофена [43].

Основным преимуществом использования БЦ является её способность к локальной доставке лекарств к опухолям с контролируемым высвобождением, в результате чего минимизируются системные побочные эффекты [40, 56]. В этом исследовании мы разработали композит БЦ и хитозана для иммобилизации L-АСП *Erw. carotovora* для увеличения времени её действия на опухолевые клетки меланомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение бактериальной целлюлозы.

Для получения биоплёнок использовали штамм *Komagataeibacter hansenii* (ВКПМ № В-11239). Штамм-продуцент культивировали в среде Хестрина–Шрамма следующего состава (в расчёте на литр): 10 г глюкозы («Sigma», США); 5 г пептона («Диаэм», Россия); 5 г дрожжевого экстракта («PanReas Applichem», Испания); 1,15 г моногидрата лимонной кислоты («Merck Millipore», Германия); 2,7 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ («PanReas Applichem»). Среду готовили на деионизированной воде, доводили до pH 4,5 и автоклавировали в колбах. Затем на 200 мл среды добавляли 1 мл 90%-ного этанола и 15 мл среды, содержащей *K. hansenii* В-11239, разливали по 2 мл в стерильные 24-луночные планшеты («Wuxi NEST Biotechnology», Китай) и культивировали в статичных условиях при 27 °С. Мембраны БЦ выращивали в течение 48, 72 и 96 ч для получения мембран различной толщины. Для лизиса и удаления бактерий полученные мембраны БЦ обрабатывали смесью 0,1 М NaCl («Диаэм») и 1%-ного додецилсульфата натрия («Merck Millipore») в течение 72 ч, а затем промывали деионизированной водой для удаления остатков клеток и нейтрализации pH.

Подготовка композитов БЦ–хитозан. Композит БЦ–хитозан получали с помощью стратегии *ex situ* [37, 57, 58]. Раствор хитозан·HCl со средней молекулярной массой 7 кДа (степень деацелирования – 80%; предоставлен Федеральным исследовательским центром «Основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия) готовили в концентрациях 0,05; 0,1; 0,5 или 1%. Для этого хитозан растворяли в 1%-ном растворе CH_3COOH и выдерживали 1 ч на водяной бане при 50 °С до полного растворения. Влажные мембраны БЦ подсушивали 20 мин при 60 °С для удаления избытка влаги и погружали в 1 мл раствора хитозана на 1, 2, 3 или 6 ч при постоянном перемешивании со скоростью 100 об./мин при 37 °С. Далее, к мембранам БЦ добавляли 0,5 мл водного раствора 1%-ного глутарового альдегида (pH 7,0) («neoFroxx», Гер-

мания) и инкубировали при 23 °С в течение 1, 2, 3 или 4 ч. Лиофильное высушивание плёнок БЦ проводили для определения их физических характеристик. Плёнки замораживали в жидком азоте и лиофилизировали в течение 24 ч при температуре –50 °С и давлении 0,07 мбар в сублимационной сушилке Alpha 2-4 LD типа 101042 Lab («Christ», Германия).

Определение содержания воды в плёнках, их пористости и адсорбционной способности. Содержание воды в плёнках оценивали по изменению их веса до и после лиофильного высушивания. Процент воды рассчитывали по уравнению:

$$\text{Содержание воды (\%)} = \frac{A - B}{A} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где A – вес влажного образца; B – вес сухого образца.

Пористость рассчитывали по уравнению Kitaoka et al. [59]. Сначала БЦ взвешивали, предварительно удалив избыток влаги с помощью фильтровальной бумаги. Затем образцы лиофилизировали, и плёнку инкубировали в деионизированной воде 12 ч при комнатной температуре, после чего снова измеряли вес. Пористость определяли по уравнению:

$$P (\%) = \frac{Q_0 - Q_1}{Q_0 - Q_2} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где P – пористость мембраны; Q_0 – вес влажного образца (г); Q_1 – вес сухого образца (г); Q_2 – вес образца (г) после инкубации (12 ч) высушенного образца в воде.

Адсорбционную ёмкость плёнок измеряли по методике, предложенной Wu et al. [60], путём инкубации лиофильно высушенного образца плёнок в буфере HEPES (50 мМ (pH 8,0); «Serva», Германия) в течение 24 ч при 37 °С. Для расчёта использовали следующее уравнение:

$$\text{Адсорбционная ёмкость (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где W_0 и W_t – вес образцов до и после инкубации в буфере соответственно.

Определение химического состава методом инфракрасной (ИК) спектроскопии. ИК-Спектры лиофильно высушенных образцов регистрировали на ИК-Фурье-микроскопе МИКРАН-3 («Симекс», Россия). Спектры записывались в режиме поглощения. Проводили 36 сканов с разрешением 4 см^{-1} при 22 °С. Спектральный диапазон составлял 4000–900 см^{-1} .

Морфология. Морфологию лиофильно высушенных БЦ и композитов БЦ–хитозан изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы плёнок покрывали золотом и исследовали с помощью сканирующего электрон-

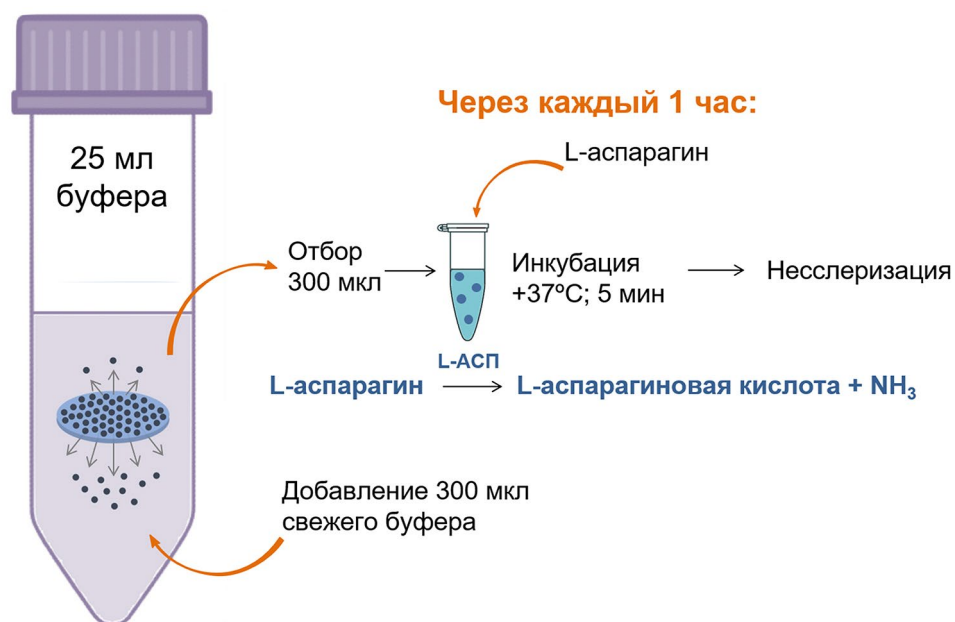


Рис. 1. Схема эксперимента для определения высвобождения L-АСП из плёнок БЦ и БЦ-хитозан. Плёнки БЦ и БЦ-хитозан с иммобилизованным ферментом инкубировали в 25 мл 50 мМ HEPES. Происходило высвобождение L-АСП из плёнок и её накопление в буфере. Каждый час отбирали 300 мкл пробы (одновременно добавляли 300 мкл свежего буфера для поддержания объёма) и определяли активность фермента по детекции количества ионов аммония методом прямой несслеризации после инкубации с субстратом

ного микроскопа MAJAZ («Tescan», Чехия) [61]. Изображения образцов были получены при ускоряющем напряжении 7 кВ и увеличении 20 000.

Иммобилизация L-АСП на БЦ. L-АСП EwA из продуцента *Erw. carotovora* (595 МЕ/мг; молекулярная масса – 37 кДа; 349 аминокислотных остатков; чистота – 98,1%; изоэлектрическая точка – 8,1; GenBank ID: AAR92666.3) была получена в лаборатории медицинской биотехнологии ИБМХ [62]. L-АСП была иммобилизована на БЦ методом физической адсорбции в 50 мМ HEPES (pH 8,0). Для этого мембраны БЦ погружали в 0,5 мл раствора фермента в концентрации 0,05 мг/мл (28 МЕ/мл) и инкубировали при 4 °C в течение 12 ч. Количество иммобилизованной L-АСП определяли с помощью UV-VIS-спектрофотометрии (Aquarius CE 7400 Spectrophotometer; «Cecil Instruments Ltd.», Великобритания) по методике Dawson et al. [63]. Процент адсорбированной L-АСП определяли как разницу между начальным количеством белка и количеством в супернатанте после инкубации.

Оценка высвобождения L-АСП. Высвобождение L-АСП из мембран БЦ-хитозан и БЦ определяли путём инкубации плёнки в 25 мл 50 мМ HEPES (pH 8,0) без субстрата в течение 24 ч. Через каждый час отбирали 300 мкл пробы, в которой проводили определение активности фермента. Для этого к пробе добавляли 100 мкл L-аспарагина (40 мкМ; «Диаэм») и инкубировали 5 мин при 37 °C, после чего определяли концентрацию ионов аммония методом прямой несс-

леризации, используя реактив Несслера («PanReac Applichem», Испания) [64, 65]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует высвобождение 1 мкмоль аммония за 1 мин при 37 °C. После отбора проб каждый раз добавляли 300 мкл свежего буфера для поддержания объёма реакции. Схема эксперимента по определению высвобождения фермента представлена на рис. 1.

Данные скорости высвобождения фермента использовали для построения кинетических моделей высвобождения: модель нулевого порядка, модель первого порядка, модель Хигучи, модель Корсмейера–Пеппаса и модель Хиксона–Кроуэлла [66]. Для описания механизма высвобождения применяли модель Корсмейера–Пеппаса и определяли коэффициент диффузии (n), характеризующий различия в высвобождении L-АСП из матриц БЦ.

Оценка цитотоксичности. Клетки линий меланомы человека A375, A875 и MelJuso, а также меланомы мыши B16F10 (получены из коллекции клеток Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина) культивировали на среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). В качестве условно-нормальных использовали клетки фибробластов линии WI-38 («АТСС», США), культивированные в среде DMEM («ПанЭко»). Среда для культивирования содержала 5% эмбриональной телячьей сыворотки («Capricorn Scientific», Германия) и 1% пирувата натрия («ПанЭко»).

Клетки выращивали в атмосфере 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Перед экспериментом клеточные линии тестировали на загрязнение микоплазмой с помощью набора для обнаружения микоплазмы Plasmotest™ («InvivoGen», Калифорния).

Для определения значения IC₅₀ (концентрация фермента, при которой жизнеспособность клеток снижается на 50%) клетки культивировали в течение 72 ч в 96-луночном планшете («Wuxi NEST Biotechnology») в присутствии свободной EwA в диапазоне концентраций 0,01–10 Ед./мл. Цитотоксичность определяли путём измерения превращения тетразолиевой соли, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид («Serva»), в формазан (МТТ-тест) [67]. Определяли поглощение формазана при длине волны 540 нм при помощи планшетного ридера SuPerMax3000 («Flash Spectrum», Китай). Значения IC₅₀ были рассчитаны по уравнениям зависимости жизнеспособности клеток от концентрации фермента [68].

Для определения наиболее чувствительной к EwA линии клеток, иммобилизованной на композите БЦ-хитозан, клетки инкубировали в присутствии композита в 24-луночном планшете («Wuxi NEST Biotechnology») в течение 24 ч. Цитотоксичность определяли МТТ-тестом через 48 ч после начала инкубации с плёнками.

Для определения продолжительности действия иммобилизованного фермента клетки уvealной меланомы линии A875 или условно-нормальные фибробласты линии WI-38 высевали в 24-луночный планшет с плотностью посева 5×10^4 клеток на лунку и выращивали в течение 24 ч. Затем плёнки БЦ или БЦ-хитозан с иммобилизованной L-АСП помещали в лунки с клетками и инкубировали с течением 3 ч с последующим переносом в новые лунки планшета с клетками. Цитотоксичность оценивали через 48 ч после окончания инкубации с плёнками МТТ-тестом. Оптические изображения морфологии клеток через 72 ч инкубации получали с помощью инвертированного микроскопа «Биомед 3И» («Биомед», Россия) в режиме светлого поля.

Статистический анализ. Количественные данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение и получены в трёх независимых экспериментах. Все данные были проанализированы с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2016 («Microsoft Inc.», США). Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подбор оптимальных условий создания композита БЦ-хитозан. Для подбора оптималь-

ных условий по созданию композита БЦ-хитозан были проведены эксперименты по подбору времени культивирования плёнок, времени сшивки хитозана глутаровым альдегидом, концентрации хитозана и времени инкубации хитозана с БЦ. Оптимальным условием считали таковое, при котором активность фермента на плёнке БЦ-хитозан не отличается от активности фермента на БЦ через 24 ч, т.е. нет значительной потери активности.

На рис. 2 представлена кинетика высвобождения L-АСП из плёнок БЦ и БЦ-хитозан. Скорость высвобождения L-АСП, иммобилизованной на плёнке БЦ-хитозан (концентрация хитозана 0,05%), зависела от времени культивирования продуцента БЦ, т.е. толщины и пористости плёнок (рис. 2, а). Максимальной скоростью высвобождения фермента обладали плёнки, выращенные в течение 72 ч. Плёнки, выращенные в течение 48 и 96 ч, продемонстрировали скорость высвобождения в 2 раза ниже. Такое различие можно объяснить различием внутренней структуры плёнок. При добавлении хитозана в БЦ образуется новая сетчатая трёхмерная структура, в результате чего изменяется размер пор и адсорбционная ёмкость плёнок. Известно, что включение экзогенной молекулы, как правило, макромолекулы, изменяет структуру фибрилл БЦ, влияющих на размер и объём пор [69]. Таким образом, плёнки, выращенные в течение 72 ч, обладали оптимальными характеристиками пористости для иммобилизации и высвобождения L-АСП.

Концентрация хитозана в композите не влияла прямо пропорционально на скорость высвобождения фермента (рис. 2, б). Композиты с концентрацией хитозана 0,1, 0,5 и 1% показали более низкую скорость высвобождения фермента, чем композит с концентрацией 0,05%. Оптимальное время инкубации БЦ и хитозана (в концентрации 0,05%) составило 2 ч (рис. 2, в), так как наблюдали максимальную активность иммобилизованной L-АСП. Эти различия можно объяснить небольшим временем инкубации БЦ в хитозане (2 ч). В других работах [70–72] использовали более продолжительное время инкубации хитозана или другой компонент с БЦ, и было показано, что проникновение хитозана в БЦ значительно увеличивается в промежутке с 5 до 20 ч, а затем практически не изменяется [73]. Таким образом, концентрация хитозана при времени инкубации БЦ с хитозаном 1–2 ч не влияет на скорость высвобождения L-АСП.

В ходе подбора оптимального времени инкубации композита БЦ-хитозан и глутарового альдегида наилучшие показатели активности L-АСП через 24 ч были получены для плёнок с хитозаном, инкубированных с глутаровым альдегидом

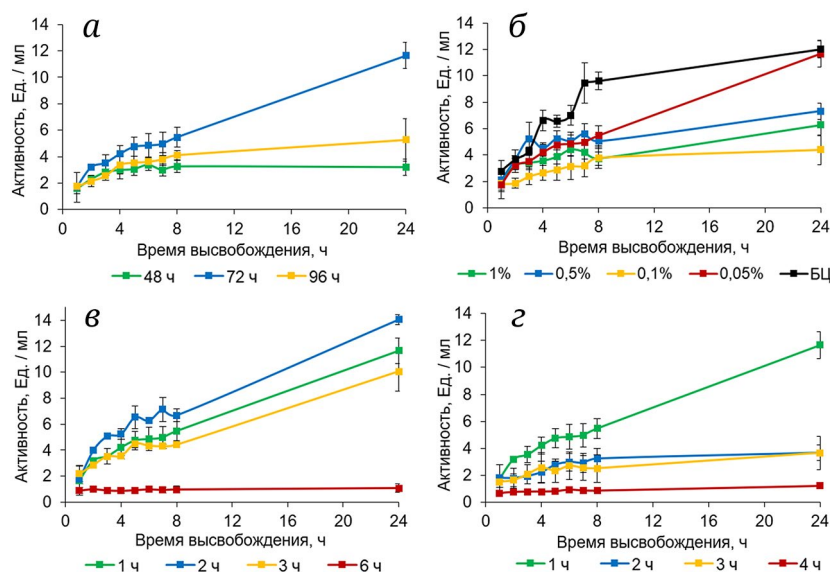


Рис. 2. Влияние условий создания композита БЦ–хитозан на высвобождение фермента в течение 24 ч. а – Влияние времени выращивания плёнок; б – влияние концентрации хитозана. Активность фермента, иммобилизованного на плёнки БЦ, показана для сравнения на панели. в – Влияние времени инкубации с хитозаном; г – влияние времени инкубации с глутаровым альдегидом

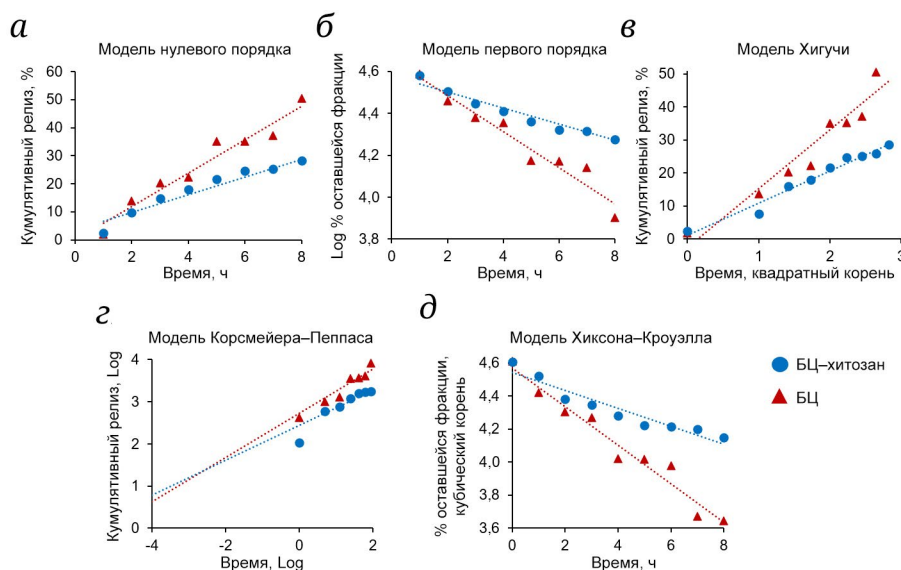


Рис. 3. Графическое изображение кинетических моделей высвобождения для L-АСП, иммобилизованной на БЦ–хитозан или БЦ. а – Модель нулевого порядка. б – Модель первого порядка. в – Модель Хигучи. г – Модель Корсмейера–Пеппаса. д – Модель Хиксона–Кроуэлла

в течение 1 ч (рис. 2, г). Увеличение времени инкубации до 4 ч вызывало значительное снижение активности фермента, а через 24 ч активность фермента снижалась практически до нуля.

После подбора условий получения композитов БЦ–хитозан было установлено, что оптимальное время выращивания плёнки составляет 72 ч, концентрация хитозана – 0,05%, время инкубации с хитозаном – 2 ч, время инкубации БЦ–хитозан с глутаровым альдегидом – 1 ч. С данными плёнками БЦ–хитозан проводили дальнейшие эксперименты.

Кинетические модели высвобождения.

Данные динамики высвобождения L-АСП, измеренные по активности фермента, использовали для моделирования кинетических параметров высвобождения из БЦ или композитов БЦ–хитозан. Высвобождение из композита БЦ–хитозан более всего соответствует модели Хигучи (рис. 3, в; табл. 1), при которой высвобождение лекарственного средства контролируется диффузией и имеет зависимость первого порядка от градиента концентрации [74]. Высвобождение из немодифицированной БЦ соответствует кинетической модели

Таблица 1. Коэффициенты регрессии (R^2) для кинетических моделей высвобождения L-АСП в течение 8 ч из БЦ и БЦ-хитозан

Кинетическая модель	БЦ	БЦ-хитозан
Нулевого порядка	0,960	0,928
Первого порядка	0,959	0,948
Хигучи	0,937	0,971
Хиксона-Кроуэлла	0,962	0,915
Корсмейера-Пеппаса	0,985	0,961

Корсмейера-Пеппаса (рис. 3, г; табл. 1), для которой высвобождение лекарственного средства регулируется процессами релаксации и перестройки матрицы [75].

За первые 8 ч из плёнок БЦ высвободилось 52% L-АСП, а из плёнок БЦ-хитозан – лишь 29% (рис. 2, б; рис. 3, а). Через 24 ч из плёнок БЦ высвободилось 65% фермента, а из плёнок БЦ-хитозан – 63% фермента. Эти данные указывают на то, что для немодифицированной плёнки характерно относительно быстрое высвобождение в течение 8 ч, которое потом замедляется. Плёнки, модифицированные хитозаном, имеют более медленное, пролонгированное высвобождение фермента без резкого скачка в первые 8 ч.

Кроме того, плёнки БЦ и БЦ-хитозан отличались характером диффузии. В течение первых 8 ч для композита БЦ-хитозан рассчитанный коэффициент диффузии (n) составил $0,246 \pm 0,029$, а для БЦ – $0,743 \pm 0,142$ ($p < 0,05$). В первом случае характер диффузии L-АСП из матрицы подчиняется закону Фика ($n < 0,45$), при котором скорость процессов диффузии гораздо меньше, чем скорость релаксации матрицы полимера [76]. Во втором случае высвобождение фермента характеризуется нефиковской диффузией ($0,45 < n < 0,89$). Фиковская диффузия относится к процессу переноса растворённого вещества, в котором время релаксации полимера намного превышает время диффузии растворителя. Когда время релаксации полимера соответствует времени диффузии растворителя, макроскопическое высвобождение лекарства становится аномальным или нефиковским [77], что было характерно для L-АСП, иммобилизованной на БЦ.

Влияние модификации БЦ на характеристики плёнок. Анализ водоудерживающей способности плёнок БЦ до и после модификации показал, что модификация хитозаном практически не влияет на водоудерживающую способность (табл. 2). Однако адсорбционная ёмкость воды плёнок БЦ-хитозан после лиофильного высушивания была в 1,6 раза выше, чем у БЦ.

Таблица 2. Характеристики плёнок БЦ-хитозан и БЦ

Параметр	БЦ-хитозан	БЦ
Масса влажной плёнки, мг	$401,8 \pm 0,7$	$402,0 \pm 0,9$
Масса лиофилизированной плёнки, мг	$5,3 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,6$
Масса плёнки после инкубации в воде, мг	$154,3 \pm 18,2$	$63,7 \pm 23,1$
Содержание воды, %	$98,67 \pm 0,14$	$99,09 \pm 0,14$
Пористость, %	$160,77 \pm 11,47$	$119,52 \pm 7,95$
Адсорбционная ёмкость, %	2794 ± 341	1745 ± 630

Также было выявлено увеличение пористости внутренней структуры композита БЦ-хитозан в 1,34 раза по сравнению с БЦ.

Улучшение адсорбционной ёмкости и пористости модифицированной БЦ после лиофильной сушки может быть связано с более высокой температурой плавления связанной воды вследствие меньшей доступности и лучшей способностью удерживать воду по сравнению с контролем. Образование пор зависит от количества кристаллов льда, образующихся из воды, связанной с материалом. Кристаллы льда полностью сублимируются в процессе сушки, а объём, занимаемый льдом, остаётся для образования пор [78]. Более высокие соотношения площади поверхности к объёму у более тонких немодифицированных плёнок БЦ приводят к более высоким скоростям образования несвязанной воды и её испарения [79] и вследствие этого пониженной адсорбционной ёмкостью для воды.

ИК-Спектры состава плёнок. Для идентификации химического состава плёнок БЦ-хитозан или БЦ с иммобилизованной L-АСП были получены их ИК-спектры (рис. 4).

В спектрах, соответствующих БЦ, присутствуют общие пики, соответствующие целлюлозе: широкий пик при 3335 см^{-1} (рис. 4, а), характерный для валентного колебания –ОН; пик при 2876 см^{-1} , характерный для алифатических валентных колебаний CH_2 -групп, и пик при 1435 см^{-1} , относящийся к деформационным колебаниям –СН [80]. Пики, наблюдаемые при волновых числах 1618, 1435, 1323, 1155 и 1066 см^{-1} , соответствовали разным группам целлюлозы: деформационным колебаниям –СН₂, деформационным колебаниям –СН, асимметричному растяжению гликозидной связи С–О–С и растяжению С–О соответственно (рис. 4, б).

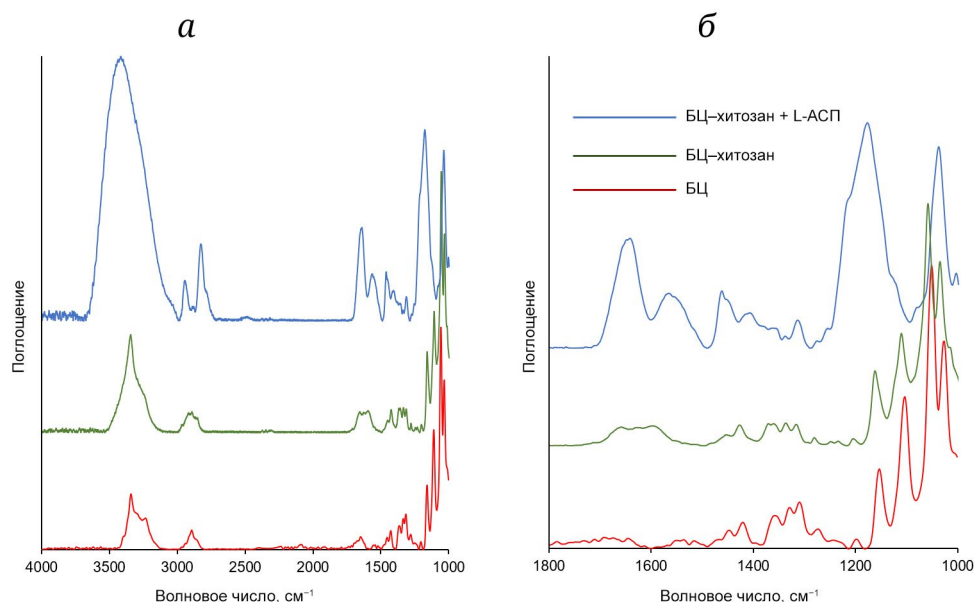


Рис. 4. ИК-спектры плёнок БЦ-хитозан и БЦ. а – Диапазон 1000–4000 см^{-1} ; б – диапазон 1000–2000 см^{-1}

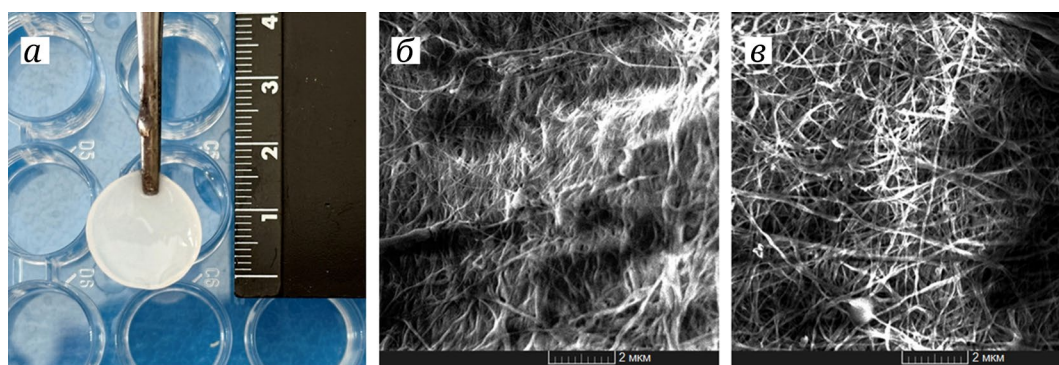


Рис. 5. Морфология плёнок. а – Внешний вид плёнки БЦ, выращенной в лунке 24-луночного планшета. б – СЭМ-изображения продольного среза плёнок БЦ-хитозан; в – СЭМ-изображения продольного среза плёнок БЦ

Спектр БЦ-хитозан был подобен спектру БЦ, поскольку большинство функциональных групп являются общими как для целлюлозы, так и для хитозана [81, 82]. Наблюдали пики валентных колебаний —OH при 3359 см^{-1} , —CH при 2837 см^{-1} и пик деформационных колебаний при 1435 см^{-1} , характерный для $\alpha\text{—CH}_2$ (рис. 4, а) [83]. В отличие от спектра БЦ, в спектре БЦ-хитозан присутствует пик группы N—H хитозана (деацилированные аминокислоты) при 1589 см^{-1} – первичный амин (рис. 4, б). Также на спектре для композита БЦ-хитозан присутствовал характерный пик группы —CH=N— , полученный при $\sim 1682 \text{ см}^{-1}$, который указывает на образование основания Шиффа [84]. На спектре БЦ-хитозан L-АСП видны (рис. 4, б) характерные пики амида I ($1500\text{--}1600 \text{ см}^{-1}$), амида II ($1600\text{--}1700 \text{ см}^{-1}$), амида III ($1200\text{--}1350 \text{ см}^{-1}$). Таким образом, в композите БЦ-хитозан при добавлении глутарового альдегида наблюдали его

реакцию с первичными аминогруппами хитозана с образованием ковалентных сшивок [85].

Морфология плёнок. Культивирование штамма продуцента *K. hansenii* в 24-луночном планшете позволяет получать биоплёнки 16 мм в диаметре (рис. 5, а). Анализ СЭМ проводили для определения морфологических изменений каркаса БЦ до и после модификации. В процессе лиофилизации в БЦ образуются пустоты, которые определяют финальную пористую структуру [71]. Микроструктуры БЦ и БЦ-хитозан показаны на рис. 5. У плёнок БЦ-хитозан (рис. 5, б) формируется более упорядоченная пористая послойная структура и большее количество пор меньшего диаметра по сравнению с БЦ (рис. 5, в). Нановолокна БЦ более плотно переплетены и свернуты по сравнению с более рыхло расположенными волокнами БЦ. Таким образом, различная степень плотности трёхмерной сети БЦ

Таблица 3. Значение IC_{50} свободной EwA и выживаемость клеток после инкубации с EwA, иммобилизованной на плёнке БЦ-хитозан

Клеточная линия	Значение IC_{50} , Ед./мл	Выживаемость, % от контроля
A875	0,04	$11,49 \pm 6,93$
MelJuso	0,12	$22,89 \pm 2,66$
B16F10	0,24	$34,26 \pm 6,92$
A375	0,38	$50,81 \pm 10,51$
WI-38	8,22	$93,61 \pm 17,24$

и БЦ-хитозан будет влиять на набухание, адсорбционную ёмкость плёнок и скорость высвобождения L-АСП.

Пролонгированное цитотоксическое действие L-АСП, иммобилизованной на плёнке БЦ-хитозан. Для выбора наиболее чувствительных к

действию L-АСП клеток определены значения IC_{50} для нативного фермента EwA. Среди линий меланомы наиболее чувствительными оказались клетки A875, а наименее чувствительными – клетки A375 (табл. 3). Контрольные фибробласты WI-38, ожидаемо, были наиболее устойчивыми к действию фермента.

Токсичность L-АСП, высвобождаемой из мембран, определяется скоростью высвобождения и скоростью деградации фермента, т.е. количеством активного фермента в среде. Для определения линии клеток, наиболее чувствительной к EwA, иммобилизованной на композите БЦ-хитозан, определяли выживаемость клеток после 24-часовой инкубации с плёнками. Данные выживаемости хорошо согласовались со значением IC_{50} . Наиболее чувствительными клетками меланомы были A875, а наименее чувствительными – A375 (табл. 3). Условно-нормальные фибробласты WI-38 были наиболее устойчивыми и показали наивысшую жизнеспособность.

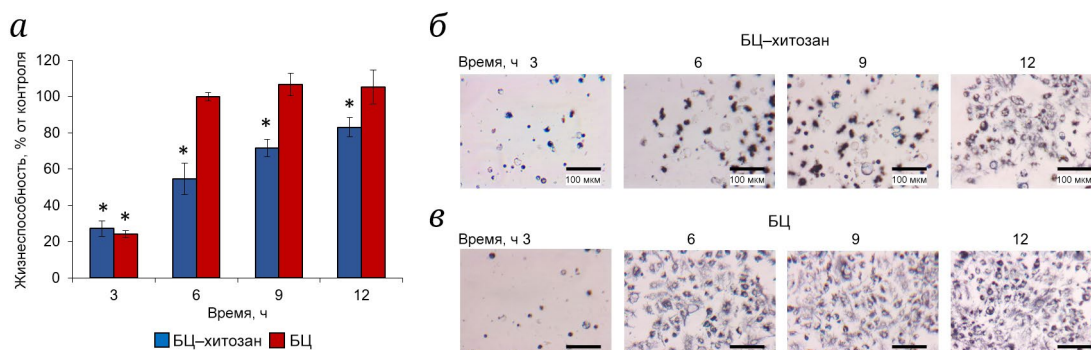


Рис. 6. Продолжительность цитотоксического действия L-АСП, иммобилизованной на плёнке БЦ и БЦ-хитозан на клетки меланомы A875. *a* – Жизнеспособность клеток, измеренная методом МТТ-теста, после инкубации с плёнками и последовательных переносов каждые 3 ч. Микрофотографии в режиме светлого поля клеток, синтезирующих кристаллы формазана, после инкубации с плёнками БЦ-хитозан (*б*) или БЦ (*в*) с иммобилизованной L-АСП. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам, инкубированным с пустыми плёнками БЦ или БЦ-хитозан

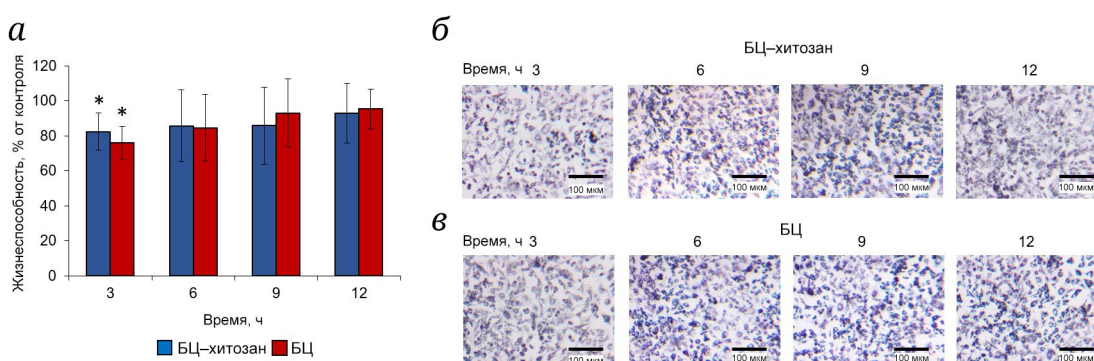


Рис. 7. Продолжительность цитотоксического действия L-АСП, иммобилизованной на плёнке БЦ и БЦ-хитозан, на условно-нормальные фибробласты линии WI-38. *a* – Жизнеспособность клеток, измеренная методом МТТ-теста, после инкубации с плёнками и последовательных переносов каждые 3 ч. Микрофотографии в режиме светлого поля клеток, синтезирующих кристаллы формазана, после инкубации с плёнками БЦ-хитозан (*а*) или БЦ (*б*) с иммобилизованной L-АСП. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам, инкубированным с пустыми плёнками БЦ или БЦ-хитозан

Для оценки продолжительности действия L-АСП, иммобилизованной на БЦ или БЦ–хитозан, на клетки меланомы А875 или условно-нормальные фибробласты было проведено исследование, в котором плёнки последовательно переносили каждые 3 ч в новые лунки с клетками (рис. 6 и 7). Фермент на модифицированных хитозаном БЦ сохранял цитотоксическую активность даже после четырёх последовательных инкубаций с клетками (рис. 6). Через 6 ч жизнеспособность опухолевых клеток составляла ~50%, а через 12 ч – 80%. В то же время БЦ не сохраняли цитотоксическую активность после первой инкубации и уже через 3 ч жизнеспособность клеток была на уровне контрольных, не обработанных L-АСП клеток. Таким образом, иммобилизация L-АСП на композит БЦ–хитозан способствует её пролонгированному действию на опухолевые клетки меланомы.

Ожидаемо, фермент ЕwА, иммобилизованный на плёнки, практически не вызывал цитотоксического эффекта на условно-нормальные фибробласты WI-38 (рис. 7). Наблюдали небольшое понижение жизнеспособности клеток только при первой трёхчасовой инкубации до уровня 66,5–85,4% для ЕwА, иммобилизованной на БЦ, и до уровня 71,7–93,0% – для фермента, иммобилизованного на БЦ–хитозан.

Таким образом, иммобилизация L-АСП на композит БЦ–хитозан способствует её пролонгированному действию на опухолевые клетки меланомы. Пролонгированного действия на условно-нормальные клетки не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на уникальные свойства нативной БЦ, её использование в качестве носителя терапевтических агентов ограничено их профилями абсорбции и высвобождения лекарственного агента. Зачастую высокая скорость этих процессов ограничивается несколькими первыми часами [37, 70, 86, 87]. В некоторых ситуациях это может привести к первоначальному локальному высокому накоплению препарата и вызывать токсические эффекты в клетках нормальных тканей [88].

На данный момент разработано несколько композитов (полупроницающих гидрогелей) на основе БЦ и хитозана с улучшенными механическими и антибактериальными свойствами [43, 51, 55, 89]. Гидрогели обычно готовят путём смешивания БЦ с раствором хитозана с последующей сшивкой глутаровым альдегидом. В такой системе один полимер шит, а другой полимер остаётся линейным. Однако линейный полимер остаётся физически связанным со шшитым полимером посредством сил Ван-дер-Ваальса, электро-

статических взаимодействий, водородных связей, гидрофобных взаимодействий или комбинации этих взаимодействий [89]. Известно, что сшивка сети гидрогелей может препятствовать преждевременной протеолитической деградации иммобилизованных высоколабильных макромолекулярных препаратов (например, антител), что может способствовать увеличению времени полужизни препаратов в крови и улучшить стабильность гидрогелей за счёт увеличения плотности поперечных связей [90].

В нашем исследовании для БЦ, выращенной в течение 96 ч, наблюдали более медленное высвобождение L-АСП, по сравнению с 72-часовыми плёнками, и сравнимое с тонкими 48-часовыми плёнками (рис. 2, а). Такой результат соотносится с исследованием Pavaloiu et al. [43], в котором композиты поливиниловый спирт–хитозан–БЦ применяли для достижения контролируемого высвобождения ибупрофена. Диффузия ибупрофена снижалась по мере увеличения концентрации БЦ в составе плёнок. В нашем случае это указывает на то, что толщина БЦ (которая зависит от времени выращивания продуцента) значительно влияла на высвобождение L-АСП через 24 ч: активность плёнок, выращенных в течение 72 ч, была в 2 раза выше, чем у таковых, выращенных за 48 или 96 ч.

При анализе высвобождения L-АСП из плёнок БЦ и БЦ–хитозан было показано, что концентрация хитозана не влияла на активность L-АСП (рис. 2, б; рис. 3). Это можно объяснить тем, что частицы хитозана могли агрегировать между собой, и хитозан не успевал полностью пропитать плёнки БЦ. В подтверждение этому в работе Li et al. [72] было показано, что адсорбционная способность композита БЦ–гиалуроновая кислота не зависела от концентрации последней в первые часы инкубации.

Ранее композиты БЦ–хитозан в основном разрабатывались как перевязочный материал для ран [91, 92] и БЦ с хитозаном инкубировали 6–12 ч. Нами было предложено подобрать оптимальное время инкубации хитозана и БЦ для доставки L-АСП в опухолевые клетки меланомы. Длительное время инкубации (6 ч) с хитозаном (рис. 2, в) приводило к уменьшению активности L-АСП практически до нуля, в то время как инкубация БЦ с хитозаном в течение 1–2 ч не влияла на активность L-АСП через 24 ч. Это указывает на то, что для иммобилизации нашего фермента время инкубации БЦ с хитозаном должно быть значительно снижено.

Кроме того, на активность фермента влияло время инкубации БЦ–хитозан с глутаровым альдегидом (рис. 2, г). Ранее в исследовании Monteiro et al. [85] были подобраны условия реак-

ции глутарового альдегида и хитозана. Реакция проводилась в нейтральной среде, а время инкубации составляло 1 ч при комнатной температуре. Таким образом, данные условия подходят для получения композита БЦ–хитозан для иммобилизации L-АСП.

При оценке высвобождения L-АСП для композита БЦ–хитозан (концентрация хитозана 0,05%) был показан более длительный кумулятивный релиз в течение 24 ч, чем для нативных плёнок БЦ. Эти данные соотносятся с результатами исследования по применению БЦ-хитозановых композитных гидрогелевых шариков для иммобилизации липазы из *Candida rugosa* [51]. В результате иммобилизации время полужизни липазы увеличилось более чем в 3 раза. Хитозан при сшивании с глутаровым альдегидом образовывал дополнительную трёхмерную структуру на волокнах БЦ, в результате чего происходило утолщение волокон (это подтверждается изображениями СЭМ на рис. 5) и более эффективное удержание L-АСП в композите.

Данные характера высвобождения L-АСП из плёнок БЦ или композита, а также сопоставление кинетической модели Хигучи и коэффициента диффузии со значением $n < 0,45$ указывает на контролируемое диффузией высвобождение фермента [93]. Модель Хигучи предполагает, что высвобождение лекарственного средства основано на диффузии Фика, где основным результатом является зависимость транспорта лекарства от квадратного корня времени [94, 95]. В то время как для описания высвобождения L-АСП из БЦ без модификации наиболее соответствовала модель Корсмейера–Пеппаса и была характерна аномальная диффузия ($n > 0,45$) с характеристиками субдиффузии [96] и более быстрое высвобождение L-АСП в первые часы.

Диффузия веществ тесно связана со структурой материала, через который происходит диффузия [95], поэтому модификация БЦ–хитозаном позволила получить пролонгированное высвобождение L-АСП. На степень адсорбции белка на БЦ влияют такие характеристики, как её пористость и плотность волокон, зависящие от времени культивирования и состава среды [97]. В нашем исследовании пористость композита БЦ–хитозан была в 1,6 раза выше, чем немодифицированной БЦ, и включение в матрицу БЦ–хитозана с последующей сшивкой глутаровым альдегидом способствовало уменьшению пор. Это создало стерические препятствия для быстрого высвобождения фермента из матрицы и пролонгировало действие на клетки *in vitro*. Наиболее важной особенностью плёнок является размер сетки, образуемый фибриллами БЦ. Размер влияет на стерические взаимодействия между

БЦ и терапевтическим средством и в конечном итоге определяет, как средство высвобождается из матрицы [90]. Эффект стерических затруднений вызывает блокировку средства внутри сети до тех пор, пока не произойдёт разрушение сети или увеличение размера сетки за счёт набухания или деформации [98].

Данные, полученные на клетках (рис. 6), соответствовали общей тенденции высвобождения L-АСП из БЦ и композитов БЦ–хитозан в растворе. Иммобилизованный фермент обладал цитотоксическим действием на опухолевые клетки линии увеальной меланомы A875, а использование композита БЦ–хитозан увеличило продолжительность его действия до четырёх последовательных инкубаций. Это указывает на то, что даже при нескольких переносах небольшого количества высвободившейся L-АСП было достаточно для цитотоксического эффекта, в то время как высвобождение L-АСП из БЦ было практически 100% после первой инкубации. На условно-нормальных клетках WI-38 пролонгации цитотоксического эффекта не обнаружено. В недавних исследованиях цитотоксическая активность свободной формы L-АСП была показана на нескольких культурах клеток солидных опухолей [99], а ПЭГ–L-АСП обладала хорошей противоопухолевой активностью в отношении злокачественной меланомы в клинических испытаниях фазы I [100]. Ранее были разработаны конъюгаты EwA с ПЭГ [22], альбумином [101], гликоль–хитозаном [102] и ПЭГ–хитозаном [103]. Конъюгаты EwA и ПЭГ–хитозан имели в 3–5 раз большую специфическую активность в отношении клеток K562 и Jurkat, а состав и структура конъюгата имели критическое влияние на цитотоксический эффект [103]. На данный момент ведётся рандомизированное клиническое исследование препарата инкапсулированного в эритроциты для терапии тройного негативного рака молочной железы [104]. Кроме того, известно, что преклонение на альтернативные типы L-АСП рекомендуется для пациентов с реакцией гиперчувствительности, иммунной или протеолитической инактивацией фермента [105]. Меланомы представляют собой поверхностный тип рака, который эффективно лечится хирургическим путём [106]. Однако существуют клинически и генетически различные подгруппы меланомы, для которых данная стратегия неэффективна [106, 107], что определяет актуальность разработки подходов к терапии отдельных видов меланом. Именно поэтому клетки линии меланомы были выбраны для данного исследования.

Некоторые традиционные методы лечения меланомы оказались неэффективны, что привело к исследованию комбинированных подходов

для терапии данного заболевания [106]. Терапия, основанная на истощении аминокислот с помощью ферментов, расщепляющих аминокислоты, может иметь потенциальное применение для лечения некоторых типов опухолей [108], в том числе меланом. Подобный эффект на меланомы продемонстрирован для таких ферментов, как аргининдеминаза и аргиназа [109].

Разработано несколько систем для доставки лекарств к клеткам с минимальными побочными эффектами. Одним из видов носителей для таких систем доставки являются гидрогели с использованием натуральных и синтетических полимеров [110]. Трансдермальная доставка имеет ряд преимуществ перед инъекцией белков в системный кровоток – это неинвазивность, предотвращение метаболизма первого прохождения, пролонгированное и контролируемое действие, уменьшение частоты введения лекарства, улучшенная биодоступность, простота самостоятельного применения [111, 112]. Доставка EwA с помощью БЦ позволит увеличить концентрацию EwA в месте опухоли, а также может быть альтернативой для пациентов, которые не могут быть оперированы или имеют противопоказания к системной химиотерапии. Однако для данного подхода есть ряд ограничений. Роговой слой действует как барьер для больших молекул, в том числе белков [113]. Другим ограничением является то, что L-АСП, иммобилизованная на плёнках БЦ, применима только к поверхностным опухолям. Также опухолевые клетки могут обходить чувствительность к L-АСП из-за высокой экспрессии аспарагинсинтетазы, в результате чего может потребоваться терапия более высокими дозами L-АСП [114]. Определение уровня экспрессии аспарагинсинтетазы [109] в клетках перед терапией позволит определить потенциальную чувствительность клеток к ферменту.

Таким образом, локализованное непрерывное высвобождение L-АСП EwA может быть перспективным для терапии солидных опухолей, обеспечивая пролонгированное локальное воздействие на опухолевые клетки меланомы при снижении частоты применения препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общеизвестным механизмом цитотоксической активности L-АСП является гидролиз аспарагина. Однако альтернативные механизмы, такие как подавление теломеразы [115–117], высвобождение 2-HS гликопротеина фетуина [118] и разрушение рецепторов конконовалина [119], также могут быть вовлечены в развитие цитотоксиче-

ских эффектов. Широкий спектр известных L-АСП различных продуцентов с индивидуальными свойствами, прежде всего термофильных организмов [120–122], а также подходы к получению рекомбинантных аналогов делают возможным создание биоплёнок с заданной характеристикой биологического действия [6]. Новые композиты БЦ–хитозан были успешно получены путём смешивания суспензии хитозана с мембранами БЦ и последующей сшивкой с помощью глutarового альдегида. По сравнению с немодифицированными мембранами, композиты БЦ–хитозан показали более высокую пористость, водоудерживающую способность и меньший средний размер пор. L-АСП *Erw. carotovora*, иммобилизованная на композиты БЦ–хитозан, обладала в 3 раза более длительным высвобождением и сохраняла цитотоксические свойства в отношении клеток меланомы, но не условно-нормальных фибробластов (даже после трёх последовательных переносов), в то время как цитотоксичность при её иммобилизации на БЦ сохранялась лишь при первой инкубации с клетками.

Вклад авторов. А.Н. Шишпарёнок – концепция работы, планирование и проведение экспериментов по модификации плёнок и анализу цитотоксичности, написание чернового варианта статьи; Е.Р. Петряев, С.А. Королёва – эксперименты по изучению высвобождения фермента; Е.Н. Комедчикова, О.А. Колесникова – получение СЭМ-изображений; Н.В. Добрякова, И.Д. Злотников, Е.В. Кудряшова – ИК-спектроскопия; Д.Д. Жданов – концепция работы, общее руководство работой, привлечение финансирования, редактирование финальной версии.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Шипуновой Виктории Олеговне (Московский физико-технический институт) за проведение работ по получению СЭМ-изображений и Козлову Андрею Фёдоровичу (НИИ Биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича) за лиофильное высушивание плёнок. Работа проводилась с использованием оборудования Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова (ИК-Фурье-микроскоп MICRAN-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pokrovskaya, M. V., Pokrovsky, V. S., Aleksandrova, S. S., Sokolov, N. N., and Zhdanov, D. D. (2022) Molecular analysis of L-asparaginases for clarification of the mechanism of action and optimization of pharmacological functions, *Pharmaceutics*, **14**, 599, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030599>.
2. Castro, D., Marques, A. S. C., Almeida, M. R., de Paiva, G. B., Bento, H. B. S., Pedrolli, D. B., Freire, M. G., Tavares, A. P. M., and Santos-Ebinuma, V. C. (2021) L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105**, 4515-4534, <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11359-y>.
3. Chand, S., Mahajan, R. V., Prasad, J. P., Sahoo, D. K., Mihooliya, K. N., Dhar, M. S., and Sharma, G. (2020) A comprehensive review on microbial L-asparaginase: bioprocessing, characterization, and industrial applications, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **67**, 619-647, <https://doi.org/10.1002/bab.1888>.
4. Suresh, S. A., Ethiraj, S., and Rajnish, K. N. (2022) A systematic review of recent trends in research on therapeutically significant l-asparaginase and acute lymphoblastic leukemia, *Mol. Biol. Rep.*, **49**, 11281-11287, <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07688-4>.
5. Jia, R., Wan, X., Geng, X., Xue, D., Xie, Z., and Chen, C. (2021) Microbial L-asparaginase for application in acrylamide mitigation from food: current research status and future perspectives, *Microorganisms*, **9**, 1659, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081659>.
6. Shishparenok, A. N., Gladilina, Y. A., and Zhdanov, D. D. (2023) Engineering and expression strategies for optimization of L-asparaginase development and production, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15220, <https://doi.org/10.3390/ijms242015220>.
7. Chan, W. K., Horvath, T. D., Tan, L., Link, T., Harutyunyan, K. G., Pontikos, M. A., Anishkin, A., Du, D., Martin, L. A., Yin, E., Rempe, S. B., Sukharev, S., Konopleva, M., Weinstein, J. N., and Lorenzi, P. L. (2019) Glutaminase activity of L-Asparaginase contributes to durable preclinical activity against acute lymphoblastic leukemia, *Mol. Cancer Ther.*, **18**, 1587-1592, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1329>.
8. Tsegaye, K., Tsehai, B. A., and Getie, B. (2024) Desirable L-asparaginases for treating cancer and current research trends, *Front. Microbiol.*, **15**, 1269282, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1269282>.
9. Liu, W., Wang, H., Wang, W., Zhu, M., Liu, C., Wang, J., and Lu, Y. (2016) Use of PEG-asparaginase in newly diagnosed adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia compared with *E. coli*-asparaginase: a retrospective single-center study, *Sci. Rep.*, **6**, 39463, <https://doi.org/10.1038/srep39463>.
10. Mazloum-Ravasan, S., Madadi, E., Mohammadi, A., Mansoori, B., Amini, M., Mokhtarzadeh, A., Baradaran, B., and Darvishi, F. (2021) *Yarrowia lipolytica* L-asparaginase inhibits the growth and migration of lung (A549) and breast (MCF7) cancer cells, *Int. J. Biol. Macromol.*, **170**, 406-414, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.141>.
11. Van Trimont, M., Peeters, E., De Visser, Y., Schalk, A. M., Mondelaers, V., De Moerloose, B., Lavie, A., Lammens, T., Goossens, S., and Van Vlierberghe, P. (2022) Novel insights on the use of L-asparaginase as an efficient and safe anti-cancer therapy, *Cancers (Basel)*, **14**, 902, <https://doi.org/10.3390/cancers14040902>.
12. Talluri, V. P., Mutaliyeva, B., Sharipova, A., Ulaganathan, V., Lanka, S. S., Aidarova, S., Suigenbayeva, A., and Tleuova, A. (2023) L-Asparaginase delivery systems targeted to minimize its side-effects, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **316**, 102915, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102915>.
13. Bahreini, E., Aghaiypour, K., Abbasalipourkabir, R., Mokarram, A. R., Goodarzi, M. T., and Saidijam, M. (2014) Preparation and nanoencapsulation of l-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and *in vitro* release study, *Nanoscale Res. Lett.*, **9**, 340, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-340>.
14. Aghaeepoor, M., Akbarzadeh, A., Mirzaie, S., Hadian, A., Jamshidi Aval, S., and Dehnavi, E. (2018) Selective reduction in glutaminase activity of l-Asparaginase by asparagine 248 to serine mutation: a combined computational and experimental effort in blood cancer treatment, *Int. J. Biol. Macromol.*, **120**, 2448-2457, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.015>.
15. Chan, W. K., Lorenzi, P. L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D. M., Sukharev, S., Rempe, S. B., and Weinstein, J. N. (2014) The glutaminase activity of l-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells, *Blood*, **123**, 3596-3606, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535112>.
16. Rizzari, C., Möricke, A., Valsecchi, M. G., Conter, V., Zimmermann, M., Silvestri, D., Attarbaschi, A., Niggli, F., Barbaric, D., Stary, J., Elitzur, S., Cario, G., Vinti, L., Boos, J., Zucchetti, M., Lanvers-Kaminsky, C., von Stackelberg, A., Biondi, A., and Schrappe, M. (2023) Incidence and characteristics of hypersensitivity reactions to PEG-asparaginase observed in 6136 children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the AIEOP-BFM ALL 2009 study protocol, *HemaSphere*, **7**, e893, <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000893>.
17. Figueiredo, L., Cole, P. D., and Drachtman, R. A. (2016) Asparaginase *Erwinia chrysanthemi* as a component of a multi-agent chemotherapeutic regimen for the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia who have developed hypersensitivity to *E. coli*-derived asparaginase, *Expert Rev. Hematol.*, **9**, 227-234, <https://doi.org/10.1586/17474086.2016.1142370>.

18. Ko, R. H., Jones, T. L., Radvinsky, D., Robison, N., Gaynon, P. S., Panosyan, E. H., Avramis, I. A., Avramis, V. I., Rubin, J., Ettinger, L. J., Seibel, N. L., and Dhall, G. (2015) Allergic reactions and anti-asparaginase antibodies in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group report, *Cancer*, **121**, 4205-4211, <https://doi.org/10.1002/cncr.29641>.
19. Papageorgiou, A. C., Posypanova, G. A., Andersson, C. S., Sokolov, N. N., and Krasotkina, J. (2008) Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase, *FEBS J.*, **275**, 4306-4316, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06574.x>.
20. Faret, M., de Morais, S. B., Zanchin, N. I. T., and de Souza, T. (2019) L-Asparaginase from *Erwinia carotovora*: insights about its stability and activity, *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 1313-1316, <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4459-2>.
21. Singh, M., Hassan, N., Verma, D., Thakur, P., Panda, B.P., Panda, A.K., Sharma, R.K., Mirza, A., Mansoor, S., Alrokayan, S.H., Khan, H.A., Ahmad, P., and Iqbal Z. (2020) Design of expert guided investigation of native L-asparaginase encapsulated long-acting cross-linker-free poly (lactic-co-glycolic) acid nanoformulation in an Ehrlich ascites tumor model, *Saudi Pharm. J.*, **28**, 719-728, <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.04.014>.
22. Melik-Nubarov, N. S., Grozdova, I. D., Lomakina, G. Y., Pokrovskaya, M. V., Pokrovski, V. S., Aleksandrova, S. S., Abakumova, O. Y., Podobed, O. V., Grishin, D. V., and Sokolov, N. N. (2017) PEGylated recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*: production, properties, and potential applications, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **53**, 165-172, <https://doi.org/10.1134/S0003683817020119>.
23. Fonseca, M. H. G., Fiúza, T. da S., de Morais, S. B., Souza, T., and de Trevizani, R. (2021) Circumventing the side effects of L-asparaginase, *Biomed. Pharmacother.*, **139**, 111616, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111616>.
24. Meneguetti, G. P., Santos, J. H. P. M., Obreque, K. M. T., Barbosa, C. M. V., Monteiro, G., Farsky, S. H. P., Marim de Oliveira, A., Angeli, C. B., Palmisano, G., Ventura, S. P. M., Pessoa-Junior, A., and de Oliveira Rangel-Yagui, C. (2019) Novel site-specific PEGylated L-asparaginase, *PLoS One*, **14**, e0211951, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211951>.
25. Feenstra, L. R., Gehring, R., van Geijlswijk, I. M., König, T., Prinsen, H. C. M. T., Vandemeulebroecke, K., Lammens, T., Krupa, A., and Teske, E. (2022) Evaluation of PEG-L-asparaginase in asparagine suppression and anti-drug antibody development in healthy Beagle dogs: a multi-phase preclinical study, *Vet. J.*, **286**, 105854, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105854>.
26. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., and Wahab, R. A. (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **29**, 205-220, <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.
27. Zhang, D.-H., Yuwen, L.-X., and Peng, L.-J. (2013) Parameters affecting the performance of immobilized enzyme, *J. Chem.*, **2013**, 1-7, <https://doi.org/10.1155/2013/946248>.
28. Ulu, A., and Ates, B. (2017) Immobilization of L-asparaginase on carrier materials: a comprehensive review, *Bioconjug. Chem.*, **28**, 1598-1610, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00217>.
29. Dobryakova, N. V., Zhdanov, D. D., Sokolov, N. N., Aleksandrova, S. S., Pokrovskaya, M. V., and Kudryashova, E. V. (2023) *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase conjugates with polyamines of improved biocatalytic properties as a new promising drug for the treatment of leukemia, *Appl. Sci.*, **13**, 3373, <https://doi.org/10.3390/app13053373>.
30. Qian, G., Zhou, J., Ma, J., He, B., and Wang, D. (1997) Chemical modification of L-asparaginase with N, O-carboxymethyl chitosan and its effects on plasma half-life and other properties, *Sci. China Ser. B Chem.*, **40**, 337-341, <https://doi.org/10.1007/BF02877748>.
31. Dobryakova, N. V., Zhdanov, D. D., Sokolov, N. N., Aleksandrova, S. S., Pokrovskaya, M. V., and Kudryashova, E. V. (2022) Improvement of biocatalytic properties and cytotoxic activity of L-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* by conjugation with chitosan-based cationic polyelectrolytes, *Pharmaceuticals*, **15**, 406, <https://doi.org/10.3390/ph15040406>.
32. Imam, H. T., Marr, P. C., and Marr, A. C. (2021) Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment, *Green Chem.*, **23**, 4980-5005, <https://doi.org/10.1039/D1GC01852C>.
33. Zalewska-Szewczyk, B., Gach, A., Wyka, K., Bodalski, J., and Młynarski, W. (2009) The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different l-asparaginase preparations, *Clin. Exp. Med.*, **9**, 113-116, <https://doi.org/10.1007/s10238-008-0026-9>.
34. Wang, N., Ji, W., Wang, L., Wu, W., Zhang, W., Wu, Q., Du, W., Bai, H., Peng, B., Ma, B., and Li, L. (2022) Overview of the structure, side effects, and activity assays of L-asparaginase as a therapy drug of acute lymphoblastic leukemia, *RSC Med. Chem.*, **13**, 117-128, <https://doi.org/10.1039/D1MD00344E>.
35. Liang, S. (2023) Advances in drug delivery applications of modified bacterial cellulose-based materials, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **11**, 1252706, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1252706>.
36. Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., and Park, J. K. (2013) Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material, *Carbohydr. Polym.*, **98**, 1585-1598, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.018>.

37. Adepu, S., and Khandelwal, M. (2020) *Ex-situ* modification of bacterial cellulose for immediate and sustained drug release with insights into release mechanism, *Carbohydr. Polym.*, **249**, 116816, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116816>.
38. Gregory, D. A., Tripathi, L., Fricker, A. T. R., Asare, E., Orlando, I., Raghavendran, V., and Roy, I. (2021) Bacterial cellulose: a smart biomaterial with diverse applications, *Mater. Sci. Eng. R Reports*, **145**, 100623, <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100623>.
39. Stumpf, T. R., Yang, X., Zhang, J., and Cao, X. (2018) *In situ* and *ex situ* modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*, **82**, 372-383, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.121>.
40. Cacicedo, M. L., Islan, G. A., León, I. E., Álvarez, V. A., Chourpa, I., Allard-Vannier, E., García-Aranda, N., Díaz-Riascos, Z. V., Fernández, Y., Schwartz, S., Jr, Abasolo, I., and Castro, G. R. (2018) Bacterial cellulose hydrogel loaded with lipid nanoparticles for localized cancer treatment, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **170**, 596-608, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.056>.
41. Autier, L., Clavreul, A., Cacicedo, M. L., Franconi, F., Sindji, L., Rousseau, A., Perrot, R., Montero-Menei, C. N., Castro, G. R., and Menei, P. (2019) A new glioblastoma cell trap for implantation after surgical resection, *Acta Biomater.*, **84**, 268-279, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.027>.
42. Pandey, A., Singh, M. K., and Singh, A. (2024) Bacterial cellulose: a smart biomaterial for biomedical applications, *J. Mater. Res.*, **39**, 2-18, <https://doi.org/10.1557/s43578-023-01116-4>.
43. Pavaloiu, R.-D., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Jinga, S. I., and Dobre, T. (2014) Composite films of poly(vinyl alcohol)-chitosan-bacterial cellulose for drug controlled release, *Int. J. Biol. Macromol.*, **68**, 117-124, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.040>.
44. Mohamed, M. H., Udoetok, I. A., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2015) Fractionation of carboxylate anions from aqueous solution using chitosan cross-linked sorbent materials, *RSC Adv.*, **5**, 82065-82077, <https://doi.org/10.1039/C5RA13981C>.
45. Udoetok, I. A., Dimmick, R. M., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2016) Adsorption properties of cross-linked cellulose-epichlorohydrin polymers in aqueous solution, *Carbohydr. Polym.*, **136**, 329-340, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.032>.
46. Mohamed, M. H., and Wilson, L. D. (2016) Sequestration of agrochemicals from aqueous media using cross-linked chitosan-based sorbents, *Adsorption*, **22**, 1025-1034, <https://doi.org/10.1007/s10450-016-9796-7>.
47. Wilson, L. D., and Xue, C. (2013) Macromolecular sorbent materials for urea capture, *J. Appl. Polym. Sci.*, **128**, 667-675, <https://doi.org/10.1002/app.38247>.
48. Poon, L., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2014) Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties, *Carbohydr. Polym.*, **109**, 92-101, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.086>.
49. Udoetok, I. A., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2016) Self-assembled and cross-linked animal and plant-based polysaccharides: chitosan-cellulose composites and their anion uptake properties, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**, 33197-33209, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11504>.
50. Udoetok, I. A., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2018) "Pillaring Effects" in cross-linked cellulose biopolymers: a study of structure and properties, *Int. J. Polym. Sci.*, **2018**, 1-13, <https://doi.org/10.1155/2018/6358254>.
51. Kim, H. J., Jin, J. N., Kan, E., Kim, K. J., and Lee, S. H. (2017) Bacterial cellulose-chitosan composite hydrogel beads for enzyme immobilization, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **22**, 89-94, <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0381-4>.
52. Ribeiro-Viana, R. M., Faria-Tischer, P. C. S., and Tischer, C. A. (2016) Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes, *Carbohydr. Polym.*, **148**, 21-28, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.033>.
53. Wacker, M., Riedel, J., Walles, H., Scherner, M., Awad, G., Varghese, S., Schürlein, S., Garke, B., Veluswamy, P., Wippermann, J., and Hülsmann, J. (2021) Comparative evaluation on impacts of fibronectin, heparin-chitosan, and albumin coating of bacterial nanocellulose small-diameter vascular grafts on endothelialization *in vitro*, *Nanomaterials*, **11**, 1952, <https://doi.org/10.3390/nano11081952>.
54. Jantararat, C., Attakitmongkol, K., Nicholsapa, S., Sirathanarun, P., and Srivaro, S. (2020) Molecularly imprinted bacterial cellulose for sustained-release delivery of quercetin, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **31**, 1961-1976, <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1787602>.
55. Arikibe, J. E., Lata, R., Kuboyama, K., Ougizawa, T., and Rohindra, D. (2019) pH-responsive studies of bacterial cellulose/chitosan hydrogels crosslinked with genipin: swelling and drug release behaviour, *ChemistrySelect*, **4**, 9915-9926, <https://doi.org/10.1002/slct.201902290>.
56. Mohammadi, S., Jabbari, F., and Babaeipour, V. (2023) Bacterial cellulose-based composites as vehicles for dermal and transdermal drug delivery: a review, *Int. J. Biol. Macromol.*, **242**, 124955, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124955>.
57. Pasaribu, K. M., Ilyas, S., Tamrin, T., Radecka, I., Swingler, S., Gupta, A., Stamboulis, A. G., and Gea, S. (2023) Bioactive bacterial cellulose wound dressings for burns with collagen *in-situ* and chitosan *ex-situ* impregnation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **230**, 123118, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.123118>.

58. Abu Hasan, N. S., Mohamad, S., Sy Mohamad, S. F., Arzmi, M. H., and Supian, N. N. I. (2023) *Ex-situ* development and characterization of composite film based on bacterial cellulose derived from oil palm frond juice and chitosan as Food packaging, *Pertanika J. Sci. Technol.*, **31**, 1173-1187, <https://doi.org/10.47836/pjst.31.3.03>.
59. Kitaoka, K., Yamamoto, H., Tani, T., Hoshijima, K., and Nakauchi, M. (1997) Mechanical strength and bone bonding of a titanium fiber mesh block for intervertebral fusion, *J. Orthop. Sci.*, **2**, 106-113, <https://doi.org/10.1007/BF02489521>.
60. Wu, S., Wu, S., and Su, F. (2017) Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **92**, 109-114, <https://doi.org/10.1002/jctb.4994>.
61. Isobe, N., Lee, D.-S., Kwon, Y.-J., Kimura, S., Kuga, S., Wada, M., and Kim, U.-J. (2011) Immobilization of protein on cellulose hydrogel, *Cellulose*, **18**, 1251-1256, <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9561-8>.
62. Krasotkina, J., Borisova, A. A., Gervaziev, Y. V., and Sokolov, N. N. (2004) One-step purification and kinetic properties of the recombinant l-asparaginase from *Erwinia carotovora*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **39**, 215-221, <https://doi.org/10.1042/BA20030138>.
63. Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., and Jones, K. M. (1989) *Data for Biochemical Research*, 3rd ed. Oxford, Clarendon Press.
64. Meister, A. (1955) Glutaminase, asparaginase, and α -keto acid- ω -amidase, *Methods Enzym.*, **2**, 380-385.
65. Cooney, D. A., Capizzi, R. L., and Handschumacher, R. E. (1970) Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man, *Cancer Res.*, **30**, 925-935.
66. Dave, P. N., Macwan, P. M., and Kamaliya, B. (2023) Biodegradable Gg-cl-poly(NIPAm-co-AA)/-o-MWCNT based hydrogel for combined drug delivery system of metformin and sodium diclofenac: *in vitro* studies, *RSC Adv.*, **13**, 22875-22885, <https://doi.org/10.1039/D3RA04728H>.
67. Looi, C. Y., Moharram, B., Paydar, M., Wong, Y. L., Leong, K. H., Mohamad, K., Arya, A., Wong, W. F., and Mustafa, M. R. (2013) Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centratherrum anthelminticum* (L.) seeds involves NF-kappaB, p53 and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling pathways, *BMC Complement. Altern. Med.*, **13**, 166, <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-166>.
68. Denizot, F., and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, *J. Immunol. Methods*, **89**, 271-277, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
69. Horue, M., Silva, J. M., Berti, I. R., Brandão, L. R., Barud, H. da S., and Castro, G. R. (2023) Bacterial cellulose-based materials as dressings for wound healing, *Pharmaceutics*, **15**, 424, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020424>.
70. Ul-Islam, M., Khan, T., and Park, J. K. (2012) Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by *in situ* and *ex situ* modification, *Carbohydr. Polym.*, **88**, 596-603, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>.
71. Li, G., Nandgaonkar, A. G., Habibi, Y., Krause, W. E., Wei, Q., and Lucia, L. A. (2017) An environmentally benign approach to achieving vectorial alignment and high microporosity in bacterial cellulose/chitosan scaffolds, *RSC Adv.*, **7**, 13678-13688, <https://doi.org/10.1039/C6RA26049G>.
72. Li, Y., Jiang, H., Zheng, W., Gong, N., Chen, L., Jiang, X., and Yang, G. (2015) Bacterial cellulose-hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair, *J. Mater. Chem. B*, **3**, 3498-3507, <https://doi.org/10.1039/C4TB01819B>.
73. Ul-Islam, M., Shah, N., Ha, J. H., and Park, J. K. (2011) Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose, *Korean J. Chem. Eng.*, **28**, 1736-1743, <https://doi.org/10.1007/s11814-011-0042-4>.
74. Ojagh, S. M. A., Vahabzadeh, F., and Karimi, A. (2021) Synthesis and characterization of bacterial cellulose-based composites for drug delivery, *Carbohydr. Polym.*, **273**, 118587, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118587>.
75. Bayer, I. S. (2023) Controlled drug release from nanoengineered polysaccharides, *Pharmaceutics*, **15**, 1364, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051364>.
76. Zhu, W., Long, J., and Shi, M. (2023) Release kinetics model fitting of drugs with different structures from viscose fabric, *Materials (Basel)*, **16**, 3282, <https://doi.org/10.3390/ma16083282>.
77. Fu, Y., and Kao, W. J. (2010) Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **7**, 429-444, <https://doi.org/10.1517/17425241003602259>.
78. Hu, Y., Catchmark, J. M., Zhu, Y., Abidi, N., Zhou, X., Wang, J., and Liang, N. (2014) Engineering of porous bacterial cellulose toward human fibroblasts ingrowth for tissue engineering, *J. Mater. Res.*, **29**, 2682-2693, <https://doi.org/10.1557/jmr.2014.315>.
79. R. Rebelo, A., Archer, A.J., Chen, X., Liu, C., Yang, G., and Liu, Y. (2018) Dehydration of bacterial cellulose and the water content effects on its viscoelastic and electrochemical properties, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **19**, 203-211, <https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1430981>.
80. Numata, Y., Kono, H., Mori, A., Kishimoto, R., and Tajima, K. (2019) Structural and rheological characterization of bacterial cellulose gels obtained from *Gluconacetobacter* genus, *Food Hydrocoll.*, **92**, 233-239, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.060>.

81. Munim, S. A., Saddique, M. T., Raza, Z. A., and Majeed, M. I. (2020) Fabrication of cellulose-mediated chitosan adsorbent beads and their surface chemical characterization, *Polym. Bull.*, **77**, 183-196, <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02711-4>.
82. Urbina, L., Guaresti, O., Reques, J., Gabilondo, N., Eceiza, A., Corcuera, M. A., and Retegi, A. (2018) Design of reusable novel membranes based on bacterial cellulose and chitosan for the filtration of copper in wastewaters, *Carbohydr. Polym.*, **193**, 362-372, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.007>.
83. Kalyani, P., and Khandelwal, M. (2021) Modulation of morphology, water uptake/retention, and rheological properties by *in situ* modification of bacterial cellulose with the addition of biopolymers, *Cellulose*, **28**, 11025-11036, <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04256-0>.
84. Maity, M., Pramanik, U., Hathwar, V. R., Brandao, P., Mukherjee, S., Maity, S., Maity, R., Maity, T., and Chandra Samanta, B. (2022) Biophysical insights into the binding capability of Cu(II) schiff base complex with BSA protein and cytotoxicity studies against SiHa, *Heliyon*, **8**, e11345, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11345>.
85. Monteiro, O. A., and Airoidi, C. (1999) Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system, *Int. J. Biol. Macromol.*, **26**, 119-128, [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00068-9).
86. Vasconcellos, V., and Farinas, C. (2018) The effect of the drying process on the properties of bacterial cellulose films from *Gluconacetobacter hansenii*, *Chem. Eng. Trans.*, **64**, 145-150.
87. Ciecholewska-Juśko, D., Żywicka, A., Junka, A., Drozd, R., Sobolewski, P., Migdał, P., Kowalska, U., Toporkiewicz, M., and Fijałkowski, K. (2021) Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings, *Carbohydr. Polym.*, **253**, 117247, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117247>.
88. Ciecholewska-Juśko, D., Junka, A., and Fijałkowski, K. (2022) The cross-linked bacterial cellulose impregnated with octenidine dihydrochloride-based antiseptic as an antibacterial dressing material for highly-exuding, infected wounds, *Microbiol. Res.*, **263**, 127125, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127125>.
89. Wahid, F., Hu, X.-H., Chu, L.-Q., Jia, S.-R., Xie, Y.-Y., and Zhong, C. (2019) Development of bacterial cellulose/chitosan based semi-interpenetrating hydrogels with improved mechanical and antibacterial properties, *Int. J. Biol. Macromol.*, **122**, 380-387, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.105>.
90. Li, J., and Mooney, D. J. (2016) Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.*, **1**, 16071, <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.
91. Kim, J., Cai, Z., Lee, H. S., Choi, G. S., Lee, D. H., and Jo, C. (2011) Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application, *J. Polym. Res.*, **18**, 739-744, <https://doi.org/10.1007/s10965-010-9470-9>.
92. Lin, W.-C., Lien, C.-C., Yeh, H.-J., Yu, C.-M., and Hsu, S. (2013) Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications, *Carbohydr. Polym.*, **94**, 603-611, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.076>.
93. Shishparenok, A. N., Koroleva, S. A., Dobryakova, N. V., Gladilina, Y. A., Gromovych, T. I., Solopov, A. B., Kudryashova, E. V., and Zhdanov, D. D. (2024) Bacterial cellulose films for L-asparaginase delivery to melanoma cells, *Int. J. Biol. Macromol.*, **276**, 133932, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133932>.
94. Paul, D. R. (2011) Elaborations on the Higuchi model for drug delivery, *Int. J. Pharm.*, **418**, 13-17, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.037>.
95. Siepmann, J., and Peppas, N. A. (2011) Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse, *Int. J. Pharm.*, **418**, 6-12, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051>.
96. Danyuo, Y., Ani, C. J., Salifu, A. A., Obayemi, J. D., Dozie-Nwachukwu, S., Obanawu, V. O., Akpan, U. M., Odusanya, O. S., Abade-Abugre, M., McBagonluri, F., and Soboyejo, W. O. (2019) Anomalous release kinetics of prodigiosin from poly-N-isopropyl-acrylamid based hydrogels for the treatment of triple negative breast cancer, *Sci. Rep.*, **9**, 3862, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39578-4>.
97. Drozd, R., Szymańska, M., Przygodzka, K., Hoppe, J., Leniec, G., and Kowalska, U. (2021) The simple method of preparation of highly carboxylated bacterial cellulose with Ni- and Mg-ferrite-based versatile magnetic carrier for enzyme immobilization, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8563, <https://doi.org/10.3390/ijms22168563>.
98. Ciolacu, D. E., Nicu, R., and Ciolacu, F. (2020) Cellulose-based hydrogels as sustained drug-delivery systems, *Materials (Basel)*, **13**, 5270, <https://doi.org/10.3390/ma13225270>.
99. Kislyak, I. A., Pokrovskaya, M. V., Zhanturina, D. Y., and Pokrovsky, V. S. (2023) The use of L-asparaginase for the treatment of solid tumors: data from experimental studies and clinical trials, *Russ. J. Oncol.*, **28**, 79-94, <https://doi.org/10.17816/onco562802>.
100. Taylor, C. W., Dorr, R. T., Fanta, P., Hersh, E. M., and Salmon, S. E. (2001) A phase I and pharmacodynamic evaluation of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced solid tumors, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **47**, 83-88, <https://doi.org/10.1007/s002800000207>.
101. Nerkar, D. P., and Gangadharan, M. (1989) Modification of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* using human serum albumin, *Mol. Biother.*, **1**, 152-4.

102. Sukhoverkov, K. V., and Kudryashova, E. V. (2015) PEG-chitosan and glycol-chitosan for improvement of biopharmaceutical properties of recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, *Biochemistry (Mosc)*, **80**, 113-119, <https://doi.org/10.1134/S0006297915010137>.
103. Sukhoverkov, K. V., Sokolov, N. N., Abakumova, O. Y., Podobed, O. V., and Kudryashova, E. V. (2016) The formation of conjugates with PEG-chitosan improves the biocatalytic efficiency and antitumor activity of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **71**, 122-126, <https://doi.org/10.3103/S0027131416020073>.
104. Rossi, L., Pierigè, F., Aliano, M. P., and Magnani, M. (2020) Ongoing developments and clinical progress in drug-loaded red blood cell technologies, *BioDrugs*, **34**, 265-272, <https://doi.org/10.1007/s40259-020-00415-0>.
105. Burke, M. J., and Zalewska-Szewczyk, B. (2022) Hypersensitivity reactions to asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia: immunology and Clinical consequences, *Futur. Oncol.*, **18**, 1285-1299, <https://doi.org/10.2217/fon-2021-1288>.
106. Villani, A., Potestio, L., Fabbrocini, G., Troncone, G., Malapelle, U., and Scalvenzi, M. (2022) The treatment of advanced melanoma: therapeutic update, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 6388, <https://doi.org/10.3390/ijms23126388>.
107. Klinac, D., Gray, E. S., Millward, M., and Ziman, M. (2013) Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring, *Front. Oncol.*, **3**, <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00054>.
108. Pokrovsky, V. S., Chepikova, O. E., Davydov, D. Z., Zamyatnin Jr, A. A., Lukashev, A. N., and Lukasheva, E. V. (2019) Amino acid degrading enzymes and their application in cancer therapy, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 446-464, <https://doi.org/10.2174/0929867324666171006132729>.
109. Pokrovsky, V. S., Abo Qoura, L., Morozova, E., and Bunik, V. I. (2022) Predictive markers for efficiency of the amino-acid deprivation therapies in cancer, *Front. Med.*, **9**, 1035356, <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1035356>.
110. Vishnubhakthula, S., Elupula, R., and Durán-Lara, E. F. (2017) Recent advances in hydrogel-based drug delivery for melanoma cancer therapy: a mini review, *J. Drug Deliv.*, **2017**, 1-9, <https://doi.org/10.1155/2017/7275985>.
111. Rastogi, V., and Yadav, P. (2012) Transdermal drug delivery system: an overview, *Asian J. Pharm.*, **6**, 161, <https://doi.org/10.4103/0973-8398.104828>.
112. Ramadon, D., McCrudden, M. T. C., Courtenay, A. J., and Donnelly, R. F. (2022) Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **12**, 758-791, <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00909-6>.
113. Kalluri, H., and Banga, A. K. (2011) Transdermal delivery of proteins, *AAPS PharmSciTech*, **12**, 431-441, <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9601-6>.
114. Shakambari, G., Sameer Kumar, R., Ashokkumar, B., Ganesh, V., Vasantha, V. S., and Varalakshmi, P. (2018) Cloning and expression of L-asparaginase from *Bacillus tequilensis* PV9W and therapeutic efficacy of Solid Lipid Particle formulations against cancer, *Sci. Rep.*, **8**, 18013, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36161-1>.
115. Zhdanov, D. D., Pokrovsky, V. S., Pokrovskaya, M. V., Alexandrova, S. S., Eldarov, M. A., Grishin, D. V., Basharov, M. M., Gladilina, Y. A., Podobed, O. V., and Sokolov, N. N. (2017) *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase targets tumor growth by a dual mechanism involving telomerase inhibition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **492**, 282-288, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.078>.
116. Zhdanov, D. D., Pokrovsky, V. S., Pokrovskaya, M. V., Alexandrova, S. S., Eldarov, M. A., Grishin, D. V., Basharov, M. M., Gladilina, Y. A., Podobed, O. V., and Sokolov, N. N. (2017) Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase in cancer Jurkat cell line and normal human CD4⁺ T lymphocytes, *Cancer Med.*, **6**, 2697-2712, <https://doi.org/10.1002/cam4.1218>.
117. Plyasova, A. A., Pokrovskaya, M. V., Lisitsyna, O. M., Pokrovsky, V. S., Alexandrova, S. S., Hilal, A., Sokolov, N. N., and Zhdanov, D. D. (2020) Penetration into cancer cells via clathrin-dependent mechanism allows l-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* to inhibit telomerase, *Pharmaceuticals*, **13**, 1-18, <https://doi.org/10.3390/ph13100286>.
118. Bosmann, H. B., and Kessel, D. (1970) Inhibition of glycoprotein synthesis in L5178Y mouse leukemic cells by L-asparaginase *in vitro*, *Nature*, **226**, 850-851, <https://doi.org/10.1038/226850a0>.
119. Ankel, E. G., Zirneski, J., Ring, B. J., and Holcenberg, J. S. (1984) Effect of asparaginase on cell membranes of sensitive and resistant mouse lymphoma cells, *In Vitro*, **20**, 376-384, <https://doi.org/10.1007/BF02619582>.
120. Dumina, M. V., Zhgun, A. A., Pokrovskaya, M. V., Aleksandrova, S. S., Zhdanov, D. D., Sokolov, N. N., and El'darov, M. A. (2021) Comparison of enzymatic activity of novel recombinant L-asparaginases of extremophiles, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **57**, 594-602, <https://doi.org/10.1134/S0003683821050057>.
121. Dumina, M., Zhgun, A., Pokrovskaya, M., Aleksandrova, S., Zhdanov, D., Sokolov, N., and El'darov, M. (2021) A novel L-asparaginase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus*: heterologous expression and characterization for biotechnology application, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9894, <https://doi.org/10.3390/ijms22189894>.
122. Dumina, M., Zhgun, A., Pokrovskaya, M., Aleksandrova, S., Zhdanov, D., Sokolov, N., and El'darov, M. (2021) Highly active thermophilic L-asparaginase from *Melioribacter roseus* represents a novel large group of type II bacterial L-asparaginases from chlorobi-ignavibacteria-bacteroidetes clade, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13632, <https://doi.org/10.3390/ijms222413632>.

BACTERIAL CELLULOSE AND CHITOSAN COMPOSITE FOR PROLONGED ACTION OF L-ASPARAGINASE ON MELANOMA CELLS

A. N. Shishparenok¹, E. R. Petryaev², S. A. Koroleva³, N. V. Dobryakova¹,
I. D. Zlotnikov⁴, E. N. Komedchikova⁵, O. A. Kolesnikova⁵,
E. V. Kudryashova⁴, and D. D. Zhdanov^{1*}

¹ *Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Russia, Moscow; e-mail: zhdanovdd@mail.ru*

² *Moscow Polytechnic University, 107023 Moscow, Russia*

³ *Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University),
117198 Moscow, Russia*

⁴ *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

⁵ *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

A significant challenge associated with the therapeutic use of L-ASNase for the treatment of tumors is its rapid clearance from plasma. The effectiveness of L-ASNase is limited by dose-dependent toxicity. Therefore, new approaches are being developed for L-ASNase to improve its therapeutic properties. One of the approaches to enhance the properties of enzymes, including L-ASNase, is immobilization on various types of biocompatible polymers. The immobilization of enzymes on a carrier allows for the improvement of enzyme stability and the alteration of enzymatic activity duration. Bacterial cellulose (BC) is a promising carrier for various drugs due to its biocompatibility, non-toxicity, high porosity, and high drug loading capacity. Therefore, this material has a high potential for application in biomedicine. Native BC is known to have a number of disadvantages related to structural stability, which has led to the consideration of modified BC as a potential carrier for the immobilization of various proteins, including L-ASNase. In our study, a BC-chitosan composite in which chitosan is cross-linked with glutaraldehyde was proposed for the immobilization of L-ASNase. The physicochemical characteristics of BC-chitosan films were found to be superior to those of native BC films, resulting in an increase in the release time of L-ASNase in vitro from 8 to 24 hours and from 2 to 10 hours in a melanoma cell line upon transfer. Consequently, chitosan-modified BC films exhibit an augmented duration of cytotoxic action of immobilized L-ASNase on melanoma tumor cells in comparison to BC. This effect is associated with a transformation in the structure of BC due to cross-links between chitosan, which altered the physicochemical properties of BC.

Keywords: L-asparaginase, bacterial cellulose, chitosan, kinetic models, cytotoxicity, melanoma

СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ ПУТЁМ ДЕПРИВАЦИИ ГЛУТАМИНА ЗАВИСИТ ОТ КЛЕТОЧНОГО ФЕНОТИПА И МЕТАБОЛИЗМА

© 2024 А.А. Исакова^{1,2}, И.Н. Дружкова³, А.М. Можеров³, Д.В. Мазур¹, Н.В. Антипова¹, К.С. Краснов⁴, Р.С. Фадеев⁴, М.Э. Гаспарян¹, А.В. Яголович^{2*}

¹ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: anneyagolovich@gmail.com

³ Приволжский исследовательский медицинский университет, 603081 Нижний Новгород, Россия

⁴ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 03.06.2024

После доработки 23.08.2024

Принята к публикации 05.09.2024

Содержание глутамина играет важную роль в опухолевом метаболизме. Известно, что в толще солидных опухолей происходит депривация глутамина, которая влияет на рост и распространение опухоли. В работе было исследовано влияние депривации глутамина на клеточный метаболизм и чувствительность клеток глиобластомы человека U87MG и T98G к препаратам различной природы: алкилирующему цитостатику темозоломиду; цитокину TRAIL DR5-B – агонисту рецептора смерти 5 (DR5); а также GMX1778 – таргетному ингибитору фермента никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT), лимитирующего биосинтез NAD. Биоинформатический анализ транскриптома показал, что клетки U87MG обладают более дифференцированным фенотипом относительно T98G, а также отличаются по профилю экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина. При депривации глутамина скорость роста клеток U87MG и T98G снижалась. Исходя из анализа клеточного метаболизма методом флуоресцентной время-разрешённой микроскопии (FLIM) NADH и оценки содержания лактата в среде, депривация глутамина смещала метаболический статус клеток U87MG в сторону гликолиза. Это сопровождалось повышением экспрессии маркера стволовости CD133 (проминина-1), что совокупно может свидетельствовать о дедифференцировке этих клеток. При этом повышались экспрессия рецептора DR5 и чувствительность клеток U87MG к DR5-B. Однако в клетках T98G депривация глутамина, наоборот, индуцировала сдвиг метаболизма в сторону окислительного фосфорилирования, снижение экспрессии DR5 и устойчивость к DR5-B. Эффекты ингибирования NAMPT также отличались в разных линиях и были противоположны эффектам DR5-B: при депривации глутамина клетки U87MG становились более резистентными, а T98G – более чувствительными к GMX1778. Таким образом, фенотипические и метаболические отличия между двумя клеточными линиями глиобластомы человека послужили причиной разнонаправленных метаболических изменений и контрастных ответов на воздействия различными таргетными препаратами при депривации глутамина. Эти данные следует учитывать при разработке стратегий лечения глиобластомы путём лекарственной депривации аминокислот, а также при исследовании новых потенциальных терапевтических мишеней.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: депривация глутамина, глиобластома, дифференцировка, CD133, TRAIL, DR5, NADH, FLIM-микроскопия, NAMPT, GMX1778.

DOI: 10.31857/S0320972524100043 EDN: IPVWAR

Принятые сокращения: CD133 – проминин-1; DR5 – рецептор смерти 5; FLIM – флуоресцентная время-разрешённая микроскопия; GSEA – Gene Sets Enrichment Analysis, анализ обогащения групп генов по функциональной принадлежности; NAMPT – никотинамидфосфорибозилтрансфераза; TRAIL – лиганд, вызывающий апоптоз, из семейства цитокинов фактора некроза опухоли; OXPHOS – окислительное фосфорилирование.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Для опухолевых клеток характерны интенсивные метаболические процессы, которые требуют повышенного расходования питательных веществ. Глутамин является наиболее распространённой заменимой аминокислотой в организме [1]. Высокое потребление глутамина опухолевыми клетками является адаптивным метаболическим механизмом, который способствует пролиферации в условиях гипоксии и дефицита питательных веществ. В процессе глутаминализа глутамин конвертируется в глутамат и α -кетоглутарат. Глутамин является донором углерода и азота для синтеза восстановленного глутатиона (GSH), таким образом регулируя окислительно-восстановительный статус опухолевых клеток [2]. Показано, что глутамин является анаплеротическим предшественником для цикла трикарбоновых кислот; кроме того, продуктом глутаминализа является NAD(P)H, который обеспечивает другие анаболические процессы [3]. Отсутствие глутамина может влиять на рост опухоли: к примеру, депривация глутамина в клетках остеосаркомы вызывала увеличение секреции провоспалительного хемокина интерлейкина-8 (IL-8) [4]; также недостаток глутамина способствовал с-MYC-опосредованному клеточному апоптозу [5]. Метаболизм глутамина может перепрограммироваться онкогенами с-MYC, KRAS, PI3K/AKT/mTOR, а также опухолевым супрессором p53 [2].

В солидных опухолях существует пространственная неоднородность в распределении кислорода и питательных веществ, которая приводит к локальной гипоксии. Подобно этому в опухолях существует и локальный дефицит глутамина, который может служить одним из факторов устойчивости к химиотерапии [6]. Среди солидных опухолей глиобластома особенно зависит от метаболизма глутамина, поскольку для нормальной функции мозга необходим гомеостаз нейротрансмиттера глутамата, источником которого является глутамин. При глиобластоме также была показана локальная депривация глутамина, которая была более выражена в глубине опухоли [7, 8]. Лекарственная терапия глиобластомы в настоящее время ограничивается преимущественно темозоломидом, цитостатическим химиопрепаратом алкилирующего типа. Однако ввиду его недостаточной эффективности необходим поиск новых перспективных молекулярных мишеней [9]. Известно, что рецептор смерти 5 (DR5) является прогностическим маркером для пациентов с глиобластомой [10], а также исследуется применение агонистов DR5 в терапии глиобластомы [11]. Другой перспективной мишенью является никотинамидфосфорибозилтрансфераза

(NAMPT) – фермент, катализирующий синтез никотинамидмононуклеотида, который является лимитирующей стадией биосинтеза NAD. Ингибиторы NAMPT обладают потенциалом для лечения солидных опухолей, в том числе глиобластомы [12].

Разрабатывается ряд стратегий лекарственной депривации глутамина в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами для повышения терапевтической эффективности [13, 14]. Целью данной работы было исследование влияния депривации глутамина на метаболизм клеток глиобластомы человека и чувствительность к терапевтическому воздействию препаратами разной природы: конвенциональным химиопрепаратом темозоломидом [15], агонистом рецептора DR5 – модифицированным цитокином TRAIL (лиганд, вызывающий апоптоз, из семейства цитокинов фактора некроза опухоли) DR5-B [16], а также низкомолекулярным таргетным ингибитором NAMPT GMX1778 [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Клеточные линии глиобластомы U87MG и T98G были получены из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC, США) и культивировались в питательной среде DMEM («ПанЭко», Россия, кат. № C420п), содержащей 4,5 г/л глюкозы и 110 мг/мл пирувата натрия, с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone», США, кат. № K052/SV30 160.03), 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», кат. № Ф032), пенициллина (100 мкг/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) («ПанЭко», кат. № A073п) при 37 °C и 5% CO₂. Для моделирования депривации глутамина клетки инкубировали в среде без L-глутамина в течение не менее 72 ч.

Секвенирование транскриптомов. Секвенирование РНК проводили в ООО «Геноаналитика» на приборе HiSeq1500 («Illumina», США) с генерацией не менее 40 млн коротких чтений длиной 150 нуклеотидов. С помощью программы STAR (версия 2.7.9a) исходные чтения картировались на геном GRCh38, после чего подсчитывалось количество чтений, картированных на отдельные гены (аннотация Ensembl, версия 99) с не более чем тремя несоответствиями. Секвенирование РНК каждой из групп проводили в двух экземплярах.

Анализ дифференциальной экспрессии генов. Дифференциальная экспрессия генов культуры клеток U87MG относительно T98G была посчитана с помощью пакета DEseq2 версии 1.28.1 [18] для языка программирования R версии 4.2.2. Анализ обогащения по функциональной принад-

Таблица 1. Праймеры, используемые для проведения ПЦР в реальном времени.

№	Название	Последовательность (5' → 3')
1	p21 ^{Waf1} (CDKN1A-F110) прямой	AGTCAGTTCSTTGTGGAGCC
	p21 ^{Waf1} (CDKN1A-R110) обратный	CATTAGCGCATCACAGTCGC
2	p27 ^{KIP1} (CDKN1B-F115) прямой	TGTTTCAGACGGTTCCCCAAA
	p27 ^{KIP1} (CDKN1B-R115) обратный	CCATTCCATGAAGTCAGCGAT
3	CD133 прямой	ACTCCCATAAAGCTGGACCC
	CD133 обратный	TCAATTTTGGATTTCATATGCCTT
4	DR5 прямой	TGGAACAACGGGGACAGAACG
	DR5 обратный	GCAGCGCAAGCAGAAAAGGAG
5	cFLIP прямой	GGCTCCCCCTGCATCACATC
	cFLIP обратный	CCGCAGTACACAGGCTCCAGA
6	18S прямой	GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC
	18S обратный	CCAAGATCCAACCTACGAGCTT

лежности групп генов (GSEA, Gene Sets Enrichment Analysis) производился по базе данных молекулярных сигнатур MsigDB (Molecular Signature DataBase) [19] с использованием библиотеки для языка программирования Python версии 3.11.7, GSEApy версии 1.0.6 [20]. Для анализа использовался ранжированный список генов, отсортированный по уменьшению кратности изменения экспрессии, полученный при расчёте дифференциальной экспрессии генов (GSEA preranked). Для детального изучения изменения транскрипционной активности клеток был проведён GSEA с использованием наборов генов из курируемых баз данных GeneOntology (субколлекции: GO: Biological Processes GO:BP, GO: Cellular Components GO:CC и GO: Molecular Functions GO:MF) [21], Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [22], Reactome [23], WikiPathways (WP) [24], Protein Interaction Database (PID) [25], Transcription Factor Targets Legacy (TFT Legacy) [26]. Для оценки изменения транскрипционной активности генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина, был получен список генов из набора генов базы данных Reactome Glutamate and Glutamine Metabolism, для которого использовались значения кратности изменения экспрессии (logFC). Для оценки достоверности изменения экспрессии генов с использованием DESeq2 использовался тест Вальда с поправкой на множественное тестирование Беньямини–Хохберга (FDR) [27]. Все данные представлены для результатов $FDR \leq 0,05$.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией. Выделение тотальной РНК проводили с

использованием реагента для выделения РНК ExtractRNA («Евроген», Россия). Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop One C («Thermo Fisher Scientific», США). Суммарную РНК использовали в качестве матрицы для построения кДНК с помощью набора MMLV RT kit («Евроген»), по инструкции производителя. Амплификация проводилась в течение 5 мин при 10 °C, а затем по 25 мин при 37 °C и 42 °C соответственно, при 70 °C в течение 10 мин для инактивации фермента. ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 («Roche», Австрия) с использованием реагента qPCRMix-HS SYBR («Евроген»), согласно инструкции производителя по следующей программе: 95 °C в течение 150 с, затем 45 циклов: 95 °C в течение 20 с, 60 °C в течение 20 с и 72 °C в течение 20 с. Сбор данных осуществлялся с помощью программного обеспечения LightCycler Software (версия 4.1). Отсутствие побочных продуктов ПЦР определяли по кривой плавления. Для каждой пары праймеров во всех образцах наблюдали одинаковые пики плавления ПЦР каждого образца в трёх повторях. Полученные значения C_t (cycle threshold) для каждого образца не превышали 35. В качестве внутреннего контрольного образца использовали ген рибосомальной 18S РНК. Относительные уровни экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Визуализация и статистическая обработка данных проводилась с использованием программы GraphPad Prism 9.3.1 («GraphPad Software», США). Выборки клеток сравнивали между собой с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Праймеры для детекции экспрессии генов p21^{Waf1}, p27^{KIP1}, CD133 (проминина-1), DR5 и cFLIP приведены в табл. 1.

Флуоресцентная время-разрешённая микроскопия (FLIM). Микроскопию метаболического кофактора NADH с временным разрешением (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 («Carl Zeiss», Германия). В качестве источника возбуждения использовали фемтосекундный Ti:Sa-лазер («Spectra Physics», США) с частотой следования импульсов 80 МГц и длительностью 120 фс. Детекцию времён жизни флуоресценции осуществляли с помощью FLIM-модуля TCSPC («Becker & Hickl GmbH», Германия), основанного на время-коррелированном счёте единичных фотонов. Для получения изображений использовали масляный иммерсионный объектив 40×/1.3. Возбуждение флуоресценции NAD(P)H осуществляли в двухфотонном режиме на длине волны 750 нм, сигнал принимали в диапазоне 450–490 нм. Мощность возбуждающего излучения составила 7 мВт. Время сбора фотонов составляло 60 с. Количество фотонов в пикселе было не менее 5000. Во время эксперимента клетки находились в инкубаторе при 37 °C, 5% CO₂. Данные FLIM обрабатывали в программе SPCImage («Becker & Hickl GmbH»). Для получения параметров кривых затухания в каждом пикселе использовали аппроксимацию методом наименьших квадратов. Кривые затухания флуоресценции NAD(P)H были аппроксимированы биэкспоненциальной моделью. Точность аппроксимации оценивали посредством параметра χ^2 . Для всех данных χ^2 лежал в диапазоне от 0,8 до 1,2. Были оценены короткая и длинная компоненты затухания (τ_1 и τ_2 соответственно), относительные амплитуды этих компонент (α_1 и α_2), а также среднее время жизни флуоресценции ($\tau_m = \alpha_1\tau_1 + \alpha_2\tau_2$). Анализ аутофлуоресценции проводили по клеточно в области цитоплазмы клетки. Для каждой группы были получены не менее 5 изображений с общим числом клеток не менее 30.

Оценка гликолитической активности клеток по содержанию лактата в культуральной среде. Клетки U87MG и T98G высевали на 6-луночный планшет по 5×10^5 клеток на лунку и культивировали в среде с глутамином либо без глутамин в течение 20 ч. Затем культуральную среду собирали и депротеинизировали с помощью набора для депротеинизации (ab204708, «Abcam», США), по инструкции производителя. Образцы анализировали с помощью набора для колориметрического анализа лактата (MAK064, «Sigma-Aldrich», США), по протоколу производителя. Количество лактата оценивали по оптической плотности раствора на длине вол-

ны 570 нм с помощью микропланшетного ридера SYNERGYmx («BioTek», США).

Проточная цитометрия. Для анализа поверхностной экспрессии рецептора DR5 клетки U87MG и T98G высевали в 6-луночные планшеты по 2×10^5 клеток на лунку и культивировали при 37 °C, 5% CO₂ с добавлением либо в отсутствие глутамин в течение не менее 72 ч. Клетки открепляли раствором Версена, промывали ледяным PBS, ресуспендировали в буфере FACS (1%-ный BSA в PBS) и инкубировали в течение 1 ч при 4 °C с моноклональными антителами (5 мкг/мл) к DR5. После этого клетки дважды промывали и инкубировали в течение 1 ч при 4 °C со вторичными антителами Dylight 488 (20 мкг/мл), промывали и ресуспендировали в буфере FACS с йодидом пропидия. Экспрессию рецептора DR5 определяли с помощью проточного цитометра CytoFlex («Beckman Coulter», Бреа, Индиана, США) с использованием мышиного IgG1 в качестве изотипического контроля.

Получение рекомбинантного DR5-специфичного варианта TRAIL DR5-B. Рекомбинантный белок DR5-B был экспрессирован в клетках *E. coli* SHuffle B и очищен из растворимой клеточной фракции с помощью никель-аффинной и ионообменной хроматографии, как описано ранее [28].

Тест на цитотоксичность. Клетки U87MG либо T98G рассаживали в 96-луночные планшеты по 1×10^4 клеток на лунку. Спустя 24 ч к клеткам добавляли темозоломид («Macklin», Китай), DR5-B либо GMX1778 в указанных концентрациях и инкубировали в течение 72 ч. Темозоломид и GMX1778 предварительно растворяли в ДМСО в концентрации 1 M и 100 mM соответственно и добавляли к клеткам таким образом, чтобы итоговое содержание ДМСО в лунке не превышало 0,5% и не проявляло цитотоксического эффекта. Затем к клеткам добавляли 0,05%-ный МТТ, инкубировали 4 ч и растворяли образовавшиеся кристаллы в ДМСО (100 мкл на лунку). Измеряли поглощение при 570 нм на планшетном спектрофотометре iMark («Bio-Rad», США).

Статистический анализ. Полученные данные имели нормальное распределение и выражались как среднее или среднее $\pm$ стандартное отклонение. Нормальность распределения оценивалась по критерию Шапиро–Уилка. Значимых выбросов не наблюдалось. Статистический анализ всех результатов, кроме дифференциальной экспрессии генов, проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента. Эксперименты проводились в трёх повторностях. Результаты были обработаны с помощью программы GraphPad Prism 8.0.1 («GraphPad Software»). Значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клетки глиобластомы человека U87MG обладают более дифференцированным фенотипом по сравнению с T98G. В работе были исследованы клеточные линии глиобластомы человека U87MG и T98G. Для сравнения особенностей и различий двух линий было проведено секвенирование транскриптомов в стандартных условиях культивирования. Анализ GSEA дифференциальной экспрессии генов между клеточными линиями U87MG и T98G из базы данных GO:BP показал повышенную активность генов, связанных с главным комплексом гистосовместимости II класса в клетках U87MG относительно T98G (рис. 1, а). Похожие результаты были получены при анализе генов из субколлекций GO:CC и GO:MF (рис. 1, б). Это может свидетельствовать о том, что эти клетки обладают более дифференцированным фенотипом по сравнению с T98G [29, 30]. Анализ

с использованием наборов генов из коллекций KEGG, WP, Reactome и PID (рис. 2, а) показал в клетках U87MG повышенную активность генов, участвующих в процессах передачи сигнала за счёт генерации вторичных сигнальных молекул, а также в сигнальном пути PD-1, который может служить одним из факторов клеточной резистентности к действию TRAIL [31]. Кроме того, был проведён анализ GSEA с использованием наборов генов-мишеней транскрипционных факторов (TF) (коллекция TFT-Legacy), которые могут косвенно указывать на активность генов, находящихся под контролем определённых TF (рис. 2, б). Транскрипционная активность генов под контролем TF EN, RSRFC4 (MEF2A), EVI1 (MECOM), FOXJ2, CDPCR3 (CUTL1, CUX1), RORA2 (RORA), NKX25 (NKX2-5), PAX4, HFN1 (FOXQ1) и FOXD3 была повышена в клетках U87MG относительно T98G. Активность этих TF важна для регуляции клеточной дифференцировки, что указывает на более

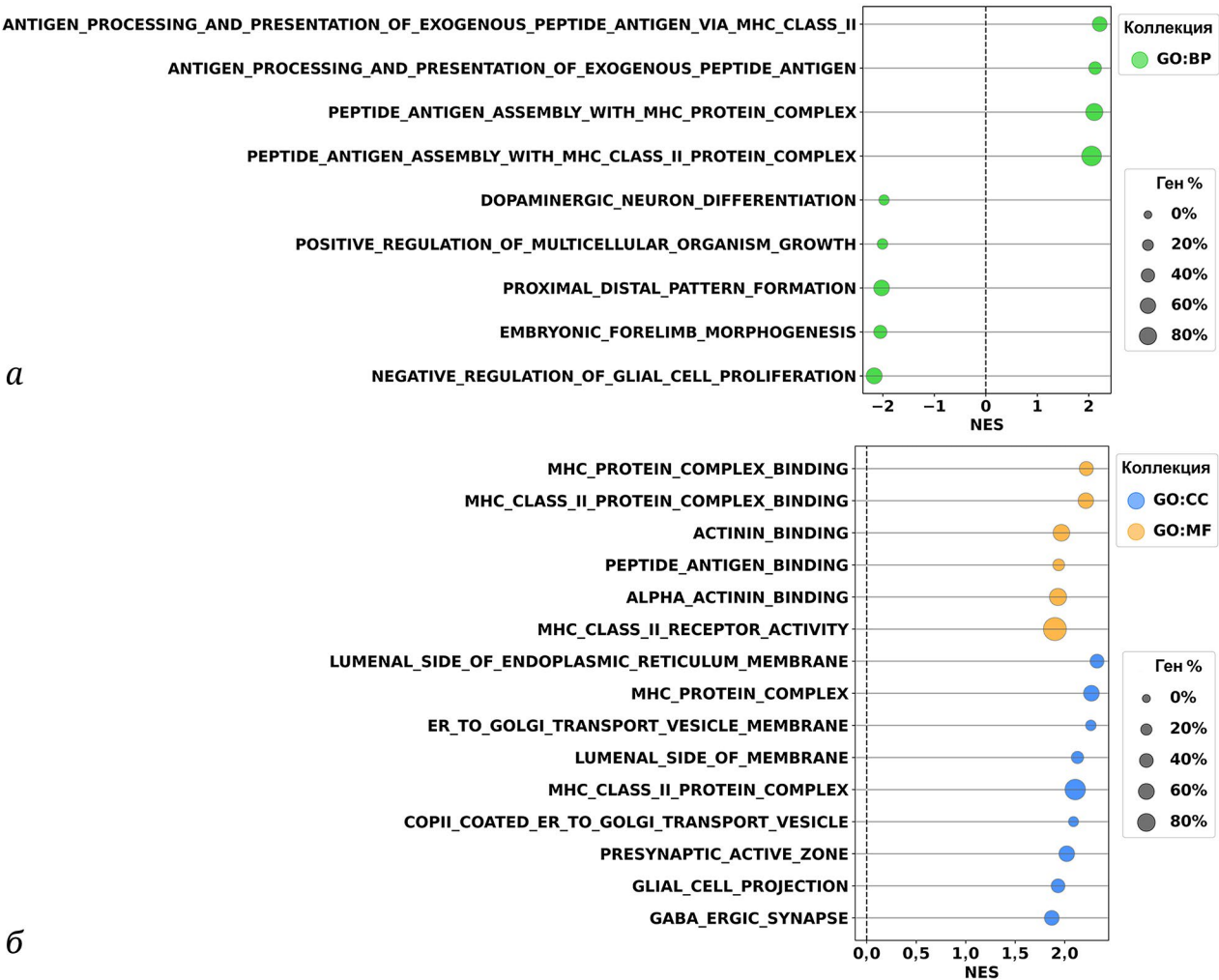


Рис. 1. Сравнительный анализ наборов генов GSEA в клетках U87MG относительно T98G. Результаты GSEA: а – для коллекций GO:BP; б – для GO:CC и GO:MF. Диаметр круга пропорционален количеству генов с разным уровнем экспрессии по сравнению с общим количеством генов в наборе. NES – нормализованный показатель обогащения. FDR ≤ 0,05

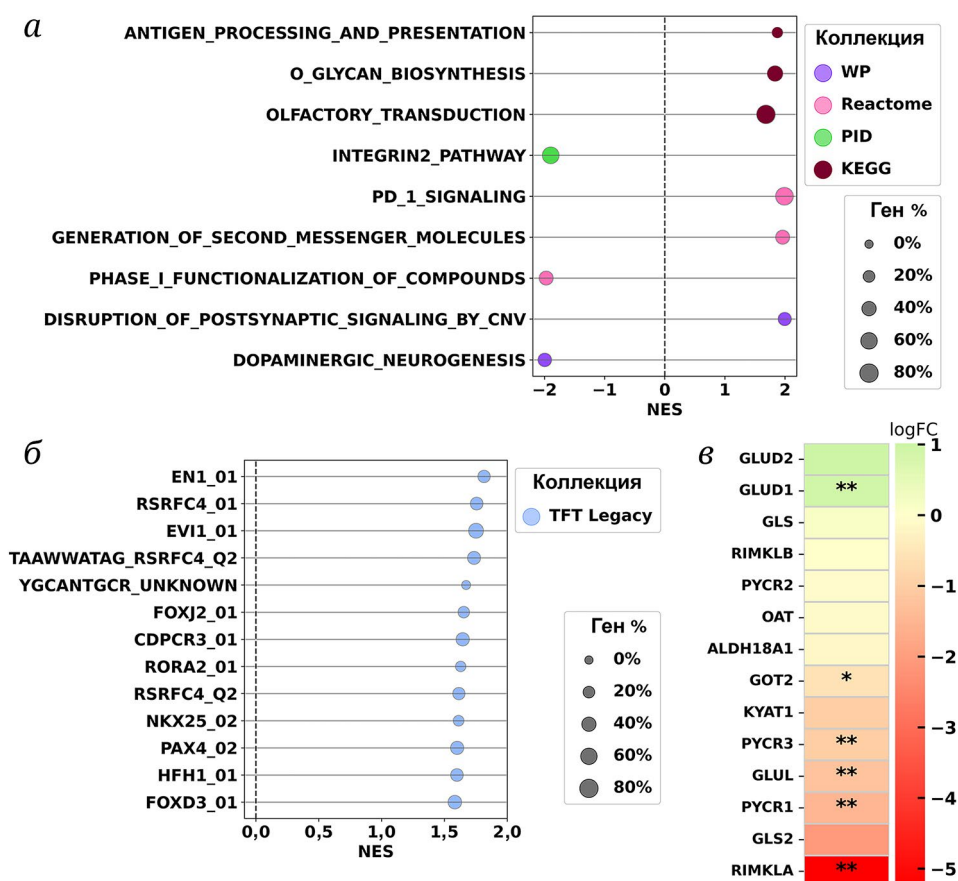


Рис. 2. Сравнительный анализ наборов генов GSEA в клетках U87MG относительно T98G. Результаты GSEA: а – для коллекций KEGG, PID, Reactome, WP; б – TFT Legacy. Диаметр круга пропорционален количеству генов с разным уровнем экспрессии по сравнению с общим количеством генов в наборе. NES – нормализованный показатель обогащения. FDR ≤ 0,05. в – Кратность изменения экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина, из базы данных Reactome Glutamate and Glutamine Metabolism в культуре клеток U87MG относительно T98G (logFC). * FDR ≤ 0,05, ** FDR ≤ 0,01

дифференцированный фенотип U87MG по сравнению с T98G.

Клетки U87MG и T98G отличаются по уровню транскрипционной активности генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина. Анализ изменения транскрипционной активности генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина, из базы данных GSEA MSigDB Reactome Glutamate and Glutamine Metabolism показал, что в клетках U87MG относительно T98G статистически значимо повышена экспрессия глутамат-дегидрогеназы 1 (GLUD1), участвующей в катаболизме глутамата [32], но не её паралога GLUD2 (рис. 2, в). В то же время экспрессия ряда других генов в клетках U87MG была значимо ниже, чем в T98G, а именно: митохондриальной аспарат-аминотрансферазы (GOT2), что ассоциировано со сниженным метаболизмом глутамина и клеточной сенесцентностью [33]; цитоплазматической (PYCR3) и митохондриальной (PYCR1) пирролин-5-карбоксилатредуктаз, катализирующих биосинтез пролина из глутамата в качестве пре-

курсора [34]; глутамин-синтетазы (GLUL), катализирующей эндогенный синтез глутамина из глутамата [32]; и N-ацетил-аспартил-глутамат-синтазы A (NAAGSA, RIMKLA), метаболизирующей глутамат [35]. Достоверных изменений экспрессии других генов, участвующих в метаболизме глутамина, не наблюдалось (рис. 2, в).

При депривации глутамина снижается скорость роста клеток U87MG и T98G и повышается экспрессия маркера стволовых клеток CD133 и ингибиторов циклин-зависимых киназ p21^{Waf1} и p27^{KIP1} в клетках U87MG. Культивирование клеток в отсутствие глутамина в разной степени приводило к снижению скорости роста исследуемых клеточных линий U87MG и T98G (рис. 3, а), что соответствует ранее опубликованным данным [36, 37]. Поскольку клетки U87MG и T98G отличались по исходной степени дифференцировки, мы оценили изменение экспрессии маркера стволовых клеток глиомы CD133 при депривации глутамина с помощью ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии CD133 возрастал

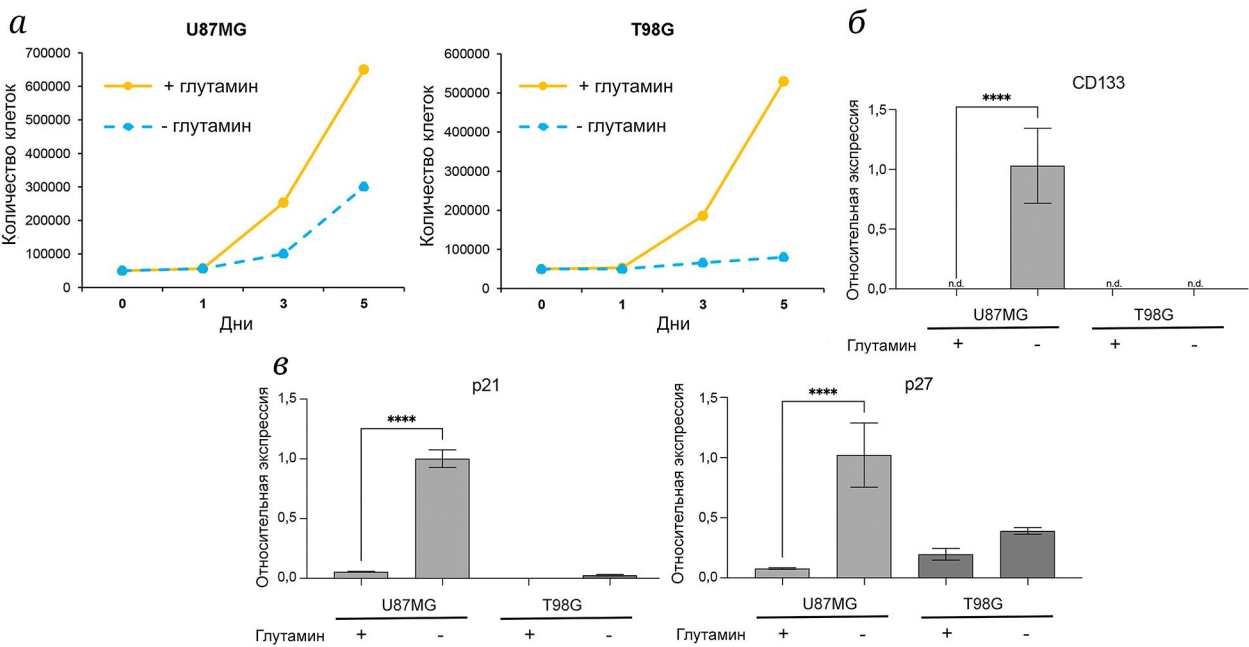


Рис. 3. Влияние депривации глутамина на линии клеток U87MG и T98G. *а* – Скорость роста клеток U87MG и T98G в отсутствие либо в присутствии глутамина. Изменение уровней экспрессии на уровне мРНК, определенное методом ПЦР в реальном времени: *б* – CD133, *в* – p21^{Waf1} и p27^{KIP1}. **** *p* < 0,005

Таблица 2. Параметры аутофлуоресценции NADH в клетках U87MG и T98G в отсутствие либо в присутствии глутамина (среднее значение ± стандартное отклонение)

Клеточная линия	Глутамин	τm, нс	τ1, нс	τ2, нс	α1, %
U87MG	+	0,84 ± 0,07	0,42 ± 0,03	2,47 ± 0,19	79,31 ± 1,74
	–	0,74 ± 0,07* <i>p</i> < 0,001	0,37 ± 0,04 <i>p</i> < 0,001	2,32 ± 0,18 <i>p</i> < 0,001	81,16 ± 1,60* <i>p</i> < 0,001
T98G	+	0,86 ± 0,08	0,46 ± 0,04	2,46 ± 0,21	79,84 ± 1,95
	–	0,99 ± 0,10* <i>p</i> < 0,001	0,51 ± 0,05* <i>p</i> < 0,001	2,73 ± 0,24 <i>p</i> < 0,001	77,56 ± 2,07* <i>p</i> < 0,001

Примечание. τ1 и τ2 – времена жизни флуоресценции свободной и связанной с белком формы NADH соответственно, τm – среднее время жизни флуоресценции NADH, α1 – процентный вклад свободной формы NADH. * Достоверное отличие от контроля, *p* < 0,001.

в клетках U87MG, что может указывать на процесс дедифференцировки этих клеток. В клетках T98G маркер CD133 не определялся независимо от присутствия глутамина (рис. 3, б). Аналогичный эффект наблюдался для экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ p21^{Waf1} и p27^{KIP1}: значимое повышение экспрессии наблюдалось в U87MG, но не T98G (рис. 3, в).

Депривация глутамина вызывает контрастные метаболические эффекты в клетках U87MG и T98G, выявленные методом FLIM. Изменения в метаболизме опухолевых клеток U87MG и T98G при депривации глутамина исследовали с помощью метаболического имиджинга на основе двухфотонной FLIM по аутофлуоресценции кофермента NADH. Фосфорилированной формы NADPH,

которая характеризуется наибольшим временем жизни флуоресценции ~4,4 нс [38], в проанализированных клеточных культурах обнаружено не было. При культивировании с глутамином процентные вклады свободной (α1) и связанной форм NADH для клеток U87MG и T98G исходно не отличались (табл. 2). Анализ параметров аутофлуоресценции NADH показал, что времена жизни свободной (τ1) и связанной с белком (τ2) форм соответствовали типичным значениям [39, 40]. При депривации глутамина у клеток U87MG наблюдалось снижение среднего времени жизни флуоресценции (τm), времени жизни свободной формы (τ1) и повышение вклада свободной формы (α1), что в совокупности может говорить о сдвиге метаболического статуса клеток в сторону гликолиза.

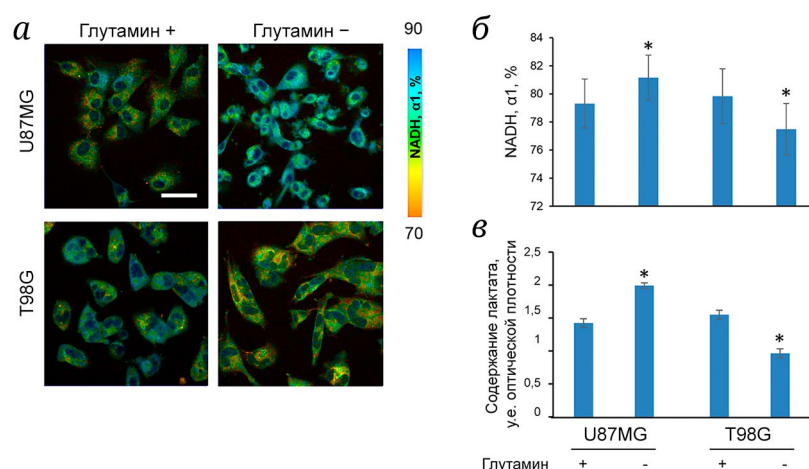


Рис. 4. Исследование метаболического статуса клеток U87MG и T98G при депривации глутамина. *а* – Микроскопические псевдоокрашенные FLIM-изображения отношения вклада свободной формы NADH, α1, масштабная линейка = 50 мкм для всех изображений. *б* – Количественная оценка NADH, α1, методом FLIM. Столбчатые диаграммы отражают среднее значение ± стандартную ошибку среднего. * Статистически значимое отклонение от группы «глутамин+», $p < 0,005$. *в* – Оценка содержания лактата в культуральной среде колориметрическим методом при длине волны 570 нм. Столбчатые диаграммы отражают среднее значение оптической плотности раствора ± стандартное отклонение, * $p < 0,001$

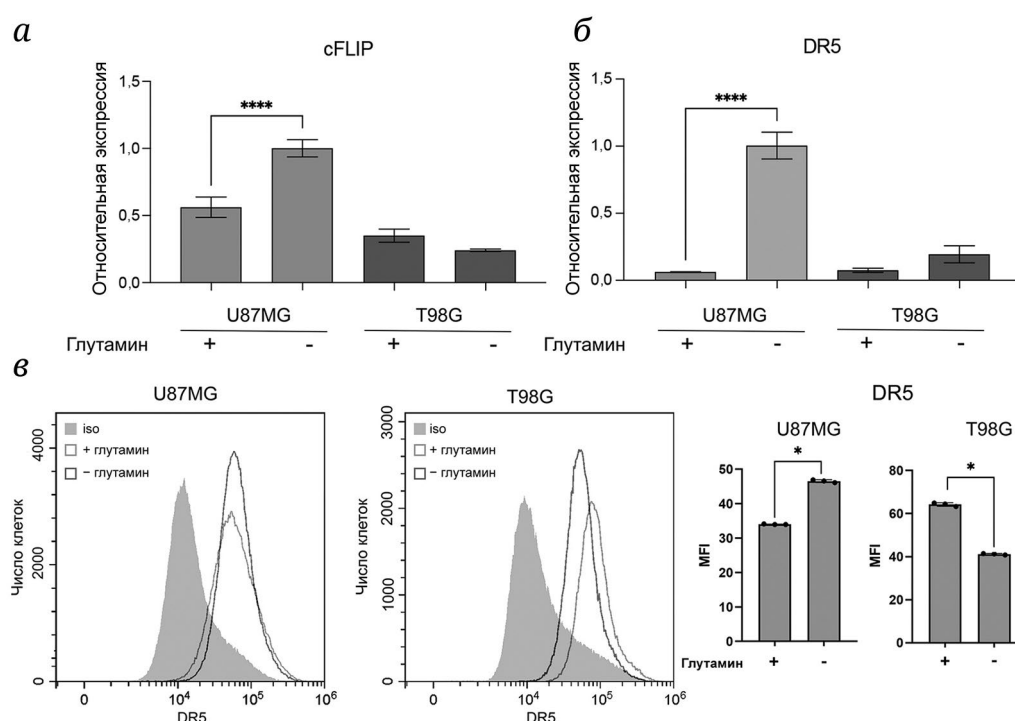


Рис. 5. Исследование экспрессии DR5 и cFLIP в линиях клеток U87MG и T98G. *а* – Экспрессия cFLIP; *б* – экспрессия DR5 на уровне мРНК, **** $p < 0,005$. *в* – Экспрессия DR5 на поверхности клеток, * $p < 0,05$. MFI – средняя интенсивность флуоресценции

При этом время жизни связанной с белком формы (τ_2) оставалось без изменений. У клеток линии T98G, наоборот, наблюдалось увеличение параметров τ_1 и τ_2 и значимо снижался вклад свободной компоненты α1, ассоциированной с гликолизом, что позволяет делать вывод о сдвиге метаболизма в сторону окислительного фосфорилирования (OXPHOS) [41] (рис. 4, а, б, табл. 2).

Депривация глутамина по-разному модулирует содержание лактата в культуральной среде клеток U87MG и T98G. Наблюдалось значимое увеличение продукции лактата клетками U87MG, культивируемыми в среде без глутамина: при оценке колориметрическим методом оптическая плотность составила $1,99 \pm 0,04$ против $1,42 \pm 0,07$ в присутствии глутамина ($p < 0,01$).

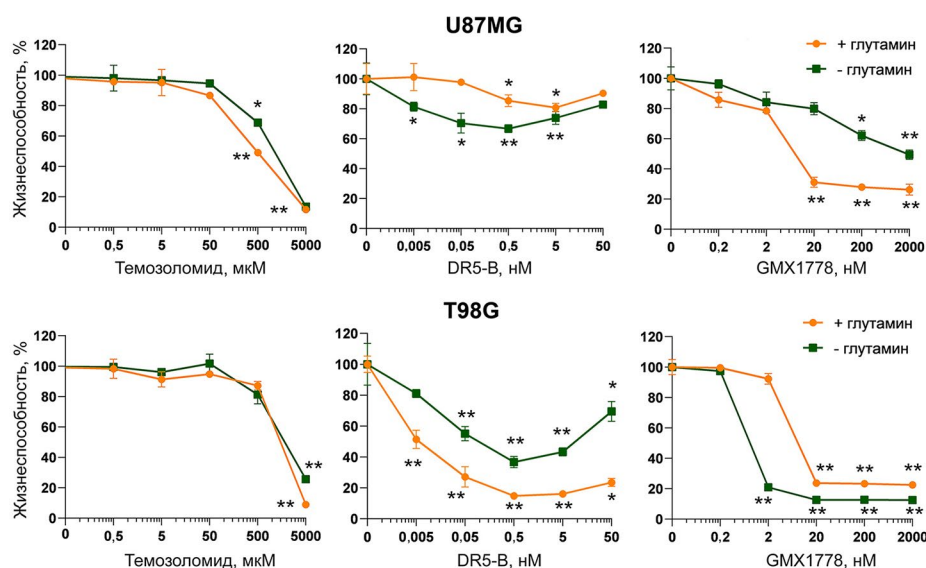


Рис. 6. Цитотоксическая активность темозоломида, TRAIL DR5-B и ингибитора NAMPT GMX1778 на линиях клеток глиобластомы U87MG и T98G в стандартных условиях и при депривации глутамина, МТТ-тест. Значимость по сравнению с контролем: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

Для клеток T98G, напротив, при депривации глутамина наблюдалось снижение оптической плотности раствора с $1,55 \pm 0,05$ до $0,96 \pm 0,07$, $p < 0,01$ (рис. 4, в). Полученные данные подтверждают изменения, наблюдаемые с помощью FLIM.

Депривация глутамина модулирует экспрессию компонентов сигнального пути цитокина TRAIL. В недавней работе депривация глутамина в клетках рака поджелудочной железы приводила к снижению экспрессии антиапоптотического белка cFLIP, гомолога каспазы-8 без протеазной активности, тем самым повышая чувствительность клеток к цитотоксическому действию цитокина TRAIL; при этом не изменялась поверхностная экспрессия рецептора DR5, мишени TRAIL [42]. Однако в наших экспериментах на клетках глиобластомы наблюдались разнонаправленные эффекты: при депривации глутамина экспрессия cFLIP в клетках U87MG повышалась, а в клетках T98G не изменялась (рис. 5, а).

При этом в U87MG также наблюдалось повышение экспрессии рецептора DR5 как на уровне мРНК, что было определено с помощью ПЦР в реальном времени (рис. 5, б), так и на поверхности клеток, что было определено с помощью проточной цитометрии (рис. 5, в), тогда как для T98G наблюдалась противоположная тенденция (рис. 5, б, в). Это говорит о том, что не только клетки разных типов опухолей, но также разные линии одного типа опухоли могут по-разному отвечать на депривацию глутамина.

Депривация глутамина в клетках U87MG и T98G приводит к противоположным эффектам при терапевтических воздействиях. Несмотря на предполагаемую взаимосвязь депривации

глутамина с химиорезистентностью опухолей, в наших экспериментах депривация глутамина не влияла на чувствительность клеток обеих линий к темозоломиду (рис. 6, а). Однако чувствительность клеток к таргетному DR5-специфичному цитокину TRAIL DR5-B существенно отличалась: депривация глутамина сенсibilizировала DR5-B-резистентные клетки U87MG, тогда как исходно DR5-B-чувствительные клетки T98G, напротив, стали более устойчивы к DR5-опосредованной клеточной гибели (рис. 6, б). Подобный гетерогенный ответ клеток U87MG и T98G на DR5-B коррелирует с разнонаправленным изменением экспрессии DR5 и cFLIP в этих клетках (рис. 5). Под действием ингибитора NAMPT GMX1778 также наблюдался контрастный эффект: в отсутствие глутамина повысилась резистентность клеток U87MG, но при этом клетки T98G сенсibilizировались к GMX1778 (рис. 6, в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метаболизм аминокислот, в частности глутамина, играет важную роль в развитии опухолей. В связи с этим исследование влияния депривации глутамина на опухолевые клетки важно как для выявления биохимических процессов, протекающих в опухолях, так и для разработки новых потенциальных методов терапии путём лекарственной депривации аминокислот. В данной работе было исследовано влияние депривации глутамина на две клеточные линии глиобластомы человека, U87MG и T98G, отличающиеся по ряду характеристик. Транскриптомный анализ выявил

исходно более дифференцированный фенотип клеточной линии U87MG по сравнению с T98G. Также данные о дифференциальной активности генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина, из базы данных GSEA MSigDB Reactome Glutamate and Glutamine Metabolism в клетках U87MG относительно T98G (повышенная экспрессия GLUD1 и пониженная экспрессия GOT2, PYCR3, PYCR1, GLUL, RIMKLA) указывали на возможные различия в восприимчивости клеток к депривации глутамина, что и наблюдалось в последующих экспериментах.

В частности, при культивировании в отсутствие глутамина в клетках U87MG, в отличие от T98G, наблюдалось повышение экспрессии маркера стволовых клеток CD133. Это может указывать на процесс дедифференцировки клеток U87MG, что поддерживается рядом исследований. К примеру, в исследовании Pan et al. региональный дефицит глутамина в глубине опухоли приводил к гиперметилированию гистонов и вызывал дедифференцировку опухолевых клеток [6]. Кроме того, была показана дедифференцировка дифференцированных клеток глиобластомы в центральной зоне опухоли в результате гипоксии, что сопровождалось повышением экспрессии маркеров стволовости и закислением коровой области [43, 44]. В целом, процесс дедифференцировки опухолевых клеток при различных воздействиях с активацией генов стволовости и приобретением свойств, подобных свойствам раковых стволовых клеток, описан в литературе [45].

Существуют противоречивые данные относительно влияния глутамина на степень стволовости опухолевых клеток. К примеру, депривация глутамина или ингибирование глутаминазы 1 (GLS1), конвертирующей глутамин в глутамат, снижали экспрессию генов, связанных со стволовостью, в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [46]. Аналогично депривация глутамина ингибировала самообновление опухолевых клеток и снижала экспрессию генов, связанных со стволовостью, в стволовых клетках рака поджелудочной железы [47]. Напротив, в другой работе наблюдалось, что недостаток глутамина в клетках рака яичника и толстой кишки вызывал метаболическое перепрограммирование, приводя к усилению гликолиза, снижению пролиферации и увеличению популяции опухолевых стволовых клеток [48]. Подобные противоречивые эффекты наблюдались нами в линиях U87MG и T98G.

Снижение скорости пролиферации при депривации глутамина в наших экспериментах наблюдалось в обеих линиях, но было сильнее выражено для клеток T98G, чем для U87MG. Имеются данные о различной зависимости скорости роста клеток глиобластомы от глутамина: отсут-

ствие экзогенного глутамина ограничивало пролиферацию клеточных линий глиом D-54 MG, U-118 MG и U-251 MG, но не U-373 MG, D-245 MG и D-259 MG [36]. Позже было показано, что стволовые клетки глиом способны расти независимо от экзогенного глутамина, что связано с повышенной экспрессией в них GLUL [49]. Однако в недавней работе было показано, что опухоль из клеточной линии U87MG, наоборот, является зависимой от глутамина [50], что коррелирует с пониженным уровнем экспрессии GLUL и повышенным уровнем экспрессии GLUD1 (рис. 2, в), также детерминирующей зависимость от глутамина [51]. Это может свидетельствовать об отсутствии в ней популяции стволовых клеток, поддерживая наши выводы о высокой степени дифференцировки U87MG. К сожалению, в клетках T98G не наблюдалось экспрессии CD133, что, однако, не противоречит её более низкой степени дифференцировки, так как степень стволовости и дифференцировки определяется по экспрессии целого ряда маркеров, среди которых CD133 не является наиболее специфическим [45].

Известно, что ингибиторы циклин-зависимых киназ p21^{Waf1} и p27^{KIP1} препятствуют пролиферации и тем самым поддерживают дормантное состояние стволовых клеток и их способность к самообновлению [52]. Следовательно, повышение экспрессии p21^{Waf1} и p27^{KIP1} в клетках U87MG, наряду с повышением CD133, коррелирует с литературными данными, по которым активация p21^{Waf1} и p27^{KIP1} поддерживала дормантное состояние CD133+ стволовых клеток [53]. Это также подтверждает нашу гипотезу о дедифференцировке клеток U87MG при депривации глутамина. При этом в клетках T98G, в отличие от U87MG, повышение экспрессии p21^{Waf1} и p27^{KIP1} не было статистически значимым. Это может быть связано с наличием у них мутации в гене TF p53 [54], поскольку в T98G пролиферация была тем не менее ингибирована с помощью альтернативных механизмов.

Выявленные нами различия между клеточными линиями U87MG и T98G при культивировании в отсутствие глутамина сопровождалось противоположными метаболическими процессами. Наши результаты по исследованию аутофлуоресценции кофермента NADH с помощью метаболического имиджинга на основе FLIM показали сдвиг метаболической активности в сторону гликолиза в клетках U87MG, который был также подтверждён повышением продукции лактата. Этот результат коррелирует с ранее опубликованными данными: например, в недавней работе было показано, что депривация глутамина в клетках колоректального рака и рака поджелудочной железы приводит к закислению лизосом и индукции аутофагии, способствующей выживанию.

Там же был показан метаболический сдвиг в сторону гликолиза при недостатке глутамина с помощью стресс-теста на гликолиз Seahorse™ и с помощью платформы для мультисенсорного клеточного анализа CYRIS® flox [37]. Также было показано усиление гликолиза в качестве адаптивного ответа на недостаток глутамина в клетках глиобластомы [8]. Поскольку ранее было показано переключение метаболической активности в сторону OXPHOS при дифференцировке стволовых [55, 56] и индуцированных плюрипотентных клеток [57, 58], наблюдаемый нами противоположный сдвиг в сторону гликолиза при депривации глутамина в U87MG является независимым подтверждением обратного процесса, т.е. дедифференцировки этих клеток.

В клетках T98G, в отличие от U87MG, метаболические изменения при депривации глутамина были ассоциированы со сдвигом в сторону OXPHOS – как по аутофлуоресценции NADH, так и по снижению продукции лактата. Ранее нами и другими исследователями было показано, что эти изменения коррелируют со стрессовой реакцией клеток в ответ на неблагоприятное воздействие. В частности, сдвиг в сторону OXPHOS является типичной реакцией на воздействие химиопрепаратов, в том числе для клеток глиом [59, 60]. Возможно, разнонаправленные сдвиги в сторону гликолиза либо OXPHOS, наблюдаемые при депривации глутамина в линиях U87MG и T98G соответственно, обусловлены метаболической пластичностью опухолевых клеток, которая может определять чувствительность опухолевых клеток к терапии. К примеру, в метформин-чувствительной линии колоректального рака HT29 наблюдался высокий уровень OXPHOS, тогда как метформин-устойчивые клетки линии SW620 имели низкий уровень OXPHOS, но при депривации глутамина приобретали чувствительность к метформину [61]. Также есть данные о противоположном влиянии глутамина на чувствительность клеток

нейробластомы к химиопрепаратам: депривация глутамина подавляла апоптоз, индуцированный этопозидом, но стимулировала апоптоз, индуцированный цисплатином [62].

С учётом этих данных на следующем этапе работы была исследована чувствительность линий U87MG и T98G к терапевтическим воздействиям препаратами различной природы: конвенциональным препаратом темозоломидом, DR5-специфичным цитокином TRAIL DR5-B и таргетным ингибитором NAMPT. Депривация глутамина не оказывала влияния на чувствительность ни клеток U87MG, ни T98G к темозоломиду, но при этом существенно изменялась чувствительность обеих линий к двум другим таргетным препаратам.

Клетки U87MG исходно резистентны к цитокину TRAIL DR5-B, в отличие от T98G, что коррелирует с их высокой степенью дифференцировки, т.к. известно, что по мере дифференцировки клеток снижается поверхностная экспрессия рецепторов смерти TRAIL [63, 64]. В соответствии с этим, при депривации глутамина в клетках U87MG наблюдалось повышение экспрессии DR5 и усиление DR5-опосредованной клеточной гибели, хотя сенсibiliзирующий эффект не был ярко выражен, по-видимому, за счёт повышения cFLIP либо из-за наличия мутации в гене, кодирующем фосфатазу PTEN [54]. Эти результаты коррелируют с данными о повышении чувствительности клеток рака молочной железы (PMЖ) [65] и рака поджелудочной железы к TRAIL-опосредованному апоптозу при депривации глутамина [42]. Аналогично острая депривация глутамина вызывала апоптоз опухолевых клеток, запускаемый CD95-опосредованным каспазным каскадом [66]. Однако следует заметить, что клеточная линия T98G, исходно высокочувствительная к DR5-опосредованной клеточной гибели, напротив, в отсутствие глутамина становилась более устойчивой к DR5-B, что сопровождалось снижением экспрессии DR5. Интересно, что похожие результаты были ранее

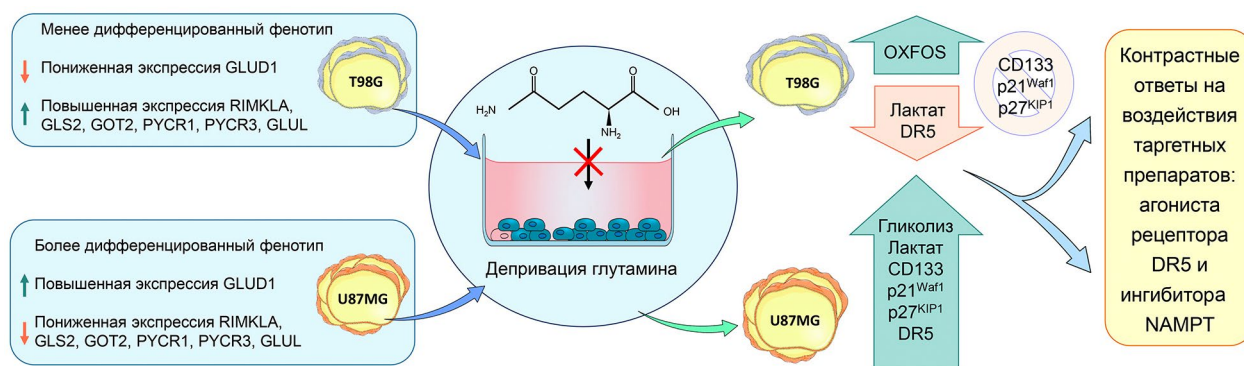


Рис. 7. Схематическое изображение противоположных эффектов, наблюдаемых в клеточных линиях глиобластомы человека U87MG и T98G при депривации глутамина

получены на линиях РМЖ: депривация глутамина в клетках трижды негативного РМЖ с базальным (мезенхимным) фенотипом увеличивала их чувствительность к TRAIL, тогда как линии клеток РМЖ с люминальным фенотипом были рефрактерны к сенсibilизации к TRAIL при депривации глутамина [67]. Поскольку сигнальный путь TRAIL играет важную роль в иммунологическом надзоре за опухолевыми клетками, наши результаты дополняют известный факт, что метаболизм глутамина может модулировать противоопухолевый иммунный ответ [68].

NAMPT также является перспективной мишенью в глиобластоме: в частности, её экспрессия коррелирует со степенью стволовости глиобластомы и прогнозом для пациентов [69]. Поскольку глутамин является одним из источников NAD(P)H [3], а NAMPT является лимитирующей стадией биосинтеза NAD, катализируя образование его промежуточного продукта никотинамидмононуклеотида, очевидно, что эти метаболические пути взаимосвязаны. Свежие данные говорят о том, что одновременное лекарственное ингибирование глутаминализа и синтеза NAD может быть успешной стратегией терапии рака [70]. Как и в случае с TRAIL DR5-B, при культивировании в отсутствие глутамина в клетках U87MG и T98G также наблюдались контрастные эффекты: клетки T98G сенсibilизировались к ингибитору NAMPT GMX1778, тогда как U87MG приобретали устойчивость. Этот результат коррелирует с опубликованными данными о том, что устойчивость опухолевых клеток к ингибитору NAMPT связана со сдвигом в сторону гликолиза [71], который мы наблюдали в клетках U87MG. Важно отметить, что изменения чувствительности клеток U87MG и T98G к GMX1778 при депривации глутамина были противоположны изменениям чувствительности к DR5-опосредованной клеточной гибели, однако механизмы данного явления ещё предстоит изучить.

Схематическое изображение эффектов, наблюдаемых в клеточных линиях U87MG и T98G при депривации глутамина, показано на рис. 7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере двух клеточных линий, U87MG и T98G, была показана фенотипическая и метаболическая гетерогенность клеток глиобластомы человека. При депривации глутамина различия этих клеточных линий в исходной степени дифференцировки и метаболическая пластичность послужили причиной разнонаправленных метаболических изменений и контрастных ответов на воздействия различными таргетными препаратами. Наши данные в перспективе послужат эффективному подбору пациентов, способных ответить на различные виды таргетной терапии, на основании фенотипического и метаболического статуса опухоли. Кроме того, полученные результаты могут помочь выявлению механизмов резистентности опухолей, ассоциированных с метаболизмом глутамина, и способствовать разработке схем лекарственной депривации глутамина для усиления эффективности противоопухолевой терапии.

Вклад авторов. А.В. Яголович – концепция и руководство работой; А.А. Исакова, Д.В. Мазур, К.С. Краснов, И.Н. Дружкова, А.М. Можеров – проведение экспериментов; Н.В. Антипова, И.Н. Дружкова, Р.С. Фадеев, М.Э. Гаспарян – обсуждение результатов исследования; А.В. Яголович – написание текста; М.Э. Гаспарян – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 24-24-00222, <https://rscf.ru/project/24-24-00222/>.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность Д.Н. Казюлькину, А.В. Куркину за предоставленный GMX1778 и В.В. Татарскому за предоставленные праймеры, а также Б.В. Черняку и М.В. Ширмановой за ценные комментарии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bergström, J., Fürst, P., Norée, L. O., and Vinnars, E. (1974) Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue, *J. Appl. Physiol.*, **36**, 693-697, <https://doi.org/10.1152/jappl.1974.36.6.693>.
2. Yang, L., Venneti, S., and Negrath, D. (2017) Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism, *Annu. Rev. Biomed. Engin.*, **19**, 163-194, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>.
3. DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., et al. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19345-19350, <https://doi.org/10.1073/pnas.0709747104>.
4. Shanware, N. P., Bray, K., Eng, C. H., Wang, F., Follettie, M., et al. (2014) Glutamine deprivation stimulates mTOR-JNK-dependent chemokine secretion, *Nat. Commun.*, **5**, 4900, <https://doi.org/10.1038/ncomms5900>.

5. Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., and Lazebnik, Y. (2007) Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells, *J. Cell Biol.*, **178**, 93-105, <https://doi.org/10.1083/jcb.200703099>.
6. Pan, M., Reid, M. A., Lowman, X. H., Kulkarni, R. P., Tran, T. Q., et al. (2016) Regional glutamine deficiency in tumours promotes dedifferentiation through inhibition of histone demethylation, *Nat. Cell Biol.*, **18**, 1090-1101, <https://doi.org/10.1038/ncb3410>.
7. Márquez, J., Alonso, F. J., Matés, J. M., Segura, J. A., Martín-Rufián, M., et al. (2017) Glutamine addiction in gliomas, *Neurochem. Res.*, **42**, 1735-1746, <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2212-1>.
8. Yin, H., Liu, Y., Dong, Q., Wang, H., Yan, Y., et al. (2024) The mechanism of extracellular CypB promotes glioblastoma adaptation to glutamine deprivation microenvironment, *Cancer Lett.*, 216862, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216862>.
9. Jia, J. L., Alshamsan, B., and Ng, T. L. (2023) Temozolomide chronotherapy in glioma: a systematic review, *Curr. Oncol.*, **30**, 1893-1902, <https://doi.org/10.3390/curroncol30020147>.
10. Kuijlen, J. M., Mooij, J. J. A., Platteel, I., Hoving, E. W., Van Der Graaf, W. T., et al. (2006) TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma multiforme, *J. Neuro. Oncol.*, **78**, 161-171, <https://doi.org/10.1007/s11060-005-9081-1>.
11. Thang, M., Mellowes, C., Mercer-Smith, A., Nguyen, P., and Hingtgen, S. (2023) Current approaches in enhancing TRAIL therapies in glioblastoma, *Neuro Oncol. Adv.*, **5**, vdad047, <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad047>.
12. Galli, U., Colombo, G., Travelli, C., Tron, G. C., Genazzani, A. A., and Grolla, A. A. (2020) Recent advances in NAMPT inhibitors: a novel immunotherapeutic strategy, *Front. Pharmacol.*, **11**, 656, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00656>.
13. Fung, M. K. L., and Chan, G. C.-F. (2017) Drug-induced amino acid deprivation as strategy for cancer therapy, *J. Hematol. Oncol.*, **10**, 144, <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0509-9>.
14. Jin, J., Byun, J.-K., Choi, Y.-K., and Park, K.-G. (2023) Targeting glutamine metabolism as a therapeutic strategy for cancer, *Exp. Mol. Med.*, **55**, 706-715, <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00971-9>.
15. Jezierzański, M., Nafalska, N., Stopyra, M., Furgoń, T., Miciak, M., et al. (2024) Temozolomide (TMZ) in the treatment of glioblastoma multiforme – a literature review and clinical outcomes, *Curr. Oncol.*, **31**, 3994-4002, <https://doi.org/10.3390/curroncol31070296>.
16. Gasparian, M. E., Chernyak, B. V., Dolgikh, D. A., Yagolovich, A. V., Popova, E. N., et al. (2009) Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, *Apoptosis*, **14**, 778-787, <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0349-3>.
17. Watson, M., Roulston, A., Bélec, L., Billot, X., Marcellus, R., Bédard, D., Bernier, C., Branchaud, S., et al. (2009) The small molecule GMX1778 is a potent inhibitor of NAD⁺ biosynthesis: strategy for enhanced therapy in nicotinic acid phosphoribosyltransferase 1-deficient tumors, *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 5872-5888, <https://doi.org/10.1128/MCB.00112-09>.
18. Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, **15**, 550, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
19. Liberzon, A., Subramanian, A., Pinchback, R., Thorvaldsdóttir, H., Tamayo, P., and Mesirov, J. P. (2011) Molecular signatures database (MSigDB) 3.0, *Bioinformatics*, **27**, 1739-1740, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr260>.
20. Fang, Z., Liu, X., and Peltz, G. (2023) GSEApY: a comprehensive package for performing gene set enrichment analysis in Python, *Bioinformatics*, **39**, btac757, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac757>.
21. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., et al. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology, *Nat. Genet.*, **25**, 25-29, <https://doi.org/10.1038/75556>.
22. Kanehisa, M. (2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 27-30, <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
23. Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., et al. (2022) The reactome pathway knowledgebase 2022, *Nucleic Acids Res.*, **50**, D687-D692, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1028>.
24. Martens, M., Ammar, A., Riutta, A., Waagmeester, A., Slenter, D. N., et al. (2021) WikiPathways: connecting communities, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D613-D621, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1024>.
25. Schaefer, C. F., Anthony, K., Krupa, S., Buchoff, J., Day, M., et al. (2009) PID: the pathway interaction database, *Nucleic Acids Res.*, **37**, D674-D679, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn653>.
26. Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., et al. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals, *Nature*, **434**, 338-345, <https://doi.org/10.1038/nature03441>.
27. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Methodological)*, **57**, 289-300, <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.

28. Yagolovich, A. V., Artykov, A. A., Dolgikh, D. A., Kirpichnikov, M. P., and Gasparian, M. E. (2019) A new efficient method for production of recombinant antitumor cytokine TRAIL and its receptor-selective variant DR5-B, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 627-636, <https://doi.org/10.1134/S0006297919060051>.
29. Suárez-Álvarez, B., Rodríguez, R. M., Calvanese, V., Blanco-Gelaz, M. A., Suhr, S. T., et al. (2010) Epigenetic mechanisms regulate MHC and antigen processing molecules in human embryonic and induced pluripotent stem cells, *PLoS One*, **5**, e10192, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010192>.
30. Vagaska, B., New, S. E. P., Alvarez-Gonzalez, C., D'Acquisto, F., Gomez, S. G., et al. (2016) MHC-class-II are expressed in a subpopulation of human neural stem cells *in vitro* in an IFN γ -independent fashion and during development, *Sci. Rep.*, **6**, 24251, <https://doi.org/10.1038/srep24251>.
31. Liu, R., Zeng, L.-W., Li, H.-F., Shi, J.-G., Zhong, B., et al. (2023) PD-1 signaling negatively regulates the common cytokine receptor γ chain via MARCH5-mediated ubiquitination and degradation to suppress anti-tumor immunity, *Cell Res.*, **33**, 923-939, <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00890-4>.
32. Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., and Han, J. M. (2020) Glutamine reliance in cell metabolism, *Exp. Mol. Med.*, **52**, 1496-1516, <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8>.
33. Yang, S., Hwang, S., Kim, M., Seo, S. B., Lee, J.-H., et al. (2018) Mitochondrial glutamine metabolism via GOT2 supports pancreatic cancer growth through senescence inhibition, *Cell Death Dis.*, **9**, 55, <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0089-1>.
34. Li, Y., Bie, J., Song, C., Liu, M., and Luo, J. (2021) PYCR, a key enzyme in proline metabolism, functions in tumorigenesis, *Amino Acids*, **53**, 1841-1850, <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03047-y>.
35. Lodder-Gadaczek, J., Becker, I., Gieselmann, V., Wang-Eckhardt, L., and Eckhardt, M. (2011) N-acetylasparylglutamate synthetase II synthesizes N-acetylasparylglutamylglutamate, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16693-16706, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230136>.
36. Dranoff, G., Elion, G. B., Friedman, H. S., Campbell, G. L., and Bigner, D. D. (1985) Influence of glutamine on the growth of human glioma and medulloblastoma in culture, *Cancer Res.*, **45**, 4077-4081.
37. Lengauer, F., Geisslinger, F., Gabriel, A., Von Schwarzenberg, K., Vollmar, A. M., et al. (2023) A metabolic shift toward glycolysis enables cancer cells to maintain survival upon concomitant glutamine deprivation and V-AT-Pase inhibition, *Front. Nutr.*, **10**, 1124678, <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1124678>.
38. Blacker, T. S., and Duchon, M. R. (2016) Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence, *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 53-65, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010>.
39. Kolenc, O. I., and Quinn, K. P. (2019) Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD, *Antioxid. Redox Signal.*, **30**, 875-889, <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7451>.
40. Skala, M. C., Ricking, K. M., Bird, D. K., Gendron-Fitzpatrick, A., Eickhoff, J., Eliceiri, K. W., Keely, P. J., and Ramanujam, N. (2007) *In vivo* multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia, *J. Biomed. Optics*, **12**, 024014, <https://doi.org/10.1117/1.2717503>.
41. Song, A., Zhao, N., Hilpert, D. C., Perry, C., Baur, J. A., et al. (2024) Visualizing subcellular changes in the NAD(H) pool size versus redox state using fluorescence lifetime imaging microscopy of NADH, *Commun. Biol.*, **7**, 428, <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06123-7>.
42. Kim, J. H., Lee, J., Im, S. S., Kim, B., Kim, E.-Y., et al. (2024) Glutamine-mediated epigenetic regulation of cFLIP underlies resistance to TRAIL in pancreatic cancer, *Exp. Mol. Med.*, **56**, 1013-1026, <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01231-0>.
43. Li, P., Zhou, C., Xu, L., and Xiao, H. (2013) Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an *in vitro* study, *Int. J. Med. Sci.*, **10**, 399-407, <https://doi.org/10.7150/ijms.5407>.
44. Larionova, T. D., Bastola, S., Aksinina, T. E., Anufrieva, K. S., Wang, J., et al. (2022) Alternative RNA splicing modulates ribosomal composition and determines the spatial phenotype of glioblastoma cells, *Nat. Cell Biol.*, **24**, 1541-1557, <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00994-w>.
45. Najafi, M., Farhood, B., and Mortezaee, K. (2019) Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 8381-8395, <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>.
46. Li, B., Cao, Y., Meng, G., Qian, L., Xu, T., et al. (2019) Targeting glutaminase 1 attenuates stemness properties in hepatocellular carcinoma by increasing reactive oxygen species and suppressing Wnt/beta-catenin pathway, *EBioMedicine*, **39**, 239-254, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.063>.
47. Li, D., Fu, Z., Chen, R., Zhao, X., Zhou, Y., et al. (2015) Inhibition of glutamine metabolism counteracts pancreatic cancer stem cell features and sensitizes cells to radiotherapy, *Oncotarget*, **6**, 31151-31163, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5150>.
48. Prasad, P., Ghosh, S., and Roy, S. S. (2021) Glutamine deficiency promotes stemness and chemoresistance in tumor cells through DRP1-induced mitochondrial fragmentation, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 4821-4845, <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03818-6>.

49. Tardito, S., Oudin, A., Ahmed, S. U., Fack, F., Keunen, O., et al. (2015) Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1556-1568, <https://doi.org/10.1038/ncb3272>.
50. Wang, L., Han, Y., Gu, Z., Han, M., Hu, C., et al. (2023) Boosting the therapy of glutamine-addiction glioblastoma by combining glutamine metabolism therapy with photo-enhanced chemodynamic therapy, *Biomater. Sci.*, **11**, 6252-6266, <https://doi.org/10.1039/D3BM00897E>.
51. Wang, Q., Wu, M., Li, H., Rao, X., Ao, L., et al. (2022) Therapeutic targeting of glutamate dehydrogenase 1 that links metabolic reprogramming and Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition in drug-resistant lung cancer, *Pharmacol. Res.*, **185**, 106490, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106490>.
52. Ezoe, S., Matsumura, I., Satoh, Y., Tanaka, H., and Kanakura, Y. (2004) Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells, *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **3**, 314-318.
53. Wei, Y., Chen, Q., Huang, S., Liu, Y., Li, Y., et al. (2022) The interaction between DNMT1 and high-mannose CD133 maintains the slow-cycling state and tumorigenic potential of glioma stem cell, *Adv. Sci.*, **9**, 2202216, <https://doi.org/10.1002/adv.202202216>.
54. Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Tada, M., Sawamura, Y., et al. (1999) Frequent co-alterations of *TP53*, *p16/CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *PTEN* tumor suppressor genes in human glioma cell lines, *Brain Pathol.*, **9**, 469-479, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00536.x>.
55. Wanet, A., Arnould, T., Najimi, M., and Renard, P. (2015) Connecting mitochondria, metabolism, and stem cell fate, *Stem Cells Dev.*, **24**, 1957-1971, <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0117>.
56. Pattappa, G., Heywood, H. K., De Bruijn, J. D., and Lee, D. A. (2011) The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation, *J. Cell. Physiol.*, **226**, 2562-2570, <https://doi.org/10.1002/jcp.22605>.
57. Rodimova, S. A., Meleshina, A. V., Kalabusheva, E. P., Dashinimaev, E. B., Reunov, D. G., et al. (2019) Metabolic activity and intracellular pH in induced pluripotent stem cells differentiating in dermal and epidermal directions, *Methods Appl. Fluores.*, **7**, 044002, <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab3b3d>.
58. Rodimova, S., Mozherov, A., Elagin, V., Karabut, M., Shchechkin, I., et al. (2023) FLIM imaging revealed spontaneous osteogenic differentiation of stem cells on gradient pore size tissue-engineered constructs, *Stem Cell Res. Ther.*, **14**, 81, <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03307-6>.
59. Morelli, M., Lessi, F., Barachini, S., Liotti, R., Montemurro, N., et al. (2022) Metabolic-imaging of human glioblastoma live tumors: a new precision-medicine approach to predict tumor treatment response early, *Front. Oncol.*, **12**, 969812, <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.969812>.
60. Yuzhakova, D. V., Sachkova, D. A., Shirmanova, M. V., Mozherov, A. M., Izosimova, A. V., et al. (2023) Measurement of patient-derived glioblastoma cell response to temozolomide using fluorescence lifetime imaging of NAD(P)H, *Pharmaceuticals*, **16**, 796, <https://doi.org/10.3390/ph16060796>.
61. Kim, J. H., Lee, K. J., Seo, Y., Kwon, J.-H., Yoon, J. P., et al. (2018) Effects of metformin on colorectal cancer stem cells depend on alterations in glutamine metabolism, *Sci. Rep.*, **8**, 409, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18762-4>.
62. Valter, K., Chen, L., Kruspig, B., Maximchik, P., Cui, H., et al. (2017) Contrasting effects of glutamine deprivation on apoptosis induced by conventionally used anticancer drugs, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1864**, 498-506, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.016>.
63. Siegmund, D., Lang, I., and Wajant, H. (2017) Cell death-independent activities of the death receptors CD 95, TRAILR 1, and TRAILR 2, *FEBS J.*, **284**, 1131-1159, <https://doi.org/10.1111/febs.13968>.
64. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018, *Cell Death Differ.*, **25**, 486-541, <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
65. Dilshara, M. G., Jeong, J.-W., Prasad Tharanga Jayasooriya, R. G., Neelaka Molagoda, I. M., Lee, S., et al. (2017) Glutamine deprivation sensitizes human breast cancer MDA-MB-231 cells to TRAIL-mediated apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **485**, 440-445, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.059>.
66. Fumarola, C., Zerbini, A., and Guidotti, G. G. (2001) Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis, *Cell Death Differ.*, **8**, 1004-1013, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400902>.
67. Mauro-Lizcano, M., and López-Rivas, A. (2018) Glutamine metabolism regulates FLIP expression and sensitivity to TRAIL in triple-negative breast cancer cells, *Cell Death Dis.*, **9**, 205, <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0263-0>.
68. Wang, B., Pei, J., Xu, S., Liu, J., and Yu, J. (2024) A glutamine tug-of-war between cancer and immune cells: recent advances in unraveling the ongoing battle, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **43**, 74, <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02994-0>.
69. Lucena-Cacace, A., Otero-Albiol, D., Jiménez-García, M. P., Peinado-Serrano, J., and Carnero, A. (2017) NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis, *Oncotarget*, **8**, 99514-99530, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20577>.

70. Hasan Bou Issa, L., Fléchon, L., Laine, W., Ouelkdite, A., Gaggero, S., et al. (2024) MYC dependency in GLS1 and NAMPT is a therapeutic vulnerability in multiple myeloma, *iScience*, **27**, 109417, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109417>.
71. Thongon, N., Zucal, C., D'Agostino, V. G., Tebaldi, T., Ravera, S., et al. (2018) Cancer cell metabolic plasticity allows resistance to NAMPT inhibition but invariably induces dependence on LDHA, *Cancer Metab.*, **6**, 1, <https://doi.org/10.1186/s40170-018-0174-7>.

GLIOBLASTOMA SENSITIZATION TO THERAPEUTIC EFFECTS BY GLUTAMINE DEPRIVATION DEPENDS ON CELLULAR PHENOTYPE AND METABOLISM

A. A. Isakova^{1,2}, I. N. Druzhkova³, A. M. Mozherov³, D. V. Mazur¹, N. V. Antipova¹, K. S. Krasnov⁴, R. S. Fadeev⁴, M. E. Gasparian¹, and A. V. Yagolovich^{2*}

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: annevayagolovich@gmail.com

³ Privolzhsky Research Medical University, 603081 Nizhny Novgorod, Russia

⁴ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Glutamine plays an important role in tumor metabolism. It is known that the core region of the solid tumors is deprived of glutamine which affects tumor growth and spread. Here we investigated the effect of glutamine deprivation on cellular metabolism and sensitivity of human glioblastoma cells U87MG and T98G to drugs of various origin: alkylating cytostatic agent temozolomide; cytokine TRAIL DR5-B – agonist of the DR5 receptor; and GMX1778 – a targeted inhibitor of the enzyme nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), limiting NAD biosynthesis. Bioinformatics analysis of the cell transcriptomes showed that U87MG cells have a more differentiated phenotype than T98G, and also differ in the expression profile of genes associated with glutamine metabolism. Upon glutamine deprivation, the growth rate of U87MG and T98G cells decreased. Analysis of cellular metabolism by FLIM microscopy of NADH as well as assessment of the lactate content in the medium showed that glutamine deprivation shifted the metabolic status of U87MG cells towards glycolysis. This was accompanied by an increase in the expression of the stemness marker CD133, which collectively may indicate the de-differentiation of these cells. At the same time, we observed an increase in both the expression of DR5 receptor and the sensitivity of U87MG cells to DR5-B. On the contrary, glutamine deprivation of T98G cells induced a metabolic shift towards oxidative phosphorylation, a decrease in DR5 expression and resistance to DR5-B. The effects of NAMPT inhibition also differed across two cell lines and were opposite to those of DR5-B: upon glutamine deprivation, U87MG cells acquired resistance, while T98G cells were sensitized to GMX1778. Thus, phenotypic and metabolic differences between two human glioblastoma cell lines resulted in divergent metabolic changes and contrasting responses to different targeted drugs during glutamine deprivation. These data should be considered when developing treatment strategies for glioblastoma via drug deprivation of amino acids, as well as when exploring novel therapeutic targets.

Keywords: glutamine deprivation, glioblastoma, cell differentiation, CD133, TRAIL, DR5, NAD(P)H, FLIM microscopy, NAMPT, GMX1778

МИОГЕННЫЕ КЛАССИЧЕСКИЕ ЭНДОКАННАБИНОИДЫ, ИХ МИШЕНИ И АКТИВНОСТЬ

Обзор

© 2024 О.П. Балезина, Е.О. Тарасова*, П.О. Богачева

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: cate1990@list.ru

Поступила в редакцию 16.04.2024

После доработки 20.09.2024

Принята к публикации 23.09.2024

Обзор посвящён рассмотрению необычной активности двух классических эндоканнабиноидов (ЭК) – 2-арахидоноилглицерина (2-АГ) и арахидонилэтаноламида (АЭА) или анандамида – при их синтезе и высвобождении из скелетной мускулатуры, т.е. действию пула мио-эндоканнабиноидов (миоЭК). Влияние данного пула рассматривается на трёх разных уровнях: на уровне скелетной мышцы, моторных синапсов, а также на уровне целого организма, включая структуры центральной нервной системы. При этом особое внимание уделяется малоизвестной, до сих пор значительно недооценённой и интригующей способности миоЭК оказывать позитивное влияние на энергообмен и сократительную активность мышечных волокон, а также на секрецию медиатора в моторных синапсах. Рассмотрена роль мышечных сокращений как регулятора баланса активности ферментов синтеза и деградации миоЭК, их высвобождения и специфических эффектов. Обсуждаются набирающие популярность гипотезы о выбросе именно миоЭК (АЭА и/или 2-АГ) как причине подъёма общего уровня ЭК в крови при мышечных нагрузках, приводящего к развитию «эйфории бегуна», а также роли миоЭК в коррекции ряда психофизиологических состояний (болевого синдрома, стресса и др.). В результате в обзоре впервые представлены сведения о пуле миоЭК с точки зрения его возможной самостоятельной и нетривиальной регуляторной роли в организме в отличие от традиционной и общеизвестной активности нейрогенных ЭК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эндоканнабиноиды мышц, каннабиноидные рецепторы, выброс эндоканнабиноидов из мышц, базальная концентрация эндоканнабиноидов.

DOI: 10.31857/S0320972524100055 EDN: IPVGNJN

ВВЕДЕНИЕ

В конце XX – начале XXI века в нервной, а также других тканях животных и человека были обнаружены животные аналоги фитоканнабиноидов (каннабиноидов растительного происхождения), получившие название эндоканнабиноидов (ЭК). Ими оказалась специфическая группа

липофильных сигнальных молекул, образуемых путём ферментативного расщепления фосфолипидов клеточных мембран. Наиболее изученными на сегодня являются два основных ЭК – это 2-арахидоноилглицерин (2-АГ) и арахидонилэтаноламид (АЭА) или анандамид. Описаны пути их ферментативного синтеза и деградации, возможности высвобождения из нейронов и других

Принятые сокращения: 2-АГ – 2-арахидоноилглицерин; АЭА – арахидонилэтаноламид (анандамид); АХ – ацетилхолин; КГРП – кальцитонин-ген-родственный пептид; МПКП – миниатюрные потенциалы концевой пластинки; СІР – саркоплазматический ретикулум; ЭК – эндоканнабиноиды; миоЭК – миогенные эндоканнабиноиды; ЭМС – электромеханическое сопряжение; BDNF – нейротрофический фактор мозга; СВ – каннабиноидные рецепторы; DAGL – диацилглицеринлипаза; FAAH – гидролаза амидов жирных кислот; GPRXX – орфанные рецепторы, сопряжённые с G-белком; MAGL – моноацилглицеринлипаза; NAPE-PLD – N-ацилфосфатидилэтаноламин-специфическая фосфолипаза D; PKA – протеинкиназа A; PLC – фосфолипаза C; PPAR – рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором; TRPV1 – каналы транзитного рецепторного потенциала ванилоидного типа 1.

* Адресат для корреспонденции.

клеток, а также специфика их действия на каннабиноидные рецепторы (СВ), среди которых наиболее известны два типа, СВ1 и СВ2. Присутствие рецепторов к ЭК было показано на нервных терминалах и на других участках нейронов, а также на нейроглии и клетках целого ряда других тканей и органов [1].

Наиболее известна активность ЭК в ЦНС. Установлено, что в синапсах ЦНС АЭА и 2-АГ синтезируются и высвобождаются из постсинаптических структур «*on demand*» (по требованию), т.е. в ответ на срабатывание синапса и постсинаптическое действие медиатора. После высвобождения из постсинаптических структур ЭК действуют на пресинаптические СВ-рецепторы, вызывая ретроградное торможение секреции медиаторов [2].

Однако в настоящее время доказана возможность синтеза, высвобождения и рецепции (с участием рецепторов СВ1- и СВ2-типа) ЭК не только в нервной системе, но и в других тканях, включая жировую ткань, железы, клетки крови, иммунной системы, скелетной мускулатуры, где также находятся специальные ферменты, метаболизирующие ЭК [3–5]. Описаны суточные колебания уровня ЭК в крови человека и животных, его возрастание при стрессе, ожирении [6–10], определённых видах мышечной нагрузки, при мышечных и других патологиях [11–13]. Вопрос о клеточных источниках, формирующих системный пул ЭК в крови, и его предназначении при разных условиях функционирования организма остаётся малоизученным.

Скелетная мускулатура, составляющая до 40% всей массы организма человека, представляет в этой связи особый интерес как возможный источник ЭК [11]. Обнаруженная в последние два десятилетия способность скелетных мышц осуществлять не только сократительную, но и весьма существенную секреторную активность привела к выявлению широкого спектра сигнальных молекул (миокинов), синтезирующихся в мышцах и высвобождающихся во внеклеточную среду и кровь. В последние годы список миогенно секретруемых белковых и других по своей химической природе молекул вырос до нескольких сотен наименований [14].

Неожиданно среди них были выявлены и ЭК [14, 15], обозначенные в данном обзоре как миоэндоканнабиноиды (миоЭК), среди которых 2-АГ, АЭА и родственные им соединения [16]. Установлено, что эти миоЭК могут синтезироваться и расщепляться с помощью специальных ферментов, экспрессия которых была показана в мышцах наряду с экспрессией СВ-рецепторов [17, 18]. При этом уровень и влияние миоЭК на мышечные волокна и другие мишени способны меняться в зависимости от режимов активности мышц [19, 20]

и их патологий [16, 21]. Несмотря на это открытие и неизменно высокий интерес к каннабиноидам с целью их использования для коррекции различных функциональных состояний [22–24], роль миоЭК как отдельного пула в системе эндогенных каннабиноидов, способного к самостоятельной разнообразной регуляторной активности на региональном и системном уровнях организма, до сих пор не была специально рассмотрена в обзорах, посвящённых центральному [1, 2] либо периферическому [11, 24–26] эффектам ЭК. В связи с этим цель данного обзора – суммировать полученные в последние годы сведения о свойствах и эффектах миоЭК и представить их специфическую активность и механизмы действия на разных уровнях организма с учётом известных сегодня мембранных и внутриклеточных мишеней ЭК.

ФЕРМЕНТЫ СИНТЕЗА И ДЕГРАДАЦИИ МИОЭНДОКАННАБИНОИДОВ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ

В последние десятилетия в мышечной ткани удалось обнаружить специфические ферменты, управляющие синтезом и деградацией двух наиболее известных эндоканнабиноидов, 2-АГ и АЭА. Известно, что их синтез в нейронах и других клетках может происходить посредством образования этих молекул из фосфолипидов мембраны с участием специфических липид-превращающих ферментов. К ним относятся диацилглицеринлипазы (DAGL), а также специфические фосфолипазы, и среди них в первую очередь фосфолипаза D (PLD), расщепляющая N-ацилфосфатидилэтаноламины (NAPE) мембран. Расщепление ЭК производят моноацилглицеринлипаза (MAGL) либо гидролаза амидов жирных кислот (FAAH) (рис. 1). Выяснилось, что 2-АГ и АЭА имеют принципиально разные пути синтеза и метаболизма [27]. 2-АГ синтезируется с участием DAGL и метаболизируется преимущественно с помощью MAGL. В свою очередь, АЭА преимущественно синтезируется системой NAPE-PLD и расщепляется при помощи FAAH [2, 28, 29].

Использование иммуоблоттинга и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ ПЦР) позволило установить наличие ферментов синтеза и деградации ЭК (DAGLα и -β, NAPE-PLD, MAGL и FAAH) в скелетной мускулатуре человека и грызунов [17, 18]. При этом синтез миоЭК в мускулатуре не исчерпывается двумя классическими ЭК – АЭА и 2-АГ. Аналогичным синтезу АЭА путём образуются и структурные аналоги АЭА, из которых в мускулатуре наиболее известны такие родственные соединения, как пальмитоилэтаноламид (ПЭА) и олеоилэтаноламид (ОЭА).

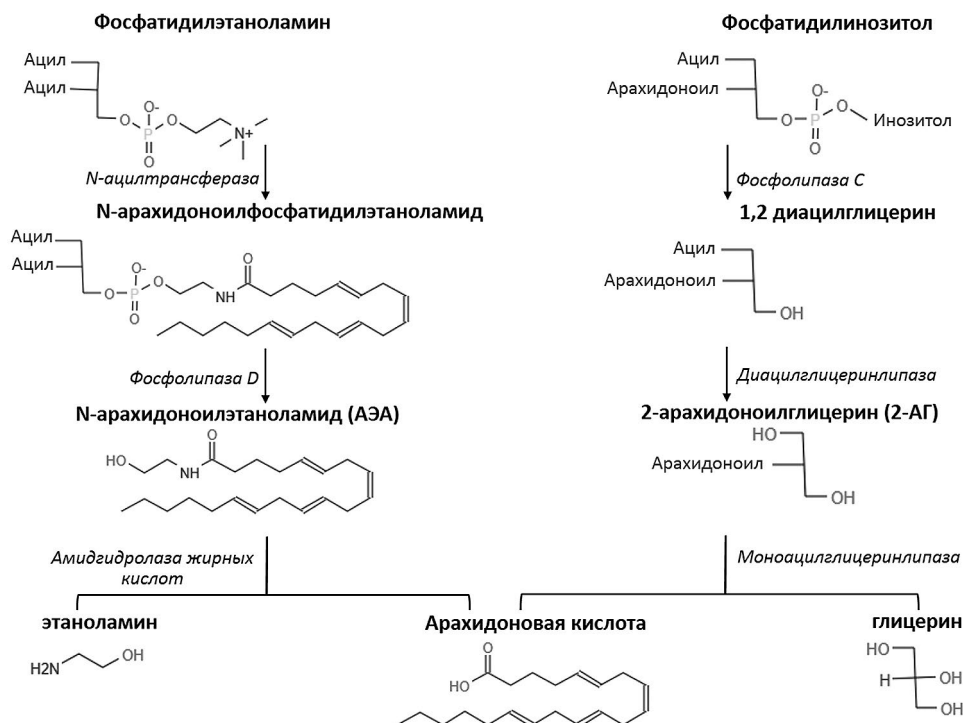


Рис. 1. Схема основных путей синтеза и деградации АЭА и 2-АГ

Они могут высвобождаться из мышц одновременно с АЭА и 2-АГ [16], хотя и в меньших количествах. Свои физиологические эффекты они проявляют, минуя CB1- или CB2-рецепторы, действуя преимущественно как эндогенные агонисты рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPAR), или TRPV1-рецепторов [11, 30].

При помощи жидкостной хроматографии было определено содержание ЭК и родственных им соединений в скелетной мускулатуре 56 пациентов. Наблюдался значительный разброс индивидуальных данных, а усредненные показатели у испытуемых разного пола в дневное время суток составили: АЭА – $1,5 \pm 0,8$ пикомоль/г; ОЭА – $30,4 \pm 22,0$ пикомоль/г; 2-АГ – $723,4 \pm 392,7$ пико-

моль/г [31]. Анализ содержания тех же миоЭК (2-АГ и АЭА) и родственных им соединений (ОЭА и ПЭА) в мускулатуре взрослых крыс также выявил, что относительное содержание 2-АГ и АЭА отличалось в быстрой и медленной мышцах в 2–4 раза, а уровень родственных соединений (ПЭА и ОЭА) был значительно ниже и мало отличался в разных типах мышц [16].

В настоящее время определена экспрессия мРНК ферментов синтеза и деградации эндоканнабиноидов в целом ряде тканей, среди которых первое место занимает жировая ткань и ткани мозга (табл. 1). Но и в скелетных мышцах животных и человека выявлен достаточно высокий уровень экспрессии мРНК ферментов, ответственных

Таблица 1. Экспрессия мРНК ферментов синтеза и деградации ЭК в разных тканях

Ткань	Экспрессия мРНК, нТНМ (нормализованные транскрипты на миллион)				
	MAGL	DAGL α	DAGL β	FAAH	NAPE-PLD
Нервная ткань (кора больших полушарий)	121,0	17,3	12,3	20,4	11,7
Жировая ткань	165,9	1,7	7,0	7,3	1,9
Сердечная мышца	98,2	1,8	5,4	4,8	3,8
Скелетная мышца	60,9	1,2	12,8	9,2	2,3

Примечание. Таблица составлена по данным The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>). DAGL – диацилглицеринлипаза; FAAH – гидролаза амидов жирных кислот; MAGL – моноацилглицеринлипаза; NAPE-PLD – N-ацилфосфатидилэтаноламин-специфическая фосфолипаза D.

за синтез АЭА и 2-АГ (соответственно NAPE-PLD и DAGL), а также экспрессии мРНК ферментов деградации (соответственно FAAH и MAGL) (табл. 1).

Установлено также, что уровень экспрессии мРНК ферментов метаболизма 2-АГ и АЭА в мышцах, как и содержание самих миоЭК и родственных им соединений, может меняться при изменениях режимов двигательной активности мышц [19] и при определённых патологических состояниях скелетной мускулатуры или организма: ожирении, других изменениях липидного обмена [16], патологиях типа миодистрофии Дюшенна [21]. Недавно в опытах *in vitro* и *in vivo* у крыс при старении и развитии старческой саркопении установлены изменения экспрессии мРНК ферментов синтеза 2-АГ и АЭА, которые различались в разных типах мышц, и эти различия коррелировали с выраженностью регуляторных влияний ЭК на СВ1-рецепторы у соответствующих скелетных мышц. Наиболее выраженным оказалось увеличение экспрессии мРНК ферментов синтеза и 2-АГ, и АЭА при старческой атрофии четырёхглавой мышцы бедра. Повышение уровня синтеза и увеличение содержания миоЭК в мышцах, подверженных саркопении, коррелировало с подавлением трансмембранного транспорта глюкозы, снижением энергетического обмена и с другими характерными метаболическими перестройками в мышечных волокнах, опосредуемых активностью СВ1-рецепторов. Таким образом, можно сделать вывод, что мышечная слабость при мышечной атрофии и повышенной липидемии может быть связана не только с повышением системного уровня ЭК и липидов, но и с ростом уровня ферментов синтеза ЭК в самих скелетных мышцах и возрастанием аутокринных воздействий на СВ-рецепторы со стороны миоЭК [16].

Важной особенностью регуляции экспрессии и активности ферментов синтеза и деградации миоЭК в скелетной мышце стало обнаружение их зависимости от сократительной активности мышц. Впервые выявленная 20 лет назад корреляция между физическими нагрузками и ростом уровня ЭК в кровотоке [32] вызвала необходимость прояснить роль сократительной активности в регуляции синтеза и высвобождения миоЭК в среду. Проведённый анализ зависимости активности эндоканнабиноидной системы скелетных мышц человека от режимов двигательной нагрузки (аэробной либо с сопротивлением) привёл к заключению, что экспрессия компонентов ЭК-системы, отвечающих за синтез, деградацию и сигналинг миоЭК, зависит от физических упражнений, причём эти компоненты по-разному реагируют на различные формы физических нагрузок [19]. Необходимость сократительной активности мышцы для выброса миоЭК и проявления их влияний

на моторные синапсы (секрецию медиатора) обнаружена и на модели интенсивно работающего изолированного нервно-мышечного препарата длинного разгибателя пальцев мыши [33].

Наряду с определением уровня экспрессии мРНК ферментов синтеза и деградации ЭК, в настоящее время широко используются приёмы фармакологического выключения активности таких ферментов для подтверждения и описания регуляторной активности ЭК в синапсах ЦНС [34–37], а также в скелетной мускулатуре [38]. Так, при блокаде FAAH (фермента деградации АЭА) с помощью URB597 в синапсах изолированной диафрагмы мыши наблюдалось возрастание амплитуды миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и размеров квантов ацетилхолина (АХ). Эффект предотвращался блокадой СВ1-рецепторов и был, по мнению авторов, связан с накоплением миогенного АЭА, его повышенной утеккой из мышцы и последующим пресинаптическим действием, стимулирующим рост размеров квантов АХ в моторных терминалях [38].

Таким образом, к настоящему моменту накоплены убедительные свидетельства экспрессии и активности в скелетной мускулатуре специфических ферментов, ответственных за метаболизм ЭК. Подтверждён и синтез в мышцах самих миоЭК, и родственных им соединений, которые, высвобождаясь, могут вносить вклад в создание тонического уровня ЭК в организме, их региональную и системную активность. Канонические представления о роли ферментов метаболизма ЭК в контроле активности этих соединений в структурах мозга [1] подтвердились и в скелетной мускулатуре, где также показана зависимость синтеза миоЭК, их высвобождения и активности от экспрессии аналогичных ферментов в мышцах. Вместе с тем обнаружилась и специфическая особенность – участие сократительной активности мышц в регуляции экспрессии ферментов и выраженности эффектов миоЭК на региональном и системном уровне организма. Взятые вместе, эти данные подтверждают способность скелетной мускулатуры синтезировать миоЭК в количествах, достаточных для обеспечения их самостоятельного регуляторного вклада, наряду с известной активностью ЭК, образуемых в нервной, жировой и других тканях.

УСЛОВИЯ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ МИОЭНДОКАННАБИНОИДОВ

Считается, что в ЦНС высвобождение нейрогенных ЭК из постсинаптических структур происходит в основном «*on demand*», т.е. при действии

медиаторов на постсинаптические рецепторы. Это сопровождается повышением уровня Ca^{2+} в клетке вследствие деполяризации постсинаптической мембраны либо активацией метаболитных рецепторов, сопряжённых с G-белком, запускающих внутриклеточные каскады, сопровождающиеся повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} , что в дальнейшем приводит к ферментативному Ca^{2+} -зависимому синтезу ЭК из фосфолипидов постсинаптических мембран нейрона [1]. Описана также возможность тонического высвобождения и активности ЭК в нервной ткани в случае подавления экспрессии ферментов деградации ЭК (MAGL или FAAH) или их фармакологического выключения [35–37, 39]. Накопление в этих условиях конститутивно синтезируемого пула ЭК приводит к их тонической утечке из постсинаптических нейронов в ЦНС и осуществлению эффектов, аналогичных наблюдаемым при их вызванном высвобождении «*on demand*» или при действии экзогенно апплицируемых ЭК [40].

Несмотря на малую изученность, описана возможность трансмембранного транспорта ЭК с помощью мембранно-ассоциированных белков-шаперонов жирных кислот, так называемых FABP, экспрессируемых в нейронах [41] и способных, связывая гидрофобные молекулы ЭК, облегчать их транспортировку через мембрану или к местам внутриклеточной локализации ферментов деградации ЭК [42–45]. Известны примеры, когда генетический нокаут или блокада белков FABP-типа с помощью ингибиторов приводит к пролонгированию присутствия ЭК во внутри- или внеклеточной среде и потенцированию их эффектов в синапсах ЦНС [43, 45, 46].

Что касается периферических синапсов, то в моторных синапсах мышцы в условиях ингибирования ферментов деградации ЭК также установлена возможность тонической утечки эндогенных миоЭК в синаптическую щель и их дальнейшего действия, аналогичного эффектам экзогенных ЭК [15, 33, 38].

Кроме того, в наших недавних исследованиях показано, что и сократительная активность мышцы может быть самостоятельным фактором, способствующим высвобождению миоЭК и проявлению их ретроградных пресинаптических эффектов [33]. Исследования на уровне целого организма также свидетельствуют о том, что режимы острых и хронических нагрузок скелетных мышц могут приводить к подавлению экспрессии ферментов деградации АЭА (и реже – 2-АГ) у испытуемых, способствуя накоплению, выбросу миоЭК из мышц и повышению системного уровня ЭК в крови. Это может сказываться как на всём организме [24], так и на состоянии мускулатуры [15, 19, 47–49]. Хотя эти представления пока не получи-

ли однозначных подтверждений, но на примере других миокинов (таких как интерлейкин 6 (IL-6), нейротрофический фактор мозга (BDNF), ирисин, фактор роста фибробластов 2 (FGF2), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1) и др.) бесспорно доказано, что именно сократительная активность скелетной мускулатуры и повышение уровня Ca^{2+} в миоплазме запускает высвобождение и подъём уровня миокинов в циркулирующей крови, где они могут выполнять гормоноподобные и другие функции [14, 19, 50, 51]. Кроме того, разнообразные сигнальные молекулы, поступающие при физических нагрузках в кровь из разных источников (такие как BDNF, IL-6 и др.), также могут влиять на мышечные CB1-рецепторы (благодаря гетерорецепторным взаимодействиям) и стимулировать высвобождение миоЭК [51–54].

Итак, условия и механизмы, обеспечивающие высвобождение миоЭК из скелетных мышц, по-видимому, аналогичны таковым и в других клетках, хотя здесь имеется и важный специальный регуляторный фактор, а именно сократительная активность мышц.

МИШЕНИ ЭНДОКАННАБИНОИДОВ В МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКНАХ

При высвобождении миоЭК из скелетных мышц очевидно, что их первыми и ближайшими мишенями являются собственно мышца, её мембранные и внутриклеточные рецепторы. В скелетных мышечных волокнах описан большой и разнообразный спектр мишеней и рецепторов к ЭК. Это – и специфические метаболитные CB-рецепторы 1- и 2-типа, сопряжённые с G-белком, и каналы транзитного рецепторного потенциала TRPV1-типа, и ядерные рецепторы PPAR-типа и NR4-типа, и орфанные рецепторы GPR55 и GPR18 [19, 55, 56] (рис. 2).

В мышцах наиболее известны и распространены рецепторы CB1- и CB2-типа, имеющиеся и в других тканях (нервной, жировой, печёночной и т.д.) [57]. Оба этих типа рецепторов могут активироваться как двумя основными (2-АГ и АЭА), так и некоторыми другими каннабиноидами либо близкими по структуре липидами.

Наряду с первоначальным представлением о сопряжении CB-рецепторов с $G_{i/o}$ -типом белков, в нейронах в последние годы описана возможность их взаимодействия и с другими типами G-белков (G_s и G_q) [58, 59], а также с β -аррестинами [40, 60]. Аналогичная полифункциональность CB-рецепторов оказалась присущей и мышечным CB-рецепторам [61–63], способным запускать многочисленные внутриклеточные каскады в мышечных волокнах (рис. 2).

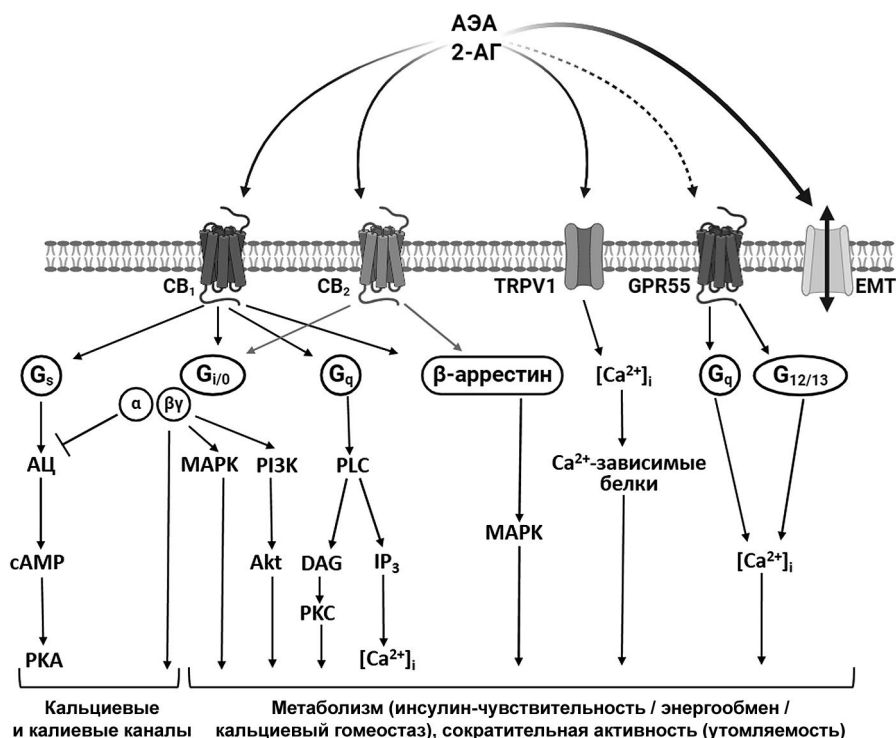


Рис. 2. Мишени действия и молекулярные каскады, запускаемые арахидонилэтаноламидом (АЭА) и 2-арахидонилглицерином (2-АГ) в мышечных волокнах. АЦ – аденилилциклаза; сАМР – циклический аденозинмонофосфат; РКА – протеинкиназа А; РКС – протеинкиназа С; MAPK – митоген-активированная протеинкиназа; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; PLC – фосфолипаза С; DAG – диацилглицерин; IP₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат; [Ca²⁺]_i – концентрация внутриклеточного кальция; MEK1/2 – MAPK/ERK киназы 1/2; CB1 и CB2 – каннабиноидные рецепторы 1- и 2-типа соответственно; TRPV1 – каналы транзитного рецепторного потенциала ванилоидного типа 1; GPR55 – орфанные рецепторы 55-типа, сопряжённые с G-белком; EMT – мембранный транспортёр эндоканнабиноидов

В настоящее время рецепторы CB1- и CB2-типов описаны на саркомере развивающихся миобластов [13] и у функционально зрелых мышечных волокон разных типов [17, 18, 64]. В зависимости от объектов и условий эксперимента выявляется доминирование CB1-рецепторов в быстрых скелетных мышцах (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*) по сравнению с медленными (*m. soleus*) [65–67] либо – наоборот [68].

Показано, что в пределах одиночного саркомера локализация CB1-рецепторов приурочена к центральной I-линии и не коррелирует с расположением рианодиновых рецепторов (РиР), идентифицируемых по краям саркомера, в местах расположения Т-трубочек и Z-линий [69].

Экспрессия и плотность CB1-рецепторов на волокнах скелетной мускулатуры, как и содержание в них миоЭК, меняется в ходе эмбрионального и постнатального созревания мышц и при таких патологиях, как саркопения и миодистрофия [16, 70]. При созревании миобластов локальное высвобождение миогенного 2-АГ тормозит дальнейший миогенез через активацию CB1-рецепторов и G_q/PLC-каскада, тормозящего Kv7-каналы, участвующих в созревании миотрубок [71].

Описана возможность активации мышечных CB1-рецепторов экзогенными 2-АГ и АЭА с последующим снижением уровня сАМР, подавлением активности РКА и дигидропиридиновых рецепторов Т-трубочек волокон [69] либо – митохондриального Ca²⁺-унипортера [20]. При действии ЭК на мышечные CB1-рецепторы возможен запуск и PI3-РКВ/Akt-киназного, и Raf-MEK1/2-ERK1/2-киназного путей [72, 73]. Конечной мишенью MAP-киназных каскадов может быть транскрипция генов ряда мышечных белков, в частности, миостатина и интерлейкина 6 [74]. Кроме того, считается, что при активации мышечных CB1-рецепторов именно за счёт этих путей подавляется инсулин-опосредованный захват глюкозы мышечными волокнами и активация в миоплазме фермента РКВ/Akt [75]. Тестирование эффектов агонистов и антагонистов CB1-рецепторов привело к широко распространённому в литературе заключению о способности ЭК вызывать инсулинорезистентность мышечных волокон и негативно влиять на функциональный и метаболический статус мышц [13, 75–77]. Однако подобные проявления, как правило, выражены в случае стойко повышенного уровня ЭК в крови, т.е. при системной гипер-

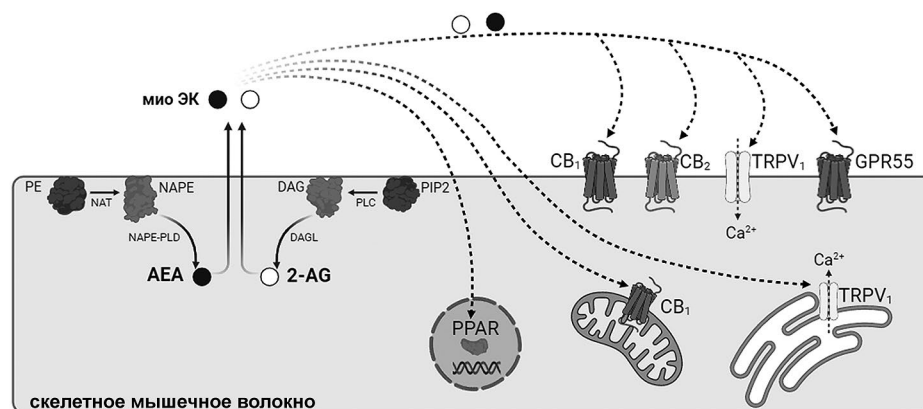


Рис. 3. Схема образования и действия миоЭК в скелетных мышечных волокнах. АЭА образуется из фосфатидилэтаноламинов (PE) мембраны с помощью N-ацетилтрансферазы (NAT), и далее – из N-ацил-фосфатидилэтаноламина (NAPE) с помощью NAPE-фосфолипазы D (NAPE-PLD). 2-АГ образуется из фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2) мембраны с помощью фосфолипазы C (PLC) и далее – из диацилглицерина (DAG) с помощью диацилглицеринлипазы (DAGL). CB1 и CB2 – каннабиноидные рецепторы 1- и 2-типа; TRPV1 – каналы транзитного рецепторного потенциала ванилоидного типа 1; GPR55 – орфанные рецепторы 55-типа, сопряжённые с G-белком; PPAR – рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором (по материалам статьи Ge et al. [15], с изменениями)

активности ЭК-системы, а также при повышенной экспрессии СВ-рецепторов в самих мышцах, которая имеет место, например, при ожирении и других патологиях, сопровождающихся повышением липидного статуса, в частности, при саркопении [16], дексаметазоновой дистрофии [78], мышечном синдроме Дюшенна [22, 70]. В таких случаях действительно наблюдается ослабление мышечной активности, которая, хотя бы в некоторой степени, опосредуется именно избыточным уровнем миоЭК.

Следует отметить, однако, что инсулинорезистентность и подавление захвата глюкозы, наиболее выраженные при гипертонусе ЭК и липидемии органов и тканей, а также избыточной экспрессии СВ-рецепторов, наблюдаются не только в скелетной мускулатуре, но и в других инсулинозависимых органах (печени, жировой ткани) [65, 77]. Таким образом, влияния системных ЭК не только на мышечные [74], но и на СВ-рецепторы других инсулинозависимых органов, видимо, направлены в первую очередь на регулировку баланса системного энергообмена в целом организме, а не на избирательное подавление энергетической и сократительной активности мышц в нормальных условиях [13, 65, 79].

Важно подчеркнуть, что распространённое мнение об основном назначении мышечных СВ1-рецепторов в развитии инсулинорезистентности, подавлении энергообмена и активности мышц не отражает всех возможных проявлений их регуляторной активности.

Были выявлены и не укладывающиеся в общую концепцию о негативном влиянии ЭК-системы на скелетную мускулатуру эффекты, когда либо активация, либо блокада мышечных СВ-рецепторов

вызывала как подавление, так и стимулирование метаболизма глюкозы и функционального статуса мышц в зависимости от условий выбранных экспериментальных моделей, т.е. в зависимости от концентрации, качества, условий и времени инкубации разнообразных агонистов и антагонистов СВ1 [22]. Избирательный генетический нокаун мышечных СВ1-рецепторов впервые показал, что наличие этого пула в мускулатуре необходимо для поддержания нормального структурно-функционального статуса мышечных волокон (захвата глюкозы, микроструктуры митохондрий и сокращений) в условиях их активации эндогенными ЭК *in vivo* [20]. Ещё одним примером проявления позитивных сдвигов в сократительной активности и в мышечном метаболизме при действии ЭК является вызванная ими активация Ca^{2+} -проводящих каналов TRPV1-типа, описанных в составе плазматических мембран и саркоплазматического ретикула (СПР) скелетных мышц (рис. 3) [80]. Отмечается, что в определённой дозе АЭА может улучшать поглощение глюкозы мышцами и активировать некоторые ключевые молекулы митохондриального биогенеза и сигнальные каскады, запускаемые инсулином [13, 81]. Возможность дуальных (стимулирующих либо тормозных) дозозависимых эффектов АЭА в регуляции метаболических и митохондриальных процессов описана недавно у миоцитов линии C2C12 при действии АЭА параллельно на СВ1-рецепторы и на каналы TRPV1 [56].

Среди мишеней ЭК в мышечных волокнах чрезвычайно важную роль играет пул встроенных в наружную мембрану митохондрий СВ1-рецепторов (рис. 3), плотность которых может превышать пул СВ1 наружной плазматической

мембраны [82, 83]. Действие ЭК и синтетических или растительных агонистов, достигающее митохондриальных CB1-рецепторов, может приводить к подавлению активности митохондриальных дегидрогеназ, цикла Кребса и энергообмена мышечных волокон [61, 62, 84]. Вместе с тем недавно установлено, что активация мышечных CB1-рецепторов эндогенными ЭК *in vivo* направлена на поддержание нормальной микроструктуры и ферментативной активности митохондрий [20].

Известно, что не только CB1, но и CB2-рецепторы могут, хотя и в меньшей степени, участвовать в регуляции метаболических процессов в мышцах [65]. В частности, показана их роль в стимулировании метаболизма глюкозы, а также в регуляции активности электрон-транспортной цепи митохондрий и синтезе АТФ у миоцитов линии C2C12 [85], стимулировании регенерации волокон [65] и в предотвращении дегенерации миотрубок при канцерогенной мышечной кахексии [86].

Сложность оценки последствий активации и функциональной роли мышечных СВ-рецепторов затруднена ещё и возможностью их гетерорецепторного взаимодействия с другими метаболитными рецепторами, которые, образуя олигомерные комплексы с СВ-рецепторами, могут при совместной активации соответствующими лигандами модифицировать эффекты CB1-рецепторов. Несмотря на ограниченность данных, уже показана возможность взаимодействия мышечных CB1-рецепторов с аденозиновыми рецепторами A_{2A}- и A_{2B}-подтипов и β2-адренорецепторами в регуляции метаболических процессов мышцы [65], а также с мускариновыми холинорецепторами в регуляции активности моторных синапсов [64].

Наряду с «классическими» рецепторами (CB1 и CB2), в мышцах обнаружены также и «неклассические» рецепторы ЭК, такие как GPR18 [87] и GPR55 [62, 65], активность которых пока значительно менее изучена. GPR18 экспрессируются миоцитами во время дифференцировки, они могут участвовать в слиянии миоцитов, а также способствовать регенерации мышц при активации своими эндогенными агонистами, например, N-арахидоноилглицином [87]. GPR55, на которые могут действовать в качестве лигандов не только АЭА и 2-АГ, но и лизофосфатидилинозитол и арахидоноилдофамин, также принимают участие в регуляции метаболических процессов мышцы (в частности, в регуляции инсулиночувствительности мышечных волокон) [62].

Наконец, в мышцах описаны PPAR, являющиеся ядерными рецепторами, функционирующими как транскрипционные факторы. Эндогенными лигандами PPAR являются свободные жирные кислоты, эйкозаноиды, ЭК и родственные им

соединения [88]. В мышцах экспрессируются все три известные изоформы PPAR (PPARα, PPARβ/δ, PPARγ). При этом PPARα и PPARβ/δ играют главную роль в регуляции липидного обмена, а PPARγ способствуют инсулин-зависимому транспорту глюкозы [89]. При активации эндогенными лигандами, в том числе ЭК (рис. 3), PPAR стимулируют экспрессию генов, регулирующих энергетический обмен, метаболизм липидов и липопротеинов, а также генов, отвечающих за пролиферацию и воспаление [90].

Наряду с PPAR, недавно выявлены ещё и ядерные (нуклеарные) рецепторы NR4-типа мышечных волокон, активируемые действием одного из синтетических аналогов ЭК – арахидонил-2'-хлорэтиламида (ACEA). Считается, что ген NR4-рецептора при активации со стороны ACEA может быть вовлечён в экспрессию различных митогенных и воспалительных факторов, а также факторов, регулирующих мышечный метаболизм [55].

Следует подчеркнуть, что современный список потенциальных мишеней миоЭК на уровне скелетной мускулатуры всё ещё неполон и постоянно расширяется. Сегодня он уже включает, помимо приведённых выше, Na⁺-каналы, β-аррестины, рецепторы клеток-сателлитов и другие пока малоизученные мишени, более подробно рассмотренные в недавнем обзоре Dalle et al. [65].

Исходя из представленных данных о многочисленных потенциальных мишенях миоЭК, очевидно, что спектр опосредуемых ими регуляторных влияний на мышечные волокна может быть чрезвычайно широким, охватывающим метаболические, функциональные и геномные процессы. При этом становится понятным, что в зависимости от условий активации тех или иных мишеней со стороны различных эндогенных ЭК и их аналогов, а также от состояния мускулатуры и всего организма в целом могут иметь место проявления как тормозных, так и потенцирующих воздействий со стороны ЭК. В результате адекватная оценка регуляторной роли миоЭК в скелетной мускулатуре ещё не завершена и требует дальнейшей детализации, учёта всей системы мишеней ЭК и выявления условий их избирательной активации.

РЕГУЛЯЦИЯ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ С УЧАСТИЕМ СВ-РЕЦЕПТОРОВ И ЭНДОКАННАБИНОИДОВ

При рассмотрении спектра воздействий ЭК на мускулатуру едва ли не главным является их влияние на сократительную активность. В числе первых наблюдений за последствиями употребления марихуаны и фитоканнабиноидов

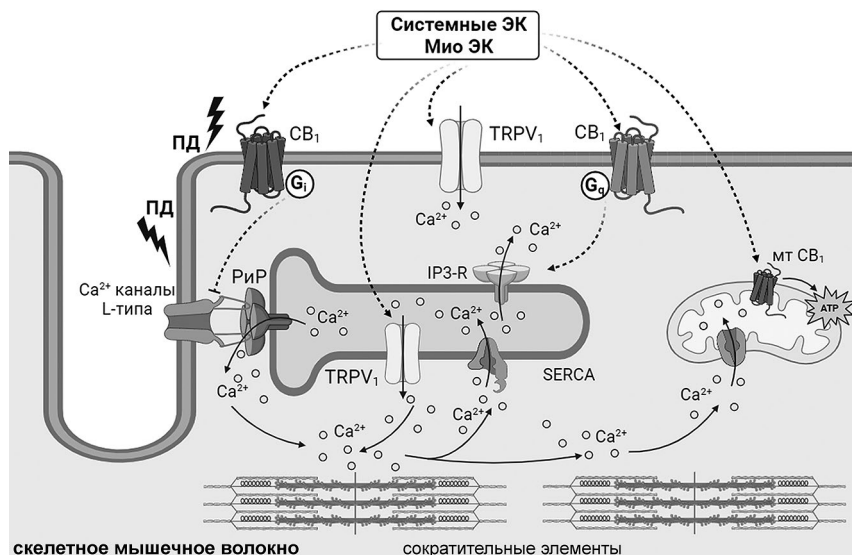


Рис. 4. Действие миеоЭК на электрохимическое сопряжение, гомеостаз Ca^{2+} и мышечное сокращение с участием таких мишеней, как Ca^{2+} -каналы L-типа (они же – дигидропиридиновые рецепторы), мембранные и митохондриальные CB_1 -рецепторы, Ca^{2+} -унипортер митохондрий, TRPV1 (по материалам статей Singlár et al. [20] и Oláh et al. [69], с изменениями). ПД – потенциал действия; мтCB1 – митохондриальные CB_1 -рецепторы; Рип – риаинодиновые рецепторы; IP3-R – рецепторы инозитол-1,4,5-трифосфата; SERCA – Ca^{2+} АТФ-аза саркоплазматического ретикула

либо системного действия синтетических экзогенных эндоканнабиноидов на организм отмечался, наряду с психотропными эффектами, синдром мышечной релаксации [91] или мышечной утомляемости [92]. В ранних работах активация CB_1 -рецепторов при системном введении синтетических каннабиноидов также снижала локомоторную активность мышей, а введение блокаторов CB_1 усиливала эту активность [93]. Однако оставалось неясным, является ли развивающаяся мышечная слабость при системном подъеме уровня ЭК следствием их прямого действия на мышцы и их CB -рецепторы или опосредована изменениями нейрогенного контроля произвольных сокращений под действием ЭК и нейрональных CB -рецепторов. Кроме того, в свете открытия активности миеоЭК возникал вопрос, может ли и как меняться сократительная активность мускулатуры при локальном выбросе и действии ЭК на мышцы по сравнению с тоническим системным действием ЭК в целом организме.

Исследования прямого действия синтетических каннабиноидов, в том числе WIN 55,212-2 (WIN), на сокращение мышц лягушки показали, что каннабиноиды подавляют контрактуру, вызванную кофеином, и процессы электрохимического сопряжения мышц, ограничивая количество Ca^{2+} , высвобождаемого из СР при сокращении [66].

Анализ прямого действия экзогенных ЭК в миотрубках (в культуре C2C12) и изолированных зрелых мышцах (*m. soleus* и *m. extensor digitorum longus* (*m. EDL*)) не обнаружил изменений оди-

ночных либо тетанических сокращений мышечных волокон, а также величин краткосрочных подъёмов уровня внутриклеточного Ca^{2+} при его выбросе из СР в ответ на действие IP3. Однако прямая активация CB_1 -рецепторов экзогенными агонистами ускоряла развитие утомления волокон в ответ на длительную тетаническую стимуляцию, снижала общий уровень внутриклеточного Ca^{2+} и эффективность электрохимического сопряжения (ЭМС) на фоне утомления [69]. Эти тормозные эффекты ЭК предотвращались пертусис-токсином, нарушающим сигнализацию через G-белки, но сохранялись при блокаде риаинодиновых рецепторов. Поэтому авторы предполагают, что в качестве конечной мишени, чувствительной к снижению уровня cAMP и активности РКА при активации CB_1 , могут быть дигидропиридиновые рецепторы (DHPR) Т-трубочек мышечных волокон. Однако в других работах была показана возможность и не связанного с CB -рецепторами прямого действия каннабиноидов на DHPR Т-трубочек скелетных мышц, также приводящего к ослаблению процессов ЭМС в мышечных волокнах (рис. 4) [94].

У мышей с генерализованным нокаутом генов CB -рецепторов не изменялась сила сократительных ответов мышц на одиночные стимулы, но возрастала устойчивость к утомлению, наблюдался краткосрочный подъём уровня Ca^{2+} в миоплазме и рост эффективности ЭМС волокон при генерации сокращений. Эти данные, по мнению авторов, свидетельствуют о наличии в обычных условиях негативных конститутивных влияний ЭК,

циркулирующих в организме, на мышечные СВ, заключающихся в ограничении сократительной и метаболической активности мышц [69]. На первый взгляд это отчасти совпадает с данными о негативных влияниях экзогенных ЭК и синтетических агонистов СВ-рецепторов на изолированные мышцы, выражавшихся в ограничении эффективности ЭМС при сокращении, усилении утомляемости мышц при длительных нагрузках.

Вместе с тем недавно обнаружено, что в случае избирательного нокаута в скелетных мышцах гена *Cnr1*, кодирующего СВ1-рецепторы, и тем самым выключения пула мышечных, но не остальных СВ-рецепторов, у мышей обнаружилась противоположная картина изменений сократительной активности, процессов ЭМС и состояния митохондрий [20]. Это означает, что в нормальных условиях функционирование пула именно мышечных СВ при их активации присутствующими в организме эндогенными ЭК может быть нацелено не на ограничение, а на поддержание структурно-функционального статуса мышц. В таком случае аутокринное действие миоЭК на СВ-рецепторы может играть роль положительной обратной связи, поддерживающей мышечную активность. В пользу этого свидетельствуют и полученные нами недавно данные о стимулирующих влияниях миогенно высвобождаемых ЭК на секрецию АХ и работу моторных синапсов мыши [33].

Накопленные в последние годы данные пока не позволяют дать однозначного ответа о роли ЭК в регуляции мышечных сокращений, что ещё раз доказывает актуальность вопроса об условиях проявления тормозных либо позитивных влияний ЭК на мышцы. На данный момент можно предположить, что воздействия ЭК, ограничивающие энергообмен мышц и их функциональную

активность, отражают лишь одну из возможных сторон действия ЭК-системы, проявляющуюся в основном при дисрегуляции липидного обмена и/или при патологически высоком подъёме системного уровня ЭК. При этом в нормальных условиях влияния эндогенных ЭК, с учётом аутокринной активности миоЭК, могут быть направлены на поддержание сократительной активности, метаболического и структурно-функционального статуса мышц.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ МОТОРНЫХ СИНАПСОВ С УЧАСТИЕМ МИОЭНДОКАННАБИНОИДОВ

В синапсах ЦНС подробно описана специфика активности ЭК (АЭА и 2-АГ) в виде их узконаправленного ретроградного действия на СВ-рецепторы терминалей для торможения секреции медиаторов [1, 95]. Вопрос о наличии аналогичной тормозной (либо другой) активности ЭК в периферических моторных синапсах скелетных мышц мало изучен, хотя и привлекает в последнее время растущее внимание [15, 38], в особенности в связи с обнаружением специального пула миоЭК [15, 33, 38, 96, 97].

Первые исследования эффектов экзогенных каннабиноидов в моторных синапсах разных групп животных дали противоречивые результаты: наряду с тормозными, были выявлены и неканонические потенцирующие воздействия на амплитуду и частоту МПКП, квантовый состав потенциалов концевых пластинок (ПКП) [64, 98–102]. Так, при действии экзогенного агониста СВ-рецепторов WIN (20 мкМ) в синапсах диафрагмы мыши обнаружен значительный,

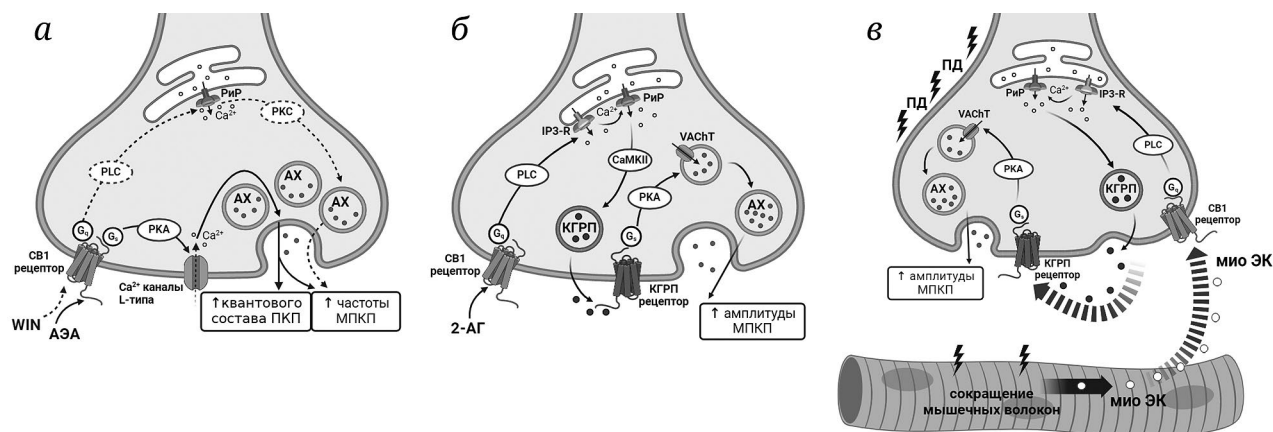


Рис. 5. Суммарная схема пресинаптических эффектов экзогенных АЭА и WIN (а), 2-АГ (б) и миогенных ЭК (в), облегчающих квантовую секрецию АХ в терминалах моторных синапсов (подробнее см. текст обзора). АХ – ацетилхолин; КГРП – кальцитонин-ген-родственный пептид; миоЭК – миогенные эндоканнабиноиды; ПД – потенциал действия; РнР – риадиноидные рецепторы; CaMKII – Ca²⁺/кальмодулин-зависимая киназа II; СВ1-рецепторы – каннабиноидные рецепторы 1-типа; IP3-R – рецепторы инозитол-3-фосфата; PKA – протеинкиназа А; PKC – протеинкиназа С; PLC – фосфолипаза С; VACHT – везикулярный транспортёр ацетилхолина

более чем на 50%, прирост частоты МПКП, который зависит от активности пресинаптических СВ1-рецепторов, фосфолипазы С, протеинкиназы С и выброса депонированного Ca^{2+} из рианодин-чувствительных Ca^{2+} -депо [97]. Также было обнаружено неканоническое пресинаптическое действие экзогенного АЭА (30 мкМ) в синапсах диафрагмы мыши, которое выражается в увеличении частоты спонтанной секреции АХ и росте квантового состава ПКП. Причём эти эффекты экзогенного АЭА реализуются, по-видимому, с участием пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа, так как предотвращаются блокадой Ca^{2+} -каналов при помощи нитрендипина (рис. 5, а) [96, 103].

Ещё более неожиданной оказалась обнаруженная нами недавно способность экзогенного 2-АГ, действуя на пресинаптические СВ1-рецепторы, стимулировать рост размеров квантов АХ и тем самым потенцировать нервно-мышечную передачу [33, 96, 103]. Способность ряда модуляторов стимулировать накачку медиатора в везикулы и увеличивать размеры одиночных квантов медиатора – явление, хорошо известное как в синапсах ЦНС [104, 105], так и в периферических синапсах [106–108], но не с участием ЭК. В периферических моторных синапсах такое потенцирование размеров квантов АХ описано в случае пресинаптического действия BDNF [109], высвобождаемого из мышц при их активности, а также при действии кальцитонин-ген-родственного пептида (КГРП; он же CGRP – calcitonin gene-related peptide), секретлируемого из электронно-плотных везикул (ЭПВ) моторных терминалей [110, 111]. Проведённые нами исследования показали, что эффекты 2-АГ, по-видимому, опосредованы действием КГРП в синапсах, так как они полностью предотвращаются блокадой рецепторов КГРП, а также блокадой СаМКП и РиР, активность которых является необходимым условием выброса КГРП из ЭПВ моторных терминалей [33, 110, 111]. Таким образом, можно предполагать, что активация пресинаптических СВ1-рецепторов со стороны экзогенного 2-АГ запускает механизм экзоцитоза ЭПВ и выброса эндогенного КГРП из терминалей в синаптическую щель. В свою очередь, последующее действие КГРП в синапсах заключается в активации пресинаптических КГРП-рецепторов и стимулировании РКА-зависимой накачки АХ в везикулы, что приводит к росту размеров квантов АХ (рис. 5, б) [33].

Важно подчеркнуть, что аналогичной активностью могут, по-видимому, обладать и миоЭК. В пользу этого свидетельствуют данные, полученные при тетанической стимуляции двигательного нерва (*n. peroneus*), приводящей к интенсивным сокращениям мышцы длинного разгибателя пальцев (*m. EDL*) в изолированном нервно-мышечном

препарате [33]. Нашей группой было показано, что сразу вслед за высокочастотной залповой активностью синапсов и мышцы наблюдается значительный (на 25–30%) рост амплитуды МПКП, который зависит не только от пресинаптических КГРП-рецепторов, но требует также обязательной активации СВ1-рецепторов. При генерации серии потенциалов действия (ПД) в ходе ритмической активности синапсов и мышечных сокращениях происходит выброс миогенных ЭК, которые, действуя на терминали, запускают выброс КГРП (рис. 5, в). Этот пептид, в свою очередь, действуя аутокринно на пресинаптические КГРП-рецепторы, запускает каскад, приводящий к стимуляции накачки АХ в везикулы, увеличению размеров квантов АХ и тем самым амплитуды МПКП в синапсах [33].

Примечательно, что даже в покоящейся мышце на фоне продолжительной (2–4 часа) аппликации ингибитора деградации АЭА (URB597) удалось достичь накопления пула эндогенных мышечных ЭК и их ретроградного пресинаптического действия, вызывающего рост амплитуды МПКП, который предотвращался блокадой СВ1-рецепторов и везамиколом (блокатором накачки АХ в везикулы) [33].

Таким образом, в отличие от центральных синапсов, где ЭК, действуя на пресинаптические терминали, ретроградно тормозят передачу и секрецию медиаторов, в периферических моторных синапсах в настоящее время выявлена неканоническая регуляторная активность АЭА и 2-АГ, заключающаяся в увеличении числа высвобождаемых квантов медиатора и росте размера одиночных квантов АХ соответственно. Важно, что подобные неканонические потенцирующие эффекты наблюдаются не только при экзогенном действии АЭА и 2-АГ, но и при действии эндогенных ЭК, либо высвобождающихся из скелетных мышц в ходе сокращений, либо накапливающихся в синаптической щели в покое при предварительном ингибировании ферментов деградации ЭК. То есть, наряду с установленной недавно ролью мышечных СВ-рецепторов в поддержании структурно-функционального статуса мышц, также имеют место влияния миоЭК на СВ-рецепторы моторных синапсов, направленные на усиление синаптической передачи и, следовательно, поддержание двигательной активности мускулатуры.

ВКЛАД МИОЭНДОКАННАБИНОИДОВ В АУТО-, ПАРАКРИННУЮ И СИСТЕМНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭНДОКАННАБИНОИДОВ

Исследования ЭК с момента их открытия в 90 гг. XX столетия остаются в числе самых ак-

туальных направлений современной физиологии и фармакологии [21, 23, 65, 112]. Это связано с множеством биологически важных функций и состояний, которые регулируются ЭК. Если первоначально основные эффекты фито- и системных эндоканнабиноидов (катаlepsия, гипоалгезия, гипотермия, снижение локомоторной активности и др.) связывали с избирательной активностью СВ-рецепторов в определённых типах синапсов ЦНС [113], то открытие периферических источников ЭК, таких как жировая ткань [114], печень [115], скелетная мускулатура [74] и другие, также высвобождающих ЭК и имеющих СВ-рецепторы и другие мишени ЭК, привели к необходимости учёта периферических систем как источников и участников активности ЭК в организме [2, 11]. В частности, стала очевидной возможность высвобождения миоЭК и их региональных ауто/паракринных влияний на уровне мышц [19, 49] и их синапсов [15, 33, 38], которые могут иметь свою специфику.

Вследствие гидрофобной природы ЭК их образование и накопление вблизи мембран может сопровождаться их трансмембранным транспортом в среду путём пассивной диффузии по градиенту концентрации [116]. Доказано также участие белков теплового шока и белков, связывающих жирные кислоты (FABP) во внутриклеточном и/или трансмембранном транспорте ЭК [43]. В кровяном русле ЭК могут эффективно связываться с альбуминами для дальнейшего транспорта и системного действия [117].

Согласно современным данным, циркулирующие ЭК могут поступать в кровоток из многих органов и тканей, включая мозг, мышцы, жировую ткань, эпителий кишечника, клетки крови и другие органы [11]. В норме суточные колебания ЭК в плазме составляют 1–5 нМ для АЭА и 10–500 нМ для 2-АГ [11]. При этом системный уровень ЭК в крови демонстрирует колебания и в покое, и особенно при определённых функциональных состояниях организма: стрессе, физических нагрузках, избыточном питании, а также при воспалении, ожирении, определённых патологических состояниях [11, 65]. Предполагается, что одной из причин суточных колебаний системного уровня ЭК может быть, в частности, их высокая липофильность, позволяющая им беспрепятственно покидать клетки при накоплении в цитоплазме и изменении баланса внутри- и внеклеточного содержания ЭК в периферических органах и тканях. В таком случае суточные колебания ЭК являются лишь косвенным маркером регионально меняющегося тканевого баланса ЭК и их местной активности в периферических органах [11].

Однако при определённых условиях и состояниях организма рост ЭК в кровотоке может нести

специальную функциональную и регуляторную нагрузку, являясь важным фактором адаптации организма к изменяющимся условиям его функционирования. В частности, считается, что после физической тренировки именно возрастающий уровень ЭК может участвовать в системном регулировании баланса и потребления энергии, избирательно влияя на инсулинорезистентность и транспорт глюкозы в определённых органах и тканях [118].

В последнее время хорошо известно состояние «эйфории бегуна» и сопутствующие ему анальгезия и ряд других важных признаков (лёгкий седативный, антидепрессантный, анксиолитический и другие эффекты), наблюдаемых, как правило, сразу после бега, принято связывать с подъёмом уровня ЭК в крови, а не эндорфинов, как считалось ранее [19, 32, 49, 119]. Действительно, растёт число свидетельств того, что при умеренных физических нагрузках у животных и человека может наблюдаться значительный подъём уровня АЭА и реже – 2-АГ [12], а также иногда и других ЭК в крови [19, 26, 53]. В связи с этим целенаправленно ведутся поиски условий, при которых наблюдается связь между физическими упражнениями и ростом ЭК, поскольку это может стать инструментом для коррекции ряда состояний организма, включая неврологические заболевания (рис. 6) [24, 26]. Повышенный интерес к предполагаемой взаимосвязи физических упражнений с ростом ЭК в крови и возможности их использования на практике понятен. Физические упражнения считаются ценным нефармакологическим методом лечения, который даёт немедленный эффект, доступный экономически, и имеющий при этом множество преимуществ для здоровья. Если одним из следствий физической нагрузки является повышение уровня эндогенных каннабиноидов в крови, то этот феномен естественного нетоксичного роста ЭК в крови можно было бы использовать для снижения стресса, беспокойства, улучшения самочувствия [26] и даже, как считают, для возможного усиления когнитивных функций мозга [53, 120]. Однако механизмы возможной взаимосвязи этих явлений остаются малоизученными. Важно понять, во-первых, при каких именно режимах физических нагрузок и состояниях организма растёт уровень ЭК в крови, во-вторых, является ли в этих случаях подъём системного уровня ЭК результатом преимущественного выброса именно миоЭК вследствие их усиленного синтеза и высвобождения при мышечных нагрузках, и в-третьих, каковы конкретные мишени этой активности миогенных ЭК на уровне ЦНС и периферии.

Анализ состояния ЭК-системы в кровотоке и в скелетных мышцах у разных групп испытуемых

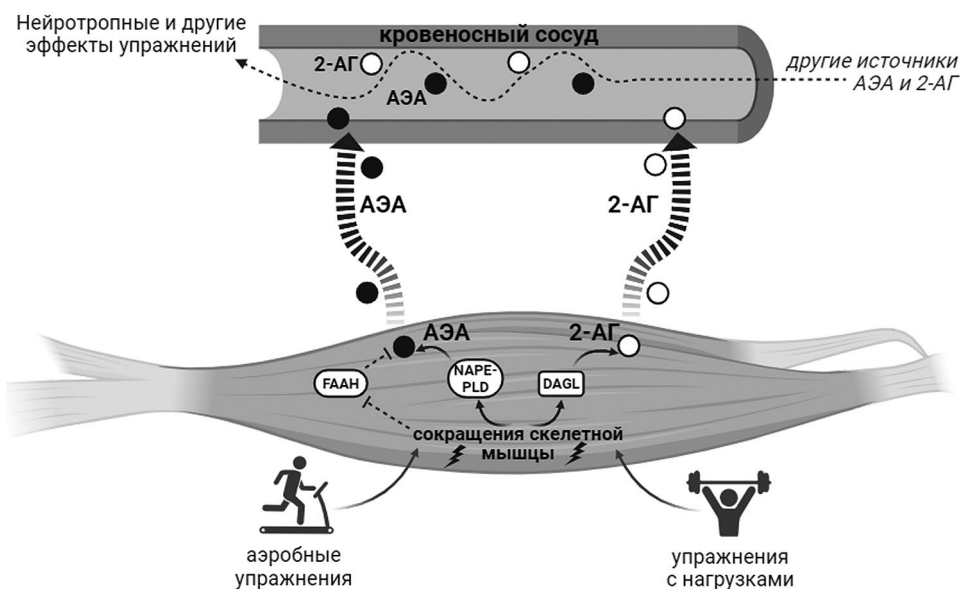


Рис. 6. Схема дифференцированных сдвигов в балансе активности ферментов синтеза/деградации миоЭК (DAGL – диацилглицеринлипаза; NAPE-PLD – N-ацилфосфатидилэтаноламин-специфическая фосфолипаза D; FAAH – гидролаза амидов жирных кислот) в мышцах при определённых режимах их физической нагрузки, что приводит к повышенному выбросу миогенных АЭА и/или 2-АГ (по материалам статьи Schönke et al. [19], с изменениями); ← – активирующее влияние; ⊥ – тормозное влияние

(здоровых или с патологиями) показывает, что краткосрочные аэробные упражнения (а также тренировки с нагрузкой) действительно повышают уровень ЭК [19, 121]. Из сводного метаанализа транскриптомной активности генов СВ-рецепторов, ферментов синтеза и деградации ЭК следует, что в ответ на краткосрочную аэробную нагрузку и другие виды тренировок не происходит существенного изменения уровня экспрессии генов СВ-рецепторов в мышцах подопытных участников. При этом экспрессия ферментов синтеза 2-АГ (DAGL) подавляется, а экспрессия ферментов синтеза АЭА (NAPE-PLD) – возрастает (рис. 6). В то же время в большинстве других исследований показано, что уровень экспрессии ферментов расщепления АЭА (FAAH1) в мышцах подавляется как при краткосрочных, так и при хронических (долговременных) режимах интенсивных мышечных нагрузок. В условиях хронических нагрузок обнаруживается также повышенная активность NAPE-PLD, а значит, видимо, растёт и уровень синтеза АЭА в мышце [13, 122]. Установлено, что у испытуемых уровень ЭК в плазме существенно возрастает вслед за значительной аэробной нагрузкой, но восстанавливается до первоначальных значений в течение 1 часа после упражнений [123]. Это, по мнению авторов, свидетельствует об адаптивных изменениях уровня миоЭК в ответ на физические нагрузки и возможном участии миоЭК (АЭА, 2-АГ и др.) в подъёме системного уровня ЭК во время мышечных нагрузок [19, 122]. Однако накопленные экспериментальные данные и заключения

ряда обзоров о вкладе пула миоЭК в повышение системного уровня ЭК при физических нагрузках [11, 24, 26, 122] пока неоднозначно подтверждены данными других проводимых в настоящее время исследований [124]. Это связано в основном со сложностью создания единообразных условий для анализа мышечного и системного уровней ЭК при различных режимах мышечных нагрузок у индивидуумов разных групп.

В настоящее время накоплено большое количество экспериментального материала, рассматриваемого в ряде обзоров, посвящённых связи физических нагрузок с подъёмом уровня ЭК и сопутствующими эффектами [11, 26, 122]. При этом на сегодняшний момент наиболее интригующим остаётся вопрос о способности пула миоЭК, высвобождаемого при физических нагрузках, вносить существенный вклад в подъём системного уровня ЭК и тем самым участвовать в регуляции последующих функциональных сдвигов организма на центральном и периферическом уровнях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённый анализ литературы позволяет представить скелетную мускулатуру как орган, обладающий малоизвестной до сих пор функцией: синтеза, деградации и высвобождения самостоятельного пула миоЭК, имеющего мишени на уровне самих мышц, их синапсов, а также на уровне целого организма (табл. 2).

Таблица 2. Примеры регуляторных влияний миогенных ЭК на разных системных уровнях

Скелетные мышцы	регуляция: инсулин-чувствительности; энергообмена; Ca ²⁺ -гомеостаза; структуры и функций митохондрий; сокращения и утомляемости; экспрессии генов
Моторные синапсы	стимуляция: вызванного выброса медиатора; размера квантов медиатора; частоты спонтанной секреции медиатора
Системные эффекты	участие в: эйфории бегуна; анальгезии; антистрессе

Сегодня наиболее подробно описан спектр местных регуляторных воздействий миоЭК на мышечные волокна. МиоЭК обеспечивают контроль эмбрионального развития миоцитов, Ca²⁺-гомеостаз при ЭМС, митохондриальную, метаболическую и сократительную активность зрелых волокон, а также регулируют активность мышечного генома. Наряду с наиболее известной способностью ЭК при действии на CB1-рецепторы вызывать инсулинорезистентность, подавление транспорта глюкозы и энергообмена, а также усиливать утомляемость мышц, в обзоре суммированы факты, согласно которым активация мышечных CB1-рецепторов и других мишеней (TRPV1, GPR55) может обеспечивать и противоположно направленные, т.е. позитивные влияния миоЭК на мышечный статус. В обзоре представлены заслуживающие особого внимания данные об участии пула именно мышечных СВ-рецепторов в поддержании энергообмена, сократительной активности и устойчивости к утомлению скелетных мышц. В контексте позитивных влияний миоЭК на мускулатуру в обзоре представлены данные об уникальной, не имеющей аналогов в ЦНС регу-

ляторной активности миоЭК в нервно-мышечных синапсах, направленной на усиление секреции медиатора.

Наконец, пул миоЭК вызывает сейчас огромный интерес и в связи с его возможным участием в повышении и поддержании системного уровня ЭК в крови при умеренных физических нагрузках, что сопровождается важными для состояния здоровья испытуемых эффектами – подъёмом настроения, анальгезией, снижением стресса и др. Этот заманчивый аспект возможной системной активности миоЭК имеет особую значимость в связи с поисками алгоритмов нетоксических воздействий ЭК, направленных на улучшение самочувствия пациентов с разным родом клинических расстройств.

Данный обзор впервые обращает специальное внимание на пока малоизвестный пул миоЭК, позволяет по-новому взглянуть на мишени, механизмы действия и значимость этого пула, демонстрируют его самостоятельный и нетривиальный паттерн регуляторной активности на разных уровнях организма. Учёт и дальнейшее рассмотрение специфической активности миоЭК позволит расширить современные представления о регуляторных возможностях ЭК и о перспективах их использования в клинической и ординарной практике.

Вклад авторов. О.П. Балежина – концепция и написание текста, П.О. Богачева – создание рисунков и написание текста, Е.О. Тарасова – написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00065).

Благодарности. Благодарим Гайдукова Александра Евгеньевича за ценные замечания и обсуждение концепции.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission, *Physiol. Rev.*, **89**, 309-380, <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008>.
2. Zou, S., and Kumar, U. (2018) Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 833, <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>.
3. Howlett, A. C. (2002) The cannabinoid receptors, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **68-69**, 619-631, [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00060-6).
4. O'Keefe, L., Simcocks, A. C., Hryciw, D. H., Mathai, M. L., and McAinch, A. J. (2014) The cannabinoid receptor 1 and its role in influencing peripheral metabolism, *Diabetes Obes. Metab.*, **16**, 294-304, <https://doi.org/10.1111/dom.12144>.

5. Schmidt, A., Brune, K., and Hinz, B. (2006) Determination of the endocannabinoid anandamide in human plasma by high-performance liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.*, **20**, 336-342, <https://doi.org/10.1002/bmc.568>.
6. Abdulnour, J., Yasari, S., Rabasa-Lhoret, R., Faraj, May., Petrosino, S., Piscitelli, F., Prud'homme, D., and Di Marzo, V. (2014) Circulating endocannabinoids in insulin sensitive vs. insulin resistant obese postmenopausal women. A MONET group study, *Obesity*, **22**, 211-216, <https://doi.org/10.1002/oby.20498>.
7. Blüher, M., Engeli, S., Klöting, N., Berndt, J., Fasshauer, M., Bátkai, S., Pacher, P., Schön, M. R., Jordan J., and Stumvoll, M. (2006) Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity, *Diabetes*, **55**, 3053-3060, <https://doi.org/10.2337/db06-0812>.
8. Bowles, N. P., Karatsoreos, I. N., Li, X., Vemuri, V. K., Wood, J.-A., Li, Z., Tamashiro, K. L. K., Schwartz, G. J., Makriyannis, A. M., Kunos, G., Hillard, C. J., McEwen, B. S., and Hill, M. N. (2015) A peripheral endocannabinoid mechanism contributes to glucocorticoid-mediated metabolic syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 285-290, <https://doi.org/10.1073/pnas.1421420112>.
9. Gatta-Cherifi, B., Matias, I., Vallée, M., Tabarin, A., Marsicano, G., Piazza, P. V., and Cota, D. (2012) Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity, *Int. J. Obes.*, **36**, 880-885, <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.165>.
10. Pastor, A., Fernández-Aranda, F., Fitó, M., Jiménez-Murcia, S., Botella, C., Fernández-Real, J. M., Frühbeck, G., Tinahones, F. J., Fagundo, A. B., Rodriguez, J., Agüera, Z., Langohr, K., Casanueva, F. F., and de la Torre, R. (2016) A lower olfactory capacity is related to higher circulating concentrations of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol and higher body mass index in women, *PLoS One*, **11**, e0148734, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148734>.
11. Hillard, C. J. (2018) Circulating endocannabinoids: from whence do they come and where are they going? *Neuropsychopharmacology*, **43**, 155-172, <https://doi.org/10.1038/npp.2017.130>.
12. Koltyn, K. F., Brellenthin, A. G., Cook, D. B., Sehgal, N., and Hillard, C. (2014) Mechanisms of exercise-induced hypoalgesia, *J. Pain*, **15**, 1294-1304, <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.09.006>.
13. Heyman, E., Gamelin, F.-X., Aucouturier, J., and Di Marzo, V. (2012) The role of the endocannabinoid system in skeletal muscle and metabolic adaptations to exercise: potential implications for the treatment of obesity, *Obes. Rev.*, **13**, 1110-1124, <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01026.x>.
14. Severinsen, M. C. K., and Pedersen, B. K. (2020) Muscle-organ crosstalk: the emerging roles of myokines, *Endocr. Rev.*, **41**, 594-609, <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa016>.
15. Ge, D., Odierna, G. L., and Phillips, W. D. (2020) Influence of cannabinoids upon nerve-evoked skeletal muscle contraction, *Neurosci. Lett.*, **725**, 134900, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134900>.
16. Le Bacquer, O., Salles, J., Piscitelli, F., Sanchez, P., Martin, V., Montaurier, C., Di Marzo, V., and Walrand, S. (2022) Alterations of the endocannabinoid system and circulating and peripheral tissue levels of endocannabinoids in sarcopenic rats, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **13**, 662-676, <https://doi.org/10.1002/jcsm.12855>.
17. Cuvuoto, P., McAinch, A. J., Hatzinikolas, G., Janovská, A., Game, P., and Wittert, G. A. (2007) The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **364**, 105-110, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.099>.
18. Crespillo, A., Suárez, J., Bermúdez-Silva, F. J., Rivera, P., Vida, M., Alonso, M., Palomino, A., Lucena, M. A., Serano, A., Pérez-Martín, M., Macias, M., Fernández-Llébarez, P., and Rodríguez de Fonseca, F. (2011) Expression of the cannabinoid system in muscle: effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade, *Biochem. J.*, **433**, 175-185, <https://doi.org/10.1042/BJ20100751>.
19. Schönke, M., Martinez-Tellez, B., and Rensen, P. C. (2020) Role of the endocannabinoid system in the regulation of the skeletal muscle response to exercise, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **52**, 52-60, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.05.003>.
20. Singlár, Z., Ganbat, N., Szentesi, P., Osgonsandag, N., Szabó, L., Telek, A., Fodor, J., Dienes, B., Gönczi, M., Csernoch, L., and Sztrettye, M. (2022) Genetic manipulation of CB1 cannabinoid receptors reveals a role in maintaining proper skeletal muscle morphology and function in mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 15653, <https://doi.org/10.3390/ijms232415653>.
21. Iannotti, F. A. (2023) Cannabinoids, endocannabinoids, and synthetic cannabimimetic molecules in neuromuscular disorders, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 238, <https://doi.org/10.3390/ijms25010238>.
22. Iannotti, F. A., Pagano, E., Moriello, A. S., Alvino, F. G., Sorrentino, N. C., D'Orsi, L., Gazzerri, E., Capasso, R., De Leonibus, E., De Petrocellis, L., and Di Marzo, V. (2019) Effects of non-euphoric plant cannabinoids on muscle quality and performance of dystrophic mdx mice, *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 1568-1584, <https://doi.org/10.1111/bph.14460>.
23. Cristino, L., Bisogno, T., and Di Marzo, V. (2020) Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders, *Nat. Rev. Neurol.*, **16**, 9-29, <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>.

24. Charytoniuk, T., Zywno, H., Berk, K., Bzdega, W., Kolakowski, A., Chabowski, A., and Konstantynowicz-Nowicka, K. (2022) The endocannabinoid system and physical activity – a robust duo in the novel therapeutic approach against metabolic disorders, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3083, <https://doi.org/10.3390/ijms23063083>.
25. Maccarrone, M., Bab, I., B    , T., Cabral, G. A., Dey, S. K., Di Marzo, V., Konje, J. C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., Sharkey, K. A., and Zimmer, A. (2015) Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC, *Trends Pharmacol. Sci.*, **36**, 277-296, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.008>.
26. Matei, D., Trofin, D., Iordan, D. A., Onu, I., Condurache, I., Ionite, C., and Buculei, I. (2023) The endocannabinoid system and physical exercise, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1989, <https://doi.org/10.3390/ijms24031989>.
27. Lu, H.-C., and Mackie, K. (2021) Review of the endocannabinoid system, *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging.*, **6**, 607-615, <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>.
28. Lu, H.-C., and Mackie, K. (2016) An introduction to the endogenous cannabinoid system, *Biol. Psychiatry*, **79**, 516-525, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>.
29. Tocz  k, M., and Malinowska, B. (2018) Enhanced endocannabinoid tone as a potential target of pharmacotherapy, *Life Sci.*, **204**, 20-45, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.054>.
30. Tsuboi, K., Uyama, T., Okamoto, Y., and Ueda, N. (2018) Endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines: biological activities and metabolism, *Inflamm. Regen.*, **38**, 28, <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0086-5>.
31. Heintz, S., Basolo, A., Piaggi, P., Piomelli, D., Von Schwartzberg, R. J., and Krakoff, J. (2018) Peripheral endocannabinoids associated with energy expenditure in native Americans of southwestern heritage, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **103**, 1077-1087, <https://doi.org/10.1210/jc.2017-02257>.
32. Sparling, P. B., Giuffrida, A., Piomelli, D., Rosskopf, L., and Dietrich, A. (2003) Exercise activates the endocannabinoid system, *NeuroReport*, **14**, 2209-2211, <https://doi.org/10.1097/00001756-200312020-00015>.
33. Tarasova, E., Bogacheva, P., Chernyshev, K., and Balezina, O. (2024) Quantal size increase induced by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol requires activation of CGRP receptors in mouse motor synapses, *Synapse*, **78**, e22281, <https://doi.org/10.1002/syn.22281>.
34. J. Alvarez-Jaimes, L., and Palmer, J. A. (2011) The role of endocannabinoids in pain modulation and the therapeutic potential of inhibiting their enzymatic degradation, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **12**, 1644-1659, <https://doi.org/10.2174/138920111798357357>.
35. Bambico, F. R., Cassano, T., Dominguez-Lopez, S., Katz, N., Walker, C. D., Piomelli, D., and Gobbi, G. (2010) Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus, *Neuropsychopharmacology*, **35**, 2083-2100, <https://doi.org/10.1038/npp.2010.80>.
36. Liu, X., Chen, Y., Vickstrom, C. R., Li, Y., Viader, A., Cravatt, B. F., and Liu, Q. (2016) Coordinated regulation of endocannabinoid-mediated retrograde synaptic suppression in the cerebellum by neuronal and astrocytic monoacylglycerol lipase, *Sci. Rep.*, **6**, 35829, <https://doi.org/10.1038/srep35829>.
37. Manza, P., Yuan, K., Shokri-Kojori, E., Tomasi, D., and Volkow, N. D. (2020) Brain structural changes in cannabis dependence: association with MAGL, *Mol. Psychiatry*, **25**, 3256-3266, <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0577-z>.
38. Morsch, M., Protti, D. A., Cheng, D., Braet, F., Chung, R. S., Reddel, S. W., and Phillips, W. D. (2018) Cannabinoid-induced increase of quantal size and enhanced neuromuscular transmission, *Sci. Rep.*, **8**, 4685, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22888-4>.
39. Lee, S.-H., Ledri, M., Toth, B., Marchionni, I., Henstridge, C. M., Dudok, B., Kenesei, K., Barna, L., Szabo, S. I., Renke  z, T., Oberoi, M., Watanabe, M., Limoli, C. L., Horvai, G., Soltesz, I., and Katona, I. (2015) Multiple forms of endocannabinoid and endovanilloid signaling regulate the tonic control of GABA release, *J. Neurosci.*, **35**, 10039-10057, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4112-14.2015>.
40. Balezina, O. P., Tarasova, E. O., and Gaydukov, A. E. (2021) Noncanonical activity of endocannabinoids and their receptors in central and peripheral synapses, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 818-832, <https://doi.org/10.1134/S0006297921070038>.
41. Furuhashi, M., and Hotamisligil, G. S. (2008) Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 489-503, <https://doi.org/10.1038/nrd2589>.
42. Alger, B. E. (2004) Endocannabinoids: getting the message across, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8512-8513, <https://doi.org/10.1073/pnas.0402935101>.
43. Kaczocha, M., Rebecchi, M. J., Ralph, B. P., Teng, Y.-H. G., Berger, W. T., Galbavy, W., Elmes, M. W., Glaser, S. T., Wang, L., Rizzo, R. C., Deutsch, D. G., and Ojima, I. (2014) Inhibition of fatty acid binding proteins elevates brain anandamide levels and produces analgesia, *PLoS One*, **9**, e94200, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094200>.
44. Glaser, S. T., Jayanetti, K., Oubraim, S., Hillowe, A., Frank, E., Jong, J., Wang, L., Wang, H., Ojima, I., Haj-Dahmane, S., and Kaczocha, M. (2023) Fatty acid binding proteins are novel modulators of synaptic epoxyeicosatrienoic acid signaling in the brain, *Sci. Rep.*, **13**, 15234, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42504-4>.
45. Kaczocha, M., and Haj-Dahmane, S. (2022) Mechanisms of endocannabinoid transport in the brain, *Br. J. Pharmacol.*, **179**, 4300-4310, <https://doi.org/10.1111/bph.15469>.

46. Björklund, E., Blomqvist, A., Hedlin, J., Persson, E., and Fowler, C. J. (2014) Involvement of fatty acid amide hydrolase and fatty acid binding protein 5 in the uptake of anandamide by cell lines with different levels of fatty acid amide hydrolase expression: a pharmacological study, *PLoS One*, **9**, e103479, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103479>.
47. Fernández-Aranda, F., Sauchelli, S., Pastor, A., Gonzalez, M. L., De La Torre, R., Granero, R., Jiménez-Murcia, S., Baños, R., Botella, C., Fernández-Real, J. M., Fernández-Garcia, J. C., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Rodriguez, R., Tinahones, F. J., Arcelus, J., Fagundo, A. B., Agüera, Z., Miró, J., and Casanueva, F. F. (2014) Moderate-vigorous physical activity across body mass index in females: moderating effect of endocannabinoids and temperament, *PLoS One*, **9**, e104534, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104534>.
48. Raichlen, D. A., Foster, A. D., Seillier, A., Giuffrida, A., and Gerdeman, G. L. (2013) Exercise-induced endocannabinoid signaling is modulated by intensity, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **113**, 869-875, <https://doi.org/10.1007/s00421-012-2495-5>.
49. Siebers, M., Biedermann, S. V., and Fuss, J. (2023) Do endocannabinoids cause the runner's high? Evidence and open questions, *Neuroscientist*, **29**, 352-369, <https://doi.org/10.1177/10738584211069981>.
50. Furuichi, Y., Manabe, Y., Takagi, M., Aoki, M., and Fujii, N. L. (2018) Evidence for acute contraction-induced myokine secretion by C2C12 myotubes, *PLoS One*, **13**, e0206146, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206146>.
51. Pedersen, B. K., and Febbraio, M. A. (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **8**, 457-465, <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49>.
52. Baskin, K. K., Winders, B. R., and Olson, E. N. (2015) Muscle as a “mediator” of systemic metabolism, *Cell Metab.*, **21**, 237-248, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.021>.
53. Wang, B., Liang, J., Lu, C., Lu, A., and Wang, C. (2024) Exercise regulates myokines in aging-related diseases through muscle-brain crosstalk, *Gerontology*, **70**, 193-209, <https://doi.org/10.1159/000535339>.
54. Weigert, C., Lehmann, R., Hartwig, S., and Lehr, S. (2014) The secretome of the working human skeletal muscle – a promising opportunity to combat the metabolic disaster? *Proteomics*, **8**, 5-18, <https://doi.org/10.1002/prca.201300094>.
55. Haddad, M. (2021) The impact of CB1 receptor on nuclear receptors in skeletal muscle cells, *Pathophysiology*, **28**, 457-470, <https://doi.org/10.3390/pathophysiology28040029>.
56. Standoli, S., Pecchioli, S., Tortolani, D., Di Meo, C., Fanti, F., Sergi, M., Bacci, M., Seidita, I., Bernacchioni, C., Donati, C., Bruni, P., Maccarrone, M., Rapino, C., and Cencetti, F. (2022) The TRPV1 receptor is up-regulated by sphingosine 1-phosphate and is implicated in the anandamide-dependent regulation of mitochondrial activity in C2C12 myoblasts, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 11103, <https://doi.org/10.3390/ijms231911103>.
57. Haspula, D., and Clark, M. A. (2020) Cannabinoid receptors: an update on cell signaling, pathophysiological roles and therapeutic opportunities in neurological, cardiovascular, and inflammatory diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7693, <https://doi.org/10.3390/ijms21207693>.
58. Diez-Alarcia, R., Ibarra-Lecue, I., Lopez-Cardona, Á. P., Meana, J., Gutierrez-Adán, A., Callado, L. F., Agirregoitia, E., and Urigüen, L. (2016) Biased agonism of three different cannabinoid receptor agonists in mouse brain cortex, *Front. Pharmacol.*, **7**, <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00415>.
59. Glass, M., and Felder, C. C. (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor, *J. Neurosci.*, **17**, 5327-5333, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05327.1997>.
60. Delgado-Peraza, F., Ahn, K. H., Nogueras-Ortiz, C., Mungrue, I. N., Mackie, K., Kendall, D. A., and Yudowski, G. A. (2016) Mechanisms of biased β -arrestin-mediated signaling downstream from the cannabinoid 1 receptor, *Mol. Pharmacol.*, **89**, 618-629, <https://doi.org/10.1124/mol.115.103176>.
61. Lipina, C., Vaanholt, L. M., Davidova, A., Mitchell, S. E., Storey-Gordon, E., Hambly, C., Irving, A. J., Speakman, J. R., and Hundal, H. S. (2016) CB 1 receptor blockade counters age-induced insulin resistance and metabolic dysfunction, *Aging Cell*, **15**, 325-335, <https://doi.org/10.1111/acer.12438>.
62. Lipina, C., Walsh, S. K., Mitchell, S. E., Speakman, J. R., Wainwright, C. L., and Hundal, H. S. (2019) GPR55 deficiency is associated with increased adiposity and impaired insulin signaling in peripheral metabolic tissues, *FASEB J.*, **33**, 1299-1312, <https://doi.org/10.1096/fj.201800171R>.
63. Lipina, C., and Hundal, H. S. (2017) The endocannabinoid system: ‘NO’ longer anonymous in the control of nitrergic signalling? *J. Mol. Cell Biol.*, **9**, 91-103, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjx008>.
64. Trujillo, X., Sánchez-Pastor, E., Andrade, F., and Huerta, M. (2014) Presence and colocalization of type-1 cannabinoid receptors with acetylcholine receptors in the motor end-plate of twitch skeletal muscle fibers in the frog, *J. Membr. Biol.*, **247**, 1199-1205, <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9721-5>.
65. Dalle, S., Schouten, M., Meeus, G., Slagmolen, L., and Koppo, K. (2022) Molecular networks underlying cannabinoid signaling in skeletal muscle plasticity, *J. Cell. Physiol.*, **237**, 3517-3540, <https://doi.org/10.1002/jcp.30837>.

66. Huerta, M., Ortiz-Mesina, M., Trujillo, X., Sánchez-Pastor, E., Vázquez, C., Castro, E., Velasco, R., Montoya-Pérez, R., and Onetti, C. (2009) Effects of cannabinoids on caffeine contractures in slow and fast skeletal muscle fibers of the frog, *J. Membr. Biol.*, **229**, 91-99, <https://doi.org/10.1007/s00232-009-9174-4>.
67. Zhao, D., Pond, A., Watkins, B., Gerrard, D., Wen, Y., Kuang, S., and Hannon, K. (2010) Peripheral endocannabinoids regulate skeletal muscle development and maintenance., *Eur. J. Transl. Myol.*, **20**, 167, <https://doi.org/10.4081/bam.2010.4.167>.
68. Dalle, S., and Koppo, K. (2021) Cannabinoid receptor 1 expression is higher in muscle of old vs. young males, and increases upon resistance exercise in older adults, *Sci. Rep.*, **11**, 18349, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97859-3>.
69. Oláh, T., Bodnár, D., Tóth, A., Vincze, J., Fodor, J., Reischl, B., Kovács, A., Ruzsnavszky, O., Dienes, B., Szentesi, P., Friedrich, O., and Csernoch, L. (2016) Cannabinoid signalling inhibits sarcoplasmic Ca²⁺ release and regulates excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle, *J. Physiol.*, **594**, 7381-7398, <https://doi.org/10.1113/JP272449>.
70. Iannotti, F. A., Pagano, E., Guardiola, O., Adinolfi, S., Saccone, V., Consalvi, S., Piscitelli, F., Gazzerro, E., Busetto, G., Carrello, D., Capasso, R., Puri, P. L., Minchiotti, G., and Di Marzo, V. (2018) Genetic and pharmacological regulation of the endocannabinoid CB1 receptor in Duchenne muscular dystrophy, *Nat. Commun.*, **9**, 3950, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06267-1>.
71. Iannotti, F. A., Silvestri, C., Mazzarella, E., Martella, A., Calvigioni, D., Piscitelli, F., Ambrosino, P., Petrosino, S., Czifra, G., Biró, T., Harkany, T., Taglialatela, M., and Di Marzo, V. (2014) The endocannabinoid 2-AG controls skeletal muscle cell differentiation via CB1 receptor-dependent inhibition of Kv7 channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, <https://doi.org/10.1073/pnas.1406728111>.
72. Gómez Del Pulgar, T., Velasco, G., and Guzmán, M. (2000) The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt, *Biochem. J.*, **347**, 369-373, <https://doi.org/10.1042/bj3470369>.
73. Moranta, D., Esteban, S., and García-Sevilla, J. A. (2007) Acute, chronic and withdrawal effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on the sequential activation of MAPK/Raf-MEK-ERK signaling in the rat cerebral frontal cortex: short-term regulation by intrinsic and extrinsic pathways, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 656-667, <https://doi.org/10.1002/jnr.21140>.
74. González-Mariscal, I., Montoro, R. A., O'Connel, J. F., Kim, Y., Gonzalez-Freire, M., Liu, Q., Alfaras, I., Carlson, O. D., Lehrmann, E., Zhang, Y., Becker, K. G., Hardivillé, S., Ghosh, P., and Egan, J. M. (2019) Muscle cannabinoid 1 receptor regulates Il-6 and myostatin expression, governing physical performance and whole-body metabolism, *FASEB J.*, **33**, 5850-5863, <https://doi.org/10.1096/fj.201801145R>.
75. Eckardt, K., Sell, H., Taube, A., Koenen, M., Platzbecker, B., Cramer, A., Horrigs, A., Lehtonen, M., Tenagels, N., and Eckel, J. (2009) Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle, *Diabetologia*, **52**, 664-674, <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1240-4>.
76. Engeli, S. (2008) Peripheral metabolic effects of endocannabinoids and cannabinoid receptor blockade, *Obes. Facts*, **1**, 8-15, <https://doi.org/10.1159/000114255>.
77. Nagappan, A., Shin, J., and Jung, M. H. (2019) Role of cannabinoid receptor type 1 in insulin resistance and its biological implications, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2109, <https://doi.org/10.3390/ijms20092109>.
78. Le Bacquer, O., Lanchais, K., Combe, K., Van Den Berghe, L., and Walrand, S. (2021) Acute rimonabant treatment promotes protein synthesis in C2C12 myotubes through a CB1-independent mechanism, *J. Cell. Physiol.*, **236**, 2669-2683, <https://doi.org/10.1002/jcp.30034>.
79. Kunos, G. (2007) Understanding metabolic homeostasis and imbalance: what is the role of the endocannabinoid system? *Am. J. Med.*, **120**, S18-S24, <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.06.007>.
80. Obi, S., Nakajima, T., Hasegawa, T., Kikuchi, H., Oguri, G., Takahashi, M., Nakamura, F., Yamasoba, T., Sakuma, M., Toyoda, S., Tei, C., and Inoue, T. (2017) Heat induces interleukin-6 in skeletal muscle cells via TRPV1/PKC/CREB pathways, *J. Appl. Physiol.*, **122**, 683-694, <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00139.2016>.
81. Page, A. J., Hatzinikolas, G., Vincent, A. D., Cavuoto, P., and Wittert, G. A. (2019) The TRPV1 channel regulates glucose metabolism, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **317**, E667-E676, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00102.2019>.
82. Melser, S., Pagano Zottola, A. C., Serrat, R., Puente, N., Grandes, P., Marsicano, G., and Hebert-Chatelain, E. (2017) Functional analysis of mitochondrial CB1 cannabinoid receptors (mtCB1) in the brain, *Methods Enzymol.*, **593**, 143-174, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.06.023>.
83. Mendizabal-Zubiaga, J., Melser, S., Bénard, G., Ramos, A., Reguero, L., Arrabal, S., Elezgarai, I., Gerrikagoitia, I., Suarez, J., Rodríguez de Fonseca, F., Puente, N., Marsicano, G., and Grandes, P. (2016) Cannabinoid CB1 receptors are localized in striated muscle mitochondria and regulate mitochondrial respiration, *Front. Physiol.*, **7**, <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00476>.

84. Athanasiou, A., Clarke, A. B., Turner, A. E., Kumaran, N. M., Vakilpour, S., Smith, P. A., Bagiokou, D., Bradshaw, T. D., Westwell, A. D., Fang, L., Lobo, D. N., Constantinescu, C. S., Calabrese, V., Loesch, A., Alexander, S. P. H., Clothier, R. H., Kendall, D. A., and Bates, T. A. (2007) Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **364**, 131-137, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.107>.
85. Geddo, F., Antonioti, S., Querio, G., Salaroglio, I. C., Costamagna, C., Riganti, C., and Gallo, M. P. (2021) Plant-derived trans- β -caryophyllene boosts glucose metabolism and ATP Synthesis in skeletal muscle cells through cannabinoid type 2 receptor stimulation, *Nutrients*, **13**, 916, <https://doi.org/10.3390/nu13030916>.
86. Noone, J., Rooney, M. F., Karavyraki, M., Yates, A., O'Sullivan, S. E., and Porter, R. K. (2023) Cancer-cachexia-induced human skeletal muscle myotube degeneration is prevented via cannabinoid receptor 2 agonism *in vitro*, *Pharmaceuticals*, **16**, 1580, <https://doi.org/10.3390/ph16111580>.
87. Dort, J., Orfi, Z., Fisceletti, M., Campeau, P. M., and Dumont, N. A. (2023) Gpr18 agonist dampens inflammation, enhances myogenesis, and restores muscle function in models of Duchenne muscular dystrophy, *Front. Cell Dev. Biol.*, **11**, 1187253, <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1187253>.
88. Phua, W. W. T., Wong, M. X. Y., Liao, Z., and Tan, N. S. (2018) An aPPARent functional consequence in skeletal muscle physiology via peroxisome proliferator-activated receptors, *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1425, <https://doi.org/10.3390/ijms19051425>.
89. Ciaraldi, T. P., Cha, B., Park, K., Carter, L., Mudaliar, S. R., and Henry, R. R. (2002) Free fatty acid metabolism in human skeletal muscle is regulated by PPAR γ and RXR agonists, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **967**, 66-70, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04264.x>.
90. Madrazo, J. A., and Kelly, D. P. (2008) The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **44**, 968-975, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.03.021>.
91. Lorente Fernández, L., Monte Boquet, E., Pérez-Miralles, F., Gil Gómez, I., Escutia Roig, M., Boscá Blasco, I., Poveda Andrés, J. L., and Casanova-Estruch, B. (2014) Clinical experiences with cannabinoids in spasticity management in multiple sclerosis, *Neurologia*, **29**, 257-260, <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2013.06.014>.
92. Renaud, A. M., and Cormier, Y. (1986) Acute effects of marihuana smoking on maximal exercise performance, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **18**, 685-689.
93. Zimmer, A., Zimmer, A. M., Hohmann, A. G., Herkenham, M., and Bonner, T. I. (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5780-5785, <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5780>.
94. Alptekin, A., Galadari, S., Shuba, Y., Petroianu, G., and Oz, M. (2010) The effects of anandamide transport inhibitor AM404 on voltage-dependent calcium channels, *Eur. J. Pharmacol.*, **634**, 10-15, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.02.013>.
95. Augustin, S. M., and Lovinger, D. M. (2018) Functional relevance of endocannabinoid-dependent synaptic plasticity in the central nervous system, *ACS Chem. Neurosci.*, **9**, 2146-2161, <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00508>.
96. Tarasova, E. O., Khotkina, N. A., Bogacheva, P. O., Chernyshev, K. A., Gaydukov, A. E., and Balezina, O. P. (2021) Noncanonical potentiation of evoked quantal release of acetylcholine by cannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in mouse motor synapses, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **15**, 395-405, <https://doi.org/10.1134/S199074782106012X>.
97. Gaydukov, A. E., Dzhalogoniya, I. Z., Tarasova, E. O., and Balezina, O. P. (2020) The participation of endocannabinoid receptors in the regulation of spontaneous synaptic activity at neuromuscular junctions of mice, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **14**, 7-16, <https://doi.org/10.1134/S1990747819060059>.
98. Hoekman, T. B., Dettbarn, W.-D., and Klausner, H. A. (1976) Actions of δ 9-tetrahydrocannabinol on neuromuscular transmission in the rat diaphragm, *Neuropharmacology*, **15**, 315-319, [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(76\)90135-0](https://doi.org/10.1016/0028-3908(76)90135-0).
99. Sánchez-Pastor, E., Trujillo, X., Huerta, M., and Andrade, F. (2007) Effects of cannabinoids on synaptic transmission in the frog neuromuscular junction, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **321**, 439-445, <https://doi.org/10.1124/jpet.106.116319>.
100. Silveira, P. E., Silveira, N. A., De Cássia Morini, V., Kushmerick, C., and Naves, L. A. (2010) Opposing effects of cannabinoids and vanilloids on evoked quantal release at the frog neuromuscular junction, *Neurosci. Lett.*, **473**, 97-101, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.02.026>.
101. Turkkanis, S. A., and Karler, R. (1986) Effects of δ 9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- δ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neuromuscular transmission in the frog, *Neuropharmacology*, **25**, 1273-1278, [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(86\)90147-4](https://doi.org/10.1016/0028-3908(86)90147-4).
102. Van Der Kloot, W. (1994) Anandamide, a naturally-occurring agonist of the cannabinoid receptor, blocks adenylate cyclase at the frog neuromuscular junction, *Brain Res.*, **649**, 181-184, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91062-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91062-6).

103. Tarasova, E. O., Khotkina, N. A., Gaydukov, A. E., and Balezina, O. P. (2021) Spontaneous acetylcholine release potentiation induced by 2-arachidonoylglycerol and anandamide in mouse motor synapses, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **76**, 1-6, <https://doi.org/10.3103/S0096392521010053>.
104. Pothos, E. N., Larsen, K. E., Krantz, D. E., Liu, Y., Haycock, J. W., Setlik, W., Gershon, M. D., Edwards, R. H., and Sulzer D. (2000) Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size, *J. Neurosci.*, **20**, 7297-7306, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-19-07297.2000>.
105. Wilson, N. R., Kang, J., Hueske, E. V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J. G., Erickson, J. D., and Liu, G. (2005) Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1, *J. Neurosci.*, **25**, 6221-6234, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3003-04.2005>.
106. Бalezина О. П., Гайдуков А. Е. (2018) Пресинаптическая регуляция размера квантов медиатора, *Усп. Физиол. Наук*, **49**, 20-44, <https://doi.org/10.7868/S0301179818020029>.
107. Ruiz, R., Cano, R., Casanas, J. J., Gaffield, M. A., Betz, W. J., and Tabares, L. (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse, *J. Neurosci.*, **31**, 2000-2008, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011>.
108. Sulzer, D., and Pothos, E. N. (2000) Regulation of quantal size by presynaptic mechanisms, *Rev. Neurosci.*, **11**, <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2000.11.2-3.159>.
109. Gaydukov, A., Bogacheva, P., Tarasova, E., Molchanova, A., Miteva, A., Pravdivceva, E., and Balezina, O. (2019) Regulation of acetylcholine quantal release by coupled thrombin/BDNF signaling in mouse motor synapses, *Cells*, **8**, 762, <https://doi.org/10.3390/cells8070762>.
110. Gaydukov, A. E., and Balezina, O. P. (2018) Ryanodine- and CaMKII-dependent release of endogenous CGRP induces an increase in acetylcholine quantal size in neuromuscular junctions of mice, *Brain Behav.*, **8**, e01058, <https://doi.org/10.1002/brb3.1058>.
111. Gaydukov, A. E., Bogacheva, P. O., and Balezina, O. P. (2016) Calcitonin gene-related peptide increases acetylcholine quantal size in neuromuscular junctions of mice, *Neurosci. Lett.*, **628**, 17-23, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.014>.
112. Kouchaeknejad, A., Van Der Walt, G., De Donato, M. H., and Puighermanal, E. (2023) Imaging and genetic tools for the investigation of the endocannabinoid system in the CNS, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15829, <https://doi.org/10.3390/ijms242115829>.
113. Busquets-Garcia, A., Bains, J., and Marsicano, G. (2018) CB1 receptor signaling in the brain: extracting specificity from ubiquity, *Neuropsychopharmacology*, **43**, 4-20, <https://doi.org/10.1038/npp.2017.206>.
114. Sidibeh, C. O., Pereira, M. J., Lau Börjesson, J., Kamble, P. G., Skrtic, S., Katsogiannos, P., Sundbom, M., Svensson, M. K., and Eriksson, J. W. (2017) Role of cannabinoid receptor 1 in human adipose tissue for lipolysis regulation and insulin resistance, *Endocrine*, **55**, 839-852, <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1172-6>.
115. Bazwinsky-Wutschke, I., Zipprich, A., and Dehghani, F. (2019) Endocannabinoid system in hepatic glucose metabolism, fatty liver disease, and cirrhosis, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2516, <https://doi.org/10.3390/ijms20102516>.
116. Fowler, C. J. (2013) Transport of endocannabinoids across the plasma membrane and within the cell, *FEBS J.*, **280**, 1895-1904, <https://doi.org/10.1111/febs.12212>.
117. Leboffe, L., Di Masi, A., Trezza, V., Polticelli, F., and Ascenzi, P. (2017) Human serum albumin: a modulator of cannabinoid drugs, *IUBMB Life*, **69**, 834-840, <https://doi.org/10.1002/iub.1682>.
118. Mazier, W., Saucisse, N., Gatta-Cherifi, B., and Cota, D. (2015) The endocannabinoid system: pivotal orchestrator of obesity and metabolic disease, *Trends Endocrinol. Metab.*, **26**, 524-537, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.007>.
119. Dietrich, A., and McDaniel, W. F. (2004) Endocannabinoids and exercise, *Br. J. Sports Med.*, **38**, 536-541, <https://doi.org/10.1136/bjism.2004.011718>.
120. Liu, Y., Jia, S., Wang, J., Wang, D., Zhang, X., Liu, H., Zhou, F., Zhang, Z., Li, Q., Dong, H., and Zhong, H. (2022) Endocannabinoid signaling regulates post-operative delirium through glutamatergic mediodorsal thalamus-prelimbic prefrontal cortical projection, *Front. Aging Neurosci.*, **14**, 1036428, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1036428>.
121. Crombie, K. M., Brellenthin, A. G., Hillard, C. J., and Koltyn, K. F. (2018) Endocannabinoid and opioid system interactions in exercise-induced hypoalgesia, *Pain Med.*, **19**, 118-123, <https://doi.org/10.1093/pm/pnx058>.
122. Forteza, F., Giorgini, G., and Raymond, F. (2021) Neurobiological processes induced by aerobic exercise through the endocannabinoidome, *Cells*, **10**, 938, <https://doi.org/10.3390/cells10040938>.
123. Forteza, F., Bourdeau-Julien, I., Nguyen, G. Q., Guevara Agudelo, F. A., Rochefort, G., Parent, L., Rakotoarivelo, V., Feutry, P., Martin, C., Perron, J., Lamarche, B., Flamand, N., Veilleux, A., Billaut, F., Di Marzo, V., and Raymond, F. (2022) Influence of diet on acute endocannabinoidome mediator levels post exercise in active women, a cross-over randomized study, *Sci. Rep.*, **12**, 8568, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10757-0>.
124. Belitardo De Oliveira, A., De Mello, M. T., Tufik, S., and Peres, M. F. P. (2019) Weight loss and improved mood after aerobic exercise training are linked to lower plasma anandamide in healthy people, *Physiol. Behav.*, **201**, 191-197, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.12.018>.

MYOGENIC CLASSICAL ENDOCANNABINOIDS, THEIR TARGETS AND ACTIVITY

Review

O. P. Balezina, E. O. Tarasova*, and P. O. Bogacheva

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: cate1990@list.ru

This review focuses on the recently discovered specific action of two classical endocannabinoids (EC), 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and arachidonylethanolamide (AEA), in the case of their synthesis and degradation in skeletal muscles, in other words this review is dedicated to the properties and action of the myoendocannabinoid (myoEC) pool. The influence of this pool is considered at three different levels: at the level of skeletal muscles, motor synapses, and also at the level of the whole organism, including the central nervous system. Special attention is paid to the still significantly underestimated and intriguing ability of ECs to have a positive effect on energy exchange and contractile activity of muscle fibers, as well as on transmitter secretion in motor synapses. The role of muscle contractions in the regulation of the activity balance of synthesis and degradation enzymes for myoECs and therefore in the release of myoECs and the exertion of their specific effects is thoroughly considered. Increasingly popular hypotheses about the prominent role of myoECs (AEA and/or 2-AG) in the rise of the overall level of ECs in the blood during muscle exercise and the development of “runner’s high” and about the role of myoECs in the correction of a number of psychophysiological conditions (pain syndrome, stress, etc.) are discussed here. Thus, this review presents information about the myoEC pool from a totally new viewpoint, underlining its possible independent and non-trivial regulatory role in the body, in contrast to the traditional and well-known activity of neurogenic ECs.

Keywords: muscle endocannabinoids, cannabinoid receptors, endocannabinoid release from muscle, basal endocannabinoid level

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *GRIPAP1*, *DLG4*, *KIF1B*, *NGFRAP1* И *NRF1* В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА НА РАННИХ КЛИНИЧЕСКИХ СТАДИЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© 2024 М.В. Лукашевич^{1*}, М.М. Руденок¹, Е.И. Семенова¹, С.А. Партевян¹,
А.В. Карабанов², Е.Ю. Федотова², С.Н. Иллариошкин², П.А. Сломинский¹,
М.И. Шадрина¹, А.Х. Алиева¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: farouki@mail.ru

² ФГБНУ «Научный центр неврологии», 125367 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.05.2024

После доработки 19.09.2024

Принята к публикации 23.09.2024

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространённых прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний. Важной особенностью данного заболевания является длительный скрытый период развития, в связи с чем необходим поиск прогностических биомаркеров ранних клинических стадий данного заболевания. Одним из методов выявления биомаркеров БП является изучение изменения экспрессии генов в периферической крови пациентов, находящихся на ранней стадии заболевания и не подвергавшихся лечению. В настоящей работе был проведён анализ относительных уровней мРНК генов *GRIPAP1*, *DLG4*, *KIF1B*, *NGFRAP1* и *NRF1*, которые связаны с транспортом нейромедиаторов, апоптозом и митохондриальной дисфункцией, в периферической крови пациентов с БП с применением методов обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-зондов. Результаты представленной работы позволяют предположить, что гены *GRIPAP1* и *DLG4* можно рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров ранних клинических стадий БП. Полученные данные могут указывать на то, что *NGFRAP1* вовлечён в патогенез как БП, так и других нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, в настоящей работе показано, что на исследуемых нами ранних клинических стадиях гены *KIF1B* и *NRF1* не вовлечены в патогенез БП на уровне экспрессии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Паркинсона, экспрессия генов, периферическая кровь, ранняя диагностика.

DOI: 10.31857/S0320972524100067 EDN: IPNVMC

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространённых прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний [1, 2]. По глобальным оценкам, в 2016 году количество пациентов с диагнозом БП составляло 6 млн, по данным 2020 года – уже 9,4 млн [3, 4]. Характерной особенностью БП является длительный скрытый период развития, в течение которого происходит гибель примерно половины дофаминергических нейронов (ДА-нейронов) в компактной части чёрной

субстанции (ЧС) и 80%-ное снижение уровня дофамина (ДА) в стриатуме. От инициации нейродегенерации до постановки диагноза по характерным двигательным симптомам (тремор, брадикинезия, ригидность и постуральная неустойчивость) [5] может пройти около 20 лет [6, 7].

Одним из перспективных направлений исследования нейродегенерации при БП является изучение экспрессии генов, которые могут быть связаны с патогенезом БП. Ранее на уровне транскриптома было показано изменение экспрессии большого количества генов, вовлечённых в метаболизм ДА [8–10], функционирование митохондрий, окислительный стресс [10–14], деградацию белка [10–13, 15], везикулярный транспорт, синаптическую передачу [10–12]. При этом наиболь-

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; ДА – дофамин.

* Адресат для корреспонденции.

шую сложность представляет исследование ранних стадий заболевания, поскольку для изучения недоступны эндогенные процессы, происходящие на ранних этапах развития патологии в головном мозге пациентов.

В связи с этим для исследования экспрессионного профиля генов широко используется периферическая кровь больных БП. В клетках крови экспрессируются тирозингидроксилаза [16] и рецепторы (D1- и D2-подобные) ДА [17]. Повышенная плотность D1-подобных и D2-подобных рецепторов на лейкоцитах периферической крови у пациентов с БП *de novo* может представлять собой механизм активации, возникающий в результате диффузного нарушения дофаминергической системы при БП [18]. Наличие данных белков характерно, в первую очередь, для ДА-нейронов. Кроме того, экспериментально было показано, что в периферической крови могут отражаться изменения, происходящие в головном мозге [19].

На данный момент существует большое количество работ, посвящённых изменению транскриптома, а также проведены метаанализы полученных данных. Исследования проводились в основном в постмортальных тканях мозга, а также в периферической крови, спинномозговой жидкости и фибробластах кожи пациентов с БП. По итогам этих исследований выделяются процессы, связанные с развитием иммунного ответа, воспаления, процессингом РНК, функционированием митохондрий и программируемой клеточной гибелью, ремоделированием и метилированием хроматина [20]. Однако необходимо отметить, что выявленные дифференциально экспрессирующиеся гены частично или полностью отличаются в каждой работе. Данное явление может быть обусловлено различиями в формировании выборки, проводимой терапией и/или наличием сопутствующих заболеваний у пациентов с БП [21–27]. Стоит также отметить, что в этих исследованиях участвовали пациенты преимущественно на продвинутых стадиях заболевания. В то же время большое значение имеет поиск дифференциально экспрессирующихся генов у пациентов, находящихся на максимально ранних клинических стадиях заболевания. Эти данные позволят в дальнейшем сформировать экспрессионную панель для диагностики ранних стадий БП.

В связи с этим нами был проведён анализ экспрессии генов *GRIPAP1*, *DLG4*, *KIF1B*, *NGFRAP1* и *NRF1* у пациентов, находящихся на ранних клинических стадиях заболевания. Гены были отобраны в результате проведённого ранее полнотранскриптомного анализа периферической крови пациентов с БП [28] и анализа литературы [29, 30]. Белки, кодируемые генами *DLG4* и *GRIPAP1*, участвуют в кластеризации рецепторов

глутамата и калиевых каналов [31, 32]. Белок, кодируемый геном *KIF1B*, вовлечён в транспорт митохондрий [33]. Белок, кодируемый геном *NGFRAP1*, участвует в апоптозе [34, 35]. Белок, кодируемый *NRF1*, активирует митохондриальный биогенез [36].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В данной работе были изучены 2 группы пациентов с недавно поставленным диагнозом «болезнь Паркинсона» (1–2 стадия БП по шкале Хён и Яра) (табл. 1):

- 35 пациентов с БП, не получавших медикаментозную терапию. Средний возраст и стандартное отклонение составили $57,76 \pm 8,11$ лет;
- 12 пациентов с БП, получавших медикаментозную терапию. Средний возраст и стандартное отклонение составили $57,86 \pm 9,09$ лет.

Для постановки диагноза пациенты были обследованы по Международной унифицированной оценочной шкале БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS) и шкале Хён и Яра [37]. Пациенты и неврологически здоровые добровольцы (русские, проживающие в европейской части России) были отобраны в Научном центре неврологии (Москва, Россия). Все участники были обследованы на наличие частых мутаций во всех генах, ответственных за моногенные формы БП, и не имели семейного анамнеза БП. Форма БП была спорадической. У всех участников не было серьёзных сопутствующих заболеваний, таких как тяжёлые сердечно-сосудистые заболевания, рак или сахарный диабет. Форма БП была преимущественно смешанной.

Пациенты с БП, получавшие терапию, принимали различные лекарства с агонистами рецепторов ДА (прамипексол в дозе 1,5 мг/день или пирибедил в дозе 150 мг/день, L-допа в дозе 150–200 мг/день или амантадин в дозе 300 мг/день) либо в качестве монотерапии, либо в различных комбинациях.

В качестве групп сравнения в настоящей работе исследовались следующие выборки (табл. 1):

- 23 пациента с различными неврологическими заболеваниями (боковой амиотрофический склероз, болезнь Шарко–Мари–Тута, болезнь Вильсона и мозжечковая атаксия из одной и той же популяции). Средний возраст и стандартное отклонение составили $46,11 \pm 14,47$ лет;
- 44 неврологически здоровых добровольца. Средний возраст и стандартное отклонение составили $50,45 \pm 11,92$ лет.

В группу с различными неврологическими патологиями и в группу здорового контроля отбирались лица славянского происхождения

Таблица 1. Демографическая характеристика выборок

Выборки	Возраст (лет), среднее $\pm$ ст. откл.	Соотношение полов
Здоровый контроль*	50,45 $\pm$ 11,92	43,48% мужчин, 56,52% женщин
Пациенты с БП, не получавшие терапию*	57,76 $\pm$ 8,11	45,83% мужчин, 54,17% женщин
Пациенты с БП, получавшие терапию*	57,86 $\pm$ 9,09	50,00% мужчин, 50,00% женщин
Неврологический контроль*	46,11 $\pm$ 14,47	38,64% мужчин, 61,36% женщин

* $p > 0,05$, выборки пациентов с БП и неврологический контроль сравнивались с группой здорового контроля. Достоверных различий по возрасту между выборками не было обнаружено.

обоих полов в возрасте от 30 до 70 лет. Подбор группы неврологического контроля осуществлялся так, чтобы патогенез заболеваний у пациентов из этой группы, с одной стороны, сильно отличался от такового при БП, а с другой – был напрямую связан с центральной нервной системой и процессами нейродегенерации. Согласно Международному классификатору болезней последней редакции (МКБ-10), БП входит в группу «Экстрапирамидные и другие двигательные нарушения» (G20–G26), а заболевания пациентов, входящих в группу неврологического контроля, относятся к иным классификациям (G10–G14, G60, E83 и G11).

Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассамблеи – этическими принципами медицинских исследований с участием людей. Все образцы крови были собраны с информированного согласия обследуемых лиц. Исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (Москва, Россия), протокол 18/4 [19].

Выделение РНК из крови. Для выделения тотальной РНК взятие образцов периферической крови осуществляли в 8 часов утра натощак, затем хранили образцы при температуре 4 °C не более 2 часов до выделения. Выделение тотальной РНК проводили из 200 мкл цельной крови с использованием набора ZR Whole-Blood Total RNA Kit™ («Zymo Research Corp.», Ирвайн, Калифорния, США), согласно рекомендациям производителя. Концентрацию выделенной тотальной РНК измеряли с помощью набора Quant-iT RNA BR Assay Kit и флуориметра Qubit 3.0 («Invitrogen», Карлсбад, Калифорния, США). Качество полученной РНК оценивали при помощи набора Experion™ RNA HighSens Analysis Kit и системы The Experion system («Bio-Rad», Геркулес, Калифорния, США). После выделения тотальную РНК разводили с тРНК дрожжей (100 нг/мкл) в пропорции 10 : 1 [38], что способствует наибольшему выходу целевой РНК при амплификации [39].

Анализ изменения относительных уровней мРНК генов-кандидатов. Анализ изменения относительных уровней мРНК генов-кандидатов проводили с помощью реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-зондов [40].

Реакция обратной транскрипции. Реакция обратной транскрипции была проведена с использованием набора RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase kit («Thermo Fisher Scientific», Уолтем, Массачусетс, США), в соответствии с рекомендациями производителя. Для последующей амплификации использовали прибор T3 Thermocycler (T3 Thermoblock, «Biometra», Нижняя Саксония, Гёттинген, Германия).

ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan. При проведении ПЦР в реальном времени в качестве матрицы использовались кДНК, полученные в ходе реакции обратной транскрипции и разведённые в растворе тРНК (100 нг/мкл). ПЦР в реальном времени проводилась на приборах StepOnePlus™ System («Applied Biosystems», США) с использованием реагентов для ПЦР («Синтол», Россия). В состав 30 мкл реакционной смеси входило: 5 мкл кДНК (0,02 нг/мкл), 3 мкл ПЦР-буфера ($\times 10$, «Синтол»), 3 мкл 25 мМ $MgCl_2$, 10 пМ праймеров («Евроген», Москва, Россия), 2,5 пМ зонда («ДНК-синтез», Москва, Россия), 200 мкМ каждого dNTP, 1 ед. акт. Hot-Rescue Taq-ДНК-полимеразы («Синтол»). Для повышения эффективности ПЦР в образцы кДНК также добавляли по 1 мкл тРНК дрожжей [38, 39]. При проведении амплификации использовали следующий температурный режим: 50 °C, 60 с; 95 °C, 600 с; далее 40 циклов: 95 °C, 20 с и 61 °C, 50 с. Каждый образец анализировали трижды для коррекции различий в качестве образцов и эффективности реакции обратной транскрипции.

Подбор праймеров и зондов TaqMan для ПЦР в реальном времени. При подборе праймеров использовали последовательности мРНК исследуемых генов из базы данных Gene NCBI [41]. Для определения длины интронов в геноме

Таблица 2. Последовательности ген-специфичных праймеров и зондов

Ген	Нуклеотидная последовательность		Размер ампликона, п.н.
<i>AARS</i> NM_001605.2*	зонд	5'-FAM-TATGTTCACTCGTCTGCCACCATCCCAT-BHQ1-3'	154
	прямой праймер	5'-CGGCAGCGATTATAGATTTCTTCAAG-3'	
	обратный праймер	5'-GGTGAGATGGGTCAATTGTGTTC-3'	
<i>PSMD7</i> NM_002811.4	зонд	5'-FAM-GCTTCTGTAGGCAGCCCTAGGTCCTTCGG-BHQ1-3'	127
	прямой праймер	5'-TGTCCTAATTCGATTTGGTCATCATTTG-3'	
	обратный праймер	5'-CGTGTTCAAATGTTTTCGAGGTTGG-3'	
<i>NRF1</i> NM_001293163.1	зонд	5'-VIC-CACGTTTGCTTCGGAACTTCGAGCCACG-BHQ2-3'	123
	прямой праймер	5'-AGAAACGGAAACGGCCTCAT-3'	
	обратный праймер	5'-CTTGCTGTCCCACACGAGTA-3'	
<i>KIF1B</i> NM_183416.3	зонд	5'-VIC-AATGAGACCAACCTTTCCACTGAGA-BHQ2-3'	87
	прямой праймер	5'-CTGTGTTTACGATTGTTTTC-3'	
	обратный праймер	5'-CCACCAAGCTGATTTTAC-3'	
<i>DLG4</i> NM_001128827.1	зонд	5'-VIC-AGCAATGCCTACCTGAGTGACA-BHQ2-3'	123
	прямой праймер	5'-CACGTATGATGTTGTCTAC-3'	
	обратный праймер	5'-CTGTGACTGATCTCATTG-3'	
<i>GRIPAP1</i> NM_020137.4	зонд	5'-VIC-TGAAAATGAGATGCTGCAGG-BHQ2-3'	109
	прямой праймер	5'-TCAGAAGGCACTGAGCAAGA-3'	
	обратный праймер	5'-AACTCGGCCATTAGTGTGCT-3'	
<i>NGFRAP1</i> NM_001282674.1	зонд	5'-VIC-GCGTCTGGCTACCAGCTC-BHQ2-3'	99
	прямой праймер	5'-CTTCGGTGCAGTCGTCACT-3'	
	обратный праймер	5'-TTGTTTTTCTGCTCCGCTTT-3'	

* Номера в базе данных GenBank (Accession numbers).

FAM и VIC – флуоресцентные красители; BHQ1 и BHQ2 – тушители флуоресценции.

использовался ресурс Ensembl genome browser. Праймеры и зонды для проведения реакции ПЦР в реальном времени были подобраны с помощью программы Beacon Designer 7.0 («Premier Biosoft International», Пало-Алто, США) и нуклеотидных последовательностей генов *GRIPAP1*, *DLG4*, *KIF1B*, *NRF1* и *NGFRAP1*, а также генов «домашнего хозяйства» *AARS* и *PSMD7*. Подобранные праймеры синтезировались в компании «Евроген», зонды – в «ДНК-синтез» (последовательности ген-специфичных праймеров и зондов представлены в табл. 2).

Статистическая обработка результатов. Расчёт относительных уровней экспрессии проводился с использованием метода сравнения пороговых

уровней амплификации $\Delta\Delta C_t$ [40]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ «Statistica for Windows 8.0» («StatSoft, Inc.» (2007)) и программного обеспечения MS Excel 2013 («Microsoft»). Для оценки относительных уровней экспрессии генов применяли непараметрический U-тест Манна-Уитни [42, 43]. Проверка специфичности праймеров и зонда осуществлялась с помощью ресурса Primer3 и BLAST (Primer designing tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)), используя базу RefSeq Release (RefSeq: NCBI Reference Sequence Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе был проведён анализ изменения относительных уровней мРНК генов *DLG4*, *GRIPAP1*, *KIF1B*, *NGFRAP1* и *NRF1* в периферической крови пациентов с БП, находящихся на ранних стадиях заболевания (1–2 по шкале Хён–

Яра), получавших и не получавших терапию. Для оценки специфичности наблюдаемых изменений при патогенезе БП был проведён анализ исследуемых генов в группе неврологического контроля, куда вошли пациенты с различными нейродегенеративными заболеваниями. Результаты экспрессионного анализа представлены в табл. 3.

Таблица 3. Изменение относительных уровней мРНК в периферической крови пациентов с БП и в группах сравнения относительно группы здорового контроля

Ген	Пациенты с БП, не получавшие терапию, $n = 35$	Пациенты с БП, получавшие терапию, $n = 12$	Неврологический контроль, $n = 44$
<i>DLG4</i>	0,55¹ (0,26; 0,79)²	1,21 (0,76; 1,91)	1,17 (0,75; 2,09)
<i>GRIPAP1</i>	0,42 (0,24–1,36)	1,38 (0,33–3,23)	2,84 (1,16–5,62)
<i>KIF1B</i>	0,91 (0,69–1,38)	1,01 (0,75–1,52)	1,69 (1,13–2,89)
<i>NGFRAP1</i>	0,46 (0,22–0,70)	0,52 (0,44–0,78)	0,47 (0,23–1,01)
<i>NRF1</i>	0,89 (0,64–1,31)	0,81 (0,51–0,99)	1,14 (0,65–1,34)

Примечание. Результаты с FDR представлены в Приложении.

¹ Медиана; ² 25–75-процентили; уровень экспрессии в здоровом контроле принят за единицу. Значения с $p < 0,05$ выделены цветом и жирным шрифтом.

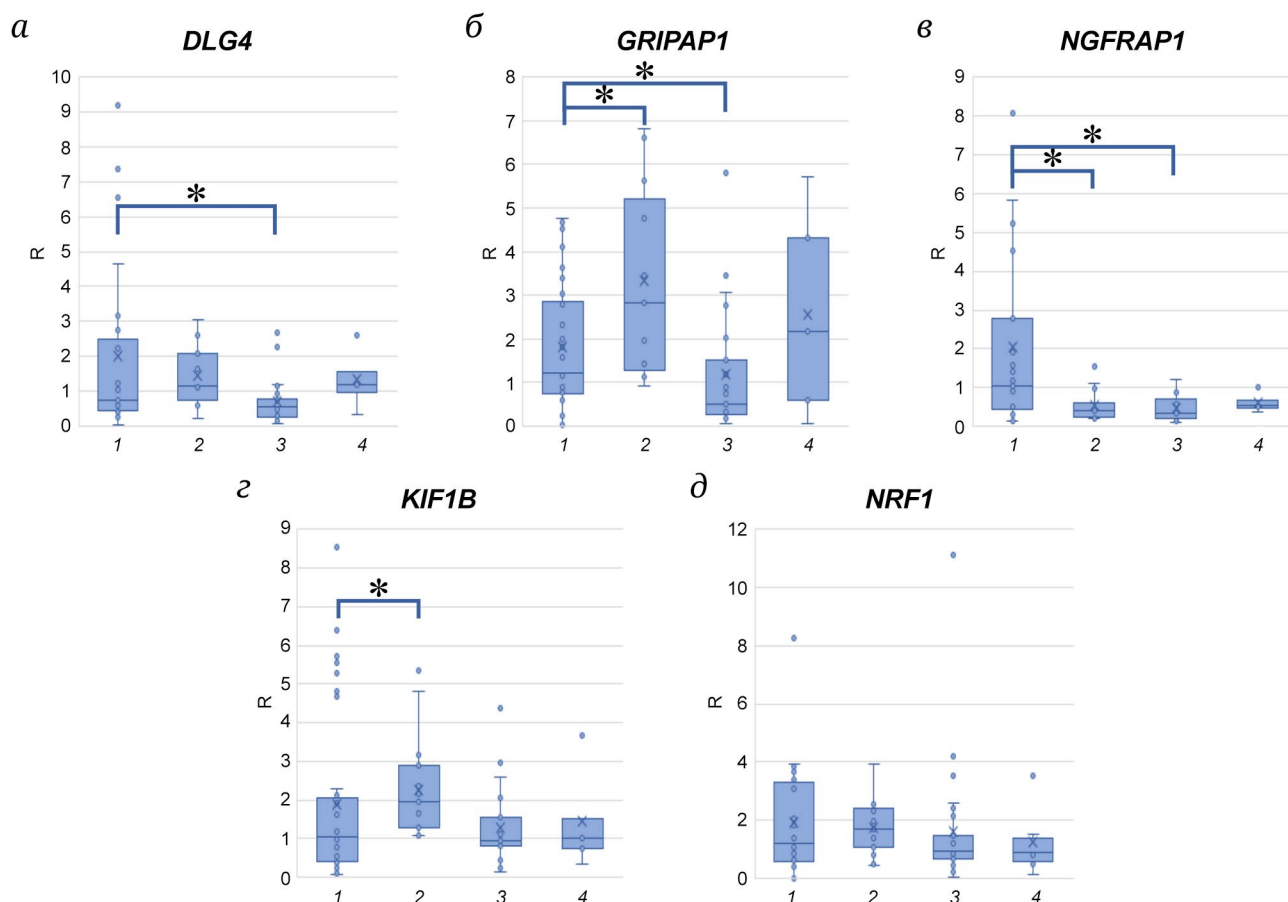


Рис. 1. Изменение относительных уровней мРНК генов *DLG4* (а), *GRIPAP1* (б), *NGFRAP1* (в), *KIF1B* (г), *NRF1* (д) в периферической крови пациентов с БП и в группах сравнения относительно группы здорового контроля (1). Значения с $p < 0,05$ выделены символом «*». 2 – Группа неврологического контроля; 3 – пациенты с БП, не получавшие медикаментозную терапию; 4 – пациенты с БП, получавшие медикаментозную терапию

Как видно из табл. 3 и рис. 1, среди всех исследуемых генов только для гена *NRF1* (рис. 1, д) не было показано статистически значимых изменений относительной экспрессии по сравнению с контрольной группой.

Для генов *DLG4* и *GRIPAP1* выявлено падение экспрессии более чем в 1,5 раза у пациентов с БП, не получавших антипаркинсоническую терапию, относительно группы здорового контроля (рис. 1, а и б соответственно). При этом такое изменение является специфичным для БП, так как в группе неврологического контроля аналогичного падения экспрессии не наблюдается. Для гена *GRIPAP1* в группе неврологического контроля, наоборот, выявлено статистически значимое повышение экспрессии почти в 3 раза.

Для гена *NGFRAP1* выявлено падение относительной экспрессии в 2 раза в группе пациентов с БП, не получавших терапию (рис. 1, в). Однако эти данные не являются специфичными для БП, так как в группе неврологического контроля также выявлено аналогичное статистически значимое снижение относительной экспрессии этого гена.

Как можно видеть в таблице, для гена *KIF1B* выявлено статистически значимое увеличение относительной представленности его транскрипта более чем в 1,5 раза в группе неврологического контроля (рис. 1, г). Однако статистически значимых изменений на уровне мРНК в образцах периферической крови пациентов с БП обнаружено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Патогенез БП характеризуется длительным бессимптомным периодом развития и медленным неуклонно прогрессирующим течением заболевания. Вследствие этого изменения, возникающие на ранних этапах, до сих пор мало изучены.

В связи с особенностями локализации ДА-нейронов практически невозможно корректное исследование молекулярных процессов, происходящих в головном мозге и лежащих в основе патогенеза БП при жизни пациентов. Исходя из этого, одним из самых доступных материалов для изучения изменения экспрессии генов у человека является периферическая кровь.

В настоящей работе был проведён экспрессионный анализ относительных уровней мРНК генов *GRIPAP1*, *DLG4*, *KIF1B* и *NGFRAP1*, отобранных по результатам полнотранскриптомного анализа [28], и *NRF1*, отобранного на основе анализа литературы [29, 30].

В результате нами выявлено достоверное снижение экспрессии для 3 генов (*DLG4*, *GRIPAP1*, *NGFRAP1*) в группе пациентов с БП, не получав-

ших лечение и находящихся на ранних клинических стадиях заболевания. При этом выявленное нами впервые падение экспрессии генов *DLG4* и *GRIPAP1* является специфичным для БП (табл. 3 и рис. 1, а и б).

Ген *DLG4* кодирует белок PSD-95. Установлено, что PSD-95 инициирует кластеризацию рецепторов глутамата и калиевых каналов (AMPA-рецепторов, NMDA-рецепторов), отвечает за взаимодействие глутаматных рецепторов с D1-рецепторами ДА [31]. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что данный белок обеспечивает закрепление глутаматных и калиевых рецепторов на синаптической мембране [44].

Ранее в исследовании на грызунах было установлено, что снижение относительных уровней мРНК *DLG4* и последующее снижение экспрессии на уровне белка PSD-95 приводят к уменьшению количества этой киназы на поверхности синаптической мембраны [45]. Это, в свою очередь, может приводить к дисбалансу нейромедиаторов, что является характерной особенностью БП. Таким образом, выявленные нами изменения в периферической крови пациентов с БП, не получавших лечения и находящихся на ранних клинических стадиях заболевания, совпадают с результатами исследований, проведённых ранее на грызунах.

Полученные нами данные могут указывать на вовлечённость глутаматергической системы в патогенез ранних клинических стадий БП, а *DLG4* можно рассматривать в качестве диагностического биомаркера ранних клинических стадий данного заболевания.

Вторым геном, изменившим свою экспрессию, является *GRIPAP1*. Как можно видеть в табл. 3 и на рис. 1, б, выявлено достоверное снижение относительного уровня экспрессии данного гена в два раза для пациентов с БП, не получавших терапию. Этот ген кодирует фактор обмена гуаниновых нуклеотидов семейства малых G-белков Ras (RasGEF) [32]. Данный белок в комплексе с GRIP1 участвует в регуляции активности AMPA-рецепторов, взаимодействуя с белками Rab4 и Rab11, и, таким образом, контролирует рециркуляцию эндосом [46].

В ряде исследований было установлено, что снижение экспрессии этого гена ингибирует слияние Rab4- и Rab11-эндосом, что приводит к последующему уменьшению кластеризации AMPA-рецепторов на плазматической мембране [32, 47].

Полученные нами данные могут указывать на участие *GRIPAP1* в компенсаторных механизмах при БП путём изменения уровня синаптической передачи сигналов через глутаматные рецепторы.

С другой стороны, нами выявлено усиление относительной экспрессии *GRIPAP1* в группе неврологического контроля (табл. 3, рис. 1, б).

В работе Hoogenraad et al. было показано, что сверхэкспрессия гена *GRIPAP1* приводит к усилению созревания рециркулирующих эндосом и увеличению количества AMPA-рецепторов на мембране [46, 47]. Полученные нами данные могут свидетельствовать об изменении функционирования глутаматергической системы при различных нейродегенеративных патологиях.

Таким образом, характер участия *GRIPAP1* в процессах, происходящих при патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в том числе при развитии БП, требует дальнейшего изучения. Однако полученные данные позволяют рассматривать снижение экспрессии данного гена в качестве потенциального биомаркера БП ранних клинических стадий БП.

Для гена *NGFRAP1* выявлено достоверное падение экспрессии как у больных с БП, не получавших лечение, так и в группе неврологического контроля (табл. 3, рис. 1, в). *NGFRAP1*, кодирующий белок VEX3, принадлежит к семейству генов VEX, которые экспрессируются преимущественно в мозге [34, 35]. На сегодняшний день роль *NGFRAP1* не только в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, но и в клеточных процессах в целом остаётся не до конца ясной.

Тем не менее Mukai et al. в своих работах на клеточных культурах показали, что Vex3 взаимодействует с рецептором нейротрофина p75 (p75NTR), что может приводить к NGF-индуцированному апоптозу [48, 49]. В 2015 году при исследовании различных культур клеток была описана критическая роль Vex3 в экспрессии трансмембранного рецептора TrkA [50]. Снижение уровня экспрессии *NGFRAP1* приводило к снижению выживаемости нейронов в связи с уменьшением количества белка TrkA и представленности транскриптов гена *trkA* [51].

Полученные нами результаты могут указывать на то, что *NGFRAP1* вовлечён в патогенез как БП, так и других нейродегенеративных заболеваний. Однако в настоящий момент о функционировании этого гена ещё недостаточно данных, которые могут указывать на его более точную роль в нейродегенеративных процессах.

Для гена *KIF1B* показано статистически значимое увеличение относительной представленности его транскрипта в 1,69 раз в группе неврологического контроля (табл. 3, рис. 1, г). Ген *KIF1B* кодирует моторный белок, участвующий в антероградном транспорте митохондрий в гладкий эндоплазматический ретикулум, где происходит митоптоз [33, 52, 53]. Антероградный транспорт митохондрий необходим для роста и регенерации аксонов, а также для доставки здоровых митохондрий из тела клетки к окончаниям аксонов [54].

Таким образом, увеличение экспрессии данного гена в группе неврологического контроля может указывать на его вовлечение в компенсаторные механизмы при развитии общих нейродегенеративных процессов. При этом может происходить усиление транспорта митохондрий для удовлетворения потребности в энергии в дистальных участках нервных клеток. Однако нами не было обнаружено подобных изменений в исследуемых группах пациентов с БП, что может указывать на отсутствие включения аналогичных компенсаторных механизмов при БП на исследуемых стадиях.

Кроме того, нами был проведён анализ изменения относительной экспрессии гена *NRF1*. В настоящее время известно, что *NRF1* активирует митохондриальный биогенез [36]. Белок, кодируемый данным геном, является транскрипционным фактором, который действует на ядерные гены, кодирующие дыхательные субъединицы и компоненты механизма транскрипции и репликации митохондрий [55, 56]. Имеющиеся данные позволяют предположить, что этот ген может быть вовлечён в патогенез БП.

Тем не менее в нашей работе для гена *NRF1* не показано статистически значимых изменений относительной экспрессии в периферической крови как пациентов с БП, получавших и не получавших терапию, так и в группе неврологического контроля.

Полученные данные позволяют предположить, что на исследуемых нами ранних клинических стадиях ген *NRF1* не вовлечён в патогенез БП на уровне экспрессии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ изменений экспрессии генов на уровне их РНК в периферической крови пациентов с БП на ранних клинических стадиях показал достоверное и специфичное для БП изменение экспрессии двух генов: *DLG4* и *GRIPAP1*. Эти гены могут быть связаны с патогенезом БП на ранних клинических стадиях заболевания. Кроме того, эти гены можно рассматривать как потенциальные биомаркеры ранних стадий БП. По полученным данным ген *NGFRAP1* может участвовать в патогенезе как БП, так и других нейродегенеративных заболеваний. Однако его роль в нейродегенеративных процессах требует дальнейшего изучения. Гены *KIF1B* и *NRF1*, вероятно, не участвуют в патогенезе БП на ранних клинических стадиях.

Вклад авторов. Проведение экспериментальных работ и статистическая обработка результатов: Лукашевич М.В., Руденок М.М., Семенова Е.И.,

Партевян С.А. Сбор и формирование выборок: Карабанов А.В., Федотова Е.Ю. Написание статьи: Лукашевич М.В., Алиева А.Х. Формирование концепции статьи: Шадрина М.И., Сломинский П.А., Иллариошкин С.Н., Алиева А.Х. Обсуждение результатов: Руденок М.М., Сломинский П.А., Шадрина М.И., Алиева А.Х.

Финансирование. Работа сотрудников Шадриной М.И., Руденок М.М., Алиевой А.Х. проводилась при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00262, <https://rscf.ru/project/20-15-00262>). Работа Семеновской Е.И., Партевян С.А., Сломинского П.А. проводилась в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» (тема 5.Ф.5.9).

Благодарности. Работа выполнена на базе «Центр коллективного пользования» КК НБИКС-ПТ НИЦ «Курчатовский институт».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balestrino, R., and Schapira, A. H. V. (2020) Parkinson disease, *Eur. J. Neurol.*, **27**, 27-42, <https://doi.org/10.1111/ene.14108>.
2. Lee, A., and Gilbert, R. M. (2016) Epidemiology of Parkinson disease, *Neurol. Clinics*, **34**, 955-965, <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>.
3. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016, *Lancet. Neurol.*, **17**, 939-953, [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(18)30295-3).
4. Maserejian, N., Vinikoor-Imler, L., and Dilley, A. (2020) Estimation of the 2020 Global population of Parkinson's disease (PD), *Mov. Disord.*, **35**, 79-80, <https://doi.org/10.1002/mds.28268>.
5. Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., Marshall, F. J., Ravina, B. M., Schifitto, G., Siderowf, A., and Tanner, C. M. (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030, *Neurology*, **68**, 384-386, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03>.
6. Maiti, P., Manna, J., and Dunbar, G. L. (2017) Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: targets for potential treatments, *Translat. Neurodegener.*, **6**, 28, <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0099-z>.
7. Cheng, F., Vivacqua, G., and Yu, S. (2011) The role of α -synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity, *J. Chem. Neuroanat.*, **42**, 242-248, <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.12.001>.
8. Grunblatt, E., Mandel, S., Jacob-Hirsch, J., Zeligson, S., Amariglio, N., Rechavi, G., Li, J., Ravid, R., Roggendorf, W., Riederer, P., and Youdim, M. B. (2004) Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta: alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes, *J. Neural Transmiss.*, **111**, 1543-1573, <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0212-1>.
9. Cruz-Monteagudo, M., Borges, F., Paz, Y. M. C., Cordeiro, M. N., Rebelo, I., Perez-Castillo, Y., Helguera, A. M., Sanchez-Rodriguez, A., and Tejera, E. (2016) Efficient and biologically relevant consensus strategy for Parkinson's disease gene prioritization, *BMC Med. Genomics*, **9**, 12, <https://doi.org/10.1186/s12920-016-0173-x>.
10. Miller, R. M., Kiser, G. L., Kaysser-Kranich, T. M., Lockner, R. J., Palaniappan, C., and Federoff, H. J. (2006) Robust dysregulation of gene expression in substantia nigra and striatum in Parkinson's disease, *Neurobiol. Disease*, **21**, 305-313, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.07.010>.
11. Bossers, K., Meerhoff, G., Balesar, R., van Dongen, J. W., Kruse, C. G., Swaab, D. F., and Verhaagen, J. (2009) Analysis of gene expression in Parkinson's disease: possible involvement of neurotrophic support and axon guidance in dopaminergic cell death, *Brain Pathol.*, **19**, 91-107, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00171.x>.
12. Hauser, M. A., Li, Y. J., Xu, H., Nouredine, M. A., Shao, Y. S., Gullans, S. R., Scherzer, C. R., Jensen, R. V., McLaurin, A. C., Gibson, J. R., Scott, B. L., Jewett, R. M., Stenger, J. E., Schmechel, D. E., Hulette, C. M., and Vance, J. M. (2005) Expression profiling of substantia nigra in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia with parkinsonism, *Arch. Neurol.*, **62**, 917-921, <https://doi.org/10.1001/archneur.62.6.917>.
13. Simunovic, F., Yi, M., Wang, Y., Macey, L., Brown, L. T., Krichevsky, A. M., Andersen, S. L., Stephens, R. M., Benes, F. M., and Sonntag, K. C. (2009) Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology, *Brain*, **132**, 1795-1809, <https://doi.org/10.1093/brain/awn323>.

14. Glaab, E., and Schneider, R. (2015) Comparative pathway and network analysis of brain transcriptome changes during adult aging and in Parkinson's disease, *Neurobiol. Disease*, **74**, 1-13, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.002>.
15. Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., and Date, I. (2019) Animal models for Parkinson's disease research: trends in the 2000s, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, <https://doi.org/10.3390/ijms20215402>.
16. Caronti, B., Tanda, G., Colosimo, C., Ruggieri, S., Calderaro, C., Palladini, G., Pontieri, F. E., and Di Chiara, G. (1999) Reduced dopamine in peripheral blood lymphocytes in Parkinson's disease, *Neuroreport*, **10**, 2907-2910, <https://doi.org/10.1097/00001756-199909290-00006>.
17. Barbanti, P., Fabbrini, G., Ricci, A., Cerbo, R., Bronzetti, E., Caronti, B., Calderaro, C., Felici, L., Stocchi, F., Meco, G., Amenta, F., and Lenzi, G. L. (1999) Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, **14**, 764-771, [https://doi.org/10.1002/1531-8257\(199909\)14:5<764::aid-mds1008>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1531-8257(199909)14:5<764::aid-mds1008>3.0.co;2-w).
18. Buttarelli, F. R., Fanciulli, A., Pellicano, C., and Pontieri, F. E. (2011) The dopaminergic system in peripheral blood lymphocytes: from physiology to pharmacology and potential applications to neuropsychiatric disorders, *Curr. Neuropharmacol.*, **9**, 278-288, <https://doi.org/10.2174/157015911795596612>.
19. Alieva, A., Rudenok, M., Filatova, E., Karabanov, A., Doronina, O., Doronina, K., Kolacheva, A., Ugrumov, M., Illarioshkin, S., Slominsky, P., and Shadrina, M. (2020) VCP expression decrease as a biomarker of preclinical and early clinical stages of Parkinson's disease, *Sci. Rep.*, **10**, 827, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57938-3>.
20. Borrageiro, G., Haylett, W., Seedat, S., Kuivaniemi, H., and Bardien, S. (2018) A review of genome-wide transcriptomics studies in Parkinson's disease, *Eur. J. Neurosci.*, **47**, 1-16, <https://doi.org/10.1111/ejn.13760>.
21. The Parkinson Progression Marker Initiative (PPMI), *Progr. Neurobiol.*, **95**, 629-635, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.09.005>.
22. Craig, D. W., Hutchins, E., Violich, I., Alsop, E., Gibbs, J. R., Levy, S., Robison, M., Prasad, N., Foroud, T., Crawford, K. L., Toga, A. W., Whitsett, T. G., Kim, S., Casey, B., Reimer, A., Hutten, S. J., Frasier, M., Kern, F., Fehlman, T., Keller, A., et al. (2021) RNA sequencing of whole blood reveals early alterations in immune cells and gene expression in Parkinson's disease, *Nat. Aging*, **1**, 734-747, <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00088-6>.
23. Miki, Y., Shimoyama, S., Kon, T., Ueno, T., Hayakari, R., Tanji, K., Matsumiya, T., Tsushima, E., Mori, F., Wakabayashi, K., and Tomiyama, M. (2018) Alteration of autophagy-related proteins in peripheral blood mononuclear cells of patients with Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging*, **63**, 33-43, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.11.006>.
24. Mutez, E., Larvor, L., Leprêtre, F., Mouroux, V., Hamalek, D., Kerckaert, J. P., Pérez-Tur, J., Waucquier, N., Vanbesien-Mailliot, C., Duflo, A., Devos, D., Defebvre, L., Kreisler, A., Frigard, B., Destée, A., and Chartier-Harlin, M. C. (2011) Transcriptional profile of Parkinson blood mononuclear cells with LRRK2 mutation, *Neurobiol. Aging*, **32**, 1839-1848, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.10.016>.
25. Scherzer, C. R., Eklund, A. C., Morse, L. J., Liao, Z., Locascio, J. J., Fefer, D., Schwarzschild, M. A., Schlossmacher, M. G., Hauser, M. A., Vance, J. M., Sudarsky, L. R., Standaert, D. G., Growdon, J. H., Jensen, R. V., and Gullans, S. R. (2007) Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 955-960, <https://doi.org/10.1073/pnas.0610204104>.
26. Shamir, R., Klein, C., Amar, D., Vollstedt, E. J., Bonin, M., Usenovic, M., Wong, Y. C., Maver, A., Poths, S., Safer, H., Corvol, J. C., Lesage, S., Lavi, O., Deuschl, G., Kühlenbaumer, G., Pawlack, H., Ulitsky, I., Kasten, M., Riess, O., Brice, A., et al. (2017) Analysis of blood-based gene expression in idiopathic Parkinson disease, *Neurology*, **89**, 1676-1683, <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000004516>.
27. Soreq, L., Israel, Z., Bergman, H., and Soreq, H. (2008) Advanced microarray analysis highlights modified neuro-immune signaling in nucleated blood cells from Parkinson's disease patients, *J. Neuroimmunol.*, **201-202**, 227-236, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.06.019>.
28. Alieva, A., Shadrina, M. I., Filatova, E. V., Karabanov, A. V., Illarioshkin, S. N., Limborska, S. A., and Slominsky, P. A. (2014) Involvement of endocytosis and alternative splicing in the formation of the pathological process in the early stages of Parkinson's disease, *BioMed Res. Int.*, **2014**, 718732, <https://doi.org/10.1155/2014/718732>.
29. Kiyama, T., Chen, C. K., Wang, S. W., Pan, P., Ju, Z., Wang, J., Takada, S., Klein, W. H., and Mao, C. A. (2018) Essential roles of mitochondrial biogenesis regulator Nrf1 in retinal development and homeostasis, *Mol. Neurodegener.*, **13**, 56, <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0287-z>.
30. Gong, X., Huang, M., and Chen, L. (2024) NRF1 mitigates motor dysfunction and dopamine neuron degeneration in mice with Parkinson's disease by promoting GLRX m⁶ A methylation through upregulation of METTL3 transcription, *CNS Neurosci. Ther.*, **30**, e14441, <https://doi.org/10.1111/cns.14441>.
31. Porras, G., Berthet, A., Dehay, B., Li, Q., Ladepeche, L., Normand, E., Dovero, S., Martinez, A., Doudnikoff, E., Martin-Négrier, M. L., Chuan, Q., Bloch, B., Choquet, D., Boué-Grabot, E., Groc, L., and Bezard, E. (2012) PSD-95 expression controls L-DOPA dyskinesia through dopamine D1 receptor trafficking, *J. Clin. Invest.*, **122**, 3977-3989, <https://doi.org/10.1172/jci59426>.

32. Ye, B., Liao, D., Zhang, X., Zhang, P., Dong, H., and Huganir, R. L. (2000) GRASP-1: a neuronal RasGEF associated with the AMPA receptor/GRIP complex, *Neuron*, **26**, 603-617, [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81198-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81198-8).
33. Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., and Hirokawa, N. (1994) KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria, *Cell*, **79**, 1209-1220, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90012-4).
34. Faria, T. N., LaRosa, G. J., Wilen, E., Liao, J., and Gudas, L. J. (1998) Characterization of genes which exhibit reduced expression during the retinoic acid-induced differentiation of F9 teratocarcinoma cells: involvement of cyclin D3 in RA-mediated growth arrest, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **143**, 155-166, [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00127-0](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00127-0).
35. Alvarez, E., Zhou, W., Witta, S. E., and Freed, C. R. (2005) Characterization of the Bex gene family in humans, mice, and rats, *Gene*, **357**, 18-28, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.05.012>.
36. Biswas, M., and Chan, J. Y. (2010) Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **244**, 16-20, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.034>.
37. Goetz, C. G., Poewe, W., Rascol, O., Sampaio, C., Stebbins, G. T., Counsell, C., Giladi, N., Holloway, R. G., Moore, C. G., Wenning, G. K., Yahr, M. D., and Seidl, L. (2004) Movement disorder society task force report on the hoehn and yahr staging scale: status and recommendations, *Mov. Disord.*, **19**, 1020-1028, <https://doi.org/10.1002/mds.20213>.
38. Suslov, O., and Steindler, D. A. (2005) PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency, *Nucleic Acids Res.*, **33**, e181, <https://doi.org/10.1093/nar/gni176>.
39. Wang, Q. T., Xiao, W., Mindrinos, M., and Davis, R. W. (2002) Yeast tRNA as carrier in the isolation of microscale RNA for global amplification and expression profiling, *BioTechniques*, **33**, 788-796, <https://doi.org/10.2144/02334st02>.
40. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, **24**, 402-408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
41. Mizrahi, I., McEntyre, J., and Ostell, J. (2007) *GenBank: The Nucleotide Sequence Database*, in The NCBI Handbook.
42. Mann, H. B., Whitney, D. R. (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other, *Ann. Math. Statistics*, **18**, 50-60.
43. Гланц С. (1998) *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва, с. 459.
44. Chen, X., Levy, J. M., Hou, A., Winters, C., Azzam, R., Sousa, A. A., Leapman, R. D., Nicoll, R. A., and Reese, T. S. (2015) PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E6983-6992, <https://doi.org/10.1073/pnas.1517045112>.
45. Sen, A., Hongpaisan, J., Wang, D., Nelson, T. J., and Alkon, D. L. (2016) Protein Kinase Ce (PKCe) promotes synaptogenesis through membrane accumulation of the postsynaptic density protein PSD-95, *J. Biol. Chem.*, **291**, 16462-16476, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.730440>.
46. Hoogenraad, C. C., Popa, I., Futai, K., Martinez-Sanchez, E., Wulf, P. S., van Vlijmen, T., Dortland, B. R., Oorschot, V., Govers, R., Monti, M., Heck, A. J., Sheng, M., Klumperman, J., Rehmann, H., Jaarsma, D., Kapitein, L. C., and van der Sluijs, P. (2010) Neuron specific Rab4 effector GRASP-1 coordinates membrane specialization and maturation of recycling endosomes, *PLoS Biol.*, **8**, e1000283, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000283>.
47. Hoogenraad, C. C., and van der Sluijs, P. (2010) GRASP-1 regulates endocytic receptor recycling and synaptic plasticity, *Commun. Integr. Biol.*, **3**, 433-435, <https://doi.org/10.4161/cib.3.5.12209>.
48. Mukai, J., Hachiya, T., Shoji-Hoshino, S., Kimura, M. T., Nadano, D., Suvanto, P., Hanaoka, T., Li, Y., Irie, S., Greene, L. A., and Sato, T. A. (2000) NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR, *J. Biol. Chem.*, **275**, 17566-17570, <https://doi.org/10.1074/jbc.C000140200>.
49. Mukai, J., Shoji, S., Kimura, M. T., Okubo, S., Sano, H., Suvanto, P., Li, Y., Irie, S., and Sato, T. A. (2002) Structure-function analysis of NADE: identification of regions that mediate nerve growth factor-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **277**, 13973-13982, <https://doi.org/10.1074/jbc.M106342200>.
50. Chiu, S. L., Diering, G. H., Ye, B., Takamiya, K., Chen, C. M., Jiang, Y., Niranjana, T., Schwartz, C. E., Wang, T., and Huganir, R. L. (2017) GRASP1 regulates synaptic plasticity and learning through endosomal recycling of AMPA receptors, *Neuron*, **93**, 1405-1419.e1408, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.031>.
51. Calvo, L., Anta, B., López-Benito, S., Martín-Rodríguez, C., Lee, F. S., Pérez, P., Martín-Zanca, D., and Arévalo, J. C. (2015) Bex3 dimerization regulates NGF-dependent neuronal survival and differentiation by enhancing *trkA* gene transcription, *J. Neurosci.*, **35**, 7190-7202, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4646-14.2015>.
52. Ando, K., Yokochi, T., Mukai, A., Wei, G., Li, Y., Kramer, S., Ozaki, T., Maehara, Y., and Nakagawara, A. (2019) Tumor suppressor KIF1B β regulates mitochondrial apoptosis in collaboration with YME1L1, *Mol. Carcinogen.*, **58**, 1134-1144, <https://doi.org/10.1002/mc.22997>.

53. Mitsugi, H., Niki, T., Takahashi-Niki, K., Tanimura, K., Yoshizawa-Kumagaye, K., Tsunemi, M., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2013) Identification of the recognition sequence and target proteins for DJ-1 protease, *FEBS Lett.*, **587**, 2493-2499, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.032>.
54. Morris, R. L., and Hollenbeck, P. J. (1993) The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth, *J. Cell Sci.*, **104** (Pt 3), 917-927, <https://doi.org/10.1242/jcs.104.3.917>.
55. Gopalakrishnan, L., and Scarpulla, R. C. (1995) Structure, expression, and chromosomal assignment of the human gene encoding nuclear respiratory factor 1, *Biol. Chem.*, **270**, 18019-18025.
56. Wang, C., Li, Z., Lu, Y., Du, R., Katiyar, S., Yang, J., Fu, M., Leader, J. E., Quong, A., Novikoff, P. M., and Pestell, R. G. (2006) Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 11567-11572.

ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF THE *GRIPAP1*, *DLG4*, *KIF1B*, *NGFRAP1*, AND *NRF1* GENES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE IN THE EARLY CLINICAL STAGES

M. V. Lukashevich^{1*}, M. M. Rudenok¹, E. I. Semenova¹, S. A. Partevyan¹,
A. V. Karabanov², E. Yu. Fedotova², S. N. Illarioshkin², P. A. Slominsky¹,
M. I. Shadrina¹, and A. Kh. Alieva¹

¹ National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia; e-mail: farouki@mail.ru

² Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia

Parkinson's disease (PD) is one of the most common progressive neurodegenerative diseases. An important feature of the disease is its long latent period, which necessitates the search for prognostic biomarkers. One method of identifying biomarkers of PD is to study changes in gene expression in the peripheral blood of patients who are at an early stage of the disease and have not been treated. In this study, we analyzed the relative levels of mRNA for the genes *GRIPAP1*, *DLG4*, *KIF1B*, *NGFRAP1*, and *NRF1*, which are associated with neurotransmitter transport, apoptosis and mitochondrial dysfunction, in the peripheral blood of PD patients using reverse transcription and real-time PCR with TaqMan probes. The results of this study suggest that the *GRIPAP1* and *DLG4* genes can be considered as potential biomarkers for the early clinical stages of Parkinson's disease. The data obtained may indicate that *NGFRAP1* is involved in the pathogenesis of both PD and other neurodegenerative diseases. Furthermore, at the early clinical stages we studied, the *KIF1B* and *NRF1* genes were not found to be involved in the pathogenesis of PD at the expression level.

Keywords: Parkinson's disease, gene expression, peripheral blood, early diagnosis

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ДИКОГО ТИПА И ДВОЙНОГО МУТАНТА Н(L173)Л/I(L177)Н ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ *Cereibacter sphaeroides*

© 2024 Т.Ю. Фуфина, А.А. Забелин, Р.А. Хатыпов, А.М. Христин, А.Я. Шкуропатов, Л.Г. Васильева*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: vsyulya@mail.ru

Поступила в редакцию 07.06.2024

После доработки 01.08.2024

Принята к публикации 22.08.2024

Ранее мы обнаружили, что в реакционном центре (РЦ) пурпурной бактерии *Cereibacter sphaeroides* образование гетеродимерного первичного донора электрона (Р), вызываемое замещением His-L173 на Leu, компенсируется второй мутацией Leu-L177 – His. Существенные изменения спектральных свойств, состава пигментов и редокс-потенциала Р, наблюдаемые в РЦ Н(L173)Л, в РЦ Н(L173)Л/I(L177)Н восстанавливаются до соответствующих характеристик нативного РЦ с той разницей, что энергия длинноволнового Q_Y оптического перехода Р значительно (на ~75 мэВ) увеличивается. В данной работе с помощью фотоиндуцированной дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии нами показано, что в РЦ Н(L173)Л/I(L177)Н сохраняется гомодимерная структура Р с частично измененными электронными свойствами: ослабевает электронное сопряжение в катион-радикале димера P^+ и увеличивается локализация положительного заряда на одной из его половин. Результаты исследования свойств РЦ тройного мутанта Н(L173)Л/I(L177)Н/F(M197)Н согласуются с предположением о том, что наблюдаемые изменения электронной структуры P^+ , а также значительное смещение полосы Q_Y Р в РЦ Н(L173)Л/I(L177)Н связаны с модификацией пространственного положения и/или геометрии Р. Методом фемтосекундной абсорбционной дифференциальной спектроскопии показано, что в РЦ Н(L173)Л/I(L177)Н сохраняется последовательность реакций $P^* \rightarrow P^+B_A \rightarrow P^+H_A \rightarrow P^+Q_A$ со скоростями переноса электрона и квантовым выходом состояния P^+Q_A , близкими наблюдаемым в РЦ дикого типа (P^* – синглетно-возбужденное состояние Р; B_A , H_A и Q_A – молекулы бактериохлорофилла, бактериофеофитина и убихинона в активной А-ветви кофакторов соответственно). Полученные результаты в совокупности с ранее опубликованными данными для РЦ с симметричной двойной мутацией Н(M202)Л/I(M206)Н демонстрируют, что с помощью введения дополнительных точечных аминокислотных замен фотохимическая активность изолированного РЦ из *C. sphaeroides* может быть сохранена на высоком уровне даже при отсутствии важных структурных элементов – аксиальных гистидиновых лигандов к первичному донору электрона Р.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реакционный центр фотосинтеза, *Cereibacter sphaeroides*, лигандирование бактериохлорофилла, первичный донор электрона, редокс-потенциал, термостабильность белка, ИК-Фурье-спектроскопия, фемтосекундная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972524100078 EDN: IPJFXW

ВВЕДЕНИЕ

В процессе фотосинтеза энергия света поглощается пигментами светособирающих антенн и передается на реакционный центр (РЦ), где преобразуется в электрохимическую энергию разделенных зарядов. Фотосинтетический аппарат пурпурной бактерии *Cereibacter sphaeroides*

(до 2020 г. – *Rhodobacter sphaeroides* [1]) состоит из РЦ и двух светособирающих антенных комплексов ССК-1 и ССК-2. Пигменты светособирающих комплексов поглощают кванты света и передают энергию возбуждения от ССК-2 на ССК-1 и затем – на РЦ [2]. В состав РЦ входят три белковые субъединицы (L, M и H), а также десять кофакторов, организованных в две ветви переноса электрона, А и В (рис. 1, а). Кофакторы представлены четырьмя молекулами бактериохлорофилла (БХл) а,

* Адресат для корреспонденции.

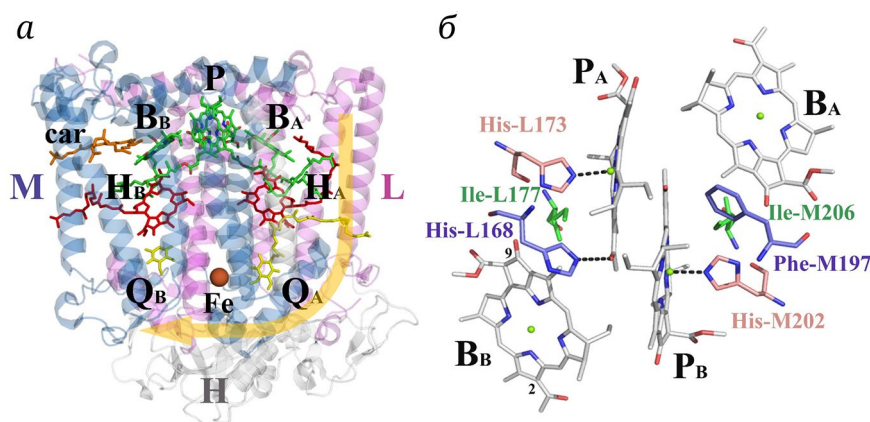


Рис. 1. Структура реакционного центра *C. sphaeroides* (PDB ID: 3v3y) (a). L – L-субъединица; M – M-субъединица; H – H-субъединица; P – димер молекул БХл; B_A и B_B – мономерные молекулы БХл; H_A и H_B – мономерные молекулы БФео; Q_A и Q_B – убикиноны; car – каротиноид. Желтой стрелкой показан путь переноса электрона в РЦ. Белковое окружение бактериохлорофиллов в структуре РЦ дикого типа (б). Показано расположение симметричных остатков His-L173 и -M202, Ile-M206 и -L177, His-L168 и Phe-M197. В структуре мономерного БХл B_B номерами отмечены 2-ацетильная и 9-кето-группы макроцикла. Пунктиром показаны координационные и Н-связи между молекулами БХл и белком

двумя молекулами бактериофеофитина (БФео) *a*, двумя молекулами убикинона (Q), атомом негемового железа и молекулой каротиноида [3]. Две экситонно сопряженные молекулы БХл (P_A и P_B) образуют димер, так называемую специальную пару P [4]. На специальную пару поступает энергия, поглощенная пигментными ансамблями светособирающих антенн и РЦ, и затем синглетно-возбужденное состояние P* служит первичным донором электрона в фотохимической реакции. Индуцированный светом перенос электрона от P* осуществляется через кофакторы активной А-ветви (БХл B_A и БФео H_A) на первичный хинон Q_A и затем – на вторичный хинон Q_B, сопровождаемая переносом протона из цитоплазмы и протонированием хинона Q_B [5]. Процесс первичного разделения зарядов с образованием состояния P⁺Q_B⁻ в РЦ происходит с квантовой эффективностью, близкой к 100% [6, 7].

Важными характеристиками P являются средноточечный потенциал (E_m) пары P/P⁺ и стабильность димерной структуры, которые обеспечиваются за счет сопряжения молекул P_A и P_B и взаимодействия P с окружающим белком. В частности, в РЦ *C. sphaeroides* 2-ацетильная группа БХл P_A, входящая в π-электронную систему макроцикла, образует водородную связь (Н-связь) с His-L168, и разрушение этой связи в результате мутаций существенно снижает величину E_m P/P⁺ [8].

Важным фактором, влияющим на спектральные и редокс-свойства первичного донора электрона, является также координирование атомов магния бактериохлорофиллов P [9]. В РЦ пурпурных бактерий атомы магния БХл координированы четырьмя атомами азота пирролов и коаксиально лигандированы остатком His [3]. Направленный мутагенез является широко применяемым подходом для исследований роли белкового окружения кофакторов РЦ в обеспечении высокой квантовой эффективности первичного разделения зарядов [10–14]. В том числе показано, что в мутантных РЦ пурпурных бактерий без ущерба для редокс-свойств P и квантового выхода фотохимического процесса лигандами БХл могут служить не только His, но и другие аминокислотные остатки, способные образовывать координационную связь с Mg²⁺, а также молекулы воды [10, 15, 16]. Также показано, что замещение гистидиновых лигандов БХл P_A или P_B на остатки лейцина приводит к появлению БФео в сайте связывания соответствующего БХл [17–19]. Подобные замещения лигандов специальной пары позволили получить так называемые гетеродимерные РЦ, в которых P представлен парой БХл/БФео [20–22]. РЦ H(M202)L с гетеродимером, в котором БФео расположен в сайте связывания P_B, и РЦ H(L173)L с «обратным» гетеродимером, в котором P_A представлен БФео, характеризуются значительным

Принятые сокращения: БФео – бактериофеофитин; БХл – бактериохлорофилл; ИК-Фурье-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием; РЦ – реакционный центр; B_A и B_B – мономерные молекулы БХл; DADS – дифференциальные спектры, связанные с экспоненциальным затуханием кинетических компонентов; E_m – средноточечный потенциал; H_A и H_B – мономерные молекулы БФео; P – димер молекул БХл, первичный донор электрона; P_A и P_B – бактериохлорофиллы димера P; Q – убикинон; SADS – дифференциальные спектры вовлеченных состояний.

повышением E_m P/P⁺, существенным изменением спектральных свойств и падением квантового выхода разделения зарядов на 60% и 50% соответственно [20]. Исследования таких мутантных РЦ внесли существенный вклад в понимание роли гомодимерной природы первичного донора электрона в обеспечении высокого квантового выхода фотохимической реакции.

Ранее мы показали, что специальная пара Р в РЦ *C. sphaeroides* остается гомодимером молекул БХл, если, наряду с замещениями Н(L173)Л и Н(M202)Л, внести в белковую структуру РЦ остатки гистидинов в симметричные позиции L177 и M206 соответственно [23, 24]. Потенциально, исследования этого эффекта могут помочь более детальному пониманию особенностей и роли аксиального лигандирования молекул БХл в РЦ пурпурных бактерий. Было найдено, что электронные спектры поглощения РЦ с двойными мутациями Н(L173)Л/И(L177)Н и Н(M202)Л/И(M206)Н характеризуются значительными коротковолновыми сдвигами полосы, принадлежащей низкоэнергетическому экситонному переходу Р [23, 24]. В то же время недавние фемтосекундные измерения показали, что, несмотря на выявленные спектральные изменения, время жизни Р* в РЦ двойного мутанта Н(M202)Л/И(M206)Н существенно не изменилось и последовательность реакций переноса электрона по А-ветви и осталась такой же, как в РЦ дикого типа, хотя отмечалось незначительное (на ~10%) снижение квантового выхода образования состояния Р⁺Q_A⁻ [24]. С целью дальнейшего развития исследований в этом направлении настоящая работа посвящена оценке влияния симметричного двойного замещения Н(L173)Л/И(L177)Н на первичную фотохимию в РЦ *C. sphaeroides* с использованием фемтосекундной абсорбционной дифференциальной спектроскопии и глобального анализа данных. Для того чтобы получить информацию о природе Р и электронных свойствах Р⁺ в РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н, был также исследован фотоиндуцированный дифференциальный ИК-Фурье-спектр для фотоокисления Р и сопряженного восстановления хинонных акцепторов электронов.

Ранее отмечалось, что двойное замещение Н(L173)Л/И(L177)Н приводит к уменьшению выхода РЦ при очистке из мембран на ~30% по сравнению с РЦ дикого типа [23]. Эти данные указывают на дестабилизирующее влияние мутаций на структуру комплекса и позволяют предположить структурные изменения в РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н. В настоящей работе с помощью дополнительной аминокислотной замены Phe-M197 на His предпринята попытка выявить признаки таких изменений в РЦ с двойной мутацией. Известно, что в РЦ дикого типа и ряда мутантов замещение F(M197)Н приводит к образованию Н-связи

между 2-ацетильной группой БХл Р_в и внесенным His-M197, что сопровождается увеличением среднеточечного потенциала Р/P⁺ на 125 мВ и заметно повышает стабильность РЦ [25–29]. Ожидается, что появление таких свойств в РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н/F(M197)Н будет указывать на образование Н-связи между БХл Р_в и His-M197, подтверждая тем самым, что положение и геометрия Р относительно аминокислотного остатка в положении M197 в РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н не изменились. Обратный результат, то есть отсутствие увеличения E_m Р/P⁺ и термостабильности РЦ тройного мутанта, по сравнению с РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н, может быть интерпретирован как указание на наличие структурных изменений, вызванных двойной мутацией и создающих препятствия для образования этой Н-связи. На основании совокупности полученных данных в работе обсуждается влияние белкового окружения димера Р на его функцию как первичного донора электрона в фотохимической реакции и как акцептора световой энергии от пигментов светособирающих антенн.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фрагменты ДНК с ранее полученными мутациями Н(L173)Л/И(L177)Н в гене *puf-L* [30] и F(M197)Н в гене *puf-M* [29] были объединены в составе *puf*-оперона и клонированы в шаттл-вектор pRK-415 [31], как описано в работе Хатышов и др. [32]. Полученная плазмида с помощью конъюгации была перенесена в штамм *C. sphaeroides* DD13 [33]. В качестве реакционного центра дикого (псевдо-дикого) типа использовали реакционные центры, выделенные из штамма *C. sphaeroides* DD13, который содержал производную pRK-415, несущую немодифицированные копии генов *puf-LMX* [32]. Рекомбинантные штаммы *C. sphaeroides* выращивали на среде Хатнера [34] в темноте, в полуаэробных условиях в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл) и канамицина (5 мкг/мл). Реакционные центры выделяли методами ионообменной и аффинной хроматографии, как описано ранее [35, 36]. Для солюбилизации комплексов из мембран использовали детергент лаурилдиметиламинооксид (ЛДАО). Смену детергента после очистки РЦ осуществляли, как описано ранее [37]. Очищенные РЦ растворяли в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 0,2% холата натрия. Термостабильность РЦ исследовали при их нагревании при 48 °С в течение 60 мин путем регистрации термозависимых изменений амплитуды полосы Q_Y мономерных бактериохлорофиллов, как описано ранее [37]. Измерение электронных спектров поглощения производили на спектрофотометре Shimadzu UV1800 («Shimadzu»,

Япония). К образцам добавляли аскорбат натрия (1 mM) для поддержания первичного донора электрона в восстановленном состоянии. Пигментный анализ проводили методом, описанным ранее [30], ошибку измерений определяли методом стандартного отклонения. Величину среднеточечного потенциала P/P^+ определяли в буфере Tris-HCl (pH 8,0), содержащем холат натрия, путем потенциометрического титрования изолированных РЦ, используя феррицианид калия в качестве окислителя и аскорбат натрия в качестве восстановителя, как описано ранее [30].

Для визуализации структуры реакционного центра и приготовления рис. 1 использовали программу PyMol [38].

Фотоиндуцированные дифференциальные ИК-спектры P^+Q/PQ измеряли на инфракрасном вакуумируемом спектрометре с Фурье-преобразованием IFS66v/S с MCT (D313/6) детектором и светоделителем из KBr («Bruker», Германия). Для приготовления образцов несколько микролитров концентрированной суспензии РЦ в 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 0,2% холата натрия, наносили на подложку из CaF_2 , частично дегидратировали под струей газообразного аргона и накрывали второй подложкой из CaF_2 [24]. Дифференциальные ИК-спектры измеряли при освещении образцов постоянным светом ($1000\text{ нм} > \lambda > 720\text{ нм}$). Спектральное разрешение составляло 4 см^{-1} . Циклы освещения повторяли сотни раз для достижения приемлемого соотношения сигнал/шум.

Дифференциальные спектры поглощения с фемтосекундным временным разрешением измеряли методом возбуждения-зондирования на установке, описанной ранее [39]. Импульсы света длительностью $\sim 35\text{ фс}$ и частотой повторения 20 Гц получали с помощью титан-сапфирового лазера MaiTai SP («Spectra-Physics», США) и регенеративного усилителя Spitfire Ace («Spectra-Physics»). Энергию выходного импульса из регенеративного усилителя ослабляли до $\sim 700\text{ мкДж}$ и использовали для накачки параметрического усилителя OPA800CF («Spectra-Physics») с целью получения импульсов возбуждения на длине волны $\sim 870\text{ нм}$ для дикого типа и $\sim 850\text{ нм}$ – для двойного мутанта (рис. П1 в Приложении). Величину энергии возбуждающего импульса ослабляли так, чтобы выцветание первичного донора электрона не превышало $\sim 10\%$. Небольшую часть (1–2%) энергии импульса из регенеративного усилителя использовали для генерации суперконтинуума в кювете с водой толщиной 5 мм. Спектрально широкие импульсы континуума использовали для зондирования образца. Спектры излучения зондирующих импульсов измеряли с помощью CCD-камеры Pixis 400BR и спектрографа SpectraPro 2300i («Princeton Instruments», США)

в области длин волн 450–750 нм и 750–1100 нм. Поляризацию импульса возбуждения ориентировали под магическим углом ($54,7^\circ$) к импульсу зондирования. Для повышения соотношения сигнал/шум на каждой задержке времени производили усреднение 500 дифференциальных спектров поглощения. В диапазоне задержек времени от $-2,1\text{ пс}$ до 1700 пс проводили измерения с переменным шагом от 20 фс до 40 пс. Полный набор разностных спектров анализировали методом глобального анализа в программе Glotaran [40]. Программа включает математическое описание дисперсии групповой скорости измерительного импульса с помощью полинома третьего порядка. С использованием полученных полиномов была скорректирована дисперсия в полных наборах экспериментально измеренных разностных спектров в видимой (500–720 нм) и ближней ИК (750–1050 нм) областях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектральные свойства, редокс-потенциал Р, пигментный состав и термостабильность РЦ.

На рис. 2 приведены электронные спектры поглощения РЦ *C. sphaeroides* дикого типа и РЦ с двойным H(L173)L/I(L177)H и тройным H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H замещением, измеренные при комнатной температуре (рис. 2, а) и 100 К (рис. 2, б). Спектр поглощения РЦ дикого типа (рис. 2, кривые 1) хорошо соответствует литературным данным, показывая в Q_y спектральной области полосы низкоэнергетического экситонного перехода димерного первичного донора электрона ($Q_y P$) (865 нм при комнатной температуре и 888 нм при 100 К), мономерных молекул БХл ($Q_y B$) (804 нм) и молекул БФео ($Q_y H$) (758 нм при комнатной температуре и 763 нм при 100 К). Полоса вблизи 600 нм отражает Q_x -переходы четырех молекул БХл. В Q_x -области спектра при 533 и 545 нм расположены максимумы полос поглощения молекул БФео неактивной и активной ветвей переноса электрона соответственно, а также плечо в районе 500 нм, отражающее поглощение молекулы каротиноида. Основным отличием электронного спектра поглощения РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)H (рис. 2, кривые 2) от спектра РЦ дикого типа является увеличение энергии $Q_y P$ -перехода на $\sim 75\text{ мэВ}$ (коротковолновый сдвиг полосы на $\sim 46\text{ нм}$, отчетливо наблюдаемый при криогенной температуре; рис. 2, б). Детальное обсуждение спектров поглощения РЦ двойного мутанта приведено в работах Fufina et al. [23] и Vasilieva et al. [30].

В электронном спектре поглощения РЦ с тройным замещением H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H

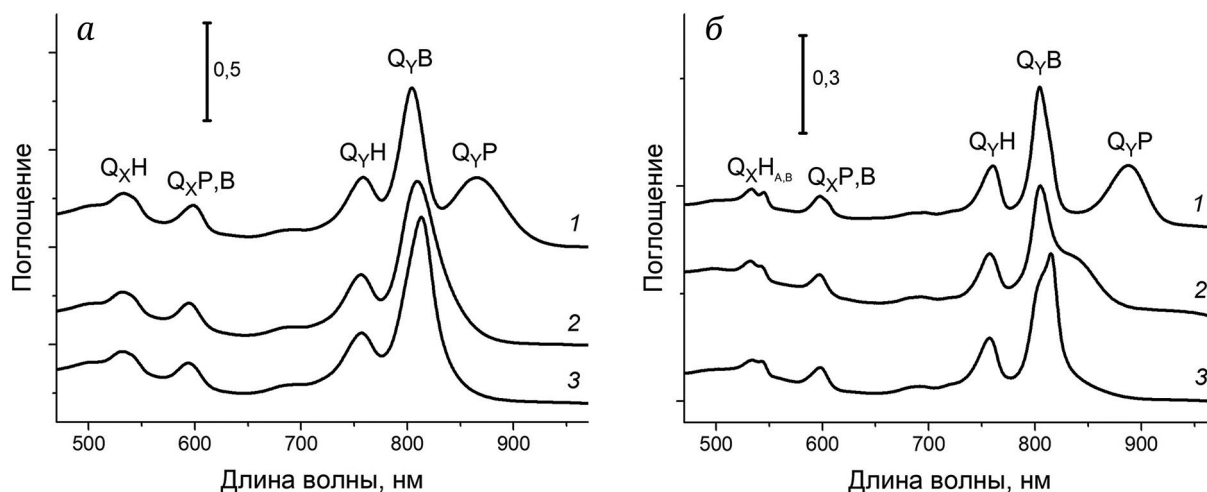


Рис. 2. Электронные спектры поглощения РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (1) и мутантов H(L173)L/I(L177)N (2) и H(L173)L/I(L177)N/F(M197)N (3), измеренные при комнатной температуре (а) и 100 К (б). Спектры нормированы по полосе поглощения Q_y Н при 760 нм

(рис. 2, кривые 3) Q_y Р-полоса поглощения первичного донора электрона не разрешается ни при комнатной, ни при криогенной температуре. Вероятно, эта полоса перекрывается с поглощением мономерных молекул БХл, вследствие чего Q_y В-полоса мутантных РЦ при 100 К заметно отличается от аналогичной полосы РЦ дикого типа, показывая максимум при 814 нм и плечо при ~803 нм. В спектре поглощения РЦ тройного мутанта амплитуда полосы при 597 нм, отражающей Q_x -переход четырех молекул БХл, сходна с амплитудами соответствующих полос в спектрах РЦ дикого типа и РЦ с двойной мутацией. Спектральное положение максимумов Q_y - и Q_x -полос поглощения молекул БФео в спектре поглощения тройного мутанта также мало отличается от такового в спектрах РЦ дикого типа и двойного мутанта. Таким образом, внесение дополнительной мутации F(M197)Н в РЦ с двойным замещением H(L173)L/I(L177)Н, по-видимому, не меняет состав пигментных кофакторов, но приводит к дальнейшему коротковолновому сдвигу Q_y -полосы поглощения Р и к увеличению энергии Q_y Р-перехода.

Результаты пигментного анализа показали, что соотношение БХл/БФео в РЦ тройного мутанта ($1,85 \pm 0,15$) сходно с таковым в РЦ дикого типа и двойного мутанта [30]. Эти данные согласуются с анализом низкотемпературных спектров поглощения (рис. 2, б) и свидетельствуют о том, что внесение тройного замещения не привело к изменению пигментного состава РЦ. Показано также, что величина E_m Р/Р⁺ в РЦ тройного мутанта близка к потенциалу Р в РЦ дикого типа и РЦ H(L173)L/I(L177)Н [30] с небольшим изменением в сторону уменьшения (рис. П2 в Приложении). Результаты редокс-титрования РЦ тройного мутанта позволяют предположить, что мутация F(M197)Н не при-

вела к образованию Н-связи между His-M197 и 2-ацетильной группой БХл Рв.

Изменения в спектре поглощения РЦ, происходящие при повышении температуры, использовали в качестве показателя стабильности структуры комплекса [37]. На рис. 3 приведены кинетики термозависимых изменений амплитуды полосы Q_y В мономерных БХл для РЦ дикого типа, двойного и тройного мутантов при 48 °С. Можно видеть, что внесение мутаций H(L173)L/I(L177)Н вызывает небольшое снижение стабильности по сравнению с РЦ дикого типа. Вопреки ожиданиям (см. раздел «Введение») добавление третьей мутации F(M197)Н в РЦ H(L173)L/I(L177)Н

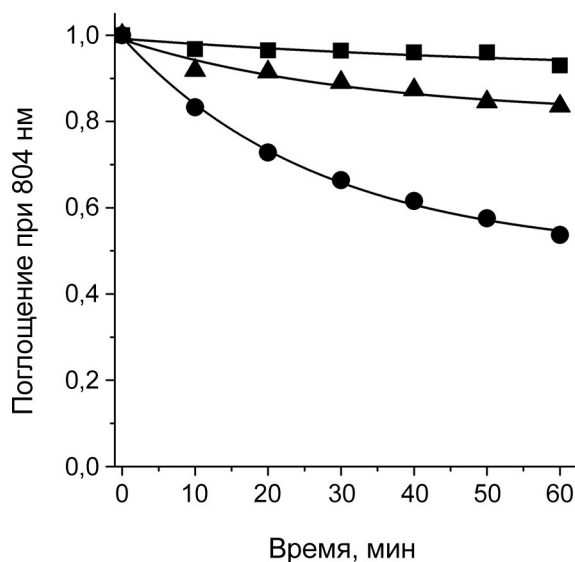


Рис. 3. Термозависимое изменение амплитуды полосы Q_y В в РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (■), РЦ H(L173)L/I(L177)Н (▲) и РЦ H(L173)L/I(L177)Н/F(M197)Н (●) при 48 °С

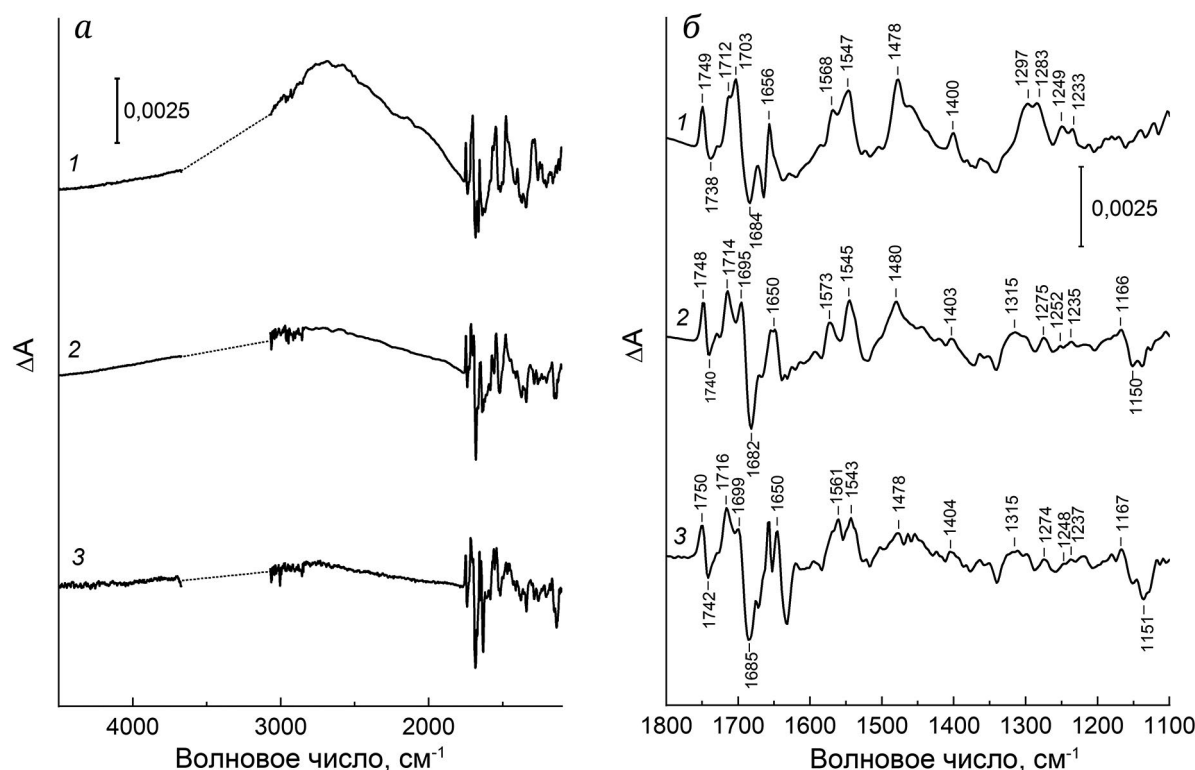


Рис. 4. Фотоиндуцированные дифференциальные (свет-минус-темнота) ИК-Фурье-спектры P^+Q^-/PQ РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (1), мутантных РЦ H(L173)L/I(L177)H (2) и РЦ H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H (3), измеренные при комнатной температуре. а – Спектральный диапазон 4500–1100 см^{-1} . Спектры нормированы по амплитуде дифференциального сигнала при $\sim 1750/\sim 1740 \text{ см}^{-1}$. Область при $\sim 3700\text{--}3070 \text{ см}^{-1}$, насыщенная из-за сильного поглощения образца и воды, исключена из рисунка. б – Низкочастотный спектральный диапазон 1800–1100 см^{-1} из панели (а), показанный в увеличенном масштабе

заметно уменьшило термостабильность комплекса. В совокупности с данными редокс-титрования это позволяет сделать вывод, что внесение замещения F(M197)H как минимум не привело к образованию Н-связи между His-M197 и БХЛ P_B вследствие изменений пространственного положения или геометрии Р, создавших препятствия для образования этой Н-связи. Можно предположить, что эти изменения наблюдаются уже в РЦ двойного мутанта. Возможными структурными модификациями, согласующимися с полученными нами результатами, могут быть изменение положения 2-ацетильных групп БХЛ P_A/P_B относительно плоскости макроцикла [8, 41, 42] или искривление плоскостей макроциклов Р [43].

Фотоиндуцированная дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия РЦ. На рис. 4 представлены фотоиндуцированные дифференциальные ИК-Фурье-спектры для фотоокисления первичного донора электрона и сопряженного восстановления хинонных акцепторов электрона с образованием состояния P^+Q^- в РЦ мутантов H(L173)L/I(L177)H (рис. 4, кривые 2) и H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H (рис. 4, кривые 3). С целью выявления особенностей электронной структуры первичного донора электрона в катион-радикальной форме P^+

в мутантных РЦ эти спектры сравниваются между собой, а также с ИК-Фурье-спектром P^+Q^-/PQ для РЦ дикого типа (рис. 4, кривые 1), измеренным в идентичных экспериментальных условиях. Отрицательные и положительные пики в ИК-Фурье-спектрах отражают, соответственно, исчезновение нейтральных форм первичных донора и акцептора электрона и появление их ион-радикальных форм.

Фотоиндуцированный дифференциальный ИК-Фурье-спектр P^+Q^-/PQ РЦ дикого типа (рис. 4, а; кривая 1) хорошо согласуется со спектрами, описанными в литературе [44], и включает широкую полосу низкоэнергетического электронного перехода при 2680 см^{-1} , отражающего перенос положительной вакансии («дырки») внутри димерного катион-радикала P^+ . В спектре имеется также набор интенсивных ИК-полос поглощения (~ 1550 , ~ 1480 и $\sim 1290 \text{ см}^{-1}$) (рис. 4, б; кривая 1), охарактеризованных как фазово-фононные полосы [45]. Ранее было показано, что полоса при 2680 см^{-1} и фазово-фононные полосы не наблюдаются для мономерного катион-радикала БХЛ $^+$ в органических растворителях [46], являясь маркерными характеристиками димерной структуры окисленного первичного донора электрона в РЦ пурпурных

бактерий [44]. Интенсивность этих маркерных полос сильно зависит от степени электронного сопряжения между молекулами бактериохлорофилла P_A и P_B , составляющими димер P^+ [44, 45].

Присутствие полосы переноса «дырки» в области $\sim 2700\text{ см}^{-1}$ и фазово-фононных полос в ИК-Фурье-спектрах обоих мутантов (рис. 4, кривые 2 и 3) позволяет заключить, что, несмотря на замену гистидина L173 на неполярный лейцин, в этих РЦ не образуется гетеродимер БХл/БФео, но сохраняется гомодимерная структура первичного донора электрона P из двух молекул БХл. Однако введение двойной мутации H(L173)L/I(L177)N вызывает значительное уменьшение интенсивности полосы переноса «дырки» при $\sim 2700\text{ см}^{-1}$ и фазово-фононных полос (рис. 4, кривые 2), а дополнительная замена F(M197)N в тройном мутанте приводит к дальнейшему падению интенсивности маркерных полос (рис. 4, кривые 3). Эти наблюдения указывают на заметное ослабление электронного сопряжения между молекулами БХл в катион-радикале P^+ в мутантных РЦ.

Дифференциальный сигнал при $\sim 1750\text{--}1740\text{ см}^{-1}$ в ИК-Фурье-спектре РЦ дикого типа (рис. 4, б; кривая 1) приписан высокочастотному сдвигу полос валентных колебаний 10а-эфирных C=O-групп молекул бактериохлорофилла P при образовании P^+ [46]. Этот сигнал сохраняется по форме в мутантных РЦ (рис. 4, б; кривые 2 и 3) и был использован нами для нормировки ИК-Фурье-спектров всех трех образцов. В области $1710\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ в ИК-спектре РЦ дикого типа (рис. 4, б; кривая 1) присутствуют сигналы, отражающие высокочастотные сдвиги полос валентных колебаний 9-кето-C=O-групп молекул P_A [$1712(+)/\sim 1690(-)\text{ см}^{-1}$] и P_B [$1703(+)/1684(-)\text{ см}^{-1}$] [46]. Отрицательная полоса при 1690 см^{-1} не видна при комнатной температуре, но хорошо разрешается при криогенных температурах [46]. Введение двойной мутации H(L173)L/I(L177)N приводит к изменению частотного положения полос 9-кето-C=O-групп: полоса P_A смещается от 1712 до 1714 см^{-1} , а полоса P_B – от 1703 до 1695 см^{-1} (рис. 4, б; кривая 2). В спектре тройного мутанта (рис. 4, б; кривая 3), в целом, наблюдаются схожие изменения в области валентных колебаний карбонильных групп с небольшими отличиями в деталях. Изменение соотношения интенсивностей полос валентных колебаний 9-кето-групп P_A при $1714\text{--}1716\text{ см}^{-1}$ и P_B при $1695\text{--}1699\text{ см}^{-1}$, наблюдаемое при введении мутаций (рис. 4, б), по-видимому, отражает увеличение локализации положительного заряда на молекуле P_A в димерном катион-радикале P^+ [47]. Интересно, что ИК-Фурье-спектры мутантных РЦ содержат дифференциальный сигнал при $1160(+)/1150(-)\text{ см}^{-1}$, который отсутствует в спектре РЦ дикого типа (рис. 4, б). Очевидно, этот сигнал

является следствием введенных мутаций, однако природа его на данный момент не ясна.

Таким образом, результаты ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием свидетельствуют о значительном нарушении сопряжения между молекулами БХл, составляющими специальную пару в РЦ с двойной и тройной мутациями. Присутствие в спектрах мутантных РЦ полосы при $\sim 2700\text{ см}^{-1}$ дает основание полагать, что первичный донор электрона является гомодимером молекул БХл даже при отсутствии природного лиганда атома магния – остатка гистидина L173, что согласуется с электронными спектрами поглощения и данными пигментного анализа. Выраженное уменьшение интенсивности полосы переноса «дырки» при $\sim 2700\text{ см}^{-1}$ в спектрах мутантных РЦ указывает на то, что введение мутаций приводит к ослаблению электронного сопряжения в катион-радикале димера P^+ и увеличению локализации положительного заряда на одной из его половин [45].

Сравнительное исследование процессов фотохимического разделения зарядов в РЦ дикого типа и двойного мутанта H(L173)L/I(L177)N. Для исследования первичных процессов разделения зарядов в РЦ использовали метод возбуждения-зондирования. С целью минимизации вклада процессов миграции энергии возбуждения первичный донор электрона P селективно возбуждали фемтосекундными импульсами света (длительность – $\sim 35\text{ фс}$) с максимумом при $\sim 870\text{ нм}$ для дикого типа и $\sim 850\text{ нм}$ – для двойного мутанта.

Абсорбционные изменения, измеренные для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа и РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)N в спектральных областях $500\text{--}720\text{ нм}$ и $750\text{--}1050\text{ нм}$, показаны на рис. ПЗ в Приложении. Для того чтобы получить информацию о константах скорости переноса электрона и связанных с ними спектров, экспериментальные 3D-массивы данных подвергали глобальному анализу, разлагая на сумму экспонент с характерными амплитудами и временами жизни [48]. В результате были получены дифференциальные спектры, связанные с экспоненциальным затуханием кинетических компонентов (decay-associated difference spectra, DADS) (рис. 5).

В согласии с литературными данными [49, 50], три экспоненты с константами времени $0,9\text{ пс}$, $3,1\text{ пс}$ и 223 пс и компонент ($>2\text{ нс}$), незатухающий на временной шкале измерений, были достаточны для описания данных для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа; соответствующие DADS представлены на рис. 5 (панели а и б). Аналогичные экспоненциальные кинетические компоненты с близкими временными константами ($1,1\text{ пс}$, $6,4\text{ пс}$ и 228 пс) и незатухающий компонент ($>2\text{ нс}$) были найдены для РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)N (DADS показаны на рис. 5, в и г). Наиболее характерной

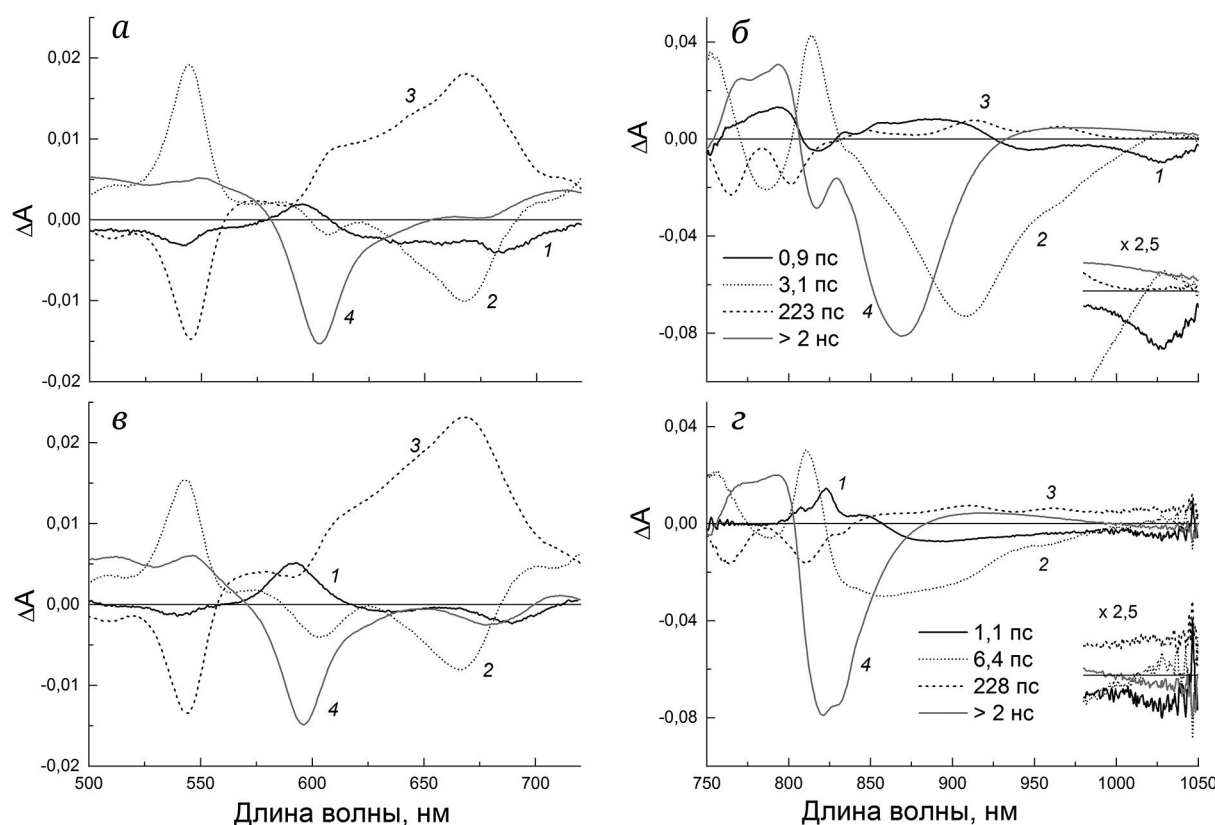


Рис. 5. DADS для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (а, б) и РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)H (в, г) в видимой (500–720 нм) и ближней ИК (750–1050 нм) спектральных областях. Вставки на панелях (б) и (г) показывают спектральные особенности в интервале 980–1050 нм на шкале ΔA , увеличенной в 2,5 раза

особенностью DADS (рис. 5, кривые 1) с временными константами 0,9 и 1,1 пс является отрицательная полоса при ~ 1030 нм, которая, по всей вероятности, отражает формирование маркерной полосы поглощения анион-радикала B_A^- в составе короткоживущего состояния $P^+B_A^-$, спадающего в течение ~ 1 пс [50–52]. DADS (рис. 5, кривые 2) с временными константами 3,1 и 6,4 пс отражают спад возбужденного состояния P^* и образование радикальной пары $P^+H_A^-$, включая широкую отрицательную полосу при ~ 912 нм (затухание стимулированного излучения из P^*), положительную полосу при 545 нм (выцветание Q_x -полосы поглощения H_A в основном состоянии) и отрицательную полосу при ~ 670 нм (развитие поглощения H_A^- в составе $P^+H_A^-$). Присутствие в обоих DADS практически симметричного коротковолнового сдвига полосы поглощения при ~ 600 нм, принадлежащей молекулам БХл $P_{A/B}$ и $B_{A/B}$, может свидетельствовать об отсутствии релаксации возбужденного первичного донора P^* в основное состояние, что является признаком высокого квантового выхода образования состояния $P^+H_A^-$ как в РЦ дикого типа, так и мутанта. Существенно, что оба DADS (рис. 5, вставки на панелях б и г) включают небольшую, но отчетливую положительную особенность при ~ 1030 нм, принадлежащую B_A^- , что

вместе с присутствием сигнала в этой области в DADS с временными константами 0,9 и 1,1 пс и с учетом литературных данных [50, 52] согласуется с моделью первичного разделения зарядов по механизму двухшагового переноса электрона $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$. В модели состояние $P^+B_A^-$ спадает с образованием $P^+H_A^-$ быстрее (за 0,9/1,1 пс), чем оно образуется из P^* (за 3,1/6,4 пс), в результате чего экспериментально обнаруживаемое заселение $P^+B_A^-$ (и, соответственно, величина сигнала при ~ 1030 нм) значительно меньше, чем реальное. По-видимому, несколько меньшая амплитуда и больший шум сигнала при ~ 1030 нм для мутантных РЦ, по сравнению с РЦ дикого типа (рис. 5, вставки на панелях б и г), могут быть связаны по крайней мере частично с увеличением разницы между константами времени первого и второго шага электронного переноса (3,1/0,9 против 6,4/1,1). Отметим также, что при измерениях на мутантных РЦ в этой спектральной области использовался пробный лазерный импульс меньшей интенсивности. DADS с константой времени ~ 200 пс для обоих РЦ показывают спектральные изменения, связанные с реакцией переноса электрона $P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$, включающие восстановление Q_x -полосы поглощения БФео H_A при 545 нм и уход полос поглощения анион-радикала H_A^- при 670, 910

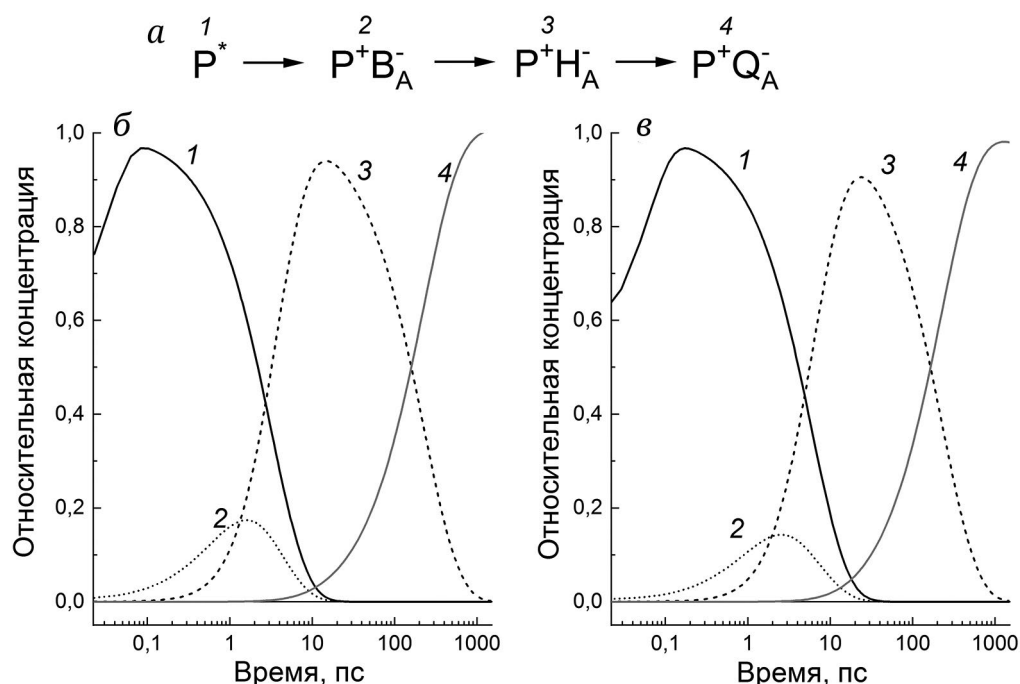


Рис. 6. Таргет-анализ спектрально-временных данных для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа и РЦ двойного мутанта H(L173)/I(L177)H. а – Кинетическая модель, использованная в анализе. б и в – Концентрационные профили состояний для РЦ дикого типа и H(L173)/I(L177)H соответственно. Шкала времени представлена в логарифмическом масштабе

и 965 нм (рис. 5, кривые 3). Следует отметить, что в ~200 пс DADS для мутантных РЦ в дополнение к изменениям, связанным с переносом электрона от H_A^- на Q_A , наблюдается небольшой отрицательный сигнал при ~840 нм (рис. 5, г; кривая 3), указывающий на переход первичного донора электрона в основное состояние. Это означает, что, в отличие от РЦ дикого типа, в РЦ H(L173)/I(L177)H рекомбинация ион-радикальной пары $P^+H_A^-$ в основное состояние частично конкурирует с прямым переносом электрона от H_A^- на Q_A , что приводит к незначительному уменьшению квантового выхода состояния $P^+Q_A^-$ (не более 10%). DADS с константой времени более 2 нс соответствуют финальному состоянию с разделенными зарядами $P^+Q_A^-$, которое в обоих РЦ не спадает до основного состояния на временной шкале измерений (рис. 5, кривые 4).

Используя результаты глобального анализа, с помощью таргет-анализа [48] для обоих РЦ была протестирована линейная четырехкомпонентная модель переноса электрона $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$ (рис. 6, а), известная для РЦ дикого типа [49, 50, 52]. Полученные временные зависимости концентраций вовлеченных состояний и их дифференциальные спектры (SADS, species associated difference spectra) показаны на рис. 6 (б, и в) и на рис. 7 соответственно.

SADS, полученные для РЦ дикого типа, хорошо соответствуют аналогичным спектрам, приведенным в литературе [50]. Из рис. 7 можно видеть,

что спектры состояний для РЦ дикого типа и мутантных РЦ, в целом, близки по форме, отличаясь лишь в деталях. Наиболее выраженные различия между спектрами видны в области Q_X - и Q_Y -полос поглощения первичного донора электрона Р: выцветающие полосы при 602 и 865 нм, наблюдаемые для РЦ дикого типа, в SADS для мутантных РЦ смещены в коротковолновую область до 597 и 830 нм соответственно. Спектр возбужденного состояния P^* со временем жизни 3,1/6 пс характеризуется выцветанием Q_X -полосы поглощения при 597–602 нм на фоне неструктурированного поглощения в этой области спектра, выцветанием Q_Y -полосы Р при 830–870 нм и стимулированным излучением из P^* на длинноволновом склоне выцветающей Q_Y -полосы Р. SADS со временем жизни 0,9/1,3 пс показывают особенности, характерные для состояния $P^+B_A^-$, включая выцветание Q_X (594–596 нм) и Q_Y (830–870 нм) полос поглощения Р и появление маркерной полосы поглощения анион-радикала B_A^- при ~1030 нм. SADS со временем жизни 223–226 пс соответствуют состоянию $P^+H_A^-$, показывая выцветание полос поглощения Р (595–600 нм и 830–870 нм) и H_A (545 нм), а также развитие полос поглощения анион-радикала H_A^- при 670 нм и 965 нм. В SADS для состояния $P^+Q_A^-$, затухающего на шкале измерений, доминируют особенности, связанные с образованием P^+ : выцветание полос поглощения Р при 595–603 нм и 830–870 нм и коротковолновый электрохромный

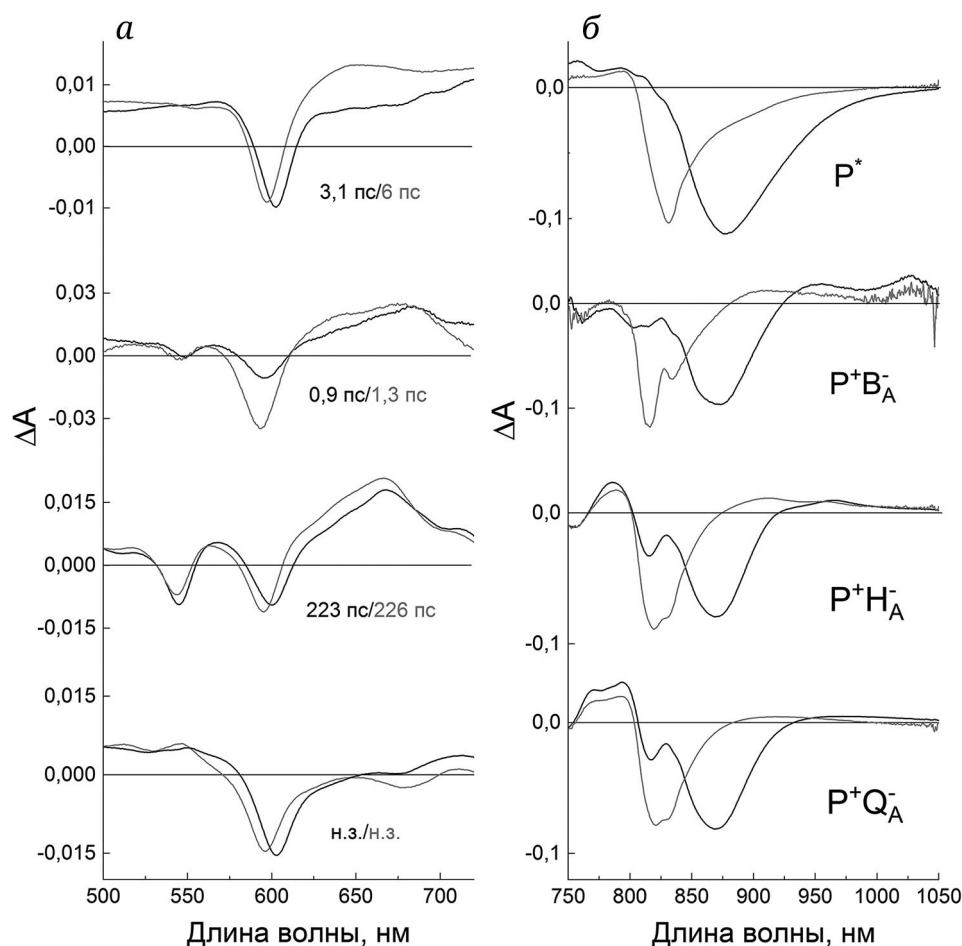


Рис. 7. SADS (species associated difference spectra) для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (черный) и РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)H (серый), полученные в результате таргет-анализа с использованием модели, показанной на рис. 6. *а* – Приведены времена жизни состояний; *б* – обозначены состояния; н.з. – незатухающий

сдвиг полосы мономерного БХл при 800 нм на фоне небольшого неструктурированного поглощения P^+ . Представленные данные позволяют заключить, что динамика и механизм первичного разделения зарядов, наблюдаемые для РЦ дикого типа, в значительной степени сохраняются в РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)H. Однако из рис. 6 (*б* и *в*) можно видеть, что, по отношению к РЦ дикого типа, максимальная степень заселения состояния $P^+B_A^-$ в РЦ двойного мутанта незначительно уменьшается и выход состояния $P^+Q_A^-$ падает на несколько процентов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, представленные в настоящей работе в совокупности с данными, опубликованными нами ранее [24], показывают, что в РЦ пурпурной бактерии *C. sphaeroides* можно предотвратить образование гетеродимеров, к которым приводят мутации H(M202)L и H(L173)L, путем внесения остатков His в симметричные позиции

M206 и L177, смещенные на один виток соответствующих α -спиралей относительно природных гистидиновых лигандов. Из литературных данных известно, что среднечетный потенциал P/P^+ и спектр поглощения гетеродимерных РЦ значительно отличаются от таковых для нативных РЦ, а также существенно снижается квантовая эффективность первичного разделения зарядов [20–22]. Внесение второй мутации как в РЦ H(M202)L/I(M206)H, так и в РЦ H(L173)L/I(L177)H приводит к формированию гомодимерного Р и сопровождается восстановлением величины потенциала P/P^+ .

Результаты фемтосекундных измерений показывают, что динамика и механизм фотоиндуцированного переноса электрона в значительной степени сохраняются при введении двойной мутации H(L173)L/I(L177)H. Как и в случае РЦ дикого типа, в мутантных РЦ первичное разделение зарядов происходит по безактивационному двухшаговому механизму $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$, при котором промежуточное короткоживущее состояние $P^+B_A^-$ спадает быстрее с образованием $P^+H_A^-$,

чем оно генерируется из P^* . По отношению к РЦ дикого типа константа времени заселения состояния $P^*B_A^-$ в мутантных РЦ увеличивается с ~ 3 пс до ~ 6 пс, а квантовый выход конечного состояния $P^*Q_A^-$ уменьшается на несколько процентов. Отметим, что в текущей литературе активно развивается представление о том, что образованию $P^*B_A^-$ в нативных бактериальных РЦ предшествует формирование промежуточного внутридимерного состояния с частичным переносом заряда $P\dot{A}P_B^-$ [53, 54]. Тот факт, что двойное аминокислотное замещение $H(L173)L/I(L177)H$ в РЦ *C. sphaeroides* практически не влияет на эффективность фотохимического разделения зарядов, указывает на отсутствие существенной модификации свойств состояния $P\dot{A}P_B^-$ в мутантных РЦ.

В то же время по ряду свойств гомодимерная специальная пара в РЦ с двойной мутацией $H(L173)L/I(L177)H$ отличается от таковой для димера P в РЦ дикого типа. Так, согласно результатам фотоиндуцированной дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии, в мутантных РЦ обнаруживается уменьшение степени электронного сопряжения между молекулами БХл в катион-радикале P^* , что, по-видимому, является следствием изменения пространственного положения и/или геометрии P . Кроме того, внесение двойных мутаций приводит к дестабилизации комплексов РЦ, выражающейся в заметном снижении устойчивости структуры димера P (или РЦ в целом) к повышенной температуре. С учетом возможных структурных изменений, вызванных аминокислотными замещениями, вновь введенные гистидиновые остатки могут, предположительно, использоваться в качестве лигандов к P в мутантных РЦ. Другим гипотетическим кандидатом на эту роль является молекула воды, внедряемая в модифицированную структуру белка мутантных РЦ [24]. Особенно важным в этом отношении является тот факт, что в РЦ с двойными мутациями вторая функция нативного P как акцептора энергии от светособирающих антенных комплексов, по-видимому, не восстанавливается в полной мере, поскольку экспериментально наблюдаемое увеличение энергии функционально активного Q_Y P -перехода в таких РЦ может привести к замедлению скорости переноса энергии электронного возбуждения от ССК-1 [55]. Включение гистидинов M202 и L173 в структуру природных РЦ *C. sphaeroides* в качестве аксиальных лигандов бактериохлофиллов димера P является, вероятно, одним из факторов, способствующих стабильности РЦ, а также оптимальному сочетанию функций P как терминального акцептора энергии от светособирающих антенн и первичного донора электрона для фотохимической реакции [4].

Таким образом, результаты этого исследования, а также данные работы Fufina et al. [24] показывают, что с помощью введения дополнительных точечных аминокислотных замен фотохимическая активность изолированного РЦ из *C. sphaeroides* может быть сохранена на высоком уровне даже при отсутствии важных структурных элементов – аксиальных гистидиновых лигандов к первичному донору электрона P . В более широком аспекте этот факт отражает устойчивую природу бактериальных РЦ, в том числе в отношении поддержания высоких скоростей реакций переноса электрона и достижения практически 100%-ного квантового выхода первичного разделения зарядов [13]. В то же время значительное изменение энергии оптического перехода $P \rightarrow Q_Y$ в мутантных РЦ $H(M202)L/I(M206)H$ [24] и $H(L173)L/I(L177)H$ может представлять интерес в связи с исследованием функции РЦ как эффективного терминального акцептора энергии электронного возбуждения от светособирающей антенны. Потенциально, полученная информация также может быть полезна при поиске возможностей и разработке способов включения фотосинтетических РЦ-комплексов в искусственные гибридные системы преобразования световой энергии [56].

Вклад авторов. Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева – мутагенез, выделение реакционных центров, изучение термостабильности, измерение спектров поглощения; А.А. Забелин, А.Я. Шкурюпатов – измерение ИК-Фурье-спектров; Р.А. Хатыпов, А.М. Христин – измерение дифференциальных спектров поглощения с фемтосекундным временным разрешением методом возбуждения-зондирования; Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева, А.А. Забелин, А.Я. Шкурюпатов, Р.А. Хатыпов, А.М. Христин – обсуждение результатов; Л.Г. Васильева, А.А. Забелин, А.Я. Шкурюпатов, А.М. Христин – написание текста статьи; Л.Г. Васильева, А.А. Забелин, А.Я. Шкурюпатов – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 122041100204-3 Минобрнауки.

Благодарности. Авторы выражают благодарность О.А. Третчиковой за участие в начальном этапе работы по изучению свойств РЦ с тройной мутацией. В работе использовались приборы ЦКП ПНЦБИ РАН (№ 670266; <https://www.ckp-rf.ru/ckp/670266/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hordt, A., Lopez, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L.-M., Tindall, B. J., Gronow, S., Kyrpides, N. C., Woyke, T., and Göker, M. (2020) Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria, *Front. Microbiol.*, **11**, 468, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>.
2. Cogdell, R. J., Gall, A., and Köhler, J. (2006) The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to *in vivo* membranes, *Q. Rev. Biophys.*, **39**, 227-324, <https://doi.org/10.1017/S0033583506004434>.
3. Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H., and Rees, D. C. (1987) Structure of reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the cofactors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5730-5734, <https://doi.org/10.1073/pnas.84.16.5730>.
4. Gorka, M., Baldansuren, A., Malnati, A., Gruszecki, E., Golbeck, J. H., and Lakshmi, K. V. (2021) Shedding light on primary donors in photosynthetic reaction centers, *Front. Microbiol.*, **12**, 1-31, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735666>.
5. Леонова М. М., Фуфина Т. Ю., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2014) Исследование пигмент-белковых взаимодействий в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий, в кн.: *Современные проблемы фотосинтеза. Том 1* (под ред. Аллахвердиева С. И., Рубина А. Б., Шувалова В. А.) Москва-Ижевск, Ижевский Институт компьютерных исследований, с. 157-196.
6. Woodbury, N. W., and Allen, J. P. (1995) The pathway, kinetics and thermodynamics of electron transfer in wild type and mutant reaction centers of purple nonsulfur bacteria, in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E., eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 527-557, https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_24.
7. Parson, W. W. (2008) Functional patterns of reaction centers in anoxygenic photosynthetic bacteria, in *Primary Processes of Photosynthesis, Part 2 Principles and Apparatus* (Renger, G., ed) RSC Publishing, Cambridge, pp. 57-109, <https://doi.org/10.1039/9781847558169-00057>.
8. Spiedel, D., Roszak, A. W., McKendrick, K., McAuley, K. E., Fyfe, P. K., Navedryk, E., Breton, J., Robert, B., Cogdell, R. J., Isaacs, N. W., and Jones, M. R. (2002) Tuning of the optical and electrochemical properties of the primary donor bacteriochlorophylls in the reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides*: spectroscopy and structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1554**, 75-93, [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00215-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00215-3).
9. Heimdal, J., Jensen, K. P., Devarajan, A., and Ryde, U. (2007) The role of axial ligands for the structure and function of chlorophylls, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**, 49-61, <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0164-z>.
10. Фуфина Т. Ю., Леонова М. М., Хатыпов Р. А., Христин, А. М., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2019) Особенности аксиального лигандирования бактериохлорофиллов в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий, *Биохимия*, **84**, 509-519, <https://doi.org/10.1134/S0006297919040047>.
11. Williams, J. C., Alden, R. G., Murchison, H. A., Peloquin, J. M., Woodbury, N. W., and Allen, J. P. (1992) Effect of mutations near the bacteriochlorophylls in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry*, **31**, 11029-11037, <https://doi.org/10.1021/bi00160a012>.
12. Wakeham, M. C., and Jones, M. R. (2005) Rewiring photosynthesis: engineering wrong-way electron transfer in the purple bacterial reaction centre, *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 851-857, <https://doi.org/10.1042/BST0330851>.
13. Jones, M. R. (2009) Structural plasticity of reaction centers from purple bacteria, In: *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., and Beatty, J. T., eds) Vol. 28 Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 295-321.
14. Allen, J. P., and Williams, J. C. (2011) The evolutionary pathway from anoxygenic to oxygenic photosynthesis examined by comparison of the properties of photosystem II and bacterial reaction centers, *Photosynth. Res.*, **107**, 59-69, <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9552-x>.
15. Goldsmith, J. O., King, B., and Boxer, S. G. (1996) Mg coordination by amino acid side chains is not required for assembly and function of the special pair in bacterial photosynthetic reaction centers, *Biochemistry*, **35**, 2421-2428, <https://doi.org/10.1021/bi9523365>.
16. Navedryk, E., Schulz, C., Müh, F., Lubitz, W., and Breton, J. (2000) Heterodimeric versus homodimeric structure of the primary electron donor in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers genetically modified at position M202, *Photochem. Photobiol.*, **71**, 582-588, [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)071<0582:hvhst>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)071<0582:hvhst>2.0.co;2).
17. Bylina, E. J., Kolaczowski, S. V., Norris, J. R., and Youvan, D. C. (1990) EPR characterization of genetically modified reaction centers of *Rhodobacter capsulatus*, *Biochemistry*, **29**, 6203-6210, <https://doi.org/10.1021/bi00478a013>.
18. Katilius, E., Turanchik, T., Lin, S., Taguchi, A. K. W., and Woodbury, N. W. (1999) B-side electron transfer in a *Rhodobacter sphaeroides* reaction center mutant in which the B-side monomer bacteriochlorophyll is replaced with bacteriopheophytin, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 7386-7389, <https://doi.org/10.1021/jp991670y>.

19. Katilius, E., Babendure, J. L., Lin, S., and Woodbury, N. W. (2004) Electron transfer dynamics in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center mutants with a modified ligand for the monomer bacteriochlorophyll on the active side, *Photosynth. Res.*, **81**, 165-180, <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000035048.10358.90>.
20. McDowell, L., Gaul, D., Kirmaier, C., Holten, D., and Schenck, C. C. (1991) Investigation into the source of electron transfer asymmetry in bacterial reaction centers, *Biochemistry*, **30**, 8315-8322, <https://doi.org/10.1021/bi00098a006>.
21. Laporte, L. L., Palaniappan, V., Davis, D. G., Kirmaier, C., Schenck, C. C., Holten, D., and Bocian, D. F. (1996) Influence of electronic asymmetry on the spectroscopic and photodynamic properties of the primary electron donor in the photosynthetic reaction center, *J. Phys. Chem.*, **100**, 17696-17707, <https://doi.org/10.1021/jp961658v>.
22. Allen, J. P., Artz, K., Lin, X., Williams, J. C., Ivancich, A., Albouy, D., Mattioli, T. A., Fetsch, A., Kuhn, M., and Lubitz, W. (1996) Effects of hydrogen bonding to a bacteriochlorophyll-bacteriopheophytin dimer in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry*, **35**, 6612-6619, <https://doi.org/10.1021/bi9528311>.
23. Fufina, T. Y., Vasilieva, L. G., Khatypov, R. A., and Shuvalov, V. A. (2013) Spectral properties of the *Rhodobacter sphaeroides* mutant photo-reaction center with double amino acid substitution I(L177)H+H(L173)L, In *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future, Advanced Topics in Science and Technology in China*, 46-49, https://doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7_9.
24. Khristin, A. M., Zabelin, A. A., Fufina, T. Y., Khatypov, R. A., Proskuryakov, I. I., Shuvalov, V. A., Shkuropatov, A. Y., and Vasilieva, L. G. (2020) Mutation H(M202)L does not lead to the formation of heterodimer of the primary electron donor in reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* when combined with mutation I(M206)H, *Photosynth. Res.*, **146**, 109-121, <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00728-9>.
25. Lin, X., Murchison, H. A., Nagarajan, V., Parson, W. W., Allen, J. P., and Williams, J. C. (1994) Specific alteration of the oxidation potential of the electron donor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10265-10269.
26. Fufina, T. Y., Selikhanov, G. K., Gabdulkhakov, A. G., and Vasilieva, L. G. (2023) Properties and crystal structure of the *Cereibacter sphaeroides* photosynthetic reaction center with double amino acid substitution I(L177)H + F(M197)H, *Membranes*, **13**, 157, <https://doi.org/10.3390/membranes13020157>.
27. Holden-Dye, K., Crouch, L. I., Williams, C. M., Bone, R. A., Cheng, J., Böhles, F., Heathcote, P., and Jones, M. R. (2011) Opposing structural changes in two symmetrical polypeptides bring about opposing changes to the thermal stability of a complex integral membrane protein, *Arch. Biochem. Biophys.*, **505**, 160-170, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.029>.
28. Kangur, L., Jones, M. R., and Freiberg, A. (2017) Hydrogen bonds in the vicinity of the special pair of the bacterial reaction center probed by hydrostatic high-pressure absorption spectroscopy, *Biophys. Chem.*, **231**, 27-33, <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.04.003>.
29. Selikhanov, G., Fufina, T., Guenther, S. Meents, A., Gabdulkhakov, A., and Vasilieva, L. (2022) X-ray structure of the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center with an M197 Phe→His substitution clarifies the properties of the mutant complex, *IUCrJ*, **9**, 261-271, <https://doi.org/10.1107/S2052252521013178>.
30. Vasilieva, L. G., Fufina, T. Y., Gabdulkhakov, A. G., Leonova, M. M., Khatypov, R. A. and Shuvalov, V. A. (2012) The site-directed mutation I(L177)H in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center affects coordination of P(A) and B(B) bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407-1417, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.008>.
31. Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trollinger, D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria, *Gene*, **70**, 191-197, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90117-5).
32. Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г., Фуфина Т. Ю., Болгарина Т. И., Шувалов В. А. (2005) Влияние замещения изолейцина L177 гистидином на пигментный состав и свойства реакционных центров пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **70**, 1527-1533, <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0256-3>.
33. Jones, M. R., Visschers, R. W., van Grondelle, R., and Hunter, C. N. (1992) Construction and characterization of a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* with the reaction center as the sole pigment-protein complex, *Biochemistry*, **31**, 4458-4465, <https://doi.org/10.1021/bi00133a011>.
34. Cohen-Basire, G., Siström, W. R., and Stanier, R. Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria, *J. Cell Comp. Physiol.*, **49**, 25-68, <https://doi.org/10.1002/jcp.1030490104>.
35. Goldsmith, J. O., and Boxer, S. G. (1996) Rapid isolation of bacterial photosynthetic reaction centers with an engineered poly-histidine tag, *Biochim. Biophys. Acta*, **1276**, 171-175, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00091-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00091-6).
36. Fufina, T. Y., Vasilieva, L. G., Khatypov, R. A., Shkuropatov, A. Y. and Shuvalov, V. A. (2007) Substitution of isoleucine L177 by histidine in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center results in the covalent binding of P_a bacteriochlorophyll to the L subunit, *FEBS Lett.*, **581**, 5769-5773, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.032>.
37. Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г. (2021) Влияние детергентов и осмолитов на термостабильность нативных и мутантных реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **86**, 607-614, <https://doi.org/10.31857/S0320972521040126>.

38. Delano, W. L. (2022) The PyMOL Molecular Graphics System, URL: <http://www.pymol.org> (accessed on 8 November 2022).
39. Фуфина Т. Ю., Третчикова О. А., Христин А. М., Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г. (2022) Свойства мутантных фотосинтетических реакционных центров пурпурной бактерии *Cereibacter sphaeroides* с замещением M206 Ile → Gln, *Биохимия*, **87**, 1447-1458, <https://doi.org/10.1134/S000629792210008X>.
40. Snellenburg, J. J., Laptanok, S. P., Seger, R., Mullen, K. M., and van Stokkum, I. H. M. (2012) Glotaran: a Java-based graphical user interface for the R package TIMP, *J. Stat. Soft.*, **49**, 1-22, <https://doi.org/10.18637/jss.v049.i03>.
41. Murchison, H. A., Alden, R. G., Allen, J. P., Peloquin, J. M., Taguchi, A. K., Woodbury, N. W., and Williams J. C. (1993) Mutations designed to modify the environment of the primary electron donor of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*: phenylalanine to leucine at L167 and histidine to phenylalanine at L168, *Biochemistry*, **32**, 3498-3505, <https://doi.org/10.1021/bi00064a038>.
42. Fyfe, P. K., and Jones, M. R. (2000) Re-emerging structures: continuing crystallography of the bacterial reaction centre, *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 413-421, [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(00\)00179-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00179-1).
43. Zucchelli, G., Brogioli, D., Casazza, A. P., Garlaschi, F. M., and Jennings, R. C. (2007) Chlorophyll ring deformation modulates Qy electronic energy in chlorophyll-protein complexes and generates spectral forms, *Biophys. J.*, **93**, 2240-2254, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104554>.
44. Breton, J., Nabedryk, E., and Parson, W. W. (1992) A new infrared electronic transition of the oxidized primary electron donor in bacterial reaction centers: a way to assess resonance interactions between the bacteriochlorophylls, *Biochemistry*, **31**, 7503-7510, <https://doi.org/10.1021/bi00148a010>.
45. Reimers, J. R., and Hush, N. S. (2003) Modeling the bacterial photosynthetic reaction center. VII. Full simulation of the intervalence hole-transfer absorption spectrum of the special-pair radical cation, *J. Chem. Phys.*, **119**, 3262-3277, <https://doi.org/10.1063/1.1589742>.
46. Naberdyk, E., Allen, J. P., Taguchi, A. K. W., Williams, J. C., Woodbury, N. W., and Breton, J. (1993) Fourier transform infrared study of the primary electron donor in chromatophores of *Rhodobacter sphaeroides* with reaction centers genetically modified at residues M160 and L131, *Biochemistry*, **32**, 13879-13885, <https://doi.org/10.1021/bi00213a017>.
47. Malferrari, M., Turina, P., Francia, F., Mezzetti, A., Leibl, W., and Venturoli, G. (2015) Dehydration affects the electronic structure of the primary electron donor in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence from visible-NIR and light-induced difference FTIR spectroscopy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **14**, 238-251, <https://doi.org/10.1039/c4pp00245h>.
48. Van Stokkum, I. H. M., Larsen, D. S., and van Grondelle, R. (2004) Global and target analysis of time-resolved spectra, *Biochim. Biophys. Acta*, **1657**, 82-104, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.04.011>.
49. Zinth, W., and Wachtveitl, J. (2005) The first picoseconds in bacterial photosynthesis – ultrafast electron transfer for the efficient conversion of light energy, *Chem. Phys. Chem.*, **6**, 871-880, <https://doi.org/10.1002/cphc.200400458>.
50. Dominguez, P. N., Himmelstoss, M., Michelmann, J., Lehner, F. T., Gardiner, A. T., Cogdell, R. J., and Zinth, W. (2014) Primary reactions in photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* – time constants of the initial electron transfer, *Chem. Phys. Lett.*, **601**, 103-109, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.03.085>.
51. Fajer, J., Brune, D. C., Davis, M. S., Forman, A., and Spaulding, L. D. (1975) Primary charge separation in bacterial photosynthesis: oxidized chlorophylls and reduced pheophytin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4956-4960, <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.4956>.
52. Weaver, J. B., Lin, C.-Y., Faries, K. M., Mathews, I. I., Russi, S., Holten, D., Kirmaier, C., and Boxer, S. G. (2021) Photosynthetic reaction center variants made via genetic code expansion show Tyr at M210 tunes the initial electron transfer mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2116439118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2116439118>.
53. Milanovsky, G. E., Shuvalov, V. A., Semenov, A. Y., and Cherepanov, D. A. (2015) Elastic vibrations in the photosynthetic bacterial reaction center coupled to the primary charge separation: implications from molecular dynamics simulations and stochastic Langevin approach, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 13656-13667, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03036>.
54. Ma, F., Romero, E., Jones, M. R., Novoderezhkin, V. I., and van Grondelle, R. (2019) Both electronic and vibrational coherences are involved in primary electron transfer in bacterial reaction center, *Nat. Commun.*, **10**, 933, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08751-8>.
55. Ma, F., Yu, L.-J., Wang-Otomo, Z.-Y., and van Grondelle, R. (2016) Temperature dependent LH1 → RC energy transfer in purple bacteria *Tch. tepidum* with shiftable LH1-Qy band: a natural system to investigate thermally activated energy transfer in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 408-414, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.12.006>.
56. Friebe, V. M., and Frese, R. N. (2017) Photosynthetic reaction center-based biophotovoltaics, *Curr. Opin. Electrochem.*, **5**, 126-134, <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.08.001>.

**COMPARATIVE STUDY OF SPECTRAL AND FUNCTIONAL
PROPERTIES OF REACTION CENTERS OF WILD TYPE
AND DOUBLE MUTANT H(L173)L/I(L177)H OF THE PURPLE
BACTERIUM *Cereibacter sphaeroides***

**T. Yu. Fufina, A. A. Zabelin, R. A. Khatypov, A. M. Khristin,
A. Ya. Shkuropatov, and L. G. Vasilieva***

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: vsyulya@mail.ru*

Previously, we found that in the reaction center (RC) of the purple bacterium *Cereibacter sphaeroides*, the formation of a heterodimeric primary electron donor (P), caused by the substitution of His-L173 by Leu, was compensated by a second mutation Ile-L177 – His. Significant changes in the spectral properties, pigment composition and redox potential of P, observed in the H(L173)L RC, are restored to the corresponding characteristics of the native RC in the RC H(L173)L/I(L177)H, with the difference that the energy of the long-wavelength Q_Y optical transition of P increases significantly (by ~75 meV). In this work, using light-induced FTIR difference spectroscopy, it was shown that in the RC with double mutation, the homodimeric structure of P is preserved with partially altered electronic properties: the electronic coupling in the radical-cation of the P^+ dimer is weakened and the localization of the positive charge on one of its halves increases. The results of the study of the triple mutant H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H are consistent with the assumption that the observed changes in the P^+ electronic structure, as well as considerable blue shift of Q_Y P absorption band in the RC H(L173)L/I(L177)H, are associated with a modification of the spatial position and/or geometry of P. Using femtosecond absorption difference spectroscopy, it was shown that the mutant H(L173)L/I(L177)H RC retains a sequence of reactions $P^* \rightarrow P^+B_A \rightarrow P^+H_A \rightarrow P^+Q_A$ with electron transfer rates and the quantum yield of the final state P^+Q_A close to those observed in the wild-type RC (P^* is the singlet-excited state of P; B_A , H_A , and Q_A are molecules of bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, and ubiquinone in the active A-branch of cofactors, respectively). The obtained results, together with previously published data for the RC with a symmetrical double mutation H(M202)L/I(M206)H, demonstrate that by introducing additional point amino acid substitutions, the photochemical activity of the isolated RC from *C. sphaeroides* can be maintained at a high level even in the absence of important structural elements – axial histidine ligands to the primary electron donor P.

Keywords: photosynthetic reaction center, *Cereibacter sphaeroides*, ligation of bacteriochlorophyll, primary electron donor, redox potential, thermal stability of membrane proteins, FTIR spectroscopy, femtosecond spectroscopy

АСТАКСАНТИН СНИЖАЕТ КАРДИОТОКСИЧНОСТЬ, ВЫЗВАННУЮ H_2O_2 И ДОКСОРУБИЦИНОМ В КЛЕТКАХ КАРДИОМИОЦИТОВ ЛИНИИ H9c2

© 2024 Р.Р. Крестинин, М.И. Кобякова, Ю.Л. Бабурин,
Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина*

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пушкино Московской обл., Россия; электронная почта: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 18.06.2024

После доработки 17.09.2024

Принята к публикации 18.09.2024

Сердечно-сосудистые заболевания представляют собой одну из самых сложных проблем в клинической практике. Астаксантин (АСТ) – это кето-каротиноид (ксантофилл) преимущественно морского происхождения, который способен проникать через клеточную мембрану, локализуясь в митохондриях, и предотвращать митохондриальную дисфункцию. В настоящем исследовании изучено влияние астаксантина на гибель кардиомиоцитов линии H9c2, вызванную цитотоксическим действием пероксида водорода (H_2O_2) и доксорубицина. С использованием методов спектрофотометрии, спектрофлуориметрии, вестерн-блоттинга показано, что обработка клеток АСТ способствовала повышению числа устойчивых к действию H_2O_2 и доксорубицина клеток H9c2 на фоне сохранения величины их трансмембранного потенциала митохондрий, снижения внутриклеточной продукции активных форм кислорода и увеличения внутриклеточного содержания маркеров митофагии PINK1, Parkin и прохибитина 2. Полученные результаты позволяют предположить, что использование АСТ может быть высокоэффективным способом для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: астаксантин, кардиомиоциты, цитотоксичность, митохондриальная дисфункция, митофагия.

DOI: 10.31857/S0320972524100084 EDN: IPAQQW

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение функций митохондрий может быть причиной возникновения различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых [1]. Митохондриальная дисфункция может провоцировать развитие заболеваний, связанных с окислительным стрессом [2, 3]. Важной предпосылкой нормальной клеточной функции является поддержание структурной и функциональной целостности митохондрий, поскольку именно митохондрии играют ключевую роль в энергетическом обмене, а также в поддержании окислительно-восстановительного состояния клеток и

регуляции апоптоза. Известно, что митохондрии являются основным источником активных форм кислорода (АФК), митохондриальная дисфункция приводит к окислительному стрессу [4]. Функционирование сердечной мышцы регулируется различными механизмами антиоксидантной защиты, однако при заболеваниях сердца антиоксидантная защита нарушается, а увеличение продукции АФК приводит к ее снижению [5, 6].

Процесс удаления (элиминация/деградация) митохондрий посредством селективной аутофагии, известной как митофагия, имеет решающее значение для поддержания правильной метаболической функции и контроля как на митохондриальном, так и на клеточном уровнях [7]. Существует путь PINK1/Parkin, который считается важной системой контроля качества, участвующей в избирательном удалении поврежденных митохондрий [8]. Parkin представляет собой цитозольную убиквитинлигазу E3, а PTEN-индуцированная предполагаемая киназа 1 (PINK1)

Принятые сокращения: АСТ – астаксантин; АФК – активные формы кислорода; Докс – доксорубин; PINK1 – PTEN-индуцированная предполагаемая киназа 1; $\Delta\psi_m$ – трансмембранный потенциал митохондрий.

* Адресат для корреспонденции.

представляет собой киназу внешней мембраны митохондрий. Накопление PINK1 в поврежденных митохондриях может дать сигнал Parkin для избирательной деградации митохондрий [9]. Кроме того, у млекопитающих было охарактеризовано несколько рецепторов митофагии, таких как FUNDC1 [10], NIX, взаимодействующий с Bcl-2/аденовирусом E1B (BNIP3, 19 кДа) во внешней митохондриальной мембране [11], прохибин 2 (PHB2) во внутренней митохондриальной мембране [12] и другие.

Чтобы повысить защитную реакцию организма на окислительный стресс, необходимо применение препаратов, направленных на снижение митохондриальной дисфункции. Среди таких препаратов следует отметить астаксантин (3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione, ACT) – каротиноид ксантофилл, который считается мощным антиоксидантом, а благодаря своим противовоспалительным свойствам он может использоваться в качестве терапевтического средства при сердечно-сосудистых заболеваниях [13]. Song et al. [14] показали, что в результате изменения проницаемости митохондриальных мембран ACT ингибировал высвобождение цитохрома c и, таким образом, предотвращал опосредованную митохондриями апоптотическую гибель клеток. На модели фиброза легких было обнаружено, что ACT ингибировал H_2O_2 - и блеомицин-индуцированный апоптоз альвеолярных эпителиальных клеток. Обработка ACT защищала митохондриальные мембраны от структурных нарушений, вызванных H_2O_2 или блеомицином, при этом мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\Psi_m$) повышался [14]. Сотрудники других лабораторий показали, что ACT ингибировал выход цитохрома c и апоптоз в клетках кардиомиоцитов линии H9c2 [15] и SH-SY5Y [16] за счет снижения уровня АФК и последующего образования продуктов окисления белков, а также за счет восстановления $\Delta\Psi_m$. Ранее мы изучили влияние хронического введения ACT крысам в течение 14 дней перорально и показали, что ACT улучшал параметры, характеризующие функциональное состояние митохондрий. Сердечная недостаточность была вызвана инъекцией изопротеренола, что представляет собой широко используемую в мировом научном сообществе модель, при которой достигается сердечная недостаточность [17–19]. ACT проявлял защитный эффект в митохондриях сердца, изолированных из крыс с инъекцией изопротеренола [16, 20–23], и поэтому мы предположили, что ACT может рассматриваться как эффективный препарат для улучшения функционирования сердечной мышцы как в нормальных, так и в клинических условиях.

В настоящем исследовании было изучено влияние ACT на жизнеспособность кардиомио-

цитов линии H9c2 при окислительном стрессе, который вызвали индукторами цитотоксичности, такими как пероксид водорода (H_2O_2) и доксорубин (Докс). Известно, что достижение цитотоксичности в клетках при помощи H_2O_2 используется для генерации внутриклеточных АФК [24], а механизм патофизиологии кардиотоксичности, вызванной Докс, обусловлен повышенным окислительным стрессом, падением митохондриального мембранного потенциала и усилением апоптоза [25]. В этих условиях были исследованы изменения жизнеспособности клеток кардиомиоцитов, продукции АФК, $\Delta\Psi_m$, PHB2 и маркеров митофагии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток и условия культивирования. В работе использовали крысиные кардиомиоциты линии H9c2, полученные из Американской коллекции типовых клеточных культур («ATCC», США). Клетки высевали в лунки 96-луночного культурального планшета («SPL Life Sciences Co., LTD», Южная Корея) в количестве $2,5 \times 10^3$ в 100 мкл питательной среды, состоящей из смеси питательных сред DMEM/F12 («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Gibco», США), содержащей 40 мкг/мл гентамицина сульфата («Sigma-Aldrich»), и культивировали 24 ч при 37 °C в атмосфере 5% CO_2 . Через 24 ч от момента посева клетки использовали для проведения экспериментов.

Тест на выживаемость (цитотоксический тест). Жизнеспособность клеток после инкубации с 5–20 мкМ ACT («Macklin», Китай), 1–200 мкМ H_2O_2 («Sigma-Aldrich») и 1–100 мкМ доксорубина (Докс) («Sigma-Aldrich») определяли по отношению количества живых клеток в опытных и контрольных (без добавления ACT, H_2O_2 или Докс) культурах через 24 ч после добавления ACT, H_2O_2 или Докс. Количество живых клеток после инкубации с ACT, H_2O_2 или Докс оценивали по интенсивности восстановления резазурина («Sigma-Aldrich») до резозурина. Для этого к клеткам добавляли резазурин (30 мкг/мл), инкубировали с красителем в течение 4 ч при 37 °C в атмосфере 5% CO_2 в инкубаторе и измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 532 нм и длине волны испускания 590 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 («Tecan», Швейцария). Данные представлены в процентах от контроля (необработанные клетки). Дополнительно для определения числа мертвых клеток после инкубации с ACT (5–20 мкМ), H_2O_2 (6–100 мкМ) или Докс (6–100 мкМ) использовали коммерческий набор Cytotoxicity Detection Kit (LDH) («Roche

Diagnostics GmbH», Германия), следуя рекомендациям производителя. Поглощение измеряли при длине волны 490 нм с использованием планшетного ридера iMARK («Bio-Rad», США). В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные 1%-ным Triton X-100 («Helicon», Россия). Данные представлены в процентах от контроля.

Анализ изменения митохондриального мембранного потенциала. Для анализа митохондриального потенциала использовали флуоресцентный зонд 3,3'-дигексилоксакарбоцианин йодид DiOC6(3) («Sigma-Aldrich») (Ex – 485 нм/Em – 530 нм). Для этого клетки окрашивали 10 нМ DiOC6(3) в течение 30 мин при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе. По истечении 30 мин клетки однократно промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) («Sigma-Aldrich»). В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные 250 нМ валиномицина («Sigma-Aldrich») в течение 30 мин перед добавлением DiOC6(3). Интенсивность флуоресценции измеряли на планшетном спектрофлуориметре Infinite F200 PRO («Tecan») при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны испускания 530 нм. Данные представлены в процентах от контроля (необработанные клетки).

Анализ внутриклеточной продукции активных форм кислорода. Внутриклеточную продукцию АФК оценивали с использованием флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (DCFH-DA; «Sigma-Aldrich») (Ex – 485 нм/Em – 530 нм). Для этого клетки окрашивали 50 мкМ DCFH-DA в течение 30 мин при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе. По истечении 30 мин клетки однократно промывали PBS. Интенсивность флуоресценции измеряли на планшетном спектрофлуориметре Infinite F200 PRO при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны испускания 530 нм. Данные представлены в процентах от контроля (необработанные клетки).

Вестерн-блот-анализ. К клеткам добавляли выбранные количества АСТ (5 и 10 мкМ), H₂O₂ (100 мкМ) и Докс (100 мкМ). Клетки дважды промывали ледяным PBS и центрифугировали при 1500 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок солибилизировали в лизирующем буфере (RIPA; «Servicebio», Китай) с добавлением ингибиторов протеиназ/фосфатаз. После инкубации в течение часа при 4 °C образцы центрифугировали при 13 000 g в течение 10 мин. Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда в супернатантах [26]. Полученные образцы растворяли в буфере для образцов Лэммли («Bio-Rad»), нагревали до 95 °C в течение 5 мин. Полученные лизаты разделяли на отдельные белки с помощью 12,5%-ного SDS-PAGE,

переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану (0,2 мкм; «Bio-Rad»), которую затем блокировали в растворе Roti-block («Carl Roth GmbH + Co.», Германия) при комнатной температуре в течение часа. Мембрану инкубировали с антителами к PINK1 (PTEN-induced kinase 1; «Cusabio», США), Parkin («Abclonal», Германия), PHB2 («Cusabio»), как описано в инструкции. В качестве контроля белковой нагрузки использовали антитела к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH; «Cell Signaling», США). Белковые полосы детектировали с использованием системы обнаружения ECL (ChemiDoc Touch Imaging System; «Bio-Rad»).

Статистический анализ. Для статистического анализа мы использовали однофакторный дисперсионный анализ и соответствующий апостериорный анализ (Стьюдента–Ньюмена–Кеулса). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование влияния различных концентраций АСТ, H₂O₂ и Докс на выживаемость клеток H9c2. Сначала был исследован эффект АСТ, H₂O₂ и Докс на жизнеспособность клеток кардиомиоцитов H9c2 (рис. 1). Для этого клетки высаживали в 96-луночный культуральный планшет (2,5 × 10³ клеток на лунку) и инкубировали в течение 24 ч с добавлением различных концентраций АСТ (0–166 мкМ; рис. 1, а), H₂O₂ (0–200 мкМ; рис. 1, б) и Докс (0–100 мкМ; рис. 1, в). Как видно из рис. 1, АСТ в ряду от 0 до 55 мкМ не оказывал влияния на жизнеспособность клеток, однако при 166 мкМ выживаемость клеток снижалась на 45%. При добавлении H₂O₂ к клеткам H9c2 их жизнеспособность снижалась при 50 мкМ на 13%, а при 100 мкМ – на 65%. В присутствии Докс в ряду 0 → 1 → 3 → 6 → 25 → 50 → 100 мкМ жизнеспособность клеток кардиомиоцитов снижалась на 14 → 26 → 38 → 39 → 43 → 57 → 66% соответственно.

На следующем этапе мы исследовали защитное действие АСТ при его совместном действии с индукторами цитотоксичности, такими как H₂O₂ и Докс (рис. 2). Следует отметить, что жизнеспособность клеток H9c2 в выбранных условиях зависела не только от концентрации исследуемых препаратов, но и от времени прединкубации клеток с АСТ. Клетки в количестве 2,5 × 10³ высевали в лунки 96-луночного планшета, через 24 ч к клеткам добавляли АСТ (5, 10, 15 и 20 мкМ) и инкубировали еще в течение 1, 4 или 6 ч, затем добавляли индукторы цитотоксичности и через 24 ч измеряли жизнеспособность клеток. При инкубации с АСТ в течение 1 ч добавление H₂O₂ в различных концентрациях не выявило защитного эффекта АСТ (рис. 2, а). При инкубации

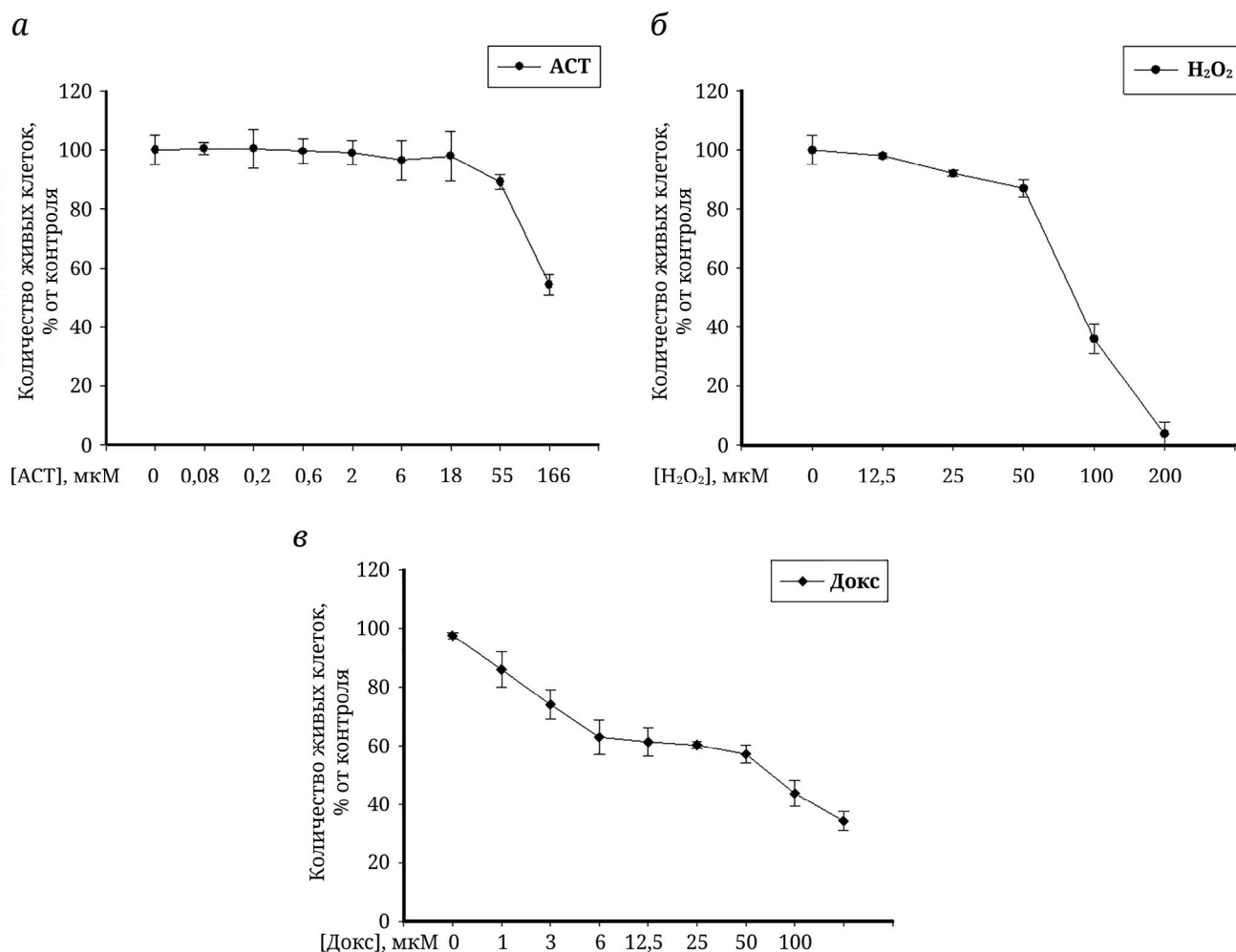


Рис. 1. Жизнеспособность кардиомиоцитов линии H9c2 после 24 ч инкубации с АСТ (а), H₂O₂ (б) и Докс (в). Клетки высевали в 96-луночный планшет при плотности $2,5 \times 10^3$ клеток на лунку и обрабатывали указанными концентрациями АСТ (а), H₂O₂ (б) и Докс (в) в H9c2 в течение 24 ч. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD) из десяти отдельных экспериментов

клеток с АСТ в течение 4 ч добавление H₂O₂ в ряду 0 $\rightarrow$ 50 мкМ не изменяло жизнеспособность клеток.

Несмотря на то что при воздействии H₂O₂ (100 мкМ) жизнеспособность клеток значительно снижалась (65%), инкубирование клеток с 5 и 10 мкМ АСТ в течение 4 ч не отличалось от контроля. В этих условиях при совместном действии АСТ (15 мкМ) с H₂O₂ (100 мкМ) жизнеспособность H9c2 снижалась на 30%, а при 20 мкМ АСТ – на 50% по сравнению с контролем (рис. 2, б). На рис. 2, в показано изменение жизнеспособности клеток при различной концентрации H9c2 после инкубации с АСТ в течение 6 ч. При инкубировании клеток с различными концентрациями АСТ добавление H₂O₂ в ряду 0 $\rightarrow$ 50 мкМ не оказывало существенного влияния на жизнеспособность клеток. Однако при совместном действии АСТ (5, 10, 15 и 20 мкМ) с H₂O₂ (100 мкМ) жизнеспособность снижалась на 10, 10, 25 и 50%

соответственно. Добавление 200 мкМ H₂O₂ к клеткам с АСТ, независимо от его концентрации, значительно снижало жизнеспособность клеток H9c2 по сравнению с контролем. Однако при инкубации с АСТ (5 и 10 мкМ) добавление H₂O₂ (200 мкМ) повышало выживаемость клеток почти на 30% по сравнению с эффектом одного H₂O₂ (200 мкМ) как при 4 ч, так и при 6 ч инкубации с АСТ.

На рис. 2 (г, д, е) показано изменение жизнеспособности клеток кардиомиоцитов линии H9c2 в присутствии различных концентраций АСТ и Докс при инкубации клеток с АСТ в течение 1, 4 и 6 ч.

На рис. 2, г и д видно, что при 1 и 4 ч инкубации с АСТ при различных концентрациях жизнеспособность клеток снижалась так же, как и в присутствии Докс. Жизнеспособность клеток при 6-часовой инкубации с АСТ (5 и 10 мкМ) и последующим добавлением 100 мкМ Докс снижалась на 35 и 40% по сравнению с контролем.

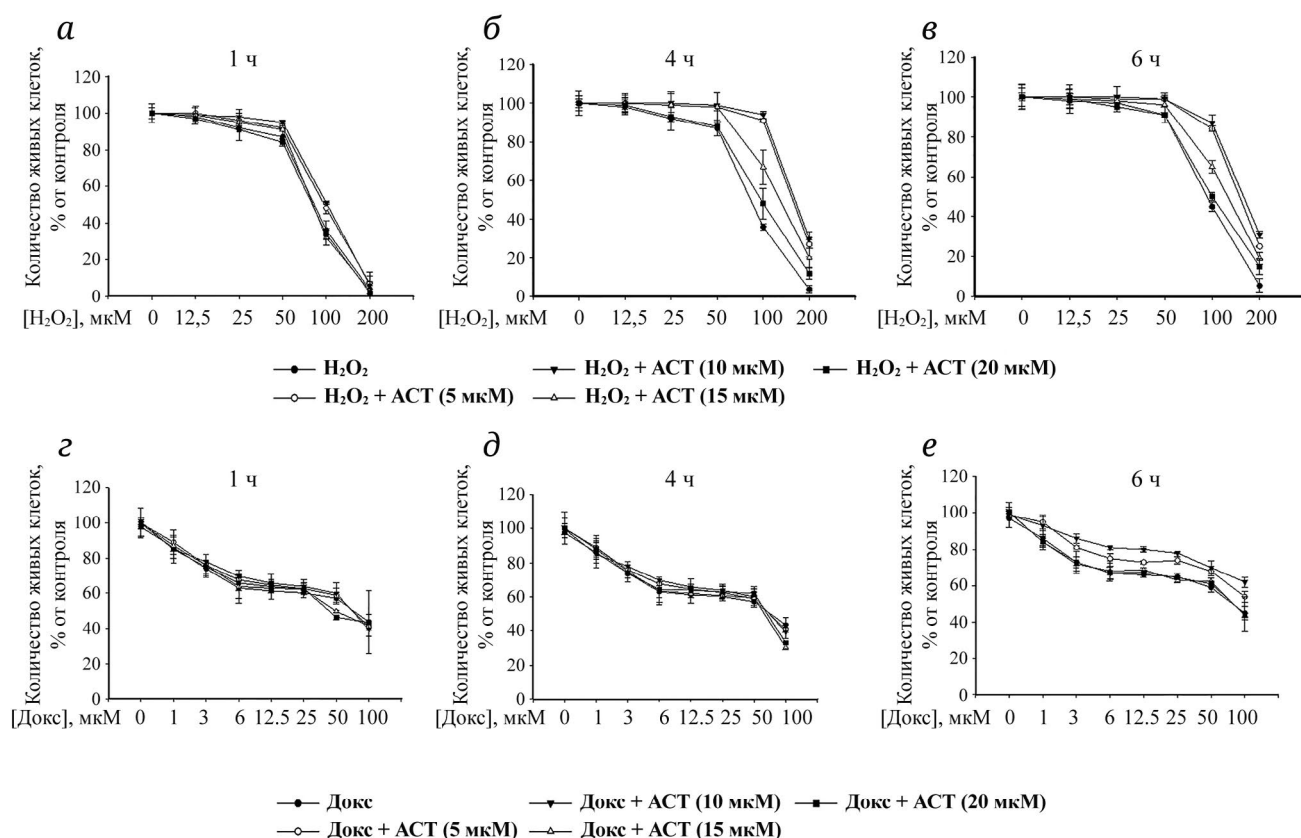


Рис. 2. Зависимость жизнеспособности клеток кардиомиоцитов H9c2 от концентрации АСТ, H_2O_2 , Докс и от времени инкубации с АСТ. Инкубация клеток с АСТ производилась в течение 1 (а, г), 4 (б, д) и 6 (в, е) часов. Количество живых клеток интактной культуры (контроль, без обработки препаратами) принималось за 100%. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из шести отдельных экспериментов. Контроль представлял собой необработанные клетки

Однако, по сравнению с действием одного Докс (100 мкМ), жизнеспособность клеток повышалась на 12% при АСТ (5 мкМ) + Докс (100 мкМ) и на 20% – при АСТ (10 мкМ) + Докс (100 мкМ). АСТ при концентрации 15 и 20 мкМ с Докс (100 мкМ) не отличались от действия одного Докс (100 мкМ).

Дополнительно мы исследовали цитотоксическое действие АСТ и его совместное действие с индукторами цитотоксичности в клетках H9c2, чтобы определить число погибших клеток (рис. 3). На рис. 3, а показано изменение количества погибших клеток в присутствии различных концентраций АСТ. Из рис. 3 видно, что при концентрации АСТ в ряду 0,03 $\rightarrow$ 0,08 $\rightarrow$ 0,2 погибших клеток не наблюдалось, при 0,6 мкМ процент погибших клеток составлял менее 1%, тогда как в ряду 2 $\rightarrow$ 6 $\rightarrow$ 18 мкМ АСТ количество погибших клеток не превышало 2,5%. Однако при 55 мкМ АСТ количество погибших клеток возрастало почти до 10%, а при дальнейшем повышении концентрации до 166 мкМ – до 55%. На рис. 3, б показано изменение количества погибших клеток при совместном применении АСТ с H_2O_2 после 4 ч инкубации с АСТ.

При повышении концентрации H_2O_2 в ряду 25 $\rightarrow$ 50 $\rightarrow$ 100 мкМ количество погибших клеток увеличивалось до 10% $\rightarrow$ 15% $\rightarrow$ 64% соответственно. Следует отметить, что при совместном действии АСТ с 25 мкМ H_2O_2 при повышении концентрации АСТ в ряду 5 $\rightarrow$ 10 $\rightarrow$ 15 $\rightarrow$ 20 мкМ количество погибших клеток снижалось в 4 $\rightarrow$ 10 $\rightarrow$ 2,5 $\rightarrow$ 1,4 раза, при 50 мкМ H_2O_2 – в 4 $\rightarrow$ 5 $\rightarrow$ 3 раза соответственно. При совместном действии 50 мкМ H_2O_2 с 20 мкМ АСТ снижения количества погибших клеток не наблюдалось. При совместном действии 100 мкМ H_2O_2 с различными концентрациями АСТ количество погибших клеток снижалось в 5 $\rightarrow$ 8,3 $\rightarrow$ 1,8 $\rightarrow$ 1,13 раза соответственно.

На рис. 3, в показано изменение количества погибших клеток при совместном применении АСТ с Докс после 6 ч инкубации с АСТ. При повышении концентрации Докс в ряду 6 $\rightarrow$ 12,5 $\rightarrow$ 25 $\rightarrow$ 50 $\rightarrow$ 100 мкМ количество погибших клеток увеличивалось до 28% $\rightarrow$ 30% $\rightarrow$ 33% $\rightarrow$ 40% $\rightarrow$ 57% соответственно. При совместном действии АСТ с 6 мкМ Докс количество погибших клеток снижалось только при 5 и 10 мкМ АСТ

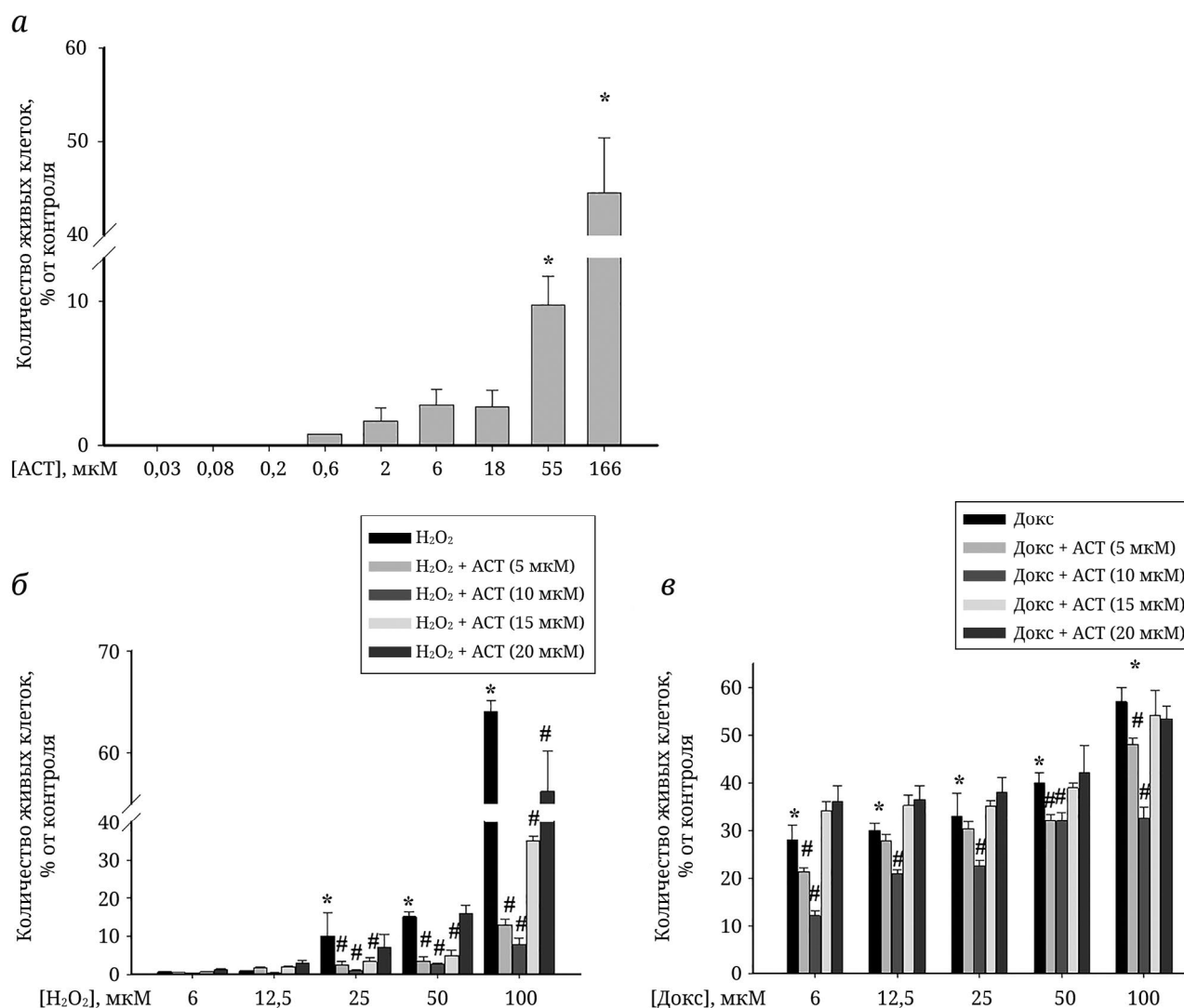


Рис. 3. Цитотоксическое действие АСТ и его совместное действие с H₂O₂ и Докс в клетках кардиомиоцитов H9c2. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные 1%-ным Triton X-100, которые принимали за 100%. *а* – Число погибших клеток в присутствии различных концентраций АСТ; *б* – количество погибших клеток при совместном применении АСТ с H₂O₂ после 4 ч инкубации с АСТ; *в* – количество погибших клеток при совместном применении АСТ с Докс после 6 ч инкубации с АСТ. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (*n* = 8); * *p* < 0,05 – значимое изменение по сравнению с контролем (интактная культура); # *p* < 0,05 – значимое изменение по сравнению с соответствующими значениями H₂O₂ или Докс

на 24% и в 2,3 раза соответственно. При более высоких концентрациях АСТ количество погибших клеток повышалось. Подобные эффекты мы заметили и при более высоких концентрациях Докс. Интересно отметить, что АСТ (10 мкМ) способствовал снижению гибели клеток при всех совместно используемых концентрациях Докс.

Таким образом, защитный эффект АСТ был существенным при концентрации АСТ 5 и 10 мкМ с H₂O₂ (100 мкМ) при инкубации клеток с АСТ в течение 4 ч, а с Докс (100 мкМ) – при инкубации клеток с АСТ в течение 6 ч.

Поскольку более существенный эффект был замечен при концентрации АСТ 5 и 10 мкМ, при

исследовании изменения ΔΨ_м и АФК использовали эти концентрации.

Исследование влияния АСТ, H₂O₂ и Докс на изменение ΔΨ_м и внутриклеточной продукции АФК в клетках H9c2. Далее, было проанализировано изменение ΔΨ_м в наших экспериментальных условиях (рис. 4).

Как видно из рис. 4, *а*, добавление к клеткам H₂O₂ (25 мкМ) не изменяло ΔΨ_м, в то время как H₂O₂ (50 мкМ) снижало ΔΨ_м на 12%, а H₂O₂ (100 мкМ) – на 25% по сравнению с контролем (необработанные клетки). АСТ при концентрации 5 и 10 мкМ не оказывал влияние на изменение ΔΨ_м по сравнению с контролем. Однако

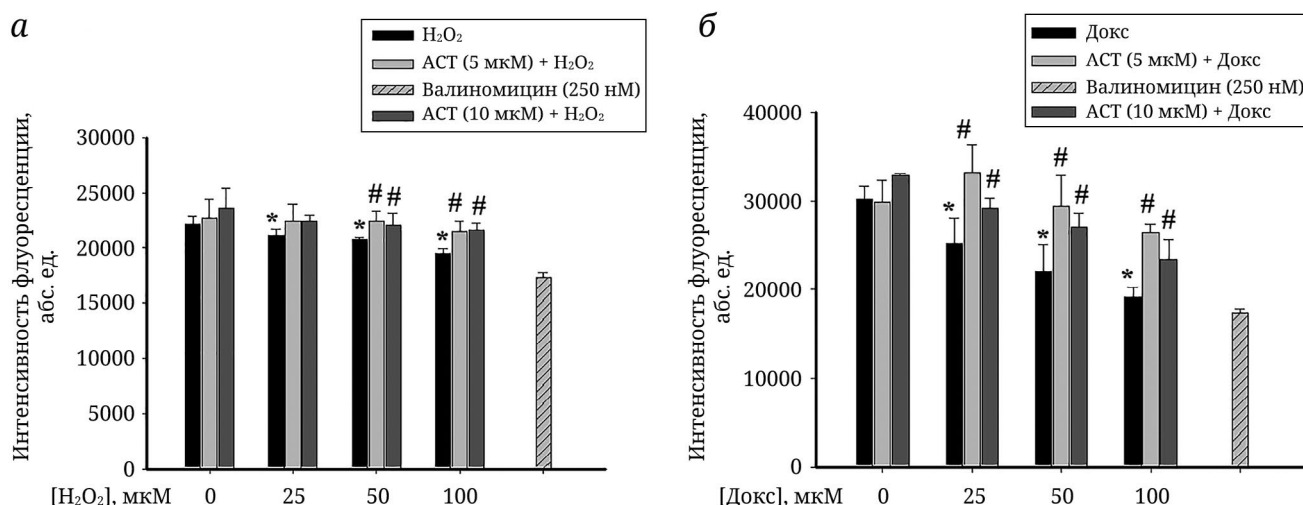


Рис. 4. Влияние АСТ, H₂O₂ и Докс на изменение ΔΨм в клетках кардиомиоцитов H9c2. Интенсивность флуоресценции intactных клеток использовали в качестве контроля (без обработки препаратами). **а** – Изменение интенсивности флуоресценции в присутствии АСТ (5 и 10 мкМ) и H₂O₂; **б** – изменение интенсивности флуоресценции в присутствии АСТ (5 и 10 мкМ) и Докс. Валиномицин (250 нМ) использовался как положительный контроль. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение ($n = 6$); * $p < 0,05$ – значимое изменение по сравнению с соответствующим контролем (необработанные клетки); # $p < 0,05$ – значимое изменение по сравнению с H₂O₂ или Докс

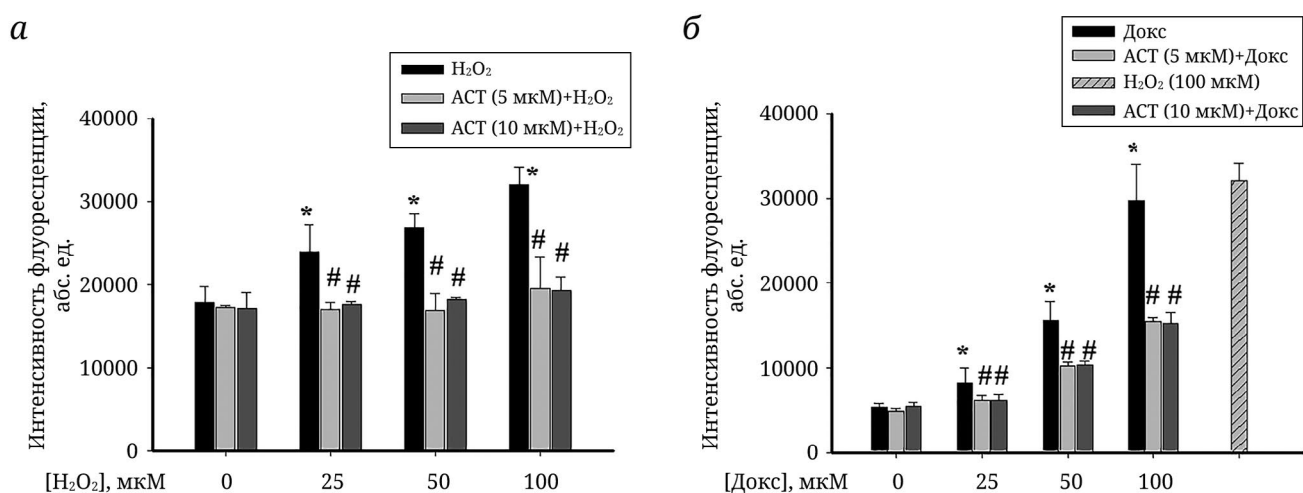


Рис. 5. Влияние АСТ, H₂O₂ и Докс на изменение внутриклеточной продукции АФК в клетках кардиомиоцитов H9c2. **а** – Изменение интенсивности флуоресценции в присутствии АСТ (5 и 10 мкМ) и H₂O₂; **б** – изменение интенсивности флуоресценции в присутствии АСТ (5 и 10 мкМ) и Докс. H₂O₂ (100 мкМ) использовали как положительный контроль. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ($n = 6$); * $p < 0,05$ – значимое изменение по сравнению с контролем (необработанные клетки); # $p < 0,05$ – значимое изменение по сравнению с H₂O₂ или Докс

при добавлении H₂O₂ (25 мкМ) к АСТ (10 мкМ) – обработанным клеткам – повышало ΔΨм на 13% по сравнению с H₂O₂ (25 мкМ). При комбинированном действии H₂O₂ (50 мкМ) с АСТ (5 мкМ) ΔΨм увеличивался на 16%, а при действии H₂O₂ (50 мкМ) с АСТ (10 мкМ) – на 12% по сравнению с H₂O₂ (50 мкМ). Добавление H₂O₂ (100 мкМ) к АСТ (5 мкМ) – обработанным клеткам – повышало ΔΨм на 25%, а H₂O₂ (100 мкМ) к АСТ (10 мкМ) – на 27% по сравнению с H₂O₂ (100 мкМ). На рис. 4, б повышение концентрации Докс в ряду 25 → 50 →

→ 100 мкМ снижало ΔΨм на 16,5, 27 и 37% соответственно. Обработка АСТ (5 и 10 мкМ) совместно с 25 мкМ Докс повышала ΔΨм на ~30 и 16% по сравнению с 25 мкМ индуктора (без АСТ), совместно с 50 мкМ Докс – на 33 и 23% по сравнению с 50 мкМ индуктора (без АСТ) и совместно с 100 мкМ Докс – на 38 и 22% по сравнению с 100 мкМ индуктора (без АСТ) соответственно. АСТ восстанавливал ΔΨм, несмотря на токсичное действие H₂O₂ и Докс.

Далее, мы исследовали влияние АСТ на изменение продукции АФК при H₂O₂- и Докс-индуци-

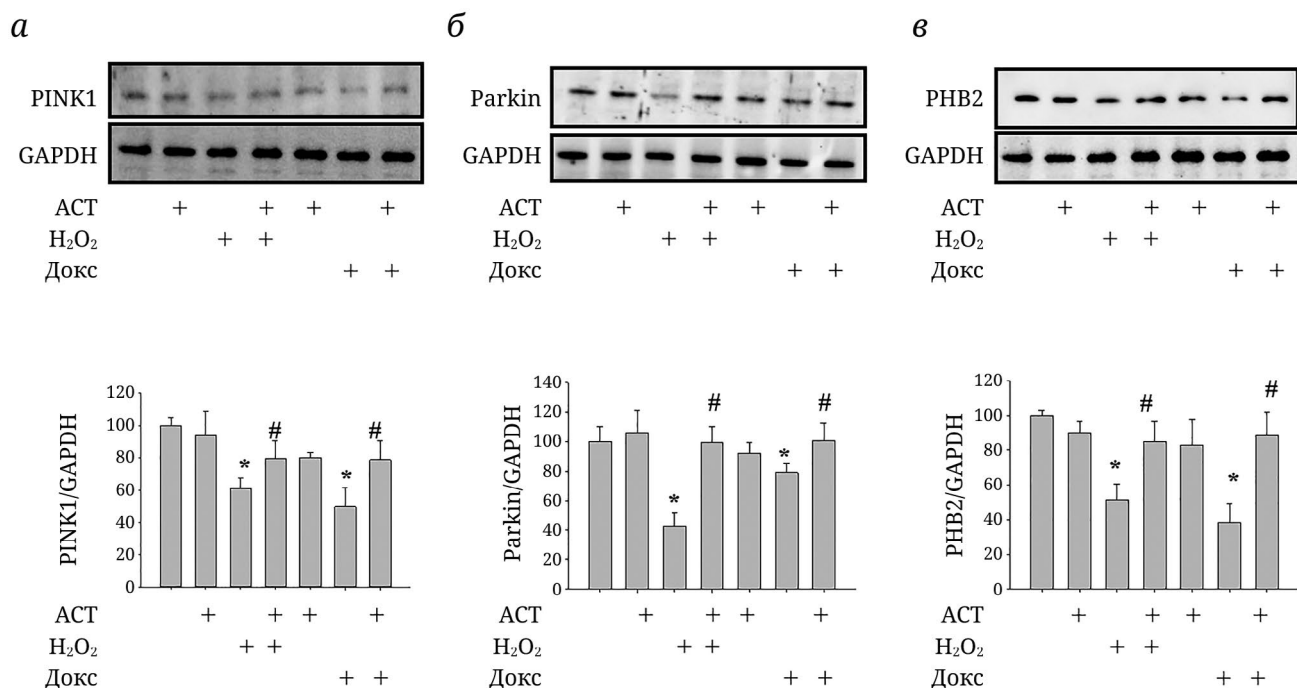


Рис. 6. Влияние АСТ (10 мкМ), H₂O₂ и Докс на изменение содержания PINK1 (а), Parkin (б) и PNH2 (в) в клетках кардиомиоцитов H9c2. Верхняя часть – иммуноокрашивание антителами к PINK1 (а), Parkin (б) и PNH2 (в); GAPDH использовали как контроль белковой нагрузки. Нижняя часть – диаграммы, количественно отражающие изменения содержания белков, нормированных на GAPDH. Уровень белка в клеточном лизате (без добавок) служил контролем (100%). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 4); * *p* < 0,05 – значимое изменение по сравнению с контролем; # *p* < 0,05 – значимое изменение по сравнению с H₂O₂ или Докс

рованной цитотоксичности в клетках кардиомиоцитов H9c2 (рис. 5).

H₂O₂ (25 мкМ; рис. 5, а) и Докс (25 мкМ; рис. 5, б) повышали продукцию АФК на 34 и 50% соответственно по сравнению с контролем (необработанные клетки). Добавление АСТ (5 и 10 мкМ) в этих условиях снижало продукцию АФК на ~26% по сравнению с индукторами (H₂O₂ или Докс) без АСТ. При повышении концентрации индукторов до 50 и 100 мкМ продукция АФК увеличивалась на ~50% и 80% для H₂O₂ и в ~3 и 5 раз для Докс по сравнению с контролем (необработанные клетки). Обработка АСТ (5 и 10 мкМ) уменьшала продукцию АФК на ~35% (при 50 мкМ H₂O₂ и Докс) по сравнению с 50 мкМ индукторами (без АСТ), и на 50% (100 мкМ H₂O₂) и 40% (100 мкМ Докс) по сравнению с 100 мкМ индукторами (без АСТ). АСТ снижал продукцию АФК, тем самым защищая клетки от вредного воздействия АФК.

Исследование влияния АСТ, H₂O₂ и Докс на изменение маркеров митохондриальной функции и проапоптоза в клетках H9c2. Поскольку митохондриальная функция играет важную роль в «контроле качества» митохондрий и выживании клеток [7], мы исследовали изменение содержания маркеров митохондриальной функции, таких как PINK1, Parkin и PNH2, в наших экспериментальных условиях. На рис. 6 показаны вестерн-блоты, окра-

шенные соответствующими антителами к PINK1, Parkin и PNH2, и количественная характеристика денситометрического анализа. Из рис. 6 видно, что H₂O₂ (100 мкМ) снижал содержание PINK1 (а) и Parkin (б) на 40 и 60% соответственно по сравнению с контролем. Аналогичный эффект наблюдался при действии Докс (100 мкМ): содержание PINK1 и Parkin снижалось на 50 и 20% соответственно по сравнению с контролем. АСТ (10 мкМ) не изменял уровень белков относительно контроля, однако при совместном действии с H₂O₂ содержание PINK1 повышалось на 20%, а Parkin на 55% относительно эффекта H₂O₂.

При комбинированном действии АСТ (10 мкМ) и Докс (100 мкМ) уровни PINK1 и Parkin не изменялись по сравнению с контролем и повышались относительно действия Докс (100 мкМ) на 30 и 20% соответственно. PNH2 считается одним из рецепторов митохондриальной функции [12]. Ранее мы предположили, что снижение экспрессии PNH2 в митохондриях сердца и мозга крыс может приводить к нарушению митохондриальной функции [27, 28]. В настоящем исследовании мы проанализировали изменение содержания PNH2 в наших экспериментальных условиях (рис. 6, в). Содержание PNH2 в клетках, инкубированных с АСТ 4 и 6 ч не отличалось от контроля. Добавление H₂O₂ и Докс снижало

уровень PNB2 на 50 и 60% соответственно по сравнению с контролем. При совместном использовании H_2O_2 и Докс с АСТ содержание PNB2 не отличалось от контроля, но повышалось на 40 и 45% соответственно по сравнению с применением H_2O_2 и Докс без АСТ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Окислительный стресс является основной причиной различных заболеваний человека, таких как метаболические синдромы, нейродегенеративные, сердечно-сосудистые, воспалительные заболевания, а также возрастные заболевания. Митохондриальная дисфункция может быть вовлечена в развитие заболеваний, связанных с окислительным стрессом [2, 3, 12]. Поддержание структурной и функциональной целостности митохондрий необходимо для нормальной клеточной функции, поскольку митохондрии играют ключевую роль в энергетическом обмене, а также в поддержании окислительно-восстановительного состояния клеток и регуляции апоптоза. Митохондрии являются основным источником АФК, их дисфункция вызывает окислительный стресс, который приводит клетки в болезненное состояние [4]. В сердце существуют различные механизмы антиоксидантной защиты, однако при увеличении продукции АФК антиоксидантная способность подавляется [5, 6]. Так называемые диетические антиоксиданты способны снижать окислительный стресс, усиливая при этом антиоксидантную систему и, как следствие, защищать от развития сердечно-сосудистых заболеваний [29, 30]. Наибольший интерес для исследований представляет каротиноид астаксантин, который получают из природных источников в виде эфира жирных кислот или конъюгата белков пищевых продуктов [4]. Было показано, что на модели воспалительной преэклампсии *in vitro* АСТ снижал продукцию АФК и повышал $\Delta\Psi_m$. Кроме того, АСТ предотвращал нарушение развития бластоцисты, вызванное тепловым стрессом, за счет увеличения $\Delta\Psi_m$ [31]. Ранее мы показали, что АСТ предотвращал митохондриальную дисфункцию, вызванную изопротеренолом и улучшал функциональное состояние митохондрий сердца и мозга крыс [21–23, 32, 33]. В настоящем исследовании здоровые клетки кардиомиоцитов линии H9c2 подвергались цитотоксическому влиянию препаратов, таких как H_2O_2 и доксорубин, снижая жизнеспособность клеток. Добавление АСТ приводило к повышению жизнеспособности клеток, причем этот эффект зависел не только от концентрации АСТ, которые были достаточно низкими (5 и 10 мкМ), но и от времени инкубации АСТ с клет-

ками (4-часовая с последующим добавлением H_2O_2 и 6-часовая с последующим добавлением Докс). Аналогичные эффекты АСТ наблюдались с другим индуктором цитотоксичности, гомоцистеином, в клетках кардиомиоцитов линии H9c2 [15]. Антиоксидантное защитное действие АСТ было более существенным при низких концентрациях, тогда как высокая концентрация, вероятно, привела бы к противоположному прооксидантному эффекту. Это свойство астаксантина малоизучено.

Известно, что АСТ проявляет противораковые, противовоспалительные, противодиабетические, иммуномодулирующие и нейропротекторные действия, основанные на его антиоксидантной активности [34]. Общепринято, что изменение проницаемости митохондриальной мембраны сопровождается падением митохондриального мембранного потенциала и повышением продукции АФК, что в конечном итоге может привести к гибели клетки. Мы наблюдали, что падение $\Delta\Psi_m$ и повышение внутриклеточной продукции АФК в присутствии H_2O_2 и Докс снижало жизнеспособность клеток кардиомиоцитов H9c2, однако при инкубации клеток с АСТ в этих условиях $\Delta\Psi_m$ восстанавливался, а внутриклеточная продукция АФК снижалась, что способствовало повышению жизнеспособности клеток.

Индукция митофагии, митохондриальная динамика (деление и слияние), модулирование молекулярных механизмов митофагии, направленные на отдельные компоненты клетки, а также взаимодействие с другими способами аутофагии и митохондриальный биогенез образуют сложную взаимодействующую сеть, которая управляет деградацией митохондрий посредством митофагии и, таким образом, воздействует на митохондриальную функцию и клеточную целостность [35]. Одним из важных путей, вовлеченных в регуляцию митофагии, является путь PINK1/Parkin. Известно, что при высоком $\Delta\Psi_m$ PINK1 импортируется в митохондриальный матрикс [36], где расщепляется митохондриальной процессинговой протеиназой (MPP) и пресенилин-ассоциированным ромбовидным белком (PARL) [37]. PINK1 способствует рекрутированию Parkin из цитозоля во внешнюю мембрану в поврежденные митохондрии с целью их удаления [38]. Исследования Billia et al. [39] показали, что нарушение PINK1/Parkin-опосредованной митофагии имеет негативные последствия для сердца. Дефицит PINK1 у мышей приводил к дисфункции сердечных митохондрий и усилению окислительного стресса. В настоящем исследовании при H_2O_2 - и Докс-индуцированной цитотоксичности содержание маркеров митофагии снижалось, что могло приводить к снижению жизнеспособности клеток в этих условиях. Накопление поврежденных митохондрий

в клетках приводило к окислительному стрессу. Обработка клеток АСТ предотвращала падение мембранного потенциала и снижала внутриклеточную продукцию АФК, повышала уровни маркеров и в конечном итоге жизнеспособность клеток кардиомиоцитов повышалась.

Как было сказано выше, белок PNB2 является важным белком, принимающим участие в функционировании клеток и в митохондриях [12]. Кроме того, считается, что PNB2 способствует рекрутированию Parkin в митохондрии [40], однако снижение его содержания в митохондриях может приводить к активации PARL, которая расщепляет PINK1. Дестабилизированный PINK1 блокирует рекрутирование Parkin в митохондрии [40]. В настоящем исследовании в присутствии H₂O₂ и Докс содержание PNB2 снижалось, что могло приводить к нарушению PINK1/Parkin-зависимого пути митохондриальной функции и накоплению дисфункциональных митохондрий. АСТ повышал уровни PNB2 и маркеров митохондриальной функции почти до контрольных значений, что повышало жизнеспособность клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате воздействия на клетку различных препаратов функционирование митохондрий в клетке может улучшаться, увеличивая при этом количество здоровых митохондрий, что может быть многообещающим подходом для устранения различных патологических состояний. В настоящем исследовании было изучено влияние АСТ на жизнеспособность клеток кардиомиоцитов линии H9c2 в присутствии индукторов цитотоксичности H₂O₂ и Докс. Снижение ΔΨ_m и повышение продукции АФК при инкубации клеток с H₂O₂

и Докс предполагает накопление дисфункциональных митохондрий, при этом снижение содержания PNB2 и маркеров митохондриальной функции не приводит к их удалению и снижает жизнеспособность клеток кардиомиоцитов. Добавление АСТ к клеткам повышало ΔΨ_m и уменьшало продукцию АФК, несмотря на присутствие H₂O₂ и Докс. Увеличение уровней PNB2, PINK1 и Parkin в этих условиях, вероятно, способствовало восстановлению процесса митохондриальной функции, что могло привести к удалению дисфункциональных митохондрий и повышению жизнеспособности клеток кардиомиоцитов. Исходя из вышеизложенного и результатов, полученных нами ранее на животной модели, можно заключить, что АСТ можно рассматривать как препарат, применяемый в качестве профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

Вклад авторов. О.В. Крестинина – концепция и руководство работой; Р.Р. Крестинин, М.И. Кобякова, Ю.Л. Бабурина, Л.Д. Сотникова – проведение экспериментов; О.В. Крестинина, Р.Р. Крестинин – обсуждение результатов исследования; Р.Р. Крестинин, М.И. Кобякова, Ю.Л. Бабурина – написание текста; О.В. Крестинина – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-25-00129).

Благодарности. В работе использовали оборудование центра коллективного пользования ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peoples, J. N., Saraf, A., Ghazal, N., Pham, T. T., and Kwong, J. Q. (2019) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease, *Exp. Mol. Med.*, **51**, 1-13, <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0355-7>.
2. Bullon, P., Newman, H. N., and Battino, M. (2014) Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol. 2000*, **64**, 139-153, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00455.x>.
3. Hernandez-Aguilera, A., Rull, A., Rodriguez-Gallego, E., Riera-Borrull, M., Luciano-Mateo, F., Camps, J., Menendez, J. A., and Joven, J. (2013) Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities, *Mediators Inflamm.*, **2013**, 135698, <https://doi.org/10.1155/2013/135698>.
4. Kim, S. H., and Kim, H. (2018) Inhibitory effect of astaxanthin on oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction-a mini-review, *Nutrients*, **10**, <https://doi.org/10.3390/nu10091137>.
5. Griffiths, E. J. (2012) Mitochondria and heart disease, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **942**, 249-267, https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_11.
6. Tsutsui, H., Kinugawa, S., and Matsushima, S. (2008) Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure, *Circ. J.*, **72 Suppl A**, A31-A37, <https://doi.org/10.1253/circj.cj-08-0014>.

7. Li, W., He, P., Huang, Y., Li, Y. F., Lu, J., Li, M., Kurihara, H., Luo, Z., Meng, T., Onishi, M., Ma, C., Jiang, L., Hu, Y., Gong, Q., Zhu, D., Xu, Y., Liu, R., Liu, L., Yi, C., Zhu, Y., Ma, N., Okamoto, K., Xie, Z., Liu, J., He, R.-R., and Feng, D. (2021) Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances, *Theranostics*, **11**, 222-256, <https://doi.org/10.7150/thno.49860>.
8. Ashrafi, G., and Schwarz, T. L. (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria, *Cell Death Differ.*, **20**, 31-42, <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81>.
9. Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R. L., Kim, J., May, J., Tocilescu, M. A., Liu, W., Ko, H. S., Magrane, J., Moore, D. J., Dawson, V. L., Grailhe, R., Dawson, T. M., Li, C., Tieu, K., and Przedborski, S. (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 378-383, <https://doi.org/10.1073/pnas.0911187107>.
10. Chen, M., Chen, Z., Wang, Y., Tan, Z., Zhu, C., Li, Y., Han, Z., Chen, L., Gao, R., Liu, L., and Chen, Q. (2016) Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy, *Autophagy*, **12**, 689-702, <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1151580>.
11. Zhu, Y., Massen, S., Terenzio, M., Lang, V., Chen-Lindner, S., Eils, R., Novak, I., Dikic, I., Hamacher-Brady, A., and Brady, N. R. (2013) Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **288**, 1099-1113, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399345>.
12. Wei, Y., Chiang, W. C., Sumpter, R., Jr., Mishra, P., and Levine, B. (2017) Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor, *Cell*, **168**, 224-238.e210, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.042>.
13. Fassett, R. G., and Coombes, J. S. (2011) Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease, *Mar. Drugs*, **9**, 447-465, <https://doi.org/10.3390/md9030447>.
14. Song, X., Wang, B., Lin, S., Jing, L., Mao, C., Xu, P., Lv, C., Liu, W., and Zuo, J. (2014) Astaxanthin inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells type II *in vivo* and *in vitro* through the ROS-dependent mitochondrial signalling pathway, *J. Cell Mol. Med.*, **18**, 2198-2212, <https://doi.org/10.1111/jcmm.12347>.
15. Fan, C. D., Sun, J. Y., Fu, X. T., Hou, Y. J., Li, Y., Yang, M. F., Fu, X. Y., and Sun, B. L. (2017) Astaxanthin attenuates homocysteine-induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo* by inhibiting mitochondrial dysfunction and oxidative damage, *Front. Physiol.*, **8**, 1041, <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01041>.
16. Liu, X., Shibata, T., Hisaka, S., and Osawa, T. (2009) Astaxanthin inhibits reactive oxygen species-mediated cellular toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitochondria-targeted protective mechanism, *Brain Res.*, **1254**, 18-27, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.076>.
17. Akila, P., Asaikumar, L., and Vennila, L. (2017) Chlorogenic acid ameliorates isoproterenol-induced myocardial injury in rats by stabilizing mitochondrial and lysosomal enzymes, *Biomed. Pharmacother.*, **85**, 582-591, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.067>.
18. Feng, W., and Li, W. (2010) The study of ISO induced heart failure rat model, *Exp. Mol. Pathol.*, **88**, 299-304, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.10.011>.
19. Odinkova, I., Baburina, Y., Kruglov, A., Fadeeva, I., Zvyagina, A., Sotnikova, L., Akatov, V., and Krestinina, O. (2018) Effect of melatonin on rat heart mitochondria in acute heart failure in aged rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, <https://doi.org/10.3390/ijms19061555>.
20. Baburina, Y., Krestinin, R., Odinkova, I., Sotnikova, L., Kruglov, A., and Krestinina, O. (2019) Astaxanthin inhibits mitochondrial permeability transition pore opening in rat heart mitochondria, *Antioxidants (Basel)*, **8**, <https://doi.org/10.3390/antiox8120576>.
21. Krestinin, R., Baburina, Y., Odinkova, I., Kruglov, A., Fadeeva, I., Zvyagina, A., Sotnikova, L., and Krestinina, O. (2020) Isoproterenol-induced permeability transition pore-related dysfunction of heart mitochondria is attenuated by astaxanthin, *Biomedicines*, **8**, 437, <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100437>.
22. Krestinina, O., Baburina, Y., and Krestinin, R. (2021) Mitochondrion as a target of astaxanthin therapy in heart failure, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22157964>.
23. Krestinina, O., Baburina, Y., Krestinin, R., Odinkova, I., Fadeeva, I., and Sotnikova, L. (2020) Astaxanthin prevents mitochondrial impairment induced by isoproterenol in isolated rat heart mitochondria, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 262, <https://doi.org/10.3390/antiox9030262>.
24. Kim, D. E., Kim, B., Shin, H. S., Kwon, H. J., and Park, E. S. (2014) The protective effect of hispidin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through Akt/GSK-3 β and ERK1/2 signaling pathway, *Exp. Cell Res.*, **327**, 264-275, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.037>.
25. Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., and Moreira, P. I. (2009) Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect, *Curr. Med. Chem.*, **16**, 3267-3285, <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>.
26. Kruger, N. J. (1994) The Bradford method for protein quantitation, *Methods Mol. Biol.*, **32**, 9-15, <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:9>.

27. Baburina, Y., Krestinin, R., Fedorov, D., Odinkova, I., Pershina, E., Sotnikova, L., and Krestinina, O. (2022) The improvement of functional state of brain mitochondria with astaxanthin in rats after heart failure, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, <https://doi.org/10.3390/ijms24010031>.
28. Крестинин Р. Р., Бабурина Ю. Л., Одинокова И. В., Сотникова Л. Д., Крестинина О. В. (2024) Астаксантин предотвращает дисрегуляцию митохондриальной динамики в митохондриях мозга крыс, индуцированную изопротеренолом, *Биофизика*, **69**, 90-102.
29. Carpenter, K. L., Kirkpatrick, P. J., Weissberg, P. L., Challis, I. R., Dennis, I. F., Freeman, M. A., and Mitchinson, M. J. (2003) Oral alpha-tocopherol supplementation inhibits lipid oxidation in established human atherosclerotic lesions, *Free Radic Res.*, **37**, 1235-1244, <https://doi.org/10.1080/10715760310001604143>.
30. Ellingsen, I., Seljeflot, I., Arnesen, H., and Tonstad, S. (2009) Vitamin C consumption is associated with less progression in carotid intima media thickness in elderly men: a 3-year intervention study, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **19**, 8-14, <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2008.01.006>.
31. Xuan, R. R., Niu, T. T., and Chen, H. M. (2016) Astaxanthin blocks preeclampsia progression by suppressing oxidative stress and inflammation, *Mol. Med. Rep.*, **14**, 2697-2704, <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5569>.
32. Krestinin, R., Baburina, Y., Odinkova, I., Kruglov, A., Sotnikova, L., and Krestinina, O. (2023) The effect of astaxanthin on mitochondrial dynamics in rat heart mitochondria under iso-induced injury, *Antioxidants (Basel)*, **12**, <https://doi.org/10.3390/antiox12061247>.
33. Krestinina, O., Odinkova, I., Sotnikova, L., Krestinin, R., Zvyagina, A., and Baburina, Y. (2022) Astaxanthin is able to prevent alcohol-induced dysfunction of liver mitochondria, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 2019, <https://doi.org/10.3390/antiox11102019>.
34. Abdelzaher, L. A., Imaizumi, T., Suzuki, T., Tomita, K., Takashina, M., and Hattori, Y. (2016) Astaxanthin alleviates oxidative stress insults-related derangements in human vascular endothelial cells exposed to glucose fluctuations, *Life Sci.*, **150**, 24-31, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.087>.
35. Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R. (2014) Mitophagy: An Overview, in *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, Academic Press, pp. 103-116.
36. Lazarou, M., Jin, S. M., Kane, L. A., and Youle, R. J. (2012) Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin, *Dev. Cell*, **22**, 320-333, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.014>.
37. Jin, S. M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L. A., Narendra, D. P., and Youle, R. J. (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL, *J. Cell Biol.*, **191**, 933-942, <https://doi.org/10.1083/jcb.201008084>.
38. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., and Youle, R. J. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy, *J. Cell Biol.*, **183**, 795-803, <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>.
39. Billia, F., Hauck, L., Konecny, F., Rao, V., Shen, J., and Mak, T. W. (2011) PTEN-inducible kinase 1 (PINK1)/Park6 is indispensable for normal heart function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9572-9577, <https://doi.org/10.1073/pnas.1106291108>.
40. Yan, C., Gong, L., Chen, L., Xu, M., Abou-Hamdan, H., Tang, M., Desaubry, L., and Song, Z. (2020) PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis, *Autophagy*, **16**, 419-434, <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1628520>.

ASTAXANTHIN REDUCES H₂O₂- AND DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY IN H9c2 CARDIOMYOCYTE CELLS

**R. R. Krestinin, M. I. Kobayakova, Yu. L. Baburina,
L. D. Sotnikova, and O. V. Krestinina***

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: ovkres@mail.ru*

Cardiovascular diseases are one of the most challenging problems in clinical practice. Astaxanthin (AST) is a keto-carotenoid (xanthophyll) mainly of marine origin, which is able to penetrate the cell membrane, localize in the mitochondria and prevent mitochondrial dysfunction. The present study examined the effect of astaxanthin on the death of H9c2 cardiomyocytes caused by the cytotoxic effect of hydrogen peroxide (H₂O₂) and doxorubicin. Using the methods of spectrophotometry,

spectrofluorimetry, and Western blotting analysis, it was shown that treatment of cells with AST contributed to an increase in the number of H9c2 cells resistant to H_2O_2 and doxorubicin, while maintaining the value of their mitochondrial transmembrane potential, reducing the intracellular production of reactive oxygen species and an increase in the intracellular content of mitophagy markers PINK1, Parkin and prohibitin 2. The obtained results suggest that the use of AST may be a highly effective way to prevent and treat cardiovascular diseases.

Keywords: astaxanthin, cardiomyocytes, cytotoxicity, mitochondrial dysfunction, mitophagy

НАКОПЛЕНИЕ ИОНОВ Li^+ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПУПОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА (HUVES), ОБРАБОТАННЫХ LiCl , ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *MYC*

© 2024 О.Е. Квитко*, Д.А. Федоров*, С.В. Сидоренко,
О.Д. Лопина, Е.А. Климанова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биохимии,
119234 Москва, Россия; электронная почта: klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.08.2024

После доработки 26.09.2024

Принята к публикации 30.09.2024

Показано, что изменение внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ приводит к изменению экспрессии генов. Другой одновалентный катион, Li^+ , хорошо известен как компонент лекарственных препаратов, используемых для лечения психических расстройств, но механизм его действия неясен. Таким образом, важно оценить влияние Li^+ на экспрессию генов в эндотелиальных клетках. В данной работе мы изучили влияние повышенной внутриклеточной концентрации Na^+ или Li^+ на транскрипцию Na^+/K^+ -чувствительных генов. Инкубация эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) в присутствии LiCl в течение 1,5 ч приводила к накоплению Li^+ в клетках. Это вызывало увеличение уровня мРНК *FOS* и *EGR1* и снижение уровня мРНК *JUN* и *MYC*. Обработка HUVES монензином обеспечивала накопление Na^+ и потерю ионов K^+ этими клетками. При этом Na^+ -ионофор монензин не оказывал существенного влияния на экспрессию генов. Инкубация HUVES в среде с повышенной внеклеточной концентрацией NaCl приводила к увеличению внутриклеточного содержания K^+ и транскрипции *ATF3* и снижению транскрипции *JUN*. Эти результаты наглядно показывают, что Na^+ и Li^+ по-разному влияют на профиль экспрессии исследуемых генов, что, по-видимому, связано с различным действием на соотношение одновалентных катионов во внутриклеточном пространстве.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: литий, натрий, Na^+/K^+ -чувствительные гены, монензин, эндотелиальные клетки.

DOI: 10.31857/S0320972524100091 EDN: IOYVJO

ВВЕДЕНИЕ

Клетки животных строго поддерживают градиент одновалентных катионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану, в основном за счёт активности Na,K-ATPазы . Этот градиент имеет решающее значение для регуляции клеточных функций, таких как поддержание объёма клетки и внутриклеточного pH, вторичный транспорт ионов и метаболитов, формирование мембранного потенциала, активность ферментов и процессы трансляции [1]. Однако при некоторых физиологических и патологических состояниях

наблюдаются изменения внутриклеточной концентрации этих катионов, которые влияют на экспрессию генов [2]. К числу таких генов принадлежат так называемые Na^+/K^+ -чувствительные гены, экспрессия которых изменяется в ответ на изменение концентрации одновалентных катионов независимо от ионов Ca^{2+} . К ним относятся гены, кодирующие различные транскрипционные (*FOS*, *JUN*, *EGR1*, *ATF3* и др.) и провоспалительные (*IL6* и *PTGS2*) факторы [3]. Было обнаружено, что количество и уровень экспрессии дифференциально экспрессируемых генов напрямую связаны с величиной соотношения Na^+/K^+ [4]. В связи с этим возникает вопрос о существовании внутриклеточного молекулярного сенсора одновалентных катионов. Одним из возможных механизмов влияния одновалентных катионов на экспрессию генов является формирование G-квадруплексов и изменение их конформации в результате взаимо-

Принятые сокращения: HUVES – эндотелиальные клетки пупочной вены человека.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

действия с ионами металлов [5, 6]. G-Квадруплексы – это неканонические вторичные структуры, образующиеся в гуанин-богатых областях нуклеиновых кислот [7]. G-Квадруплексы связывают одновалентные катионы, причём способность катионов различных металлов стабилизировать G-квадруплексы уменьшается в порядке $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ [8]. Классическим примером гена, транскрипция которого контролируется G-квадруплексом в промоторной области, является ген транскрипционного фактора с-Мус [9]. Кроме того, наличие G-квадруплексов предсказано в промоторах генов *FOS* [10], *JUN*, *EGR1* [7]. До сих пор препараты, содержащие ионы Li^+ , являются одними из основных фармакологических средств, используемых в лечении психических расстройств. Попадая в плазму крови, они в первую очередь влияют на метаболизм эндотелиальных клеток [11]. В данном исследовании была изучена взаимосвязь между влиянием ионов Na^+ и Li^+ на транскрипцию генов *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *ATF3*, *MYC*, *PTGS2* и изменением внутриклеточного содержания одновалентных катионов в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVES).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Первичная культура HUVES и среда для выращивания эндотелиальных клеток были приобретены у компании «Cell Applications» (Калифорния, Сан-Диего, США), среды DMEM и F12, L-глутамин – у «ПанЭко» (Россия). Монензин, FBS, LiCl и Trizol были приобретены у «Thermo Fisher Scientific» (США), NaCl и KCl – у «MP Biomedicals» (США), ТХУ (трихлоруксусная кислота) – у «Диа-М» (Россия), MgCl_2 – у «Honeywell Fluka» (Германия). Планшеты, культуральные флаконы и серологические пипетки были приобретены у компании «Corning» (США). Набор ZymoResearch Quick-RNA Microprep был получен от «ZymoResearch» (США), набор ImProm-IITM Reverse Transcription System – от «Promega» (США), набор R-402 для ПЦР с Taq-полимеразой в присутствии красителя SYBR Green I – от «Синтол» (Россия).

Методы. Культура клеток. HUVES, культивировавшиеся менее 3 пассажей, были получены от компании «Cell Applications» (#200-05n). Клетки высевали с плотностью $\sim 6 \times 10^4$ клеток на лунку в 6-луночные планшеты, содержащие среду для роста эндотелиальных клеток (#211-500, «Cell Applications»), и выдерживали при 37°C в увлажнённой атмосфере с 5% CO_2 . Через 3–5 дней после посева клетки достигали 80–90%-ной конфлюэнтности, после чего их повторно культивировали в среде DMEM:F12, содержащей 0,2% FBS, 4 mM L-глутамин и стрептомицин-пенициллин,

в течение 6 ч. После этого клетки инкубировали в аналогичной среде с добавлением 40 mM NaCl , 40 mM LiCl или 0,5–2 мкг/мл монензина в течение 1,5 ч.

Измерение внутриклеточного содержания Na^+ , Li^+ , K^+ . Подготовку образцов проводили на льду. Лунки планшетов трижды промывали холодным раствором 0,1 M MgCl_2 . После этого в лунки добавляли 5%-ный раствор ТХУ и инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ в течение 1–2 ч. Полученные преципитаты центрифугировали при 18 000 g в течение 40 мин. Супернатант собирали в отдельные пробирки и использовали для измерения внутриклеточного содержания Na^+ , Li^+ и K^+ методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре «Квант-2м1» («Кортек», Россия) в пропано-воздушной смеси в соответствии с инструкцией. Для калибровки использовали растворы KCl (0,5–4 мг/л K^+), LiCl (0,25–4 мг/л Li^+) и NaCl (0,5–2 мг/л Na^+) в 5%-ном растворе ТХУ. Осадки растворяли в 0,1 M NaOH , содержащем 0,1% дезокси-холата натрия, концентрацию белка определяли методом Лоури [12]. Содержание внутриклеточных ионов нормировали на общее содержание белка в образце.

Выделение РНК и обратная транскрипция.

Выделение РНК проводили с помощью набора ZymoResearch Quick-RNA Microprep. Лунки промывали ледяным раствором 0,1 M MgCl_2 , затем добавляли 400 мкл реагента Trizol. Водную фазу, содержащую тотальную РНК, выделяли из полученных лизатов с помощью хлороформа и 96%-ного этанола. Дальнейшую очистку РНК и обработку ДНК проводили на колонках Quick-RNA Microprep Kit в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию РНК в полученных элюатах определяли с помощью прибора NanoVue («VWR International», США) при длине волны 260 нм, а чистоту препаратов оценивали по соотношению A_{260}/A_{280} . Обратную транскрипцию проводили с помощью набора ImProm-IITM Reverse Transcription System в соответствии с инструкциями производителя.

ПЦР в реальном времени. Комплементарную ДНК (кДНК), синтезированную методом обратной транскрипции, использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 («BioRad», США). Изолированную РНК, не подвергавшуюся обратной транскрипции, использовали в качестве отрицательного контроля. Для контроля загрязнения реагентов использовали реакционную смесь, содержащую воду в объёме, равном объёму добавленной кДНК. Образцы содержали прямой и обратный праймеры («Синтол») в концентрации 200 нМ и кДНК в количестве 60 нг. ПЦР проводили по протоколу, описанному ранее [13]. Уровень экспрессии исследуемых генов оценивали методом $\Delta\Delta\text{Ct}$ [14], используя RPS18

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Символ гена	Название гена	Размер ПЦР-продукта, п.о.	Номер мРНК-последовательности в базе данных GenBank	Последовательности праймеров
<i>RPS18</i>	Ribosomal protein S18	205	NM_022551.3	F: 5'-ATTAAGGGTGTGGGCCGAAG-3' R: 5'-TGGCTAGGACCTGGCTGTAT-3'
<i>FOS</i>	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	154	NM_005252.4	F: 5'-GCAAGGTGGAACAGTTATCTC-3' R: 5'-GCAGACTTCTCATCTTCTAGTTG-3'
<i>EGR1</i>	Early growth response factor 1	291	NM_001964.3	F: 5'-CAGTGCCATCCAACGACAG-3' R: 5'-ACAGAGGGGTAGCGAAGG-3'
<i>JUN</i>	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	109	NM_002228.4	F: 5'-GGCTACAGTAACCCCAAGATCC-3' R: 5'-AGGTGAGGAGGTCCGAGTTC-3'
<i>ATF3</i>	Activating transcription factor 3	119	NM_001674.4	F: 5'-GAGGCGACGAGAAAGAAATAAG-3' R: 5'-CCTTCAGTTCAGCATTCACAC-3'
<i>MYC</i>	Myc proto-oncogene, bHLH transcription factor	264	NM_002467.6	F: 5'-GATTCTCTGCTCTCCTCGACG-3' R: 5'-GTTGTGCTGATGTGTGGAGAC-3'
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	156	NM_000963.4	F: 5'-GTATGTATGAGTGTGGGATTGAC-3' R: 5'-CTTGAAGTGGGTAAGTATGTAGTG-3'

в качестве референсного гена. Последовательности праймеров, использованных в работе, представлены в табл. 1.

Статистический анализ данных проводили с помощью Microsoft Excel и GraphPad Prism 9. Нормальность распределения данных проверяли с помощью теста Шапиро–Уилка. Сравнение выборок проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса и одностороннего ANOVA. Различия принимали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все данные представлены как среднее $\pm$ SE, объём выборки составлял 4–6 биологических повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для сравнения влияния ионов Li^+ и Na^+ на транскрипцию генов *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *ATF3*, *MYC* и *PTGS2* в HUVEC клетки инкубировали в среде, содержащей LiCl , или в контрольной среде, содержащей Na^+ -ионофор монензин. Для контроля осмолярности внеклеточной среды использовали NaCl в концентрации, эквивалентной LiCl .

На рис. 1, а, б показано, что инкубация HUVEC в присутствии 40 мМ внеклеточного LiCl в течение

1,5 ч не влияла на внутриклеточное содержание ионов Na^+ и K^+ , но приводила к внутриклеточному накоплению 230 нмоль Li^+ /мг белка (рис. 1, в). Добавление 40 мМ Na^+ во внеклеточную среду практически не влияло на содержание Na^+ (рис. 1, а), но увеличивало содержание K^+ внутри клеток на ~ 400 нмоль/мг белка (рис. 1, б) за счёт активации Na,K-ATPазы , как мы показали ранее [13]. Обработка клеток 1,2 мкг/мл монензина в течение 1,5 ч обеспечивала общее изменение внутриклеточного содержания одновалентных катионов (рис. 1, а, б), сопоставимое с тем, которое вызывала инкубация клеток в присутствии ионов Li^+ (рис. 1, в). Однако в этом случае наблюдалось увеличение содержания Na^+ на 300 нмоль/мг белка и уменьшение содержания K^+ на 261 нмоль/мг белка внутри клеток. Потеря K^+ , скорее всего, происходит за счёт активации K^+, Cl^- -котранспортёров (KCC) и/или K^+ -каналов, возникающей вследствие набухания клеток, опосредованного внутриклеточным накоплением Na^+ [15, 16]. Предварительно мы убедились, что зависимость содержания внутриклеточного Na^+ от концентрации монензина носит линейный характер (рис. 2). Эти результаты согласуются с увеличением внутрикле-

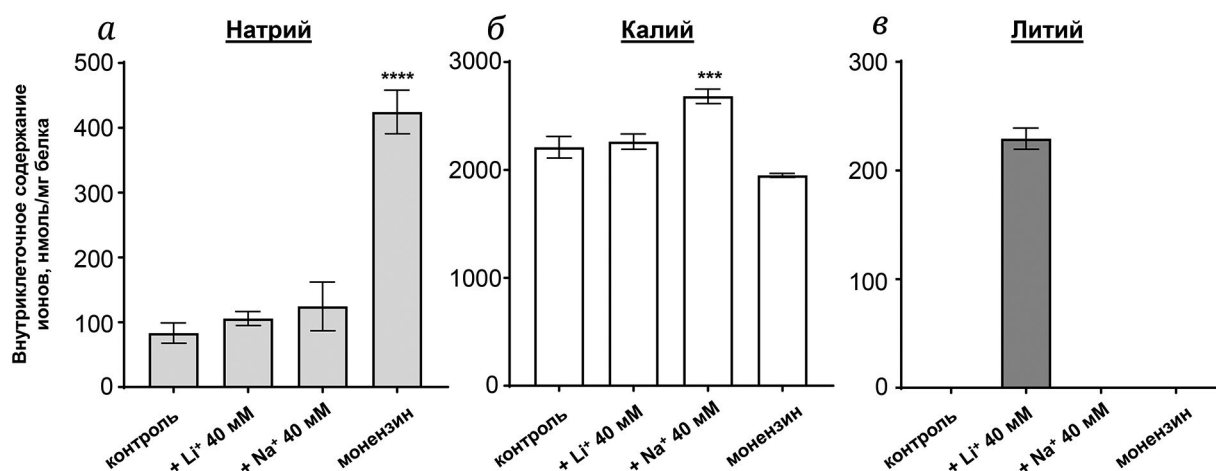


Рис. 1. Влияние 40 мМ LiCl , 40 мМ NaCl и 1,2 мкг/мл монензина, добавленных в культуральную среду, на внутриклеточное содержание ионов Na^+ (а), K^+ (б) и Li^+ (в) в HUVEC. Клетки инкубировали в экспериментальных условиях в течение 1,5 ч. Значения представлены как среднее $\pm$ SE ($n = 4-6$). Значимые различия рассчитывали с помощью одностороннего ANOVA; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

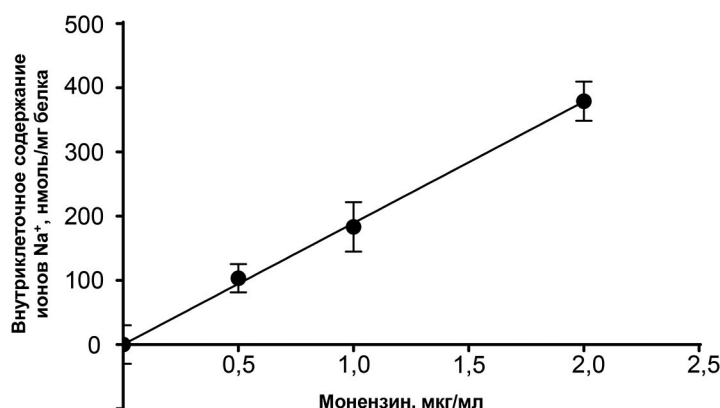


Рис. 2. Зависимость внутриклеточного содержания Na^+ в HUVEC от концентрации монензина в культуральной среде. Клетки инкубировали в среде, содержащей монензин, в течение 1,5 ч. Значения представлены как среднее $\pm$ SE ($n = 4-6$)

точного содержания Na^+ , наблюдаемым в клетках HeLa, обработанных 1 мкг/мл монензина в течение 6 ч [17]. Учитывая, что дисбаланс одновалентных катионов способствует экспрессии генов в HUVEC Ca^{2+} -независимым образом [3], мы изучили влияние ионов Na^+ и Li^+ на экспрессию некоторых Na^+/K^+ -чувствительных генов. На рис. 3, а-г показано, что накопление Li^+ в клетках приводило к увеличению транскрипции генов раннего ответа *FOS* и *EGR1* в 15 и 8 раз соответственно и снижению транскрипции *JUN* и *MYC* в 3 раза. Уровень экспрессии *A F3* и *PTGS2* существенно не изменялся (рис. 3, д, е). Эти данные в основном согласуются с ранее опубликованными результатами. Во-первых, было показано, что 24-часовая инкубация клеток лейкемии человека NB4 в присутствии 20 мМ LiCl снижала уровень белка с-Мус в 2 раза [18]. Во-вторых, лечение литием здоровых мужчин в течение 2 недель приводило к накоплению Li^+ в крови до $0,73 \pm 0,27$ мМ.

Это вызывало увеличение транскрипции *FOS* в 1,8 раза и снижение транскрипции *JUN* в 2 раза в лейкоцитах [19]. В-третьих, обработка клеток нейробластомы SH-SY5Y 20 мМ Li^+ приводила к увеличению транскрипции *EGR1* [20]. В-четвертых, лечение литием пациентов с биполярным расстройством не изменяло экспрессию *ATF3* в их моноцитах [21], тогда как инкубация хондроцитов человека T/C28a в присутствии 20 мМ LiCl в течение 5 ч приводила к увеличению уровня мРНК *PTGS2* в 3-4 раза [22], что не согласуется с нашими результатами. Возможно, это объясняется тем, что обработка эндотелиальных клеток Li^+ в течение 1,5 ч недостаточна для увеличения экспрессии *PTGS2*, и этот эффект проявится при более длительной инкубации.

Увеличение содержания внеклеточного Na^+ на 40 мМ приводило к двукратному снижению уровня мРНК *JUN* (рис. 3, в) и трёхкратному увеличению транскрипции *ATF3* (рис. 3, е), не влияя

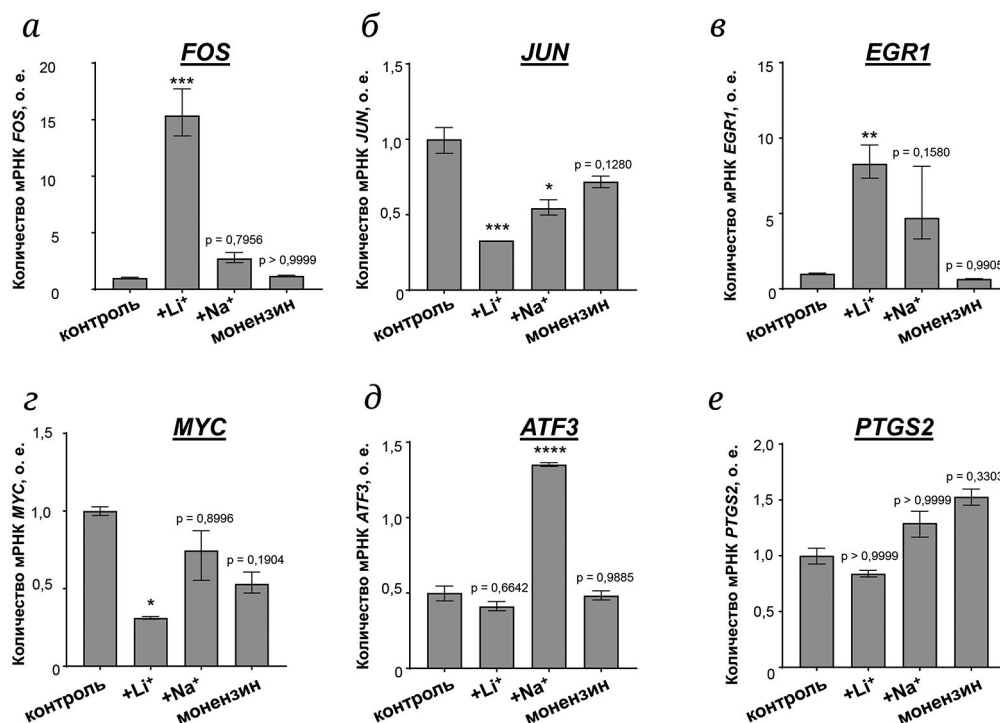


Рис. 3. Влияние 40 mM LiCl, 40 mM NaCl и 1,2 мкг/мл монензина, добавленных в культуральную среду, на содержание мРНК генов *FOS* (а), *JUN* (б), *EGR1* (в), *MYC* (з), *ATF3* (д), *PTGS2* (е) в HUVEC. Клетки инкубировали в экспериментальных условиях в течение 1,5 ч. Значения представлены как среднее ± SE (n = 5). Значимые различия рассчитывали с помощью одностороннего ANOVA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

на транскрипцию других исследуемых генов. Это согласуется с полученными нами ранее данными о том, что увеличение концентрации внеклеточного Na⁺ усиливает экспрессию *ATF3* как на уровне мРНК, так и на уровне белка в HUVEC [23]. Увеличение внутриклеточного содержания Na⁺ при инкубации клеток в присутствии монензина не оказало существенного влияния на экспрессию исследуемых генов (рис. 3). Этот результат оказался неожиданным, поскольку ранее было показано увеличение экспрессии *FOS* на уровне белка в клетках HeLa, обработанных 1 мкг/мл монензина в течение 6 ч, что сопровождалось внутриклеточным дисбалансом одновалентных катионов [17]. С другой стороны, подобный эффект не был обнаружен в аналогичных экспериментах с использованием гладкомышечных клеток из аорты крысы [24]. Однако здесь необходимо учитывать различия в паттернах экспрессии генов, инициируемых диссипацией градиента одновалентных катионов в клетках грызунов и негрызунов [25]. Несмотря на то что в клетках, обработанных монензином, содержание Na⁺ было в 4 раза выше по сравнению с контрольными образцами, мы не обнаружили изменений в экспрессии Na⁺/K⁺-чувствительных генов. Если принять во внимание гипотезу о том, что G-квадруплексы участвуют в регуляции экспрессии таких генов, то отсутствие эффекта монензина на этот параметр можно объ-

яснить стабилизирующим действием ионов K⁺, содержание которых в присутствии монензина существенно не менялось (рис. 1, б).

Влияние ионов Li⁺ на экспрессию генов было описано достаточно давно [26], однако точные механизмы этого явления до сих пор мало изучены. В этой связи рассматриваются различные сигнальные пути в клетке, включая cAMP- [27], Wnt/β-катенин- [28], PI3K/Akt-зависимый сигнальные пути [29]. Мы, в свою очередь, предлагаем рассмотреть эту проблему в контексте прямого воздействия одновалентных катионов на G-квадруплексы. Способность ионов Li⁺ увеличивать экспрессию генов посредством дестабилизации G-квадруплексов подтверждается тем, что его положительное влияние на транскрипцию *KIT* аналогично действию синтетических олигонуклеотидов, препятствующих сборке G-квадруплексов [30]. Часто предполагается, что дестабилизация G-квадруплексов должна приводить к увеличению экспрессии генов. Однако следует иметь в виду, что сами G-квадруплексы, помимо создания стерических препятствий для РНК-полимеразы, могут служить участками для взаимодействия с белками, регулирующими транскрипцию генов. В частности, показано, что мутации G-квадруплекса в промоторе *MYC*, нарушающие его формирование, приводят к уменьшению экспрессии *MYC* как на уровне транскрипции, так и на

уровне трансляции. Изменённые последовательности, не образующие G-квадруплексы, значительно слабее взаимодействовали с РНК-полимеразой и транскрипционными факторами. Кроме того, эти мутации приводили к освобождению участка для посадки нуклеосомы, затрудняющей ход транскрипции [31]. Таким образом, дестабилизация и/или изменение типа этих структур может повлиять на взаимодействие ДНК с белками или другими удалёнными регуляторными элементами генома [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что ионы Li⁺ и Na⁺ изменяют экспрессию факторов транскрипции *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *MYC* и *ATF3*, причём влияние этих ионов различно. Это явление может быть связано с G-квадруплексами, расположенными в промоторах исследуемых генов. Возможно, изменения конформации G-квадруплексов, опосредованные одновалентными катионами, приводят к последующим изменениям транскрипции этих генов. Различия во влиянии ионов Na⁺ и Li⁺ на профиль экспрессии исследуемых генов, вероятно, связаны

с различной чувствительностью разных G-квадруплексов к этим катионам. Однако эта гипотеза требует дальнейшей экспериментальной проверки. Кроме того, необходимо выяснить, каким должно быть минимальное значение внутриклеточного соотношения Na⁺/K⁺, так называемый «натрий-калиевый переключатель» [33], обеспечивающее Na⁺/K⁺-чувствительные изменения экспрессии генов.

Вклад авторов. Е.А. Климанова – концепция и руководство работой; О.Е. Квитко, Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко – проведение экспериментов; О.Е. Квитко, Д.А. Федоров, Е.А. Климанова – обсуждение результатов исследования; О.Е. Квитко, Д.А. Федоров – написание текста; О.Д. Лопина – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10009).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skou, J. C., and Esmann, M. (1992) The Na,K-ATPase, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 249-261, <https://doi.org/10.1007/BF00768846>.
2. Pollack, L. R., Tate, E. H., and Cook, J. S. (1981) Turnover and regulation of Na-K-ATPase in HeLa cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **241**, C173-C183, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1981.241.5.C173>.
3. Koltsova, S. V., Trushina, Y., Haloui, M., Akimova, O. A., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2012) Ubiquitous Na⁺/K⁺-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca²⁺-independent excitation-transcription coupling, *PLoS One*, **7**, e38032, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038032>.
4. Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., Smolyaninova, L. V., Kapilevich, L. V., Gusakova, S. V., Lopina, O. D., and Orlov, S. N. (2019) Ubiquitous and cell type-specific transcriptomic changes triggered by dissipation of monovalent cation gradients in rodent cells: physiological and pathophysiological implications, *Curr. Top. Membr.*, **83**, 107-149, <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2019.01.006>.
5. Beniaminov, A., Shchyolkina, A., and Kaluzhny, D. (2019) Conformational features of intramolecular G4-DNA constrained by single-nucleotide loops, *Biochimie*, **160**, 122-128, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.02.013>.
6. Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., and Neidle, S. (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5402-5415, <https://doi.org/10.1093/nar/gkl655>.
7. Papp, C., Mukundan, V. T., Jenjaroenpun, P., Winnerdy, F. R., Ow, G. S., Phan, A. T., and Kuznetsov, V. A. (2023) Stable bulged G-quadruplexes in the human genome: identification, experimental validation and functionalization, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 4148-4177, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad252>.
8. Venczel, E. A., and Sen, D. (1993) Parallel and antiparallel G-DNA structures from a complex telomeric sequence, *Biochemistry*, **32**, 6220-6228, <https://doi.org/10.1021/bi00075a015>.
9. Yang, D., and Hurley, L. H. (2006) Structure of the biologically relevant G-quadruplex in the c-MYC promoter, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **25**, 951-968, <https://doi.org/10.1080/15257770600809913>.
10. Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., Abramicheva, P. A., Tverskoi, A. M., Orlov, S. N., and Lopina, O. D. (2020) Transcriptomic changes in endothelial cells triggered by Na,K-ATPase inhibition: a search for upstream Na⁺/K⁺-sensitive genes, *IJMS*, **21**, 7992, <https://doi.org/10.3390/ijms21217992>.
11. Volkmann, C., Bschor, T., and Köhler, S. (2020) Lithium treatment over the lifespan in bipolar disorders, *Front. Psychiatry*, **11**, 377, <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.00377>.

12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
13. Fedorov, D. A., Sidorenko, S. V., Yusipovich, A. I., Parshina, E. Y., Tverskoi, A. M., Abramicheva, P. A., Maksimov, G. V., Orlov, S. N., Lopina, O. D., and Klimanova, E. A. (2021) Na^+/K^+ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl, *Heliyon*, **7**, e08088, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08088>.
14. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method, *Methods*, **25**, 402-408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
15. Chew, T. A., Zhang, J., and Feng, L. (2021) High-resolution views and transport mechanisms of the NKCC1 and KCC transporters, *J. Mol. Biol.*, **433**, 167056, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167056>.
16. Lang, F. (2007) Mechanisms and significance of cell volume regulation, *J. Am. College Nutr.*, **26**, 613S-623S, <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719667>.
17. Haloui, M., Taurin, S., Akimova, O. A., Guo, D.-F., Tremblay, J., Dulin, N. O., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2007) Na^+ -induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 5'-promoter containing known transcriptional elements, *FEBS J.*, **274**, 3557-3567, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05885.x>.
18. Li, L., Song, H., Zhong, L., Yang, R., Yang, X.-Q., Jiang, K.-L., and Liu, B.-Z. (2015) Lithium chloride promotes apoptosis in human leukemia NB4 cells by inhibiting glycogen synthase kinase-3 beta, *Int. J. Med. Sci.*, **12**, 805-810, <https://doi.org/10.7150/ijms.12429>.
19. Watanabe, S., Iga, J., Nishi, A., Numata, S., Kinoshita, M., Kikuchi, K., Nakataki, M., and Ohmori, T. (2014) Microarray analysis of global gene expression in leukocytes following lithium treatment, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, **29**, 190-198, <https://doi.org/10.1002/hup.2381>.
20. Kim, S. H., Yu, H. S., Park, H. G., Ahn, Y. M., Kim, Y. S., Lee, Y. H., Ha, K., and Shin, S. Y. (2013) Egr1 regulates lithium-induced transcription of the *Period 2 (PER2)* gene, *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 1969-1979, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.06.010>.
21. Haarman, B. (Benno) C., Riemersma-Van der Lek, R. F., Burger, H., Netkova, M., Drexhage, R. C., Bootsman, F., Mesman, E., Hillegers, M. H., Spijker, A. T., Hoencamp, E., Drexhage, H. A., and Nolen, W. A. (2014) Relationship between clinical features and inflammation-related monocyte gene expression in bipolar disorder – towards a better understanding of psychoimmunological interactions, *Bipolar Disord.*, **16**, 137-150, <https://doi.org/10.1111/bdi.12142>.
22. Zhang, W. V., Jüllig, M., Connolly, A. R., and Stott, N. S. (2005) Early gene response in lithium chloride induced apoptosis, *Apoptosis*, **10**, 75-90, <https://doi.org/10.1007/s10495-005-6063-x>.
23. Fedorov, D. A., Sidorenko, S. V., Yusipovich, A. I., Bukach, O. V., Gorbunov, A. M., Lopina, O. D., and Klimanova, E. A. (2022) Increased extracellular sodium concentration as a factor regulating gene expression in endothelium, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 489-499, <https://doi.org/10.1134/S0006297922060013>.
24. Taurin, S., Dulin, N. O., Pchejetski, D., Grygorczyk, R., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2002) c-Fos Expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism, *J. Physiol.*, **543**, 835-847, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.023259>.
25. Lopina, O. D., Tverskoi, A. M., Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., and Orlov, S. N. (2020) Ouabain-induced cell death and survival. Role of $\alpha 1\text{-Na,K-ATPase}$ -mediated signaling and Na^+/K^+ -dependent gene expression, *Front. Physiol.*, **11**, <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01060>.
26. Villegas-Vázquez, E. Y., Quintas-Granados, L. I., Cortés, H., González-Del Carmen, M., Leyva-Gómez, G., Rodríguez-Morales, M., Bustamante-Montes, L. P., Silva-Adaya, D., Pérez-Plasencia, C., Jacobo-Herrera, N., Reyes-Hernández, O. D., and Figueroa-González, G. (2023) Lithium: a promising anticancer agent, *Life*, **13**, 537, <https://doi.org/10.3390/life13020537>.
27. Masana, M. I., Bitran, J. A., Hsiao, J. K., and Potter, W. Z. (1992) *In vivo* evidence that lithium inactivates G_i modulation of adenylate cyclase in brain, *J. Neurochem.*, **59**, 200-205, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08891.x>.
28. Rao, A. S., Kremenevskaja, N., Resch, J., and Brabant, G. (2005) Lithium stimulates proliferation in cultured thymocytes by activating Wnt/ β -catenin signalling, *Eur. J. Endocrinol.*, **153**, 929-938, <https://doi.org/10.1530/eje.1.02038>.
29. Zeng, Z., Wang, H., Shang, F., Zhou, L., Little, P. J., Quirion, R., and Zheng, W. (2016) Lithium ions attenuate serum-deprivation-induced apoptosis in PC12 cells through regulation of the Akt/FoxO1 signaling pathways, *Psychopharmacology*, **233**, 785-794, <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4168-7>.
30. Chowdhury, S., Wang, J., Nuccio, S. P., Mao, H., and Di Antonio, M. (2022) Short LNA-modified oligonucleotide probes as efficient disruptors of DNA G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 7247-7259, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac569>.
31. Esain-Garcia, I., Kirchner, A., Melidis, L., Tavares, R. C. A., Dhir, S., Simeone, A., Yu, Z., Madden, S. K., Hermann, R., Tannahill, D., and Balasubramanian, S. (2024) G-quadruplex DNA structure is a positive regulator of *MYC* transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **121**, e2320240121, <https://doi.org/10.1073/pnas.2320240121>.

32. Lopina, O. D., Sidorenko, S. V., Fedorov, D. A., and Klimanova, E. A. (2024) G-quadruplexes as sensors of intracellular Na^+/K^+ ratio: potential role in regulation of transcription and translation, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, S262-S277, <https://doi.org/10.1134/S0006297924140153>.
33. Sen, D., and Gilbert, W. (1990) A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA, *Nature*, **344**, 410-414, <https://doi.org/10.1038/344410a0>.

Li^+ IONS ACCUMULATION TRIGGERS *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *MYC* TRANSCRIPTION ALTERATION IN LiCl -TREATED HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS (HUVEC)

O. E. Kvitko[#], D. A. Fedorov[#], S. V. Sidorenko, O. D. Lopina, and E. A. Klimanova*

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Biochemistry,
119234 Moscow, Russia; e-mail: klimanova.ea@yandex.ru*

Changes in the intracellular concentrations of Na^+ and K^+ are shown to alter gene expression. Another monovalent cation, Li^+ , is well known as medicine for the treatment of psychiatric disorders but mechanism of its action is obscure. Thus, it is important to evaluate an effect of Li^+ on gene expression in endothelial cells. Here we studied the influence of increased intracellular Na^+ or Li^+ concentrations on the transcription of Na^+/K^+ -sensitive genes. A treatment of human endothelial cells (HUVEC) with LiCl for 1.5 h caused an accumulation of Li^+ in the cells. This was followed by an increase in *FOS* and *EGR1* mRNA and a decrease in *JUN* and *MYC* mRNA levels. Treatment of HUVEC with monensin led to an accumulation of Na^+ and a loss of K^+ ions. However, Na^+ -ionophore monensin had no significant effect on gene expression. Incubation of HUVEC with elevated extracellular NaCl concentration increased intracellular K^+ concentration and *ATF3* transcription and decreased *JUN* transcription. These results indicate that Na^+ and Li^+ ions have different effects on the cellular gene expression profile that apparently due to various actions on the intracellular monovalent cations ratio.

Keywords: lithium, sodium, Na^+/K^+ -sensitive genes, monensin, endothelial cells

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ МЕЖДУ РЕДОКС-КОФАКТОРАМИ В ФОТОСИСТЕМЕ 1 МЕТОДАМИ ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2024 А.А. Суханов¹, Г.Е. Милановский^{2*}, Л.А. Витухновская^{2,3},
М.Д. Мамедов², К.М. Салихов¹, А.Ю. Семенов^{2*}

¹ Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН»,
Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского –
обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, 420111 Казань, Россия

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия;
электронная почта: milanovsky@belozersky.msu.ru, semenov@belozersky.msu.ru

³ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.08.2024

После доработки 16.09.2024

Принята к публикации 23.09.2024

С помощью высокочастотной импульсной ЭПР-спектроскопии в Q-диапазоне при криогенных температурах впервые одновременно исследованы кинетики редокс-превращений первичного донора электрона P_{700}^{+} и хинонного акцептора A_1^{-} в различных комплексах фотосистемы 1 (ФС 1) из цианобактерий *Synechocystis sp.* PCC 6803 во временном диапазоне 200 мкс – 10 мс. В комплексах A_1 -core ФС 1, не содержащих железо-серных (4Fe4S) кластеров, кинетики исчезновения сигналов A_1 и P_{700}^{+} при температуре 100 К совпадали и имели характерное время $\tau \approx 500$ мкс, обусловленное рекомбинацией зарядов в ион-радикальной паре $P_{700}^{+}A_1^{-}$ в ветви редокс-кофакторов А. Кинетика обратного переноса электрона с A_1^{-} на P_{700}^{+} в ветви редокс-кофакторов В с $\tau < 100$ мкс не могла быть зарегистрирована в связи с временными ограничениями метода. В нативных комплексах ФС 1, содержащих полный набор редокс-кофакторов, и в комплексах F_x -core, содержащих 4Fe4S-кластер F_x , кинетика сигнала A_1 была существенно быстрее, чем сигнала P_{700}^{+} . Исчезновение сигнала A_1 имело характерное время 280–350 мкс; было предположено, что, помимо обратного переноса электрона с A_1^{-} на P_{700}^{+} с $\tau \approx 500$ мкс, в его кинетику вносит вклад прямой перенос электрона с A_1^{-} на 4Fe4S-кластер F_x , замедлившийся до 150–200 мкс. В кинетике восстановления P_{700}^{+} можно было выделить компоненты, обусловленные обратным переносом электрона с A_1^{-} ($\tau \approx 500$ мкс) и с 4Fe4S-кластерами ($\tau = 1$ мс для F_x -core и $\tau > 5$ мс для нативных комплексов). Эти результаты качественно согласуются с данными по кинетике восстановления P_{700}^{+} , полученными ранее с помощью импульсной абсорбционной спектроскопии при криогенных температурах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема 1, кинетика спектров ЭПР, низкотемпературные измерения, прямой и обратный перенос электрона, F_x -core, A_1 -core.

DOI: 10.31857/S0320972524100105 EDN: IOXZQI

ВВЕДЕНИЕ

Кинетика переноса электрона между редокс-кофакторами в фотосинтетических реакционных

центрах (РЦ) исследуется в течение нескольких последних десятилетий с помощью различных методов в разных временных диапазонах, от субпикосекундных до секундных времён. Наиболее

Принятые сокращения: РЦ – реакционный центр; ФС 1 – фотосистема 1; Хл – хлорофилл; 4Fe4S – железо-серные кластеры; A_0 – первичные акцепторы электрона, Хл; A_1 – филохинонные вторичные акцепторы электрона; A_1 -core – комплекс ФС 1, лишённый 4Fe4S-кластеров F_x , F_A , F_B ; F_x -core – комплекс ФС 1, лишённый 4Fe4S-кластеров F_A , F_B ; P_{700} – первичный донор электрона, специальная пара молекул Хл.

* Адресат для корреспонденции.

распространёнными методами исследования кинетики являются импульсная абсорбционная спектроскопия и ЭПР-спектроскопия.

Импульсная абсорбционная спектроскопия позволяет регистрировать индуцированные лазерными вспышками изменения поглощения в видимом, ближнем инфракрасном и ближнем ультрафиолетовом диапазонах. В некоторых случаях удаётся приписать наблюдаемые изменения поглощения конкретным редокс-реакциям [1].

Одним из наиболее изученных типов фотосинтетических РЦ является фотосистема 1 (ФС 1) [2–4]. Редокс-кофакторы ФС 1 включают первичный донор электрона P_{700} – димер молекул хлорофилла (Хл), первичный акцептор электрона A_0 – две пары молекул Хл в симметричных ветвях редокс-кофакторов A и B (A_{0A} и A_{0B}), молекулы филлохинонов A_1 (A_{1A} и A_{1B}), а также три последовательно расположенных железо-серных ($4Fe4S$) кластера F_X , F_A и F_B . Кофакторы P_{700} , A_0 , A_1 и F_X связаны с белковыми субъединицами ФС 1 $PsaA$ и $PsaB$, составляющими центральную часть РЦ ФС 1, а терминальные $4Fe4S$ -кластеры, F_A и F_B , связаны с наружной субъединицей $PsaC$ [5]. В условиях преимущественного возбуждения Хл РЦ происходит сверхбыстрое разделение зарядов между P_{700}^* и A_0 с образованием состояния $P_{700}^+A_0^-$ за субпикосекундные времена [6, 7]. Вслед за этим электрон переносится с A_0^- на A_1 с характерным временем ~ 25 пс [6, 8, 9]. Последующие реакции переноса электрона с A_{1A} и A_{1B} на F_X происходят

с характерными временами ~ 200 нс и ~ 20 нс соответственно, вслед за этим электрон с F_X переносится на терминальные $4Fe4S$ -кластеры F_A и F_B (см. обзор Brettel и Leibl [3] и рис. 1, а).

На рис. 1, б и в схематически изображены нативный комплекс ФС 1 и комплекс A_1 -core, в котором отсутствуют субъединица $PsaC$ и железо-серные кластеры F_X , F_A и F_B . На рисунке стрелками обозначены различные прямые и обратные реакции переноса электрона. Сплошными стрелками на рисунке обозначены реакции, регистрируемые в наших экспериментах, а пунктиром – перенос электрона, который происходит быстрее, чем время разрешения установки импульсной ЭПР-спектроскопии (см. детали в подписи к рисунку и в обсуждении результатов).

Индуктируемый лазерными вспышками перенос электрона между редокс-кофакторами исследуется в широком временном диапазоне. С помощью импульсной абсорбционной спектроскопии в основном регистрируется кинетика восстановления фотоокисленного димера Хл P_{700} , отражающая реакции обратного переноса электрона на первичный донор с различных редокс-кофакторов ФС 1 (вторичных акцепторов филлохинонов A_1 и $4Fe4S$ -кластеров F_X , F_A и F_B). Эти данные дают только косвенную информацию о прямом переносе электрона от восстановленного A_1^- на $4Fe4S$ -кластеры через соотношение амплитуд компонент рекомбинации зарядов, конкурирующих с реакциями прямого переноса электрона.

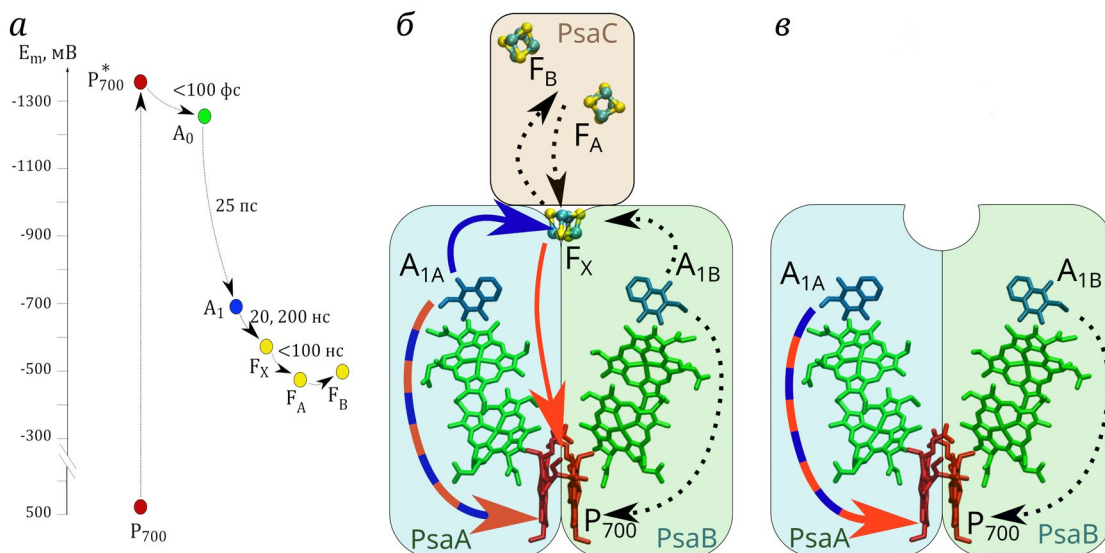


Рис. 1. Схема переноса электронов в ФС 1 цианобактерий: редокс-потенциалы основных кофакторов ФС 1 и времена прямых реакций переноса электрона (а); структурная схема нативных (б) и лишённых $4Fe4S$ -кластеров комплексов A_1 -core ФС 1 (в). Редокс-кофакторы показаны: димер Хл P_{700} – красным, Хл A_0 – зелёным, филлохиноны A_{1A} и A_{1B} – синим. $4Fe4S$ -Кластеры на рис. 1, б показаны жёлто-голубыми кубиками. $PsaA$, $PsaB$ и $PsaC$ – белковые субъединицы, содержащие кофакторы переноса электрона. Синими и красными стрелками показаны наблюдаемые в эксперименте прямые и обратные реакции переноса электрона соответственно, сине-красными стрелками показана реакция рекомбинации зарядов пары $P_{700}^+A_1^-$, наблюдаемая при исчезновении как сигнала P_{700}^* , так и A_1^- . Пунктиром на панелях б и в показан перенос электрона, не регистрируемый в представленных ниже экспериментах

Что касается кинетики окисления филлохинонного акцептора A_1 , то её, как правило, регистрируют косвенно с помощью измерения электрохромного каротиноидного сдвига на длине волны 480 нм. В некоторых случаях удаётся сопоставить кинетику редокс-реакций P_{700}/P_{700}^+ и кинетику каротиноидного сдвига, отражающую, главным образом, редокс-переходы филлохинона A_1^-/A_1 . Однако следует отметить, что этот метод является косвенным и регистрирует не только кинетику исчезновения семихинон-аниона A_1^- , но и наличие заряда на димере Хл P_{700}^+ [10–12]. Прямое измерение перехода A_1^-/A_1 возможно на длине волны ~380 нм [13, 14], однако применимость этого метода ограничена из-за низкого соотношения сигнал/шум.

Альтернативным методом регистрации кинетики переноса электрона в ФС 1 является высокочастотная ЭПР-спектроскопия в Q- и W-диапазонах [15]. Преимуществом данного метода является чёткое разделение сигналов P_{700}^+ и A_1^- – они наблюдаются при различных значениях напряжённости магнитного поля. Его ограничением является то обстоятельство, что традиционные измерения в Q- и W-диапазонах СВЧ возможны только при криогенных температурах в водно-глицериновой смеси и в относительно узком временном диапазоне [16]. В то же время недавно было обнаружено, что измерения спектров и кинетики изменения сигналов ЭПР в W-диапазоне возможны и при комнатной температуре в комплексах бактериальных РЦ, а также в комплексах ФС 1 в высушенных стекловидных трегалозных матрицах [17, 18]. Кроме того, с помощью импульсной ЭПР-спектроскопии в СВЧ диапазонах частот Q и W можно на одном и том же образце одновременно регистрировать как восстановление P_{700}^+ , так и окисление A_1^- , хотя и в ограниченном временном диапазоне. При этом кинетика восстановления P_{700}^+ в выделенных РЦ ФС 1 будет отражать обратный перенос электрона от восстановленных акцепторов, а кинетика окисления A_1^- – как обратный перенос на P_{700}^+ , так и прямой перенос электрона на 4Fe4S-кластеры. Кинетика исчезновения сигнала ЭПР спин-коррелированной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ была ранее исследована на нативных комплексах из цианобактерии *Synechococcus lividus* [19, 20]. Сопоставление кинетики восстановления P_{700}^+ с кинетикой окисления A_1^- на препаратах ФС 1, содержащих различное количество 4Fe4S-кластеров, позволяет определить кинетику и оценить соотношение прямых и обратных реакций с участием филлохинонов A_1^- .

В настоящей работе кинетики восстановления P_{700}^+ и окисления A_1^- были исследованы при температуре 100 К в водно-глицериновой смеси на препаратах нативных комплексов ФС 1, пре-

паратах Fx-core, не содержащих субъединицы PsaC и терминальных 4Fe4S-кластеров F_A и F_B, а также препаратах A₁-core, не содержащих всех трёх железо-серных кластеров. Для сопоставления данных были также произведены измерения кинетики восстановления P_{700}^+ при комнатной температуре с помощью импульсной абсорбционной спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение нативных комплексов ФС 1.

Культуру клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803 выращивали в среде BG-11 [21] при постоянном освещении белым светом. Клетки собирали в логарифмической фазе роста (примерно через 7 дней) центрифугированием и дважды промывали в 50 mM буфере HEPES-NaOH (pH 7,5).

Тримерные комплексы ФС 1 выделяли и очищали, согласно ранее описанной методике [22], с небольшими изменениями. Тилакоидные мембраны при концентрации Хл ~0,6 мг/мл растворяли в течение 90 мин при 4 °C в присутствии н-додецил-β-D-мальтозида (ДМ) до концентрации 1% (w/v). Неразрушенные мембраны осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 14 000 g и супернатант наносили на линейный градиент сахарозы (5–20%, w/v). Градиент центрифугировали в течение 3 ч в вертикальном роторе VTi 50 (полученном в рамках Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова) («Beckman Coulter», США) при 200 000 g и собирали нижнюю темно-зелёную полосу, содержащую тримеры ФС 1. После диализа исходную суспензию ФС 1 в 25 mM буфере HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащую 0,03% (m/v) ДМ, концентрировали до концентрации Хл 3 мг/мл (30 мкМ ФС 1).

Получение комплексов Fx-core. Для получения комплексов ФС 1, лишённых терминальных железо-серных кластеров F_A/F_B (обозначаемых как комплексы Fx-core), нативные комплексы ФС 1 при концентрации Хл 220 мкг/мл инкубировали в среде, содержащей 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) и 6,8 M мочевины в течение 90 мин при комнатной температуре в темноте. Затем суспензию многократно промывали 50 mM Tris-HCl-буфером (pH 8,0)/0,03% ДМ вплоть до конечной концентрации мочевины ~0,03% (более 30 циклов в зависимости от исходного объёма образца). Суспензию ядерных частиц Fx концентрировали с использованием концентраторов Centricon-50 (50 кДа, «Amicon», США) до концентрации ~2,5–3,0 мг Хл/мл.

Получение комплексов P₇₀₀-A₁-core. Для получения комплексов ФС 1, лишённых всех трёх железо-серных кластеров Fx и F_A/F_B (обозначенных как комплексы A₁-core), комплексы Fx-core

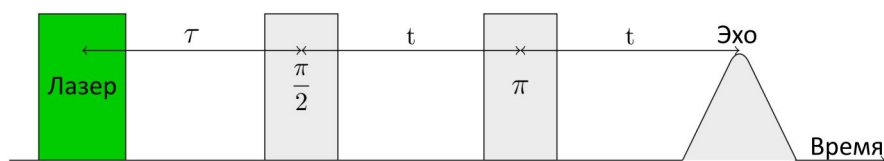


Рис. 2. Протокол эксперимента регистрации кинетики изменения сигналов ЭПР

при концентрации Хл 220 мкг/мл инкубировали в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0)-буфер, 5 мМ феррицианида калия и 3,4 М мочевины в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Для удаления мочевины и феррицианида суспензию ФС 1 несколько раз промывали 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0)-буфером до конечных концентраций мочевины и феррицианида $\sim 0,03\%$ и $\sim 0,005\%$ соответственно. Суспензию комплексов A_1 -core концентрировали с использованием концентраторов Centricon-50 до концентрации $\sim 2,5$ мг Хл/мл.

Импульсная микросекундная абсорбционная спектрофотометрия. Кинетику восстановления P_{700}^+ , индуцированного лазерной вспышкой, измеряли на длине волны 820 нм [1, 17]. В качестве источника возбуждения использовался лазер YG-481 («Quantel», Франция) с длиной волны 532 нм, интенсивностью 30 мДж и полушириной импульса 12 нс, в качестве источника измерительного света использовался лазерный диод DC25A (длина волны 820 нм) («Spindler and Hoyer», Германия). Временное разрешение установки составило ~ 100 нс [1, 17]. Препараты с концентрацией Хл 50 мкг/мл помещались в кварцевую кювету с оптическим путём 10 мм. Измерения проводили в присутствии 10 мМ аскорбата натрия в 50 мМ HEPES-буфере (pH 7,5). Кинетику сигнала снимали в логарифмической развёртке, что позволило эффективно снизить шумы во всём временном диапазоне от 1 мкс до 1 с.

Импульсная ЭПР-спектроскопия. Измерения проводились в Q-диапазоне частот (33,913–33,952 ГГц) на ЭПР-спектрометре Elexsys E580 («Bruker», Германия-США) с использованием резонатора EN 5107D2 и продувочного криостата CF935 («Oxford Instruments», Великобритания). Спектрометр был модернизирован с помощью твердотельного усилителя мощности СВЧ Q-диапазона, обеспечивающего выходную мощность 150 Вт на частоте 34 ГГц. В качестве источника возбуждения использовался лазер Brilliant B («Quantel») с длиной волны 532 нм, интенсивностью 1 мДж, с частотой повторения импульсов 10 Гц и полушириной импульса 12 нс.

Лазерный импульс индуцирует разделение зарядов в РЦ ФС 1. После временной задержки τ последовательность двух СВЧ импульсов формирует сигнал первичного электронного спинового эха. Регистрируется зависимость интенсивности

сигнала эха в зависимости от интервала времени τ между лазерным импульсом и первым СВЧ импульсом. Длительность СВЧ $\pi/2$ -импульса составляла 16 нс, задержка между двумя СВЧ импульсами составляла 440 нс. В процессе записи кинетик изменения сигналов ЭПР длительность СВЧ импульсов и задержка между двумя СВЧ импульсами не изменялись. Измерения кинетик изменения сигналов ЭПР для P_{700}^+ и A_1^- проводились при различных значениях магнитных полей в Q-диапазоне, т.к. сигналы, соответствующие P_{700}^+ и A_1^- , в спектре ЭПР имеют разные значения резонансных полей [19, 23]. Протокол эксперимента показан на рис. 2.

Анализ кинетик сигналов P_{700}^+ и A_1^- . Кинетика индуцируемых лазерной вспышкой сигналов ЭПР анализировалась с использованием набора скриптов для Matlab R2023a [24]. Кинетика изменения сигнала аппроксимировалась заданным числом экспонент (подробности в тексте) методом наименьших квадратов. В большинстве случаев достаточно хорошее разложение достигалось с помощью суммы одной восходящей экспоненциальной функции с характерным временем ~ 60 мкс и одной убывающей экспоненциальной функции с характерным временем 300–800 мкс (см. Результаты).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Регистрация кинетики восстановления P_{700}^+ с помощью импульсной абсорбционной спектроскопии. Кинетика восстановления P_{700}^+ отражает обратный перенос электрона от различных акцепторов РЦ ФС 1, а также возможное взаимодействие РЦ с экзогенными донорами и акцепторами электронов. При комнатной температуре эти реакции регистрируются как уменьшение поглощения на длине волны 820 нм после лазерной вспышки [25]. На рис. 3 показаны кинетики рекомбинации зарядов в трёх типах препаратов ФС 1: комплексах A_1 -core, лишённых всех трёх 4Fe4S-кластеров (F_x , F_A и F_B), комплексах F_x -core, лишённых кластеров F_A и F_B , а также нативных комплексах, содержащих полный набор 4Fe4S-кластеров.

В кинетике рекомбинации зарядов при комнатной температуре в случае комплексов

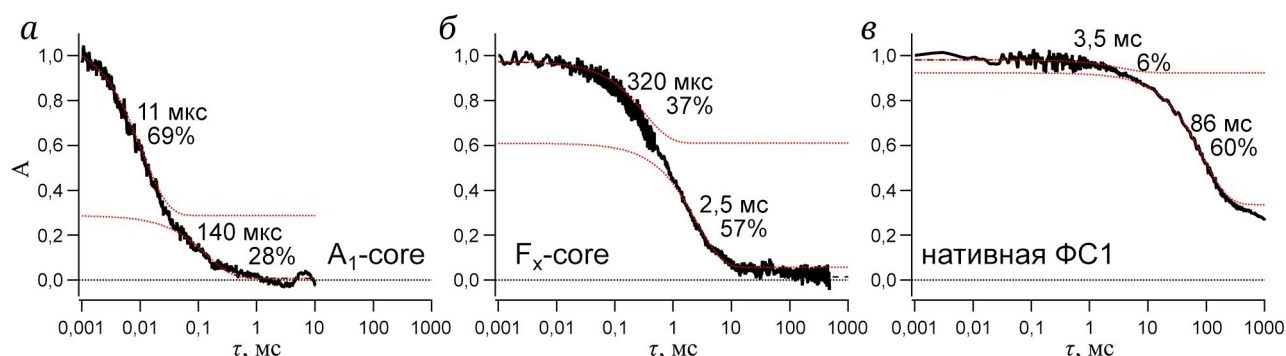


Рис. 3. Индуцированная лазерными вспышками рекомбинация зарядов в комплексах ФС 1, регистрируемая как уменьшение поглощения на длине волны 820 нм при комнатной температуре для комплексов A_1 -core (а), комплексов F_x -core (б) и полного комплекса ФС 1 (в). Указаны характерные времена и относительные амплитуды основных компонент рекомбинации. Поглощение указано в условных единицах, нормированных на максимум сигнала

A_1 -core выявляются две компоненты с характерными временами (τ) ~10 и 140 мкс (рис. 3, а), которые соответствуют обратному переносу электрона с молекул филлохинона A_{1B} и A_{1A} в симметричных ветвях кофакторов [14, 26, 27]. В приведённых экспериментальных кривых доминирует более быстрая компонента с амплитудой почти 70%. Соотношение между быстрой и медленной компонентами рекомбинации варьирует в зависимости от условий приготовления препаратов A_1 -core и использованного штамма цианобактерий [13, 14] и, вероятно, отражает не только асимметрию образования ион-радикальных пар $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ в симметричных ветвях редокс-кофакторов А и В, но и возможное повреждение и частичное удаление молекул филлохинона из сайтов A_1 , происходящее при выделении препаратов A_1 -core.

В кинетике обратного переноса электрона в комплексах F_x -core, лишённых терминальных кластеров F_A и F_B , выявляются две компоненты с характерными временами ~300 мкс и 2,5 мс и относительными амплитудами 40 и 60% соответственно (рис. 3, б). Медленная компонента может быть однозначно приписана рекомбинации с кластера F_x ; что же касается более быстрой компоненты, то она в принципе может соответствовать рекомбинации с A_{1A} во фракции комплексов с повреждённым F_x . С другой стороны, характерное время τ данной компоненты вдвое медленнее, чем кинетика рекомбинации пары $P_{700}^+A_{1A}^-$, наблюдавшаяся в препаратах A_1 -core (140 мкс), а ожидаемая более быстрая компонента пары $P_{700}^+A_{1B}^-$ (10 мкс) на этих препаратах отсутствует. Ранее было предположено, что обратный перенос электрона с F_x на P_{700}^+ имеет гетерогенную кинетику, обусловленную наличием различных конформационных состояний ФС 1, как минимум при криогенных температурах [1, 13]. Нами ранее было показано, что кластер F_x является наиболее

подверженным конформационным изменениям из кофакторов ФС 1 [1, 25]. При комнатной температуре маловероятна конформационная гетерогенность, аналогичная «замерзанию» конформации комплекса ФС 1 при понижении температуры ниже 200 К. Однако аналогичная неоднородность образца может достигаться в результате химической обработки пигмент-белкового комплекса мочевиной при приготовлении образцов F_x -core. В этом случае обе компоненты, 300 мкс и 2,5 мс, могут быть приписаны обратному переносу электрона с F_x в различных конформациях РЦ, возможно, способствующих преимущественной локализации отрицательного заряда на различных атомах кластера F_x .

В нативных комплексах ФС 1 кинетика рекомбинации зарядов, представленная на рис. 3, в, главным образом обусловлена обратным переносом электрона от терминальных кластеров F_A и F_B ($\tau \approx 90$ мс, относительная амплитуда 60%). Более быстрая минорная компонента (6%) обусловлена наличием небольшой фракции белка, не содержащей субъединицы Psac и кластеров F_A/F_B , а более медленная компонента на временах сотен миллисекунд и секунд – восстановлением P_{700}^+ от экзогенных доноров электрона [25].

Разложение кинетик рекомбинации зарядов на экспоненциальные компоненты в трёх типах комплексов ФС 1 представлено в табл. 1.

Регистрация кинетики восстановления P_{700}^+ и окисления A_1^- с помощью импульсной ЭПР-спектроскопии. После фотовозбуждения в нулевой момент времени разделённая пара зарядов в РЦ ФС 1 образуется в синглетном состоянии, при котором суммарный спин электронов равен нулю. Это состояние – немагнитное, и оно не даёт сигнала ЭПР. Благодаря разнице резонансных частот разделённых зарядов и диполь-дипольному спин-спиновому взаимодействию между зарядами пара электронов переходит из синглетного состояния

Таблица 1. Компоненты окисления P_{700}^+ при комнатной температуре, измеренные спектрофотометрически на длине волны 820 нм.

Тип комплекса ФС 1	τ , мс			Относительная амплитуда, %			
	τ_1	τ_2	τ_3	A_1	A_2	A_3	Долгоживущие компоненты
A_1 -core	0,011/0,14			69/28			3
F_x -core	0,32	2,5		37	57		6
Нативный		3,5	86		6	60	34

Примечание. Компоненты рекомбинации соответствуют: 1 – рекомбинации с A_1 (две субкомпоненты для комплексов A_1 -core), 2 – рекомбинации с кластера F_x , 3 – рекомбинации с кластеров $[F_A/F_B]$.

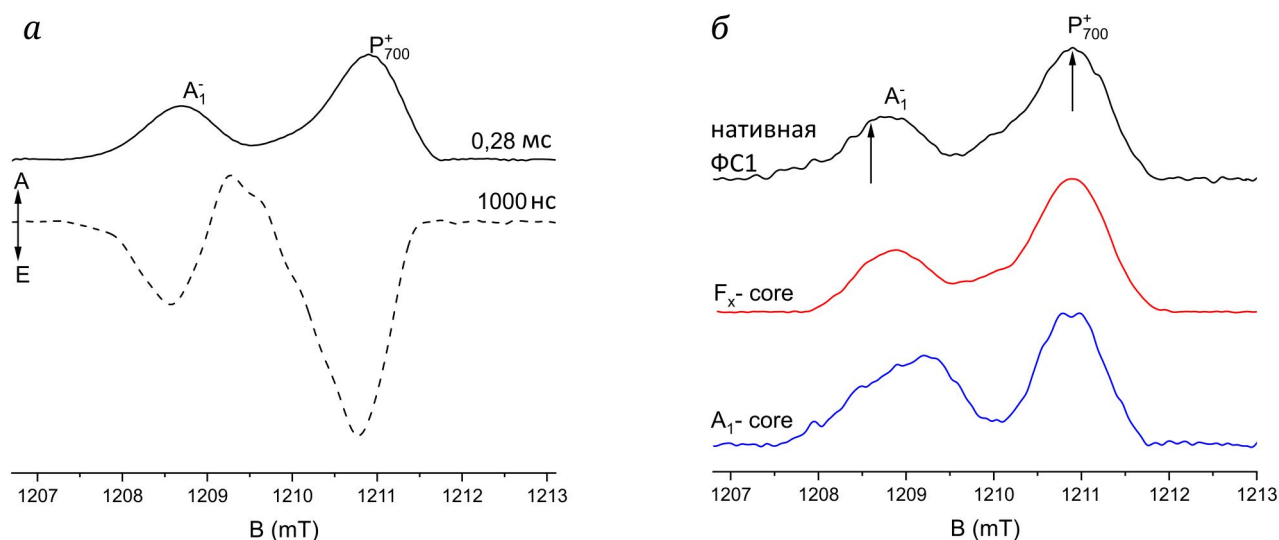


Рис. 4. Эхо-детектированные спектры ЭПР трёх комплексов ФС 1 при 100 К в Q-диапазоне СВЧ. а – Спектры нативной ФС 1 при двух различных временных задержках; б – спектры нативного комплекса ФС 1, F_x -core- и A_1 -core-комплексов, записанные при временной задержке 0,28 мс. Стрелками показаны точки спектра, в которых снимались кинетики. А, Е – поглощение и испускание СВЧ образцом соответственно

в триплетное; в результате наблюдается дипольная спиновая поляризация каждого электрона пары [28, 29]. Эта дипольная поляризация по амплитуде на 1–2 порядка превышает равновесную поляризацию электронных спинов и известна как гиперполяризация или химическая поляризация электронных спинов (далее по тексту – неравновесная поляризация) [30]. В результате спиновой динамики неравновесная поляризация затухает, и в спектре ЭПР мы наблюдаем равновесный сигнал, который спадает с характерными временами жизни возбуждённых электронных состояний (рекомбинации зарядов). На рис. 4, а (а также рис. П1 и П2 в Приложении) хорошо видно, как отличаются формы спектров ЭПР для случаев формирования неравновесной поляризации и достижения равновесного состояния в РЦ. В начальный момент времени с задержкой 1 мкс после лазерного импульса наблюдается спектр ЭПР, обусловленный формированием неравновесной поляризации (рис. 4, а, пунктирная линия),

в котором видны сигналы в форме испускания и поглощения СВЧ образцами. С увеличением времени задержки данный сигнал преобразуется в сигнал поглощения (рис. 4, а, сплошная линия), который обусловлен достижением равновесного состояния. На рис. 4, б приведены равновесные спектры трёх типов комплексов ФС 1 на временной задержке 280 мкс; вертикальными стрелками отмечены значения напряжённости магнитного поля в спектрах ЭПР, при которых производились измерения кинетики. Для лучшего разделения кинетик рекомбинаций электронных состояний и затухания неравновесной поляризации удобно выбирать именно эти значения магнитных полей [19, 23]. На кинетических кривых, представленных ниже на рис. 5–7, на временах < 200 мкс можно наблюдать переход сигнала из формы испускания в форму поглощения, который во всех случаях хорошо аппроксимируется экспонентой с характерным временем ~60 мкс. На более длительных временах наблюдается спад сигнала ЭПР,

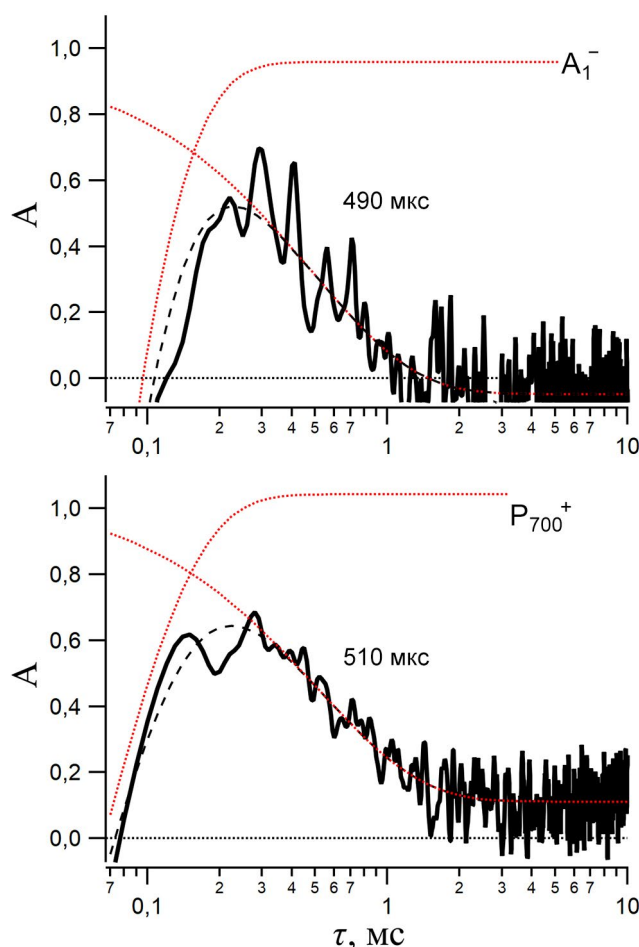


Рис. 5. Кинетика ЭПР-сигналов A_1^- и P_{700}^+ в комплексах A_1 -core ФС 1 при 100 К. Исходная кинетика показана чёрными сплошными линиями, компоненты фиттинга показаны тонкими красными пунктирными линиями, сумма компонентов фиттинга показана чёрной пунктирной линией. Амплитуда сигнала указана в условных единицах, нормированных на максимум компонент сигнала

обусловленный кинетикой исчезновения A_1^- или P_{700}^+ . Для примера на рис. ПЗ в Приложении показано, как выглядят кинетики при значении напряжения магнитного поля, при котором не наблюдается изменения формы линии в спектре ЭПР, т.е. сигнал положителен уже при начальных задержках.

На рис. 5–7 представлены кинетики спада индуцированных лазерными вспышками сигналов ЭПР, соответствующих радикалам P_{700}^+ и A_1^- , измеренные на комплексах ФС 1, лишённых всех 4Fe4S-кластеров (A_1 -core, рис. 5), только терминальных кластеров [F_A/F_B] (F_X -core, рис. 6) или же нативных комплексов (рис. 7).

Можно предполагать, что в комплексах A_1 -core характерные времена жизни P_{700}^+ и A_1^- должны совпадать ($\tau_P = \tau_{A1}$), поскольку в системе возможна только одна реакция рекомбинации

зарядов (с филлохинонов A_1^- на P_{700}^+). Наличие какого-то альтернативного пути переноса электрона с A_1^- должно уменьшить характерное время жизни радикала A_1^- , но не P_{700}^+ . Такая ситуация ожидается для F_X -core и нативных комплексов ФС 1, так как в этих системах появляется возможность прямого переноса электрона от A_1^- на 4Fe4S-кластеры. Кроме того, в F_X -core и нативных комплексах ФС 1 должна происходить более медленная рекомбинация зарядов между 4Fe4S-кластерами и P_{700}^+ , поэтому для этих систем ожидается, что $\tau_{A1} < \tau_P$.

Приведённые ниже экспериментальные результаты качественно хорошо согласуются с этими ожидаемыми результатами: в ряду « A_1 -core $\rightarrow$ F_X -core $\rightarrow$ нативные комплексы» кинетика окисления A_1^- ускорялась, в то время как кинетика восстановления P_{700}^+ , наоборот, замедлялась, что указывает на различные схемы электронного переноса в исследуемых вариантах ФС 1.

На рис. 5 представлены изменения сигналов ЭПР в комплексах A_1 -core, в которых конечным акцептором электрона являются молекулы филлохинона A_{1A} и A_{1B} . Кинетика окисления A_1^- (вверху) и кинетика восстановления P_{700}^+ (внизу) имеют близкие характерные времена $\tau \approx 500$ мкс. Это совпадение демонстрирует, что кинетики спада обоих сигналов ЭПР обусловлены одной и той же реакцией рекомбинации зарядов в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$.

Как показано на рис. 3, рекомбинация зарядов с филлохинонов A_{1B} и A_{1A} при комнатной температуре характеризуется значениями $\tau \approx 10$ и 140 мкс соответственно. Согласно ранее полученным данным [27], скорость реакции обратного переноса электрона с A_{1B} практически не зависит от температуры и маскируется в кинетике изменения сигнала ЭПР вышеописанным затуханием неравновесной поляризации. Таким образом, наблюдаемая кинетика сигнала ЭПР с $\tau \approx 490$ мкс может быть однозначно приписана рекомбинации с филлохинона A_{1A} . Замедление кинетики при понижении температуры от 140 к 490 мкс хорошо соответствует ранее наблюдаемой температурной зависимости этой реакции, зарегистрированной спектрофотометрически по сигналу восстановления P_{700}^+ на препаратах ФС 1 из цианобактерий *Synechococcus* sp. PCC 7002 [27] и *Synechocystis* sp. PCC 6803 [1], лишённых всех или части 4Fe4S-кластеров соответственно.

На рис. 6 представлена кинетика исчезновения сигналов ЭПР A_1^- и P_{700}^+ на препаратах ФС 1 F_X -core, которые содержат только 4Fe4S-кластер F_X и не содержат терминальных кластеров F_A и F_B и белковой субъединицы $PsaC$. Характерное время спада сигнала A_1^- ($\tau = 350$ мкс) здесь суще-

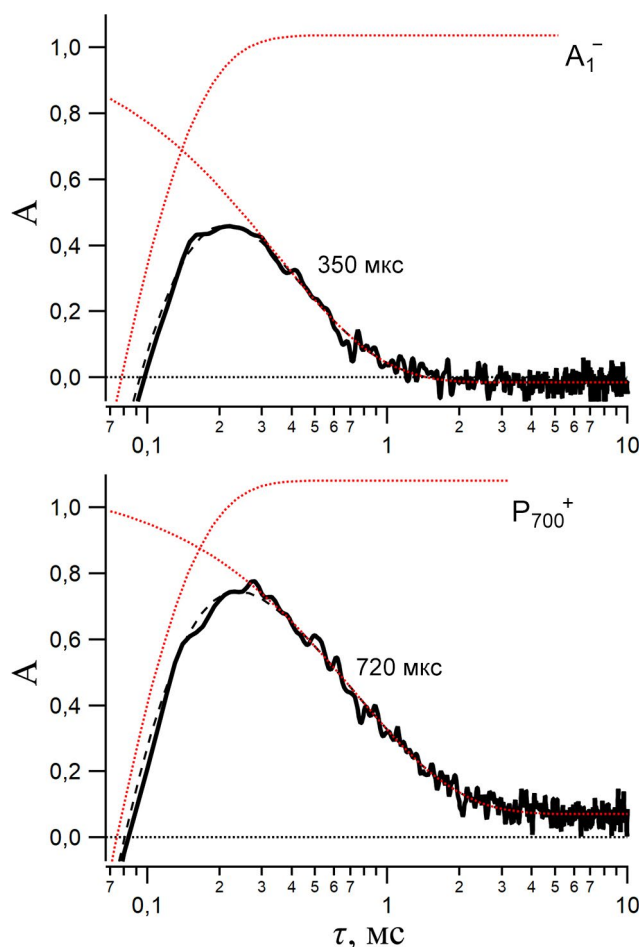


Рис. 6. Кинетика ЭПР-сигналов A_1^- и P_{700}^+ в комплексах F_x -core ФС 1 при 100 К. Обозначения такие же, как на рис. 5

ственно быстрее, чем время спада сигнала P_{700}^+ ($\tau = 720$ мкс); очевидно, что в отличие от препаратов A_1 -core, наблюдаемые кинетики не могут быть приписаны одной и той же реакции. Вместе с тем реакция восстановления P_{700}^+ должна отражать как минимум кинетику рекомбинации с филохинонов A_1 , то есть кинетику ЭПР сигнала P_{700}^+ должна включать в себя субкомпоненту, сходную со спадом сигнала A_1^- . Исходя из данных импульсной абсорбционной спектроскопии (рис. 3, табл. 1 и работа Milanovsky et al. [1]), в сигнале P_{700}^+ комплексов F_x -core можно ожидать наличия как минимум двух компонент рекомбинации – с кофакторов A_1^- и F_x^- . Низкое соотношение сигнал/шум не позволяет провести однозначного разложения кинетики сигналов ЭПР на две экспоненциальные составляющие. Однако, если предположить, что оба сигнала (A_1^- и P_{700}^+) включают экспоненциальную компоненту с характерным временем 400–500 мкс (соответствующую времени обратного переноса электрона с A_1^- и наблюдавшуюся в комплексах A_1 -core), то кинетика сигнала A_1^- также будет включать более быструю компоненту с

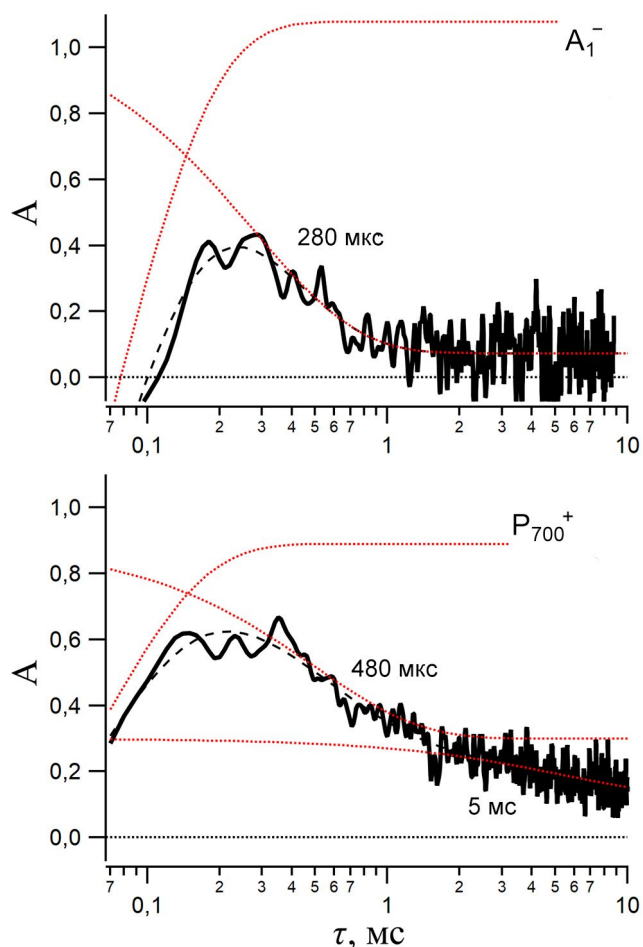


Рис. 7. Кинетика ЭПР-сигналов A_1^- и P_{700}^+ в комплексах нативной ФС 1 при 100 К. Обозначения такие же, как на рис. 5

$\tau_0 < 200$ мкс (на пределе временного разрешения метода), а кинетика сигнала P_{700}^+ – более медленную компоненту с $\tau_2 = 910$ мкс (см. табл. 2). При таком разложении кинетика обоих сигналов может быть интерпретирована как сочетание трёх различных реакций:

- в случае сигнала A_1^- более быстрая компонента ($\tau_0 < 200$ мкс) может быть приписана сильно замедленному при низкой температуре прямому переносу электрона с A_1^- на F_x , а более медленная ($\tau_1 = 420$ мкс) – рекомбинации зарядов в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$ (см. схему переноса зарядов на рис. 1). Ранее было показано [13], что прямой перенос с A_1^- на F_x , происходящий при комнатной температуре за время ~ 200 нс, при температуре 170 К может замедляться до десятков микросекунд;

- в кинетике сигнала P_{700}^+ более быстрая компонента (с той же $\tau_1 = 420$ мкс) соответствует обратному переносу электрона с A_1^- , а более медленная ($\tau_2 = 910$ мкс) – с F_x^- .

В нативных комплексах ФС 1 кинетика сигнала ЭПР A_1^- аппроксимируется экспонентой

Таблица 2. Компоненты кинетики изменения сигналов ЭПР A_1^- и P_{700}^+

Сигнал ЭПР	Тип комплекса	τ , мс			Относительная амплитуда A, %			
		τ_0	τ_1	τ_2	A_0	A_1	A_2	Долгоживущие компоненты
P_{700}	A_1 -core		0,51			89		11
	F_x -core			0,72			94	6
			0,42	0,91		45	50	6
	нативный			1,1			75	25
			0,48	5,07		66	20	14
A_1	A_1 -core		0,49			105		-5
	F_x -core		0,35			102		-2
		0,19	0,42		51	50		-1
	нативный		0,28			93		7
		0,16	0,48		86	11		3

Примечание. Жирным шрифтом отмечены разложения на одну экспоненциальную функцию, курсивом – разложения на две экспоненты при допущении наличия компоненты с $\tau_1 \approx 400\text{--}500$ мкс. Предположительные соответствия компонент: 0 – прямой перенос электрона от A_{1A} к F_x , 1 – рекомбинация с A_1 , 2 – обратный перенос электрона от 4Fe4S-кластеров.

с $\tau = 280$ мкс и долгоживущей компонентой ($\tau > 10$ мс) (рис. 7). Отношение сигнал/шум в экспериментальных данных не позволяет с уверенностью выделить две ожидаемые экспоненты, как это наблюдалось в спектрофотометрических измерениях при комнатной температуре. Если, по аналогии с вышеописанной процедурой, произвести разложение кинетики на две экспоненты, одна из которых имеет $\tau_1 \approx 400\text{--}600$ мкс, то в сигнале A_1^- можно выделить более быструю субкомпоненту со временем $\tau_0 < 200$ мкс. Мы предполагаем, что так же, как и в препаратах F_x -core, наблюдаемый спад сигнала A_1^- является комбинацией двух процессов – сильно замедленного прямого переноса электрона от A_1^- на F_x (и, возможно, далее на F_A и F_B) с $\tau_0 < 200$ мкс и обратного переноса электрона от A_1^- на P_{700}^+ с $\tau_1 = 480$ мкс.

Кинетика сигнала P_{700}^+ хорошо описывается двумя компонентами с временами $\tau_1 = 480$ мкс и $\tau_2 = 5$ мс, а также долгоживущей компонентой ($\tau > 10$ мс). Аналогично ситуации с комплексами F_x -core мы предполагаем, что более быстрая компонента обусловлена рекомбинацией зарядов в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_{1A}^-$, а более медленные – обратным переносом электрона от железосерных кластеров на P_{700}^+ .

Разложения кинетик ЭПР сигналов радикалов A_1^- и P_{700}^+ в трёх типах комплексов ФС 1 суммированы в табл. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из экспериментальных данных, суммированных в табл. 2, можно сделать несколько выводов.

1) На препаратах A_1 -core кинетики спада ЭПР-сигналов P_{700}^+ и A_1^- имеют одинаковые характерные времена $\tau_1 \approx 500$ мкс. Это время близко к одной из компонент кинетики восстановления P_{700}^+ , приписываемой рекомбинации с филлохинона A_{1A} и измеренной спектрофотометрически при 100 К на аналогичных препаратах ФС 1, лишённых 4Fe4S-кластеров [27]. Более быстрая компонента рекомбинации с A_{1B} ($\tau \approx 25$ мкс), наблюдаемая в кинетике абсорбционных изменений, в сигнале ЭПР маскируется релаксацией неравновесной поляризации системы. Можно заключить, что в этих препаратах происходит только образование ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ и обратный перенос электрона от A_1^- на P_{700}^+ .

2) На препаратах F_x -core в ЭПР-сигнале P_{700}^+ кинетика хорошо аппроксимируется одной экспонентой с $\tau = 720$ мкс, а в сигнале A_1^- – с $\tau = 350$ мкс. В отличие от данных, полученных на препаратах A_1 -core, эти сигналы не могут отражать одну и ту же реакцию переноса электрона. В то же время, если обе представленные кинетики описать как сумму двух экспоненциальных функций, то одна из них будет иметь $\tau_1 = 420$ мкс, что близко к наблюдаемой кинетике переноса электрона от A_1^- на P_{700}^+ ,

наблюдаемой на препарате A_1 -core. Вторая компонента в случае сигнала P_{700}^+ имеет $\tau_2 = 910$ мкс, а в случае $A_1^- - \tau_0 < 200$ мкс. Кинетика с $\tau_2 = 910$ мкс, вероятно, соответствует рекомбинации с $4Fe_4S$ -кластера F_x , а компонента с $\tau_0 < 200$ мкс может быть связана с замедлившимся при низкой температуре прямым переносом электрона от A_{1A} к F_x [13]. В кинетике восстановления P_{700}^+ по данным абсорбционной спектроскопии на таких же препаратах при 100 К наблюдалась быстрая компонента с $\tau = 410$ мкс и медленная гетерогенная компонента со средним значением $\tau = 104$ мс [1]; таким образом, миллисекундная компонента восстановления P_{700}^+ в сигнале ЭПР была на два порядка быстрее, чем в экспериментах по импульсной спектроскопии. Вероятно, это связано с тем, что в импульсной ЭПР-спектроскопии частота лазерных вспышек (10 Гц) существенно больше, чем в абсорбционной спектроскопии ($< 0,1$ Гц). В результате во фракции ФС 1, в которой рекомбинация происходит со временами $\tau > 1$ мс, накапливаются восстановленные $4Fe_4S$ -кластеры, с которых не происходит обратного переноса электрона. Таким образом, в наблюдаемой кинетике сигнала ЭПР наблюдается только рекомбинация с кластера F_x в конформации, обеспечивающей максимально возможную скорость этой реакции ($\tau_2 = 910$ мкс).

3) В нативных комплексах ФС 1, так же как и в комплексах F_x -core, кинетика сигнала P_{700}^+ существенно медленнее кинетики сигнала A_1^- . Аналогично вышеописанной процедуре для F_x -core, сигнал ЭПР A_1^- может быть представлен как сумма замедленной реакции прямого переноса электрона с $\tau_0 < 200$ мкс (определение амплитуды которой затруднено из-за релаксации неравновесной поляризации системы) и обратного переноса с A_{1A} с $\tau_1 = 480$ мкс. В сигнале P_{700}^+ можно выделить компоненту рекомбинации с A_{1A} с такой же кинетикой $\tau_1 = 480$ мкс и более медленные компоненты рекомбинации с $4Fe_4S$ -кластерами. Общая амплитуда последних ($\tau_2 = 5$ мс и неразрешаемые по времени долгоживущие субкомпоненты) составляет 34%, что хорошо согласуется со вкладом рекомбинации с $4Fe_4S$ -кластерами при 100 К по данным импульсной абсорбционной спектроскопии [1]. Так же, как и в F_x -core-комплексах, медленная компонента восстановления P_{700}^+ существенно быстрее в сигнале ЭПР, чем в кинетике абсорбционных изменений на длине волны 820 нм; вероятная причина этого изложена выше.

Сопоставление кинетики изменения сигналов ЭПР P_{700}^+ и A_1^- на трёх препаратах комплексов ФС 1, содержащих различное число $4Fe_4S$ -кластеров, впервые позволяет разделить прямые и обратные реакции переноса электрона с участием филлохинона A_1^- и оценить соотношение этих

реакций при криогенных температурах. Одновременное измерение ЭПР-сигналов двух редокс-кофакторов демонстрирует кинетику обратного переноса электрона от A_1^- на P_{700}^+ в нативных комплексах ФС 1. В отличие от косвенных измерений по каротиноидному сдвигу, измерение сигнала ЭПР A_1^- позволяет прямо регистрировать кинетику редокс-превращений A_1^- , в том числе в нативных комплексах ФС 1. В настоящей работе данный метод позволял регистрировать кинетику спада сигналов ЭПР в диапазоне от ~ 200 мкс до 10 мс, ограниченном релаксацией неравновесной поляризации системы на быстрых временах, а также уменьшением соотношения сигнал/шум и деградацией образца – на медленных.

Временное разрешение метода можно улучшить при повышении температуры, что позволяет существенно ускорить релаксацию неравновесной поляризации системы. В водно-глицериновой смеси измерения при более высоких температурах затруднены, однако ранее было показано, что высушивание комплексов ФС 1 в дегидратированных трегалозных матрицах даёт возможность измерять сигнал ЭПР при температурах вплоть до комнатных [17, 18]: в таких измерениях временное разрешение составляло ~ 10 мкс. Доступный временной диапазон можно расширить на времена свыше 10 мс при использовании метода измерения сигнала ЭПР в W-диапазоне в ответ на единичные вспышки [18].

Вклад авторов. А.Ю. Семёнов – концепция и руководство работой; Л.А. Витухновская, М.Д. Мамедов – получение образцов; А.Н. Суханов, К.М. Салихов – получение кинетик спектров ЭПР; А.Н. Суханов, Г.Е. Милановский – анализ результатов; Г.Е. Милановский, А.Ю. Семёнов – написание текста; все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00025).

Благодарности. Авторы приносят благодарность недавно ушедшему из жизни проф. Клаусу Мёбиусу (Freie Universität Berlin, Германия) за ценное обсуждение результатов и Аиде Мамедовой (НИИ ФХБ МГУ, Москва) за помощь в выделении образцов ФС 1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Milanovsky, G., Gupta, O., Petrova, A., Mamedov, M., Gorka, M., Cherepanov, D., Golbeck, J. H., and Semenov, A. (2019) Multiple pathways of charge recombination revealed by the temperature dependence of electron transfer kinetics in cyanobacterial photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 601-610, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.06.008>.
2. Brettel, K. (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1318**, 322-373, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(96\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00112-0).
3. Brettel, K., and Leibl, W. (2001) Electron transfer in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1507**, 100-114, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00202-X).
4. Golbeck, J. H. (2006) *Photosystem I. The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*, Springer Netherlands, Dordrecht, <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4256-0>.
5. Fromme, P., Jordan, P., and Krauß, N. (2001) Structure of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1507**, 5-31, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00195-5).
6. Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Sarkisov, O. M., Nadtochenko, V. A., Shuvalov, V. A., and Semenov, A. Y. (2010) Femtosecond primary charge separation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1410-1420, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.026>.
7. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Petrova, A., Aybush, A. V., Nadtochenko, V. A., Xu, W., Golbeck, J. H., and Semenov, A. Y. (2021) Primary charge separation within the structurally symmetric tetrameric Chl_{2A}P_AP_BChl_{2B} chlorophyll exciplex in photosystem I, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **217**, 112154, <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2021.112154>.
8. Brettel, K., and Vos, M. H. (1999) Spectroscopic resolution of the picosecond reduction kinetics of the secondary electron acceptor A₁ in photosystem I, *FEBS Lett.*, **447**, 315-317, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00317-8).
9. Savikhin, S., Xu, W., Martinsson, P., Chitnis, P. R., and Struve, W. S. (2001) Kinetics of charge separation and A₀⁻→A₁ electron transfer in photosystem I reaction centers, *Biochemistry*, **40**, 9282-9290, <https://doi.org/10.1021/bi0104165>.
10. Joliot, P., and Joliot, A. (1999) *In vivo* analysis of the electron transfer within photosystem I: are the two phyloquinones involved? *Biochemistry*, **38**, 11130-11136, <https://doi.org/10.1021/bi990857c>.
11. Guergova-Kuras, M., Boudreaux, B., Joliot, A., Joliot, P., and Redding, K. (2001) Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4437-4442, <https://doi.org/10.1073/pnas.081078898>.
12. Muhiuddin, I. P., Heathcote, P., Carter, S., Purton, S., Rigby, S. E. J., and Evans, M. C. W. (2001) Evidence from time resolved studies of the P700⁺/A₁⁻ radical pair for photosynthetic electron transfer on both the PsaA and PsaB branches of the photosystem I reaction centre, *FEBS Lett.*, **503**, 56-60, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02696-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02696-5).
13. Schlodder, E., Falkenberg, K., Gergeleit, M., and Brettel, K. (1998) Temperature dependence of forward and reverse electron transfer from A₁⁻, the reduced secondary electron acceptor in photosystem I, *Biochemistry*, **37**, 9466-9476, <https://doi.org/10.1021/bi973182r>.
14. Brettel, K., and Golbeck, J. H. (1995) Spectral and kinetic characterization of electron acceptor A₁ in a Photosystem I core devoid of iron-sulfur centers F_X, F_B and F_A, *Photosynth. Res.*, **45**, 183-193, <https://doi.org/10.1007/BF00015559>.
15. Möbius, K., and Savitsky, A. (2008) *High-Field EPR Spectroscopy on Proteins and their Model Systems*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, <https://doi.org/10.1039/9781847559272>.
16. Savitsky, A., Gupta, O., Mamedov, M., Golbeck, J. H., Tikhonov, A., Möbius, K., and Semenov, A. (2010) Alteration of the axial met ligand to electron acceptor A₀ in photosystem I: effect on the generation of P 700⁺A₁ – radical pairs as studied by W-band transient EPR, *Appl. Magn. Reson.*, **37**, 85-102, <https://doi.org/10.1007/s00723-009-0052-0>.
17. Malferrari, M., Savitsky, A., Mamedov, M. D., Milanovsky, G. E., Lubitz, W., Möbius, K., Semenov, A. Y., and Venturoli, G. (2016) Trehalose matrix effects on charge-recombination kinetics in Photosystem I of oxygenic photosynthesis at different dehydration levels, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 1440-1454, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.05.001>.
18. Shelaev, I., Gorka, M., Savitsky, A., Kurashov, V., Mamedov, M., Gostev, F., Möbius, K., Nadtochenko, V., Golbeck, J., and Semenov, A. (2017) Effect of dehydrated trehalose matrix on the kinetics of forward electron transfer reactions in photosystem I, *Zeitschrift Phys. Chemie*, **231**, 325-345, <https://doi.org/10.1515/zpch-2016-0860>.
19. Poluektov, O. G., Paschenko, S. V., Utschig, L. M., Lakshmi, K. V., and Thurnauer, M. C. (2005) Bidirectional electron transfer in photosystem I: direct evidence from high-frequency time-resolved EPR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11910-11911, <https://doi.org/10.1021/ja053315t>.

20. Poluektov, O. G., and Utschig, L. M. (2015) Directionality of electron transfer in type I reaction center proteins: high-frequency EPR study of PS I with removed iron-sulfur centers, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 13771-13776, <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.5B04063>.
21. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stanier, R. Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyano-bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 1-61, <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.
22. Shen, G., Zhao, J., Reimer, S. K., Antonkine, M. L., Cai, Q., Weiland, S. M., Golbeck, J. H., and Bryant, D. A. (2002) Assembly of photosystem I. I. Inactivation of the *rubA* gene encoding a membrane-associated rubredoxin in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 causes a loss of photosystem I activity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20343-20354, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201103200>.
23. Mula, S., Savitsky, A., Möbius, K., Lubitz, W., Golbeck, J. H., Mamedov, M. D., Semenov A. Y., and van der Est, A. (2012) Incorporation of a high potential quinone reveals that electron transfer in Photosystem I becomes highly asymmetric at low temperature, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11**, 946, <https://doi.org/10.1039/c2pp05340c>.
24. MATLAB: 9.14.0, The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts (2023) URL: <https://www.mathworks.com/>.
25. Vassiliev, I. R., Jung, Y. S., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., and Golbeck, J. H. (1997) Near-IR absorbance changes and electrogenic reactions in the microsecond-to-second time domain in Photosystem I, *Biophys. J.*, **72**, 301-315, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78669-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78669-7).
26. Shen, G., Antonkine, M. L., van der Est, A., Vassiliev, I. R., Brettel, K., Bittl, R., Zech, S. G., Zhao, J., Stehlik, D., Bryant, D. A., and Golbeck, J. H. (2002) Assembly of photosystem I. II. Rubredoxin is required for the *in vivo* assembly of F(X) in *Synechococcus* sp. PCC 7002 as shown by optical and EPR spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20355-20366, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201104200>.
27. Cherepanov, D. A., Milanovsky, G. E., Gupta, O. A., Balasubramanian, R., Bryant, D. A., Semenov, A. Y., and Golbeck, J. H. (2018) Electron-phonon coupling in cyanobacterial photosystem I, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 7943-7955, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.8b03906>.
28. Salikhov, K. M., Kandrashkin, Y. E., and Salikhov, A. K. (1992) Peculiarities of free induction and primary spin echo signals for spin-correlated radical pairs, *Appl. Magn. Reson.*, **3**, 199-216, <https://doi.org/10.1007/BF03166790>.
29. Salikhov, K. M., Sukhanov, A. A., and Khairutdinov, I. T. (2024) Features of the primary electron spin echo signal for spin-correlated radical pairs, *Appl. Magn. Reson.*, **55**, 463-475, <https://doi.org/10.1007/s00723-023-01636-6>.
30. Salikhov, K. M., Molin, Y. N., Sagdeev, R. Z., and Buchachenko, A. L. (1984) Spin polarization and magnetic effects in radical reactions, in *Studies in Physical and Theoretical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

KINETICS OF ELECTRON TRANSFER BETWEEN REDOX COFACTORS IN PHOTOSYSTEM I MEASURED BY HIGH-FREQUENCY EPR SPECTROSCOPY

**A. A. Sukhanov¹, G. E. Milanovsky^{2*}, L. A. Vitukhnovskaya^{2,3}, M. D. Mamedov²,
K. M. Salikhov¹ and A. Yu. Semenov^{2*}**

¹ FRC Kazan Scientific Center, Zavoisky Physical-Technical Institute, Russian Academy of Sciences,
420111 Kazan, Russia

² A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: milanovsky@belozersky.msu.ru, semenov@belozersky.msu.ru

³ N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia

Using high-frequency pulsed EPR spectroscopy in the Q range at cryogenic temperatures, the kinetics of redox transformations of the primary electron donor P_{700}^+ and the quinone acceptor A_1^- in various complexes of photosystem I (PSI) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 were simultaneously studied for the first time in the time range of 200 μ s-10 ms. In the A_1 -core complexes of PSI that lack 4Fe4S clusters, the kinetics of the A_1^- and P_{700}^+ signals decay at a temperature of 100 K coincided and had a characteristic time of $\tau \approx 500 \mu$ s, caused by charge recombination in the $P_{700}^+A_1A$ ion-radical pair in the A branch of redox cofactors. The kinetics of the reverse electron transfer from A_1B to P_{700}^+ in the B branch of redox cofactors with $\tau < 100 \mu$ s could not be recorded due to

the time limitations of the method. In the native PSI complexes comprising a full set of redox cofactors and in the F_x -core complexes with the 4Fe4S cluster F_x only the kinetics of the A_1^- signal was significantly faster than that of the P_{700}^+ signal. The disappearance of the A_1^- signal had a characteristic time of 280-350 μ s. It was suggested that, in addition to the reverse electron transfer from A_{1A}^- to P_{700}^+ with $\tau \approx 500$ μ s, it also includes a slowed down (up to 150-200 μ s) forward electron transfer from A_{1A}^- to the 4Fe4S cluster F_x . In the kinetics of P_{700}^+ reduction, it was possible to distinguish components caused by the reverse electron transfer from A_1^- ($\tau \approx 500$ μ s) and from 4Fe4S clusters ($\tau = 1$ ms for the F_x -core and $\tau > 5$ ms for native complexes). These results are in qualitative agreement with the data on the kinetics of P_{700}^+ reduction obtained earlier using pulsed absorption spectrometry at cryogenic temperatures.

Keywords: photosystem I, kinetics of EPR spectra, low temperature measurements, forward and backward electron transfer, F_x -core, A_1 -core