



Системная и биология
физиология

СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ И СИСТЕМНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ: РЕГУЛЯЦИЯ СЛОЖНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Внутриклеточная сигнализация и
регуляция метаболизма

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ:



ISSN: 2949-0758

СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

СПЕЦИАЛЬНЫЙ ВЫПУСК

Третья международная конференция Системная биология и системная физиология Москва, 2-4 декабря 2022 г.

Организаторы конференции:

Федеральное государственное бюджетное учреждение Центр теоретических проблем физико химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН), г. Москва, Россия

Программный комитет:

Свешникова Анастасия Никитична – председатель программного комитета, д.ф.-м.н., зав. лабораторией клеточной биологии и трансляционной медицины НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия

Белогуров Алексей Анатольевич – д.х.н., заместитель директора по науке, ИБХ РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

Григорова Ирина Леонидовна – PhD. отдел молекулярных технологий, Институт трансляционной медицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Гудимчук Никита Борисович – д.ф.м.н. зав. лабораторией биофизики цитоскелета ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

Пантелеев Михаил Александрович – д.ф.м.н. профессор, член-корреспондент РАН, директор ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

Тюрин-Кузьмин Пётр Алексеевич – к.б.н. кафедра биохимии и молекулярной медицины, ФФМ МГУ, Москва, Россия

Шалыгин Алексей Вадимович – к.б.н. лаборатория ионных каналов и клеточных мембран Институт Цитологии РАН, Санкт Петербург, Россия

Шамова Екатерина Вячеславовна – к.б.н. зав. лаборатории медицинской биофизики, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Оргкомитет:

Филькова Александра Андреевна – председатель (ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия), *Ан О.И.* (ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия), *Корнейчук А.Д.* (ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия), *Мартьянов А.А.* (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия), *Болдырева А.А.* (ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия)

Адрес оргкомитета: 109029, Москва, ул. Средняя Калитниковская 30, ЦТП ФХФ РАН, тел.: 8 (495) 678-31-16, e-mail: info@ctppcrp.ru



Авторские права: [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

ISSN: 2949-0758

DOI:



Содержание

Регуляция физиологических процессов	4
Регуляция клеточного метаболизма	16
Кальциевая и GPCR сигнализация	27
Цитоскелет и механочувствительность	40
Ионные каналы и другая внутриклеточная сигнализация	51
Старение и программируемая гибель клетки	60
Тирозинкиназная и другая протеинкиназная сигнализация	71

Секция: Регуляция физиологических процессов

Идентификация белков, регулирующих дифференцировку фибробластов, в составе секрета МСК

М. А. Кулебякина¹, Д. А. Бутузова¹, Н. А. Басалова², Е. С. Войнова¹,
О. И. Клычников³, М. С. Арбатский¹, А. Ю. Ефименко^{1,2}

1. Факультет фундаментальной медицины, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. Институт регенеративной медицины, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
3. Биологический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) регулируют заживление тканей после повреждения, секретируя большое количество биологически активных соединений, причем за оказание значительной части биологических эффектов отвечают белки. В организме человека наиболее частым результатом заживления тканей является фиброз, ключевой клеточный механизм которого представлен дифференцировкой фибробластов в миофибробласты. Недавно мы продемонстрировали, что разделение кондиционированной среды (КС) МСК на фракции, содержащие внеклеточные везикулы (ВВ) и растворимые факторы (РФ), значительно увеличивает антифибротический эффект получаемых фракций секрета в модели TGF- β -индуцированной дифференцировки фибробластов в миофибробласты [1]. Мы предположили, что процедура фракционирования обогащает ВВ и РФ антифибротическими компонентами и приводит к обеднению этих фракций профибротическими компонентами. Для проверки этой гипотезы и выявления возможных механизмов действия секрета МСК на дифференцировку фибробластов был проведен сравнительный протеомный анализ образцов секрета МСК. Выделение фракций ВВ и РФ, а также концентрирование суммарной фракции КС секрета иммортализованных МСК жировой ткани человека (hTERT-ASC, ATCC) проводили методом ультрафильтрации. Затем из образцов получали триптические пептиды, которые подвергали хромато-масс-спектрометрическому анализу на приборе Q Exactive HF-X. Биоинформатический анализ проводили с использованием программ MaxQuant и Perseus. Результаты подтверждали методом вестерн-блоттинга. Всего было идентифицировано 563 белка, из которых 343 белка значительно различались по содержанию между фракциями секрета МСК. Выявлено, что фракции ВВ и РФ обогащены белками, взаимодействующими с компонентами сигнальных путей TGF- β , Notch и Wnt. Предположительно, антифибротический эффект фракций ВВ и РФ может быть реализован за счет влияния на эти сигнальные пути. Кроме того, обнаружено, что КС обогащена 107 белками, десять из которых (F10, MIF, SDF-1 и др.) способны активировать транскрипционный фактор NF- κ B. Предположительно эти белки препятствуют антифибротическому действию секрета МСК. Методом ОТ-ПЦР мы подтвердили, что КС, но не ВВ или РФ, увеличивает экспрессию генов-мишеней NF- κ B (CXCL1, IL1B, IL6 и т.д.) в фибробластах кожи человека. Таким образом, фракционирование повышает антифибротические свойства секрета МСК, в частности, за счет обеднения белками, стимулирующими экспрессию провоспалительных факторов.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ (№19-75-30007).

Ссылки:

1. Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles. N. Basalova, G. Sagaradze, M. Arbatskiy, E. Evtushenko, K. Kulebyakin, O. Grigorieva, Z. Akopyan, N. Kalinina, A. Efimenko. Cells, 2020, 1272, 9, 10.3390/cells9051272

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
2. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Рост тромба на поврежденной стенке сосуда может привести к образованию стабильного окклюзионного/субокклюзионного тромба или нестабильного эмболизирующего тромба. Оба исхода могут нанести значительный ущерб здоровью. До сих пор не ясно, какие механизмы регулируют максимально возможный размер тромба, стабильность тромба и эмболизацию как в микро-, так и в макроциркуляторном русле. Мы исследовали влияние потока и внутритромбальных сил на стабильность гомогенных и гетерогенных тромбов в широком диапазоне геометрии тромба, уровней активации тромбоцитов, диаметров сосудов и гидродинамических условий. Используя ранее разработанную 2D-модель на основе частиц и новую 3D-модель, мы показываем, что баланс сил между гидродинамическими силами, действующими на тромб, и механическими силами внутри тромба определяет стабильность тромба. Более того, мы нашли надежный количественный параметр, который мы назвали «коэффициент баланса сил», способный предсказать, будет ли гомогенный тромб (или оболочка гетерогенного тромба) с заданным уровнем активации тромбоцитов эмболизироваться или нет в данных гидродинамических условиях. Используя зависимость между коэффициентом баланса сил и падением потока в сосудах, закупоренном тромбом, мы определили критические уровни межтромбоцитарных сил, которые связаны со стабильным тромбом, вызывающим значительное падение потока как в артериолах, так и в артериях. Мы также показываем, что образование стабильного тромба, значительно снижающего кровоток в сосудах, менее вероятно в артериях по сравнению с артериолой, поскольку требуется гораздо более высокий уровень активации тромбоцитов, чтобы противостоять гидродинамическим силам. Кроме того, мы показываем, что более длинные субокклюзионные тромбы более стабильны, чем короткие. Этот результат подтверждает идею о том, что размер повреждения может быть критическим фактором, влияющим на исход местного гемостатического ответа с точки зрения окклюзии сосуда. Суммарно наши результаты дают новое представление о взаимодействии между критическими межтромбоцитарными силами, локальной гидродинамикой и общей устойчивостью тромба к потоку. Разработанный подход в дальнейшем может быть применен в широком круге задач, включая анализ стабильности тромбов, образующихся на атеросклеротических бляшках, стабильности гемостатических пробок и других типов клинически значимых сценариев.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 22-24-01028

Ссылки:

1. Modeling Thrombus Shell: Linking Adhesion Receptor Properties and Macroscopic Dynamics. V. Kaneva, J. Dunster, V. Volpert, F. Ataullahanov, M. Panteleev, D. Nechipurenko. Biophysical Journal, 2021, 334-351, 120, 10.1016/j.bpj.2020.10.049
2. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. T. Stalker, E. Traxler, J. Wu, K. Wannemacher, S. Cermignano, R. Voronov, S. Diamond, L. Brass. Blood, 2013, 1875-1885, 121, 10.1182/blood-2012-09-457739
3. Analysis of microvascular thrombus mechanobiology with a novel particle-based model. A. Masalceva, V. Kaneva, M. Panteleev, F. Ataullakhanov, V. Volpert, I. Afanasyev, D. Nechipurenko. Journal of Biomechanics, 2022, 110801, 130, 10.1016/j.jbiomech.2021.110801

Исследование возможного влияния окислительной модификации на структуру и функциональную активность плазминогена

А. Д. Васильева¹, Е. С. Гаврилина¹, Л. В. Юрьина¹, В. Иванов¹, Д. Гусарова¹,
М. И. Индейкина², А. Е. Бугрова¹, А. С. Кононихин², Е. Н. Николаев³, М. А.
Розенфельд¹

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия
2. Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
3. Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва, Россия

В настоящей работе впервые изучено влияние HOCl/OCl^- и H_2O_2 -индуцированного окисления Glu-плазминогена на повреждение его первичной структуры и биологическую активность плазмина, образующегося из окислительно модифицированного профермента. Результаты, полученные с помощью МС/МС, электрофореза и колориметрии, показали, что ни один из окисленных аминокислотных остатков, обнаруженных в проферменте, обработанном 25 мкМ HOCl/OCl^- или 100 мкМ H_2O_2 , не был функционально значимым для плазминогена. Однако обработка плазминогена повышением концентрации HOCl/OCl^- от 25 до 100 мкМ или H_2O_2 от 100 до 300 мкМ способствовала частичной потере активности плазмина.

Обнаружены модифицированные аминокислотные остатки метионина (Met57, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met788). Окисление этих аминокислотных остатков не приводит к снижению активности плазмина, образующегося из окисленного плазминогена.

Некоторые из обнаруженных модификаций в функционально значимых аминокислотных остатках (Trp235, Trp417, Trp427, Tyr672 и Trp761) могут быть причиной снижения биологической активности плазминогена в данном случае. Поскольку Trp235 и Trp417 подвергались модификации под действием обоих окислителей (100 мкМ HOCl/OCl^- или 300 мкМ H_2O_2), потеря активности плазмина, образованного из окисленного Glu-плазминогена, скорее всего, связана с повреждением этих остатков.

В совокупности текущие результаты наряду с данными предыдущих исследований указывают на то, что нарушения в фибринолитической системе, связанные с окислительным стрессом, вряд ли связаны с потерей активности плазминогена.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда 21-74-00146.

Поиск маркеров эндотелиального генеза у лиц пожилого возраста с нарушением когнитивных функций

**П.И. Попова¹, И.В. Кудрявцев², А.С. Головкин³, М.К. Серебрякова²,
П.П. Авдонин⁴, И.А. Добрылко⁵, А.Ю. Токарев⁶, Ф.С. Великонивцев³, П.В. Авдонин⁴,
Н.В. Гончаров^{5,6}**

1. Городская поликлиника № 112, Санкт-Петербург, Россия
2. Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
3. ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
4. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
5. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия
6. НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Ленинградская обл., Россия

Среди острых неврологических расстройств, связанных с поражением эндотелиальных клеток (ЭК) сосудов мозга, наиболее известными являются инсульт, эпилепсия, травматические поражения головного и спинного мозга. Дисфункция гематоэнцефалического барьера является характерной особенностью как ишемического, так и геморрагического инсульта. Повреждение ЭК усиливает нарушение регуляции кровотока и приводит к развитию подкорковой сосудистой деменции (ПСД). Большинство факторов риска болезней малых сосудов (БМС) являются факторами риска ПСД и когнитивных расстройств. Имеющиеся достижения не решают проблему стратификации риска нейродегенеративных заболеваний и когнитивных расстройств на ранних стадиях их развития, да и на более поздних стадиях актуальной является разработка более дешевых и доступных методов диагностики с хорошими метрологическими характеристиками (чувствительность, специфичность, прогностическая значимость и др.). Целью настоящего исследования было иммунологическое-биохимическое профилирование лиц пожилого возраста (60-78 лет по классификации ВОЗ) с острыми или хроническими нарушениями мозгового кровообращения (ОНМК и ХНМК соответственно), а также лиц в состоянии преддиабета или нелеченого диабета 2 типа (СД). Для оценки психического статуса использовали методику MMSE и тест МОСА. Группой положительного контроля служили пациенты с болезнью Альцгеймера. Одна из основных задач – выявление маркеров эндотелиального генеза, свидетельствующих о дисфункции эндотелия в целом и эндотелия сосудов мозга в особенности. Полученные данные свидетельствуют об изменении психического статуса наряду с достоверными изменениями иммунологических и биохимических показателей у пожилых пациентов с ОНМК в анамнезе, ХНМК и СД. Значительная часть выявленных показателей отражает морфофункциональное состояние ЭК. Наибольшее количество отклонений выявлено в группе СД, наименьшее – в группе ОНМК.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-15-00155.

Изучение влияния окисления на структуру и функции фибриногена

Д. Гусарова¹, Л. В. Юрьина¹, А. Д. Васильева¹, Е. С. Гаврилина¹, С. И. Обыденный²,
А. С. Кононихин³, М. А. Пантелеев², М. А. Розенфельд¹

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия
2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
3. Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва, Россия

Фибриноген представляет собой высокомолекулярный растворимый белок плазмы, ответственный за образование фибрина. Будучи крайне уязвимой мишенью для оксидантов, фибриноген подвергается посттрансляционным модификациям, нарушающим структуру и функцию белка.

Объектами настоящего исследования были статическая структура и кинетика плазминового гидролиза фибринового сгустка в норме и в условиях окисления. И фибриноген, и плазминоген были флуоресцентно помечены FITC. Процесс изучался методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Статическая структура фибриновых гелей, обработанных перекисью, изменилась незначительно. Сгустки, окисленные гипохлоритом, имели тонкие фибриллы и уменьшенный диаметр пор (25 мкМ гипохлорита).

Лизис плазмينا сопровождался постепенной потерей содержания фибрина и накоплением в волокнах плазминогена. Фибриновая сеть оставалась неподвижной; наблюдалась незначительная потеря фибринсодержащего состава волокон после добавления плазминогена. Затем сгусток начинал менять свою геометрию, подвижность структуры увеличивалась, а длина волокон укорачивалась, что приводило к полному лизису фибринового геля. Плазминоген постепенно накапливался на неподвижных волокнах и оставался в подвижном и частично разъединенном сгустке до его полного расщепления. На последней стадии лизиса и фибрин, и плазминоген концентрировались на фрагментах сгустка, предположительно в результате уменьшения размеров волокна и/или агрегации разрозненных фрагментов фибриновой сети. Описанные эффекты характерны как для нативных, так и для окисленных гелей. Процесс лизиса фибрина, окисленного гипохлоритом, был замедлен по сравнению с нативным гелем. Это может быть связано с повышенной плотностью модифицированной структуры сгустка. Обработка фибриногена перекисью водорода не влияла на скорость лизиса сгустка вплоть до увеличения концентрации окислителя до 300 мкМ.

Данные сопоставлены с окислительными модификациями фибриногена. Ряд остатков метионина модифицировали при низких концентрациях перекиси водорода (10–25 мкМ). Эти концентрации оксиданта не влияли на структуру геля и скорость самосборки и лизиса сгустка. Модифицированные аминокислотные остатки не вызывали изменения биологической активности, поэтому мы предположили, что обнаруживаемые остатки метионина выполняют антиоксидантную функцию.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-00146).

Потенциальные антиагреганты и их влияние на тромбоциты человека

О.В. Демина¹, Н.И. Беликов¹, Е.И. Синауридзе^{2,3}, М.А.Пантелеев^{2,3},
Ф.И. Атауллаханов^{2,3}, С.Д. Варфоломеев¹, А.А. Ходонов¹

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия
2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
3. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

Наличие большого количества побочных эффектов и недостаточная эффективность применяемых в настоящее время антиагрегантов, а также рост популяции лиц пожилого возраста с комплексом хронических заболеваний стимулируют поиск новых химических соединений в качестве прототипов антиагрегантов нового поколения для комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Фактическими мишенями являются простаноидные рецепторы мембраны тромбоцитов.

Целью данной работы было выявление пространственных ограничений для объемных заместителей в положении 5 ряда 5-замещенных 3-(3-пиридил)изоксазолов и их 4,5-дигидропроизводных, а также выявление роли пиридина фрагмент в положении 3 в подавлении агрегации тромбоцитов с использованием селективного миметика рецептора тромбоксана A2 U46619 в качестве индуктора агрегации тромбоцитов.

Реакция Хьюсена [3+2]циклоприсоединения нитрилоксидов к терминальным алкинам или алкенам была использована для получения 5-замещенных 3-(3-пиридил)изоксазолов и их 4,5-дигидропроизводных. Ацилирование пиридин-3-карбоксамидоксима бензоилхлоридом с последующей циклизацией использовали для получения 3,5-бизамещенного 1,2,4-оксадиазола. Использовали ЯМР-спектроскопию и масс-спектрометрию. Для определения антиагрегационной активности использовали лазерный агрегометр «Биола» (Россия) на основе турбидиметрического метода Борна и взвеси отмытых тромбоцитов. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов человека использовали арахидоновую кислоту и U46619. Для разработки прототипов новых антитромбоцитарных агентов на основе нашего каркаса, 3-пиридилизоксазола, мы изучили пространственные ограничения для объемных заместителей в положении 5 изоксазольного кольца. Соединения I серии на основе 3-(3-пиридил)изоксазола и его 4,5-дигидропроизводных проявляют антиагрегантную активность в диапазоне значений IC₅₀ от 8×10⁻⁶ до 4,2×10⁻⁴ моль/л. Для выявления роли пиридинового фрагмента в положении 3 в подавлении U46619-индуцированной агрегации тромбоцитов использовали 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазол, его позиционный изомер и биоизостер: все соединения подавляли этот процесс.

Впервые полученные данные для соединений I ряда показали их перспективность для разработки новых антитромбоцитарных препаратов. Показано, что позиционный изомер обладает антитромбоцитарной активностью, подавляя агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную U-46619 или арахидоновой кислотой, а скаффолд - 3-(3-пиридил)изоксазол - более активен.

Финансирование: Работа частично поддержана РФФИ (грант № 20-03-00139_a)

Влияние ориентации коллагеновых волокон на образование тромбов

Е. А. Мельникова^{1,2}, Д. Ю. Нечипуренко^{1,2}, М. А. Пантелеев^{1,2}

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

Известно, что коллагеновые волокна в сосудах ориентированы, но нет данных о влиянии ориентации волокон на гемостаз. Используя микрофлюидный подход, мы показываем, что существуют различия в образовании тромбов на коллагеновых волокнах, ориентированных параллельно и перпендикулярно току крови. Различия в покрытии поверхности и высоте тромбов становятся более выраженными, когда скорость кровотока превышает венозную. При высоких скоростях сдвига тромбы, как правило, выше и занимают большую площадь на продольных волокнах. Для раскрытия механизмов этого эффекта использовали высокоскоростную эпифлуоресцентную микроскопию и иммуноокрашивание. Эти методы позволили сопоставить первые этапы образования агрегатов и отметить, что тромбоциты дольше взаимодействуют и перемещаются дальше при их первичной адгезии к продольным волокнам.

Мы также обнаружили, что лишь небольшая часть коллагеновых волокон связывает ФФВ и поддерживает адгезию тромбоцитов при высоких скоростях сдвига.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-24-01028.

Гибридная компьютерная модель гемодинамических изменений при повреждениях сосудистой сети руки человека

Г. А. Быков^{1,2}, М. А. Пантелеев¹⁻³

1. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
3. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

Гемодинамика играет критическую роль в регуляции ряда звеньев системы гемостаза: поток удаляет активные формы факторов свёртывания из места повреждения, доставляет туда же компоненты крови, изменяет конформацию адгезивных белков и рецепторов тромбоцитов и отрывает адгезировавшие тромбоциты от тромбоцитарного сгустка. Чтобы понять причины, приводящие к патологическому или физиологическому исходам работы системы гемостаза, необходимо исследовать изменяющиеся в процессе работы системы гемостаза гемодинамические условия. Мы разработали гибридную многомасштабную компьютерную модель, описывающую гемодинамику системы сосудов руки человека глобальными параметрами (давление крови, объём крови), а гемодинамику повреждённой части системы (прокол, катетеризация, рассечение, стеноз сосуда) детально при помощи полей скоростей и давлений в области ранения. С помощью модели показано, что в области прокола срединной локтевой вены, вблизи границы раны наблюдаются скорости сдвига порядка десятков тысяч обратных секунд, а в области прокола лучевой артерии – порядка сотен тысяч обратных секунд. Зависимость скорости сдвига от радиуса просвета сосуда при стенозе и от радиуса повреждения при проколе имеет колоколообразную форму. При этом высота пика в лучевой артерии (700000 с^{-1} при проколе) всегда выше, чем в срединной локтевой вене (70000 с^{-1} при проколе), а высота пика при проколе больше высоты при стенозе (4000 с^{-1} для лучевой артерии и 110 с^{-1} для срединной локтевой вены). Наличие катетера в сравнении с проколом уменьшает высоту пика и увеличивает его ширину, что при определённых соотношениях длины катетера и радиуса прокалываемого сосуда будет приводить к разным реологическим условиям у разных пациентов при использовании одной и той же иглы и прокалывании анатомически аналогичной вены. Аналогичные изменения наблюдаются для зависимостей потоков и давлений от радиусов. Модель прогнозирует, что при рассечении или проколе иглой различного диаметра срединной локтевой вены или лучевой артерии существенное изменение давлений ($\leq 10\%$) распространяется не дальше, чем на один соседний сосуд, но изменение потоков ($\geq 10\%$) будет заметно на всех сосудах ниже по течению, чем повреждённый. Влияние распространится и выше по течению на все сосуды того же типа, что и повреждённый (артерия/вена). Разработанная модель поможет понять причины, обуславливающие патологический или физиологический исходы гемостаза, и разработать терапию, влияющую прицельно только на механизмы тромбоза, и не затрагивающую гемостаз.

Финансирование: Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ 075-15-2022-242.

Особенности хемотаксиса нейтрофилов у пациентов с синдромом Швахмана-Даймонда и Казабаха-Мерритт

Д. П. Лазутова¹, А. А. Болдырева², Е. А. Деордиева³, И. П. Тесаков³,
Ю. Д. Д. Коробкина², А. А. Мартынов^{2,3}, Л. А. Хачатрян³, А. Ю. Щербина³,
М. А. Пантелеев^{2,3}, А. Н. Свешникова^{2,3}

1. Федеральное Государственное Автономное Образовательное Учреждение Высшего Образования Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
3. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

Введение: Синдром Швахмана-Даймонда (СШД) – редкое (1:50 000–1:76 000) генетическое заболевание, сопровождающееся легкой тромбоцитопенией ($< 150 \times 10^9$), нейтропенией ($< 1,5 \times 10^9$) и нарушением хемотаксиса нейтрофилов. Феномен Казабаха-Мерритт (ФКМ) – это тромбоцитопеническая коагулопатия, связанная с капошиформной гемангиоэндотелиомой, и характеризующаяся выраженной тромбоцитопенией ($< 50 \times 10^9$) и гипофибриногенемией. Особенности поведения иммунных клеток при данных заболеваниях мало изучены.

Цели: Анализ особенностей тромбообразования и движения нейтрофилов в области растущего тромба *ex vivo* у пациентов с СШД и ФКМ.

Методы: В исследование было включено 4 пациента с СШД и 4 пациента с ФКМ и проведено их сравнение с соответствующими по возрасту педиатрическими здоровыми донорами. Наблюдение за поведением нейтрофилов *ex vivo* проводилось в плоско-параллельной проточной камере. Анализ данных, включающих измерение площадей тромбов, а также скорости движения нейтрофилов был произведен с помощью программного обеспечения, реализованного в Python.

Результаты: У пациентов с СШД наблюдались меньшие значения скорости движения нейтрофилов и площади тромбов по сравнению с группой контроля. При ФКМ, напротив, отличия в скорости движения нейтрофилов были статистически незначимы, а различия в тромбообразовании могут быть обнаружены только после 30-й минуты.

Закключение: Наблюдение за иммунными клетками в плоско-параллельной камере позволяет отслеживать скорость и направление движения нейтрофилов, площадь и интенсивность роста тромбов. Скорость движения нейтрофилов не зависит от потока крови, это позволяет предположить, что наблюдаемое движение действительно является хемотаксисом и данная модель подходит для его изучения у пациентов с гематологическими нарушениями.

Финансирование: Работа поддержана грантом 20-45-01014

Системная регуляция физиологических процессов: что позволяет понять теория функциональных систем П.К. Анохина

А. Е. Умрюхин¹

1. Федеральное Государственное Автономное Образовательное Учреждение Высшего Образования Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Важным аспектом анализа физиологических процессов служит представление организма в качестве пассивного элемента, воспринимающего воздействия и реагирующего на них с целью сохранения постоянства внутренней среды, или как активного участника с собственной целенаправленной деятельностью, осуществляемой во внешних и внутренних условиях на основе предвидения будущих событий с учётом результативности индивидуального опыта [1]. Системообразующим фактором в физиологических взаимодействиях выступает полезный целенаправленный результат деятельности живого организма, для достижения которого организуется взаимодействие доступных организму физиологических реакций [2]. Целенаправленная деятельность организма подчиняется доминирующему мотивационному возбуждению на основе физиологических механизмов активного достижения актуальных для организма целей с учётом более важного для организма результата, достигаемого посредством взаимодействия доступных для него сформированных ранее и формируемых непрерывно с учётом результативности стратегий и элементов индивидуального опыта.

Физиологические процессы организма имеют иерархическое распределение по уровню их результативности пропорционально объёму реализуемых реакций, в соответствии с которыми осуществляется их регуляция на соответствующих уровнях. Современные представления о нейробиологии мотиваций и их реализации в поведении позволяют раскрыть механизмы физиологических реакций различного временного порядка в структуре непрерывной жизнедеятельности. Дофаминергическая нейротрансмиссия обеспечивает реализацию как быстрых фазических процессов, важных для координирующего предсказательного обеспечения деятельности и для обучения, так и протяжённых во времени тонических функций, имеющих значение для долгосрочного поддержания активности и мотивационного обеспечения [3,4]. Особенности дофаминергической нейротрансмиссии могут быть интерпретированы на основе анализа целеполагания экспериментального животного, его прогноза о вероятности достижения результата и оценки соответствия достигнутого результата ожидаемому [5]. Таким образом, при системном анализе физиологических процессов и их регуляции критически важным служит учёт следующих факторов: целенаправленной организации изучаемых процессов жизнедеятельности, результативности их взаимодействия с учётом исходного целеполагания, доминирующего взаимодействия различных физиологических процессов на основе их важности для целенаправленной деятельности организма, иерархического распределения объёмов функций организма и структуры их регуляции на различных уровнях. Учёт системных закономерностей регуляции физиологических функций позволяет проводить интерпретацию результатов изучения процессов в изолированных условиях и оценивать особенности их реализации в целостном организме.

Ссылки:

1. Neuronal metabolism in learning and memory: The anticipatory activity perspective. Y. Alexandrov, M. Pletnikov. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2022, 104664, 137, 10.1016/j.neubiorev.2022.104664
2. Biology and Neurophysiology of the Conditioned Reflex and its Role in Adaptive Behavior. PETER K. ANOKHIN. None, 1974, None, None, 10.1016/C2013-0-02871-X
3. What does dopamine mean?. J. Berke. *Nature Neuroscience*, 2018, 787-793, 21, 10.1038/s41593-018-0152-y
4. Prolonged dopamine signalling in striatum signals proximity and value of distant rewards. M. Howe, P. Tierney, S. Sandberg, P. Phillips, A. Graybiel. *Nature*, 2013, 575-579, 500, 10.1038/nature12475

Влияние обогащенной среды или социальной изоляции на соматическую болевую чувствительность крыс в норме и при патологии (диабет)

Н. И. Ярушкина¹, О. П. Комкова¹, Т. Т. Подвигина¹

1. ФГБУН Институт Физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт Петербург, Россия

Боль играет важную роль в защите организма от вредных раздражителей. Однако чрезмерная или постоянная боль в течение длительного времени приводит к патологическим явлениям. Прекондиционирование стрессом может модулировать боль, вызывая гипералгезию или анальгезию в зависимости от характера, продолжительности и величины стрессора, а также болевого раздражителя. В настоящей работе изучали влияние стрессорного прекондиционирования на соматическую болевую чувствительность крыс в норме и при патологии (сахарный диабет). В качестве прекондиционирования к стрессу использовали обогащенную среду (ОС) или социальную изоляцию в течение 1 мес. Крыс в возрасте 30 дней разделяли на группы и помещали по 6 крыс в стандартную клетку (контроль) или по 1 крысе в стандартную клетку (изоляция) или по 6 крыс в обогащенную клетку. Поскольку произвольный бег с колесом является одним из ключевых элементов ЭЭ, мы изучали влияние бега на соматическую болевую чувствительность как таковую. Применялись два вида бега: однократный форсированный бег на тредмиле (9 м/мин, 15 мин или 15 м/мин, 20 мин) и повторный произвольный бег в колесе в течение 5 дней (2 ч/день). Соматическую болевую чувствительность оценивали с помощью теста «горячая пластина» или «отдергивание хвоста». В нормальных условиях как принудительная беговая дорожка, так и произвольный бег на колесе снижали соматическую болевую чувствительность, что сопровождалось повышением уровня кортикостерона в плазме. Удержание ЭЭ приводило к снижению соматической болевой чувствительности (увеличение латентного периода облизывания лапы (PLL)) по сравнению с контрольными животными. Изоляция оказывала двоякое влияние на соматическую болевую чувствительность: вызывала как увеличение PLL (у 50% крыс), так и снижение PLL (у 50% крыс) по сравнению с контролем. Диабет, индуцированный введением стрептозотоцина (60 мг/кг внутрибрюшинно), вызывал усиление соматической болевой чувствительности (гипералгезия). ЭЭ предотвращал гипералгетический эффект диабета, тогда как изоляция не только предотвращала гипералгезию, вызванную диабетом, но и приводила к ослаблению соматической болевой чувствительности (гипоалгезии). Полученные данные свидетельствуют о зависимости эффектов стрессорного прекондиционирования от состояния организма.

Финансирование: При поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-15-2020-921 на создание и развитие научного центра мирового уровня «Павловский центр «Интегративная физиология - в медицину, высокотехнологичное здравоохранение» и технологии стрессоустойчивости»).

Гастропротекторная роль кортикотропин-рилизинг фактора: участие глюкокортикоидов

Л. П. Филаретова¹, О. Ю. Морозова¹

1. ФГБУН Институт Физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт Петербург, Россия

Кортикотропин-рилизинг-гормон (CRF) является центральным медиатором способности организма реагировать на стресс. CRF играет решающую роль в поддержании гомеостаза посредством стимуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. CRF-рецепторы 1 типа на кортикотропных клетках гипофиза являются первичными рецепторами, опосредующими повышение уровня АКТГ при стрессе. Активация сигнальной системы CRF вовлечена в расстройства, связанные со стрессом, включая желудочно-кишечные расстройства. В то же время имеются данные, свидетельствующие о защитном действии экзогенного CRF на слизистую оболочку желудка от повреждения, вызванного стрессом от удерживания на холоде (cold-restraint, CR). Кроме того, мы обнаружили гастропротекторное действие CRF при индометацин (IM)-индуцированном повреждении желудка. Однако оставалось неизвестным, способствуют ли глюкокортикоиды, высвобождаемые в ответ на инъекцию CRF, его гастропротекторному эффекту. В нашей работе мы изучали, может ли экзогенный CRF защищать слизистую оболочку желудка от ulcerогенного действия 3-часового стресса CR, а также приема индометацина (35 мг/кг, подкожно) за счет вовлечения глюкокортикоидов. Введение CRF в значительной зависимости от дозы повышало уровень кортикостерона в плазме и так же подавляло возникновение эрозии желудка. Для оценки роли глюкокортикоидов в индуцированной CRF гастропротекции изучали влияние CRF (1,25 мкг/кг) на эрозию желудка, вызванную 3-часовым CR стрессом и IM, после острого снижения высвобождения кортикостерона с помощью метирапона (30 мг/кг, внутривбрюшинно, за 30 мин до введения CRF) или антагонистом рецепторов к CRF 1 типа NBI 27914 (10 мг/кг, внутривбрюшинно, за 15 мин до введения CRF), а также после занятости глюкокортикоидных рецепторов их антагонистом RU-38486 (20 мг/кг, внутривбрюшинно за 2 ч до введения CRF). Эффекты сравнивали с таковыми у контрольных крыс без острого снижения высвобождения кортикостерона или захвата глюкокортикоидных рецепторов. Как метирапон, так и NBI 27914, введенные незадолго до введения CRF, вызывали ингибирование CRF-индуцированного кортикостеронового ответа и предотвращали защитный эффект CRF на слизистую оболочку желудка от повреждения, вызванного стрессом CR и IM. Гастропротекторный эффект CRF также устранялся предварительным лечением антагонистом глюкокортикоидных рецепторов RU-38486. В заключение, полученные результаты свидетельствуют о том, что CRF может защищать слизистую оболочку желудка от повреждений, вызванных CR стрессом и IM, за счет участия глюкокортикоидов.

Финансирование: Поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ) № 19-15-00430

Биофизическая характеристика дермальных фибробластов человека в составе биомедицинского клеточного продукта

А. Г. Бутенко¹, С. В. Пинчук¹, И. Д. Волотовский¹

1. ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии» НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Проблема лечения ожогов является чрезвычайно актуальной. Обычно ожоговые пациенты получают общее и местное лечение, включающее в себя повязки с различными препаратами. В последние годы пристальное внимание комбустиологов привлекают методы лечения ожогов на основе клеточных технологий.

В Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси совместно с Белорусской академией последипломного образования был разработан биомедицинский клеточный продукт (БМКП) на основе фибробластов и кератиноцитов кожи человека. БМКП представляет собой иммобилизованные кератиноциты и фибробласты дермы человека в соотношении 1:4 в 1%-ном коллагеновом Коллост-геле, которые наносятся послойно на раневое покрытие из хитозана [1]. Получены данные об основных морфологических и фенотипических характеристиках клеточных культур: их пролиферативная активность и жизнеспособность, генотоксичность, а также биосовместимость фибробластов с органическими матрицами [2]. Коллост гель широко используется в медицине для заполнения дефектов кожи, костей, раневых поверхностей и др. Обзор литературы показал, что исследования по использованию Коллост геля были направлены на изучение его токсичности, совместимости, отсутствия иммуногенности, эффективности заживления раневого дефекта.

Целью нашего исследования было изучить биофизическое состояние фибробластов кожи человека в Коллост геле в составе БМКП, а именно получить данные о содержании внутриклеточного кальция, активных форм кислорода (АФК) и текучести липидного слоя мембран.

Фибробласты помещали в Коллост гель, инкубировали 30 и 60 минут, а затем с помощью зонда Fluо-3АМ определяли содержание внутриклеточного ионизированного кальция, АФК определяли с помощью 2,7-дихлорфлуоресцеина ацетата с последующим моделированием окислительного стресса 100 мкМ перекисью водорода текучесть липидного слоя мембран исследовали с использованием дифенилгексатриена.

Полученные данные показали, что Коллост гель не индуцирует окислительный стресс в фибробластах, мембрана клеток не повреждается и не происходит увеличение содержания внутриклеточного кальция, текучесть мембран не изменяется.

Ссылки:

1. Эффективность лечения ожоговой травмы на модели сплошного и мозаичного ожогов у животных с использованием тканевого эквивалента кожи. 1. Часнойть А.Ч., Василевич И.Б., Квачева З.Б., Бутенко А.В., Матиевский К.А., Басалай В.М., Владимирская Т.Э., Подгайский В.Н., Волотовский И.Д. Медицинский журнал, 2022, 24-29, 3, doi.org/10.51922/1818-426X.2022.3.24
2. Tissue dermal equivalent – a cellular product based on human dermal keratinocytes and fibroblasts: the properties of equivalent components and perspectives of practical application. A. Butenka, Z. Kvacheva, I. Vasilevich, A. Chasnoit, I. Volotovskii. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series, 2021, 391-401, 66, 10.29235/1029-8940-2021-66-4-391-401

Исследование активности пероксидазы различающихся по солеустойчивости растений на ранних этапах онтогенеза при засолении

Б.А. Джафарзаде¹, В.Б. Абдыев¹, С.М. Исмаилова¹, Н.Ф. Алыева¹, А.М. Гасанова¹

1. Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

Проблема адаптации растений к меняющимся условиям среды находится в центре внимания современной физиологии и биохимии. Одним из негативных факторов среды является засоление почв важная проблема, приводящая к снижению биоразнообразия и продуктивности растений. Возрастающий интерес к ней объясняется тем, что около 25% почв земного шара в той или иной мере засолены, а более поверхности нашей планеты покрыта водами Мирового океана, где содержание солей, в основном NaCl достигает 3-4%, а хлористые соединения составляют 88,8%. По прогнозам к 2050г. значительному засолению могут подвергнуться более 50% возделываемых территорий. Кроме того, неквалифицированное использование мелиоративных и оросительных систем часто приводит к так называемому вторичному засолению почв, что является одной из серьезных причин снижения урожайности сельскохозяйственных культур.

Следовательно, познание механизма действия солей на растения и приспособительных реакций растительных организмов имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение. Поэтому во всем мире проблеме солеустойчивости растений уделяется особое внимание. Засоленные почвы в нашей республике занимают огромные площади, поэтому разработка различных способов для повышения солерезистентности различных организмов является очень актуальной и крайне необходимой.

С этой целью перед посевом семена замачивались в растворах калий-перманганат, перекиси водорода и нитратных солей в концентрации 1 mM в течение 15 часов. Установлено, что замачивание семян ячменя и хлопчатника в вышеуказанных растворах способствовало усилению всхожести, энергопрорастания в условиях сильного засоления почвы (0,8-1,0% NaCl). Интенсификация метаболических процессов у проросших семян под действием указанных препаратов отражается на их ростовых процессах, так как рост надземных частей проростков увеличивается в 2-3 раза.

Для выяснения отрицательного действия засоления на растения особое значение приобретает изучение ферментативных процессов в растительной клетке, происходящих сразу же после воздействия солей, поскольку именно первичные процессы являются определяющими для дальнейшего изменения внутриклеточных обменных реакций в растительном организме.

Выявлено, что активность пероксидазы подземных и надземных органов у водных культур выше, чем у почвенных. Кроме того, активность пероксидазы под влиянием солей 4-6-8-10 дневных проростков ячменя и хлопчатника линейно увеличивается.

Как известно при действии на растения высоких концентраций солей в клетке наблюдается накопление в избыточном количестве перекисей, что является проявлением токсического действия отмеченного фактора на растительный организм. Предполагается, что повышение активности пероксидазы растительного организма при действии солей связано с защитным механизмом клеточного метаболизма.

Фильтруемость эритроцитов у пациентов с COVID-19

Д. С. Прудинник^{1,2}, Е. И. Синауридзе^{1,2}, С. С. Шахиджанов^{1,2}, Е. А. Бовт^{1,2},
Д. Н. Проценко³, А. Г. Румянцев¹, Ф. И. Атауллаханов^{1,2,4-6}

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
3. Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка», Москва, Россия
4. Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA
5. Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
6. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Влияние COVID-19 на микрореологию эритроцитов в капиллярах изучали у 149 пациентов с различной степенью тяжести состояния. Измеряли фильтруемость эритроцитов через фильтры с размером пор 3,5 мкм. Увеличение количества эритроцитов, гематокрита и концентрации в крови гемоглобина, альбумина и общего белка положительно сказывались на микрореологии и повышали фильтруемость эритроцитов. Этот эффект был противоположен влиянию этих параметров на деформируемость эритроцитов, измеренную с помощью метода эктацитометрии, и общую макрореологию крови, так как при их повышении увеличивается вязкость крови. Фильтруемость значительно снижалась с увеличением С-реактивного белка, что свидетельствовало о влиянии воспаления на микрореологию крови в капиллярах, а также с нарастанием тяжести состояния больного. Быстрое динамическое снижение фильтруемости при госпитализации являлось показателем неблагоприятного прогноза. При этом в группе пациентов с наименьшей фильтруемостью ($\leq 0,65$) отмечена 100% летальность. Таким образом, фильтруемость эритроцитов может быть использована для оценки тяжести состояния пациента и для прогнозирования изменения его состояния при COVID-19.

Влияние расстояния между мембранами в кристе митохондрии на скорость диффузии цитохрома С к сайту связывания III дыхательного комплекса. Модель броуновской динамики

А. М. Абатурова¹, Г. Ю. Ризниченко¹

1. Биологический факультет, кафедра биофизики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия

Методом криоэлектронной томографии [1] показано, что у больных синдромом Лея затруднение производства АТФ сопряжено с увеличением толщины люмена кристы (ТЛК) митохондрий с 12 ± 3.2 нм до 16.4 ± 5.9 нм. Падение производства АТФ связано с замедлением электронного транспорта в дыхательной электрон-транспортной цепи. В люмене кристы единственным участком митохондриальной цепи, где электронный транспорт осуществляется подвижным переносчиком, является перенос электрона от комплекса III к комплексу IV цитохромом с (цитС). ЦитС является небольшим (около 12 кДа) гем-содержащим белком. С помощью программы броуновской динамики ProKSim [2] мы построили модель диффузии молекулы цитС в участке кристы, содержащем неподвижный димер III дыхательного комплекса (III₂). Использовали PDB координаты атомов димера III комплекса 1BGY и цитС 6FF5 быка. ЦитС рассматривали в окисленном состоянии, цитохром С1 (цитС1) субъединицы PIII₂ - в восстановленном. Моделировали случаи ТЛК 12 нм и 16 нм, величина реакционного объема оставалась постоянной, длина мембраны 26-30 нм. Рассчитывали траектории движения цитС из начального положения между III и IV дыхательными комплексами, шаг по времени в модели был 100 пс. Показано, что в процессе диффузии ЦитС предпочтительно занимает две области около цитС1. Одна расположена на расстоянии 1-2 нм над поверхностью цитС1 в области гема. В этой области самое меньшее расстояние между атомами Fe цитохромов из наиболее вероятных 3 вариантов составляет 3 нм. Это положение соответствует комплексу III₂С1-цитС, в котором после конформационных перестроек происходит редокс реакция. Вторая область смещена на 1.5 нм от гема в плоскости, параллельной мембране, образуя «депо» молекул цитС, потенциально участвующих в электронном транспорте. При увеличении расстояния между мембранами с 12 до 16 нм в модели среднее время диффузии цит С в область «1» увеличивается с 7.9 мкс до 8.5 мкс, среднее время диффузии в область «2» уменьшается с 15 мкс до 13 мкс. Таким образом, при увеличении расстояния между мембранами кристы митохондрии наличие второй электростатически выгодной области для цитС замедляет транспорт электрона.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500060-0.

Ссылки:

1. Three-Dimensional Analysis of Mitochondrial Crista Ultrastructure in a Patient with Leigh Syndrome by In Situ Cryoelectron Tomography. S. Siegmund, R. Grassucci, S. Carter, E. Barca, Z. Farino, M. Juanola-Falgarona, P. Zhang, K. Tanji, M. Hirano, E. Schon, J. Frank, Z. Freyberg. iScience, 2018, 83-91, 6, 10.1016/j.isci.2018.07.014
2. Multi-particle Brownian Dynamics software ProKSim for protein-protein interactions modeling. S. Khrushchev, A. Abaturova, A. Diakonova, D. Ustinin, D. Zlenko, V. Fedorov, I. Kovalenko, G. Riznichenko, A. Rubin. Computer Research and Modeling, 2013, 47-64, 5, 10.20537/2076-7633-2013-5-1-47-64

Роль компонентов секретома, ассоциированного со старением, в развитии инсулинорезистентности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

**Е. С. Войнова¹, К. Ю. Кулебякин^{1,2}, О. А. Григорьева², Е. С. Новоселетская²,
Н. А. Басалова², Н. А. Александровская², М. С. Арбатский², М. А. Вигровский²,
А. А. Зиновьева¹, Е. Бахчинян¹, П. А. Тюрин-Кузьмин¹, А. Ю. Ефименко²**

1. Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Россия
2. Институт регенеративной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Россия

Одной из существенных причин развития заболеваний при старении является нарушение обновления тканей. В частности, нарушение обновления жировой ткани может привести к ожирению, метаболическому синдрому, сахарному диабету и другим заболеваниям. Мультипотентные стромальные клетки (МСК) отвечают за обновление жировой ткани. При старении пул этих клеток истощается, и они постепенно утрачивают репаративную, регенеративную и гомеостатическую функции. Инсулин отвечает за индукцию адипогенной дифференцировки и пролиферации МСК. Нарушения чувствительности МСК к инсулину могут негативно влиять на обновление жировой ткани.

Целью нашей работы было выяснить, как с возрастом снижается адипогенный потенциал МСК и какова роль изменения чувствительности к инсулину в этом процессе.

В работе использовали МСК подкожно-жировой клетчатки живота, полученные от молодых и пожилых (старше 65 лет) доноров, а также МСК, индуцированные к накоплению признаков старения при длительном культивировании (репликативное старение). Для активации адипогенной дифференцировки клетки обрабатывали инсулином, дексаметазоном и изобутилметилксантином. Эффективность дифференцировки оценивали по цитофлуоресцентному окрашиванию красителем NileRed. Кроме того, дифференцировку оценивали с помощью ПЦР в реальном времени на основе экспрессии ключевых маркеров дифференцировки.

Получение внеклеточных везикул (ВВ), осуществляли при плотности посадки клеток 80-90% от монослоя. Добавляли среду для кондиционирования, по истечении 2 суток среду отбирали и центрифугировали через ультрафильтры-концентраторы с пористым фильтром. Верхний резервуар содержал фракцию, обогащенную ВВ.

Активность инсулинзависимых внутриклеточных сигнальных каскадов оценивали методом иммуноблоттинга.

Результаты:

1. При старении произошло значительное снижение адипогенного потенциала МСК.
2. В сенесцентных клетках базальный уровень активации инсулиновых сигнальных каскадов на уровне Erk и Akt увеличивался.
3. Добавление ВВ из молодых МСК к старым клеткам восстанавливало адипогенный потенциал, а добавление ВВ из старых МСК к молодым клеткам снижало его.
4. Добавление ВВ из старых клеток к молодым МСК приводило к усилению их ответа на инсулин.
5. Сенесцентные МСК продуцировали ВВ с повышенным содержанием микроРНК, мишенью которых являются компоненты инсулинзависимых сигнальных каскадов.

Таким образом, с возрастом происходит снижение адипогенного потенциала МСК, связанное с индукцией инсулинорезистентности внеклеточными везикулами сенесцентных клеток.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№19-29-04172)

Роль трансмембранных градиентов Na⁺ и K⁺ в стабилизации объема эритроцитов человека

М.В. Мартынов¹, Ф.И. Атауллаханов¹⁻⁵, В.М. Витвицкий¹

1. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
2. Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA
3. Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
4. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
5. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева

Функциональная эффективность эритроцитов зависит от их высокой деформируемости, что позволяет им проходить через узкие тканевые капилляры. Эритроциты могут легко деформироваться за счет дисковидной формы, обеспечиваемой стабилизацией оптимального объема клетки при заданной площади клеточной поверхности. С помощью математического моделирования была изучена роль транспортной Na/K-АТФазы и трансмембранных градиентов Na⁺ и K⁺ в стабилизации объема эритроцитов человека при неселективном повышении проницаемости клеточных мембран для катионов. Модель включала Na/K-АТФазу, активируемую внутриклеточными ионами натрия, трансмембранными градиентами ионов Na⁺ и K⁺, и учитывала вклад гликолитических метаболитов и адениновых нуклеотидов в осмотическое давление цитоплазмы. Мы обнаружили, что эта модель обеспечивает наилучшую стабилизацию объема эритроцита при неселективном повышении проницаемости клеточной мембраны, которое может быть вызвано окислением компонентов мембраны или механическим напряжением при циркуляции. Объем эритроцита отклоняется от оптимального значения не более чем на 10 % при изменении неселективной проницаемости клеточной мембраны для катионов от 50 до 200 % от нормы. Если присутствует только один трансмембранный ионный градиент (Na⁺), клетка теряет способность стабилизировать объем, и даже небольшие изменения проницаемости мембраны вызывают резкое изменение объема клетки. Наши результаты показывают, что наличие двух противоположно направленных трансмембранных градиентов ионов принципиально важно для надежной стабилизации клеточного объема в эритроцитах человека.

Сенситизация альфа1А-адренорецепторов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках: механизмы регуляции метаболического статуса

В. И. Чечехин¹, А. М. Иванова¹, В. Ю. Сысоева¹, П. В. Максимчик², Н. И. Калинина¹, П. А. Тюрин-Кузьмин¹

1. Кафедра биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия
2. Лаборатория исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) располагаются периваскулярно в строме большинства тканей организма человека. МСК участвуют в регуляции гомеостаза ткани путем секреции ряда факторов роста и цитокинов, формирования стромы ткани, а также за счет дифференцировки в различные типы клеток. При этом ниша МСК находится под строгим нейроэндокринным контролем [1]. А нарушение ее работы связано с развитием ряда заболеваний. Одним из наиболее распространенных заболеваний, связанных с нарушением активности МСК, является ожирение. Рост объема жировой ткани может происходить в результате увеличения количества и размера жировых капель в имеющихся адипоцитах. Это приводит к развитию метаболически нездорового гипертрофического типа ожирения. Другим механизмом роста жировой ткани является дифференцировка МСК в адипогенном направлении, при котором происходит увеличение количества, а не размера адипоцитов. При этом сценарии формирующиеся адипоциты имеют здоровый фенотип и активно секретируют гормоны жировой ткани адипокины [2].

Ранее мы обнаружили, что один из ключевых гормональных регуляторов МСК, норадреналин запускает уникальный для клеток взрослого организма процесс сенситизации $\alpha 1A$ -адренорецепторов. При действии на МСК норадреналина происходит опосредованное $\beta 3$ -адренорецепторами увеличение экспрессии функционально-активных $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Причем данный феномен является транзиторным, и экспрессия $\alpha 1A$ -адренорецепторов достигает максимума через 6 часов после стимуляции норадреналином, а через 12 часов возвращается к базальному уровню. Такое переключение сигнализации приводит к повышению входа глюкозы в МСК, активирует анаэробный метаболизм и повышение синтетической функции клеток. При дальнейшей дифференцировке МСК в адипогенном направлении происходит усиление утечки протонов в дыхательной цепи и повышение резерва дыхания. Анаэробный гликолиз является одной из важнейших характеристик стволовых клеток, а синтетическая активность МСК необходима для обновления и здорового разрастания жировой ткани. Усиление утечки протонов при дифференцировке в адипоциты, вероятно, является механизмом, защищающим клетки от избыточного накопления жировых капель и формирования нездорового фенотипа адипоцитов.

Таким образом, мы обнаружили в МСК новый механизм норадреналин-опосредованной регуляции метаболического статуса стволовых клеток.

Ссылки:

1. GPCRs in the regulation of the functional activity of multipotent mesenchymal stromal cells. V. Chechekhin, K. Kulebyakin, R. Kokaev, P. Tyurin-Kuzmin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, None, 10, 10.3389/fcell.2022.953374
2. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. C. Iacobini, G. Pugliese, C. Blasetti Fantauzzi, M. Federici, S. Menini. *Metabolism*, 2019, 51-60, 92, 10.1016/j.metabol.2018.11.009

Хемогенетическая активация митохондриального метаболизма опухолевых клеток

Е. С. Потехина^{1,2}, Д. Ю. Басс^{1,2}, А. В. Иваненко^{1,2}, А. А. Мощенко³, Д. А. Корженевский³, А. М. Нестеренко³, А. Е. Карнаева⁴, Н. Ф. Закирова⁵, А. В. Иванов⁵, Л. Е. Шимолина⁶, М. В. Ширманова⁶, О. В. Лянг³, О. И. Пацап³, И. Богески⁷, В. В. Белоусов¹⁻³

1. РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия; 2. ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; 3. ФЦМН, Москва, Россия; 4. ИФХЭ им. А.Н.Фрумкина РАН, Москва, Россия; 5. ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; 6. ПИМУ, Нижний Новгород, Россия; 7. Institute of Cardiovascular Physiology, University Medical Center, Georg-August University, Göttingen, Germany

Для злокачественных опухолей характерен сдвиг метаболизма от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу (эффект Варбурга) [1],[2]. Пируват является одним из ключевых участников этого метаболического переключения. При канцерогенезе подавляются транспорт пирувата в митохондрии и его включение в цикл Кребса, одновременно в цитоплазме активируются гликолиз и восстановление пирувата с последующим экспортом лактата во внеклеточное пространство. Такой тип метаболизма позволяет пролиферирующим клеткам быстро получать энергию и интермедиаты для биосинтетических процессов, подавлять иммунный ответ [3], стимулирует эпителиально-мезенхимальный переход и развитие множественной лекарственной устойчивости [4]. Секреция опухолевыми клетками пирувата важна для ремоделирование межклеточного матрикса [5] и ангиогенеза [6].

Стимуляция окислительного метаболизма, напротив, способна замедлять рост опухолей. Чтобы оценить влияние митохондриального метаболизма на раковые клетки, мы разработали генетически кодируемый инструмент для генерации пирувата в матриксе митохондрий на основе дегидрогеназы D-аминокислот (DadA) из *Pseudomonas aeruginosa*. Этот фермент окисляет D-аланин до пирувата и аммиака [7]. Поскольку D-аланин практически отсутствует в клетках млекопитающих, активность DadA контролируется добавлением субстрата извне. DadA с митохондриальной локализацией мы назвали Grubraw (Warburg в обратном прочтении).

Активность Grubraw в опухолевых клетках увеличивала мембранный потенциал митохондрий, скорость потребления кислорода и внутриклеточные количества интермедиатов цикла Кребса по сравнению с исходным значением и с контролем (мутант Grubraw-mut, не обладающий ферментативной активностью). При этом активность Grubraw не влияла на pH и концентрацию пероксида водорода в матриксе митохондрий, а также на скорость гликолиза и концентрацию пирувата в цитоплазме и митохондриях. С другой стороны, в панели протестированных раковых клеток активность Grubraw увеличивала внеклеточную концентрацию пирувата, не влияя на внеклеточный лактат. С использованием ¹³C-меченых субстратов было показано, что накапливаемый внеклеточный пируват образуется из D-аланина. При этом активность Grubraw не влияла на скорость деления раковых клеток в культуре. Чтобы оценить влияние активности Grubraw на развитие опухолей, использовали модель подкожных ксенотрансплантатов меланомы человека Lu451 в иммунодефицитных мышах линии Nude. Клетки меланомы экспрессировали Grubraw и люциферазу. Животные получали D-аланин с водой. Активность Grubraw замедляла рост опухолей, при этом потребление D-аланина не повлияло на рост опухолей в контрольной группе мышей с экспрессией Grubraw-mut.

Полученные данные указывают на то, что активность Grubraw ускоряет митохондриальный метаболизм. При этом опухолевые клетки используют компенсирующий механизм, позволяющий им выводить излишки пирувата из матрикса во внеклеточное пространство. Тем не менее, полученного изменения метаболизма достаточно, чтобы замедлить рост опухолей in vivo.

Ссылки:

1. O. Warburg. Science, 1956, 309-314, 123; 2. P. Vaupel, G. Multhoff. The Journal of Physiology, 2021, 1745-1757, 599; 3. J. Zheng. Oncology Letters, 2012, 1151-1157, 4; 4. K. Fischer et al. Blood, 2007, 3812-3819, 109; 5. I. Elia et al. Nature, 2019, 117-121, 568; 6. M. S. Lee et al. Cancer Res, 2001, 3290-3293, 61(8); 7. W. He et al. Journal of Bacteriology, 2011, 2107-2115, 193

Журнал «Системная биология и физиология»

Показатели *SBPReports* –
предшественника *СБФ*

- Создан в декабре 2020 года
- Первый выпуск – март 2021 года
- Ежеквартальные выпуски
 - 20 статей в 7 выпусках
 - 22 цитирования по версии CrossRef
 - 71218 просмотров статей
- Опубликовано 4 сборника тезисов:
 - сборники тезисов конференций «Systems Biology and Systems Physiology» 2020, 2021, 2022
 - сборник тезисов конференции «Блюменфельдовские чтения» 2021
- Индексация РИНЦ, Google Scholar

FoF1-АТФаза поддерживает мембранный потенциал митохондрий в клетках SUM159 и BT474, обработанных противоопухолевым агентом TR57

**А.А. Мишуков^{1,2}, А.В. Бережнов³, И.В. Одиноква¹, Е.Ю. Мндлян¹,
Э.Л. Холмухамедов¹**

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
3. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Введение: TR57 – экспериментальный противоопухолевый препарат, единственной молекулярной мишенью которого является митохондриальная матриксная казеинолитическая протеаза ClpP, что делает актуальным исследование молекулярных механизмов его действия, связанных с митохондриями.

Цель: Изучить действие TR57 на различные параметры митохондрий в культурах клеток рака молочной железы человека SUM159 и BT474.

Материалы и методы: Культивирование и обработка клеток SUM159 и BT474 препаратом TR57 проводились в среде DMEM/F12 в клеточном инкубаторе. Оценка среднего размера митохондрий, количества митохондриальных нуклеоидов и митохондриального мембранного потенциала производились с помощью конфокальной и флуоресцентной микроскопии с последующим анализом изображений в программе ImageJ. Уровень содержания белков оценивался методом Вестерн-блот. Активность дыхательной цепи в суспензии дигитонин-пермеабелизованных клеток измерялась с помощью кислород-чувствительного флуоресцентного датчика.

Результаты: Показано, что 72-часовая обработка клеток SUM159 150 нМ препарата TR57 индуцирует двукратное уменьшение среднего размера митохондрий, а также вызывает снижение количества митохондриальных нуклеоидов на 75%, что сопровождается падением уровня белков TFAM и TFAM, ассоциированных с мтДНК. Обработка клеток препаратом TR57 подавляла активность митохондриальной дыхательной цепи уже через 24 часа и полностью ингибировала ее после 72 часов инкубации, при этом падения мембранного потенциала не наблюдалось в течение 24-48 часов инкубации, а после 72 часов его снижение составляло 42%. С помощью Вестерн-блот анализа мы показали, что инкубация клеток с 150 нМ TR57 снижала содержание белков, участвующих в дыхании (субъединица b АТФазы, цитохром c), не влияла на уровень протеинов, принимающих участие в транспорте белков (Tom20) и метаболитов (VDAC1) и вызывала полное исчезновение IF1, природного ингибитора гидролазной активности АТФ синтазы, уже после 24 часов инкубации с TR57. Кроме того, мы показали, что ингибитор FoF1-АТФазы олигомицин вызывает деполяризацию митохондрий TR57-обработанных клеток на 64%. В культуре BT474 препарат TR57 вызывает аналогичные эффекты: уменьшение среднего размера митохондрий, снижение количества митохондриальных нуклеоидов и формирование чувствительности мембранного потенциала к олигомицину.

Заключение: Препарат TR57 вызывает фрагментацию митохондрий, потерю мтДНК и подавление активности дыхательной цепи в клетках рака молочной железы. Однако, ингибирование дыхательной цепи не приводит к потере мембранного потенциала митохондрий в клетках, обработанных TR57. Элиминация ингибитора АТФ синтазы IF1 и деполяризующее действие олигомицина на мембранный потенциал в TR57-обработанных клетках указывают на возможное обращение митохондриальной FoF1-АТФазы и использование внемитохондриального АТФ для поддержания мембранного потенциала

Антиоксидантная роль метионина во внутри- и внеклеточных белках

М. А. Розенфельд¹

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

Биологические системы постоянно подвергаются воздействию разнообразных активных форм кислорода (АФК). Белки являются крайне уязвимой мишенью для атаки АФК. АФК-зависимая окислительная модификация белка обуславливает повреждение структуры белка и нарушение его функционирования.

Превращение метионина в сульфоксид метионина (MetO) является одной из наиболее распространенных окислительных модификаций в белках из-за особой восприимчивости метионина к окислительным условиям. Большинство клеток содержат метионин сульфоксид редуктазы (MSR), которые катализируют тиоредоксин-зависимое восстановление метионин сульфоксида в нативную форму метионина. Существует большое количество данных, поддерживающей гипотезу о том, что обратимое окисление метионина обеспечивает надежный механизм, способный нейтрализовывать или смягчать токсичное действие АФК на функционально важные аминокислотные остатки белка. В пользу этого свидетельствуют также данные о том, что мутации, приводящие к снижению активности MSR, связаны со снижением устойчивости некоторых клеток к окислительному стрессу и сокращению максимальной продолжительности жизни, тогда как мутации, приводящие к перепроизводству активности MSR, приводят к увеличению устойчивости к окислительному стрессу и увеличению продолжительности жизни. Показано, что ряд внутриклеточных белков, таких как глутаминсинтетаза, 15-липоксигеназа, рекомбинантные белки, интерферон α -2b, тканевой активатор плазминогена, фактор стволовых клеток человека и др., содержат антиоксидантные метионины, которые участвуют в регуляции антиоксидантной защиты этих белков.

В противоположность внутриклеточным белкам, окисление метионина в плазменных белках является необратимым из-за отсутствия в плазме крови метионин сульфоксид редуктаз. Однако данные, полученные при индуцированном окислении ряда белков (альфа-2-макроглобулин, альбумин, антитромбин, фибриноген, коагуляционный фактор XIII, плазминоген), свидетельствовали о том, что эти белки содержали антиоксидантные метионины, окисление которых не оказывало никакого влияния или влияло незначительно на функциональную активность белка. Однако до настоящего времени для большинства белков плазмы крови антиоксидантные метионины остаются не определенными. Окисленные метионины были выявлены в некоторых плазменных белках у здоровых и больных.

Количественная оценка степени превращения метионинов в метионин сульфоксид должна облегчить идентификацию циркулирующих биомаркеров, подходящих для прогнозирования развития или прогрессирования заболеваний человека.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084–2014–0001 и 0084-2014-0005).

Неканонические сигнальные молекулы каскада фототрансдукции

Н. О. Ерофеева¹, М. В. Беляков^{1,2}, Д. А. Мешалкина¹, М. Л. Фирсов¹

1. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия
2. НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Ленинградская обл., Россия

В фоторецепторах сетчатки позвоночных поглощение кванта света запускает ряд процессов, называемых фототрансдукцией, начиная с активации молекулы зрительного пигмента родопсина и заканчивая изменением проницаемости плазматической мембраны и гиперполяризацией фоторецепторов. У позвоночных вторичным мессенджером фототрансдукции является цГМФ, уровень которого в цитоплазме относительно высок в темноте и снижается при световой стимуляции. Известно, что работа каскада фототрансдукции регулируется кальцием, но многочисленные феноменологические данные указывают на то, что в каскаде фототрансдукции могут быть и другие регуляторные сигнальные пути, для которых нет соответствующего механизма в классической схеме фототрансдукции.

Некоторые косвенные данные указывают на то, что циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), инозитолтрифосфат (ИФ3) и диацилглицерин (ДАГ) также могут оказывать регулирующее действие на каскад фототрансдукции. Очевидно, необходимым условием наличия такого регуляторного эффекта является изменение концентрации сигнальной молекулы в ходе развития регулируемого процесса. Ранее было показано, что концентрация цАМФ и ИФ3 в фоторецепторах может изменяться в ответ на изменение световых условий с характерными временами более часа, что указывает на участие этих сигнальных молекул в регуляции циркадных ритмов и замедлении светового или темновые адаптационные процессы. Однако остается неясным, участвуют ли цАМФ, ИФ3 и ДАГ в регуляции каскада фототрансдукции при развитии фоторецепторного ответа на короткий световой раздражитель или ответа на включение или выключение длительного светового раздражителя. Характерные времена этих процессов меньше секунды. Учитывая, что традиционные методы флуоресценции неприменимы для измерения концентраций любых сигнальных молекул в сетчатке, нами была создана установка, позволяющая проводить криофиксацию образцов сетчатки с необходимой скоростью. Комплекс позволяет фиксировать до 6 проб в одной серии с задержкой менее 100 мс после световой стимуляции. Концентрацию сигнальных молекул измеряют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения. Пилотные эксперименты показывают увеличение концентрации всех трех исследованных сигнальных молекул в течение 400 мс после предъявления насыщающего светового стимула длительностью 10 мс или 2000 мс. Эти данные свидетельствуют об участии цАМФ, ИФ3 и ДАГ в регуляции каскада фототрансдукции на временной шкале, соответствующей развитию быстрого фотоответа.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда РНФ №22-25-00656

Электрофизиологические свойства и регуляция активности эндогенных кальций-активируемых хлорных каналов в клетках HEK293

**Д.О. Колесников¹, Е. Р. Григорьева¹, М.А. Номеровская¹, Д. С. Решетин¹,
Е.В. Казначеева¹, А.В. Шалыгин¹**

1. Лаборатория ионных каналов клеточных мембран, Институт Цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Россия.

Кальций-активируемые хлорные каналы (CaCC), образованные белками семейства аноктаминов, участвуют в регуляции множества внутриклеточных процессов. Аноктамины – это семейство кальций-активируемых фосфолипидных скрамблаз и ионных каналов. Наиболее интересным представителем семейства является ANO6, который совмещает в себе функции скрамблазы и ионного канала [1]. Дисфункции в работе этого белка приводят к нарушениям свертываемости крови [2], формирования костной ткани [3], нарушению контроля клеточного цикла [4]. Несмотря на значение для организма CaCC, в том числе аноктамина 6, электрофизиологические свойства эндогенных CaCC на настоящий момент изучены недостаточно. Данные о проводимости и селективности этих каналов достаточно противоречивы [2], [5], [6]. Кроме того, известно, что CaCC проницаемы для ионов кальция [2], однако остается не ясно, может ли вошедший через каналы кальций участвовать в самоподдержании их активности.

Одним из основных источников кальция в электронеовозбудимых клетках являются депо-управляемые каналы [7]. Нарушения работы депо-управляемых каналов и CaCC приводят к развитию схожих патологий. Работы последних лет указывают на колокализацию CaCC и депо-управляемых каналов [8]. Тем не менее, функциональное сопряжение активаций CaCC и депо-управляемых каналов на настоящий момент изучено недостаточно. Ранее в нашей лаборатории в клетках HEK293 были описаны токи через эндогенные CaCC, похожие по своим электрофизиологическим свойствам на аноктамин-6 [9]. Мы использовали эти каналы в качестве модельного объекта для нашего исследования. Работа посвящена изучению регуляции и электрофизиологических свойств эндогенных CaCC в клетках HEK293. Используя метод локальной фиксации потенциала, мы изучили изменение электрофизиологических свойств эндогенных CaCC в зависимости от ионного состава проводящих растворов, исследовали механизмы самоподдержания активности CaCC, влияние кальциевых хелаторов BAPTA и EGTA на активность и свойства каналов CaCC, а также показали функциональное сопряжение активаций CaCC и депо-управляемых каналов в клетках HEK293.

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФИ №22-24-00761

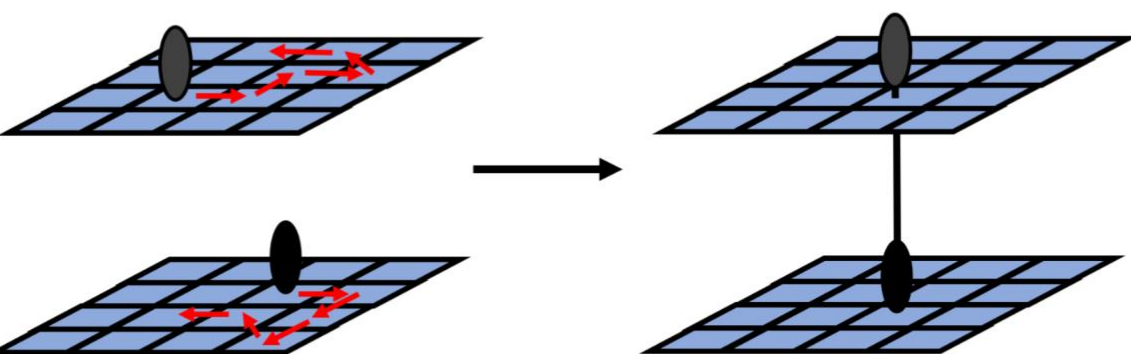
Ссылки:

1. V. Kalienkova, V. Clerico Mosina, C. Paulino. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 166941, 433, 10.1016/j.jmb.2021.166941
2. H. Yang, A. Kim, T. David, D. Palmer, T. Jin, J. Tien, F. Huang, T. Cheng, S. Coughlin, Y. Jan, L. Jan. *Cell*, 2012, 111-122, 151, 10.1016/j.cell.2012.07.036
3. J. Ousingsawat, P. Wanitchakool, R. Schreiber, M. Wuelling, A. Vortkamp, K. Kunzelmann. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 6270-6280, 290, 10.1074/jbc.M114.602979
4. K. Kunzelmann, J. Ousingsawat, R. Benedetto, I. Cabrita, R. Schreiber. *Cancers*, 2019, 382, 11, 10.3390/cancers11030382
5. T. Shimizu, T. Iehara, K. Sato, T. Fujii, H. Sakai, Y. Okada. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2013, C748-C759, 304, 10.1152/ajpcell.00228.2012
6. W. Ye, T. Han, M. He, Y. Jan, L. Jan. *eLife*, 2019, None, 8, 10.7554/eLife.45187
7. D. Bakowski, F. Murray, A. Parekh. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2021, 629-654, 61, 10.1146/annurev-pharmtox-031620-105135
8. I. Cabrita, R. Benedetto, A. Fonseca, P. Wanitchakool, L. Sirianant, B. Skryabin, L. Schenk, H. Pavenstädt, R. Schreiber, K. Kunzelmann. *The FASEB Journal*, 2017, 2123-2134, 31, 10.1096/fj.201600797RR
9. D. Kolesnikov, A. Perevoznikova, K. Gusev, L. Glushankova, E. Kaznacheyeva, A. Shalygin. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 4767, 22, 10.3390/ijms22094767

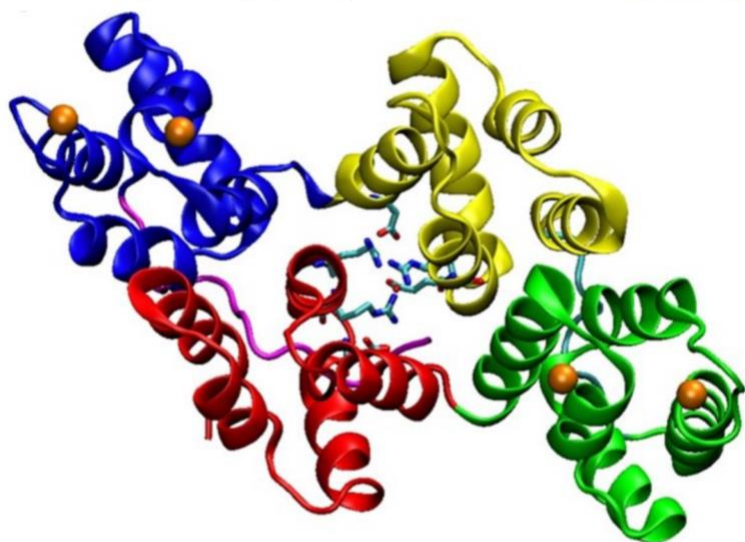
Секция: Молекулярные Системы



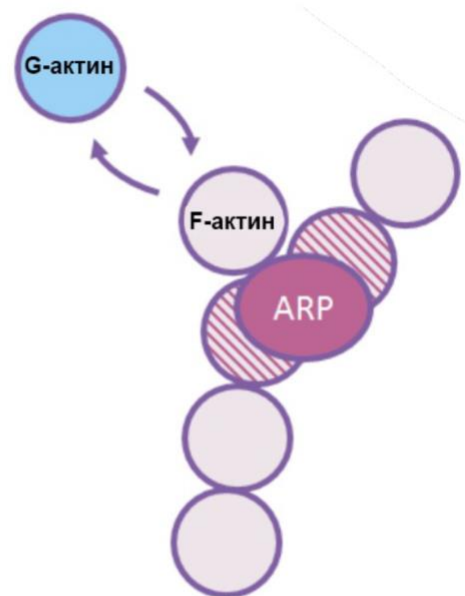
- исследования биологически значимых реакций на молекулярном уровне:
- самоорганизация на молекулярном уровне
- молекулярные механизмы биохимических реакций



Гарсон Дасгупта и соавт. [СБФ 2022](#)



Коваленко и соавт. [СБФ 2022](#)



Коробкина и соавт. [СБФ 2021](#)

Неспецифическое действие ингибитора PI3-киназы PI828

П. Д. Котова¹, Е.А. Дымова¹, С.С. Колесников¹

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Многие GPCR-рецепторы сопряжены с Ca^{2+} -сигнализацией, которая регулируется при участии ряда ферментов, в том числе и PI3-киназы. Для выявления роли PI3-киназы в механизме генерации Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин в клетках НЕК-293 мы использовали микрофотометрию с Ca^{2+} -зондом Fluo-4 и ингибиторный анализ. Однако столкнулись с противоположными эффектами ингибиторов PI3-киназы, а именно Wortmannin не влиял на способность клеток генерировать Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, тогда как PI828 полностью их подавлял. Для прямого мониторинга активности PI3-киназы при генерации Ca^{2+} -ответа на ацетилхолин нами была получена моноклональная линия клеток НЕК-293, экспрессирующих генетически кодируемые сенсоры PIP3 (PH(Akt)-Venus) и цитозольного Ca^{2+} (R-GECO1). Эксперименты на клетках данной линии показали, что стимуляция ацетилхолином приводит к повышению концентрации цитозольного Ca^{2+} , концентрация PIP3 при этом не меняется. Иными словами, PI3-киназа не задействована в генерации клеточного ответа на ацетилхолин. В то же время повышение концентрации PIP3 наблюдалось при стимуляции инсулином, активирующим PI3-киназу путем связывания с тирозин-киназными рецепторами. При этом в присутствии Wortmannin или PI828 стимуляция инсулином не приводила к увеличению концентрации PIP3, что свидетельствует о том, что эти соединения являются эффективными ингибиторами активности PI3-киназы. Однако PI828 помимо ингибирования PI3-киназы обладает действием на какую-то иную клеточную мишень, в результате которого подавляет ацетилхолин-индуцируемую Ca^{2+} -сигнализацию.

В поисках мишени, воздействуя на которую, PI828 блокирует Ca^{2+} -ответы НЕК-293 на ацетилхолин, было установлено, что это соединение не влияет на способность тех же клеток генерировать Ca^{2+} -ответы на АТФ. При этом для генерации Ca^{2+} -ответов на оба эти агониста НЕК-293 используют фосфоинозитидный путь, а значит элементы этого пути не являются мишенью PI828. Существует вероятность, что PI828 воздействует непосредственно на мускариновые рецепторы ацетилхолина. Такую возможность косвенно подтверждает тот факт, что PI828 подавляет Ca^{2+} -ответы при его одновременной аппликации с ацетилхолином, тогда как обычно ингибирование внутриклеточных мишеней требует времени для проникновения ингибитора через плазматическую мембрану и его накопления в цитозоле.

Таким образом, в данной работе показано, что стимуляция НЕК-293 ацетилхолином приводит к генерации Ca^{2+} -ответа с помощью фосфоинозитидного пути, при этом такая стимуляция не приводит к активации PI3-киназы. Также показано, что Wortmannin и PI828 действительно являются эффективными ингибиторами PI3-киназы. Однако PI828 воздействует также на иную клеточную мишень, в результате чего блокирует Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, и этой мишенью могут являться непосредственно мускариновые рецепторы ацетилхолина.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-75-10068.

Динамический баланс между PTH1R-зависимыми сигнальными каскадами определяет его про- или антиостеогенные эффекты на МСК.

**К. Ю. Кулебякин¹, П. А. Тюрин-Кузьмин¹, Н.С. Волошин¹, М. Ю. Николаев¹,
М. В. Воронцова^{2,3}**

1. Факультет фундаментальной медицины, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. Институт регенеративной медицины, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
3. ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия

Паратиреоидный гормон (ПТГ) является одним из ключевых регуляторов метаболизма кальция и фосфатов в организме, контролируя костный метаболизм и выведение ионов почками. В настоящее время попытки использовать ПТГ в качестве терапевтического средства сопряжены с побочными эффектами, природа которых не всегда ясна и предсказуема. Кроме того, известно, что нарушение пострецепторной сигнализации ПТГ *in vivo* связано с атипичным поведением дифференцировки не только клеток кости, но и соединительной ткани, в том числе жировой. В данной работе мы изучали функциональные ответы мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) на действие ПТГ на уровне одиночных клеток. Мы использовали МСК, выделенные из надкостницы и подкожной жировой ткани, для сравнения характеристик клеточного ответа на ПТГ. Мы обнаружили, что через свой рецептор, расположенный на поверхности МСК, гормон может активировать три ключевых ответа: единичные потоки кальция, осцилляции кальция и плавное повышение внутриклеточного кальция, активируемое гормоном. Эти типы кальциевых ответов приводили к принципиально разным клеточным ответам МСК. Зависимое от цАМФ плавное повышение внутриклеточного кальция было связано с проостеогенным действием ПТГ, тогда как зависимые от фосфолипазы C осцилляции кальция приводили к снижению интенсивности остеогенной дифференцировки. Различные варианты кальциевых ответов находятся в динамическом равновесии. Подавление одного типа ответа приводит к усилению активации другого типа и, соответственно, к изменению влияния ПТГ на дифференцировку клеток.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-75-30007 (исследования внутриклеточной сигнализации в МСК) и гранта МГУ имени М.В. Ломоносова для ведущих научных школ «Депозитарий живых систем» в рамках Программы развития МГУ (биоматериалы).

Динамика десенсibilизации и ресенсibilизации рецепторов тромбоцитов, сопряженных с G-белком

М. Д. Сысоев¹, А. Н. Свешникова^{1,2}

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

Актуальность: Тромбоциты представляют собой небольшие безъядерные клетки крови, которые отвечают за предотвращение кровопотери при повреждении стенки сосуда. Тромбоциты имеют множество мембранных рецепторов, которые опосредуют активацию тромбоцитов, высвобождение гранул и адгезию в местах повреждения сосудов. К рецепторам, связанным с G-белками (GPCR), относятся рецепторы к тромбину (PAR1 и PAR4) и рецепторы к АДФ (рецепторы P2Y1, P2Y12 и P2X). Одной из специфических особенностей GPCR сигнализации является ее способность терять чувствительность при активации их агонистами в норме и при патологии, например, у пациентов с тяжелой формой COVID-19 [1].

Цели: определить, происходит ли десенсibilизация GPCR при постепенном добавлении агониста или поэтапно.

Методы: Цельная кровь 10 здоровых доноров собиралась в пробирки, содержащие гирудин в соответствии с Хельсинкской декларацией. Тромбоциты загружали флуоресцентным зондом Fura-Red для оценки уровня цитозольного кальция [2] и анализировали уровень флуоресценции с помощью проточной цитометрии. Для изучения десенсibilизации PAR-рецепторов была построена компьютерная модель. Модель основывалась на системе обыкновенных дифференциальных уравнений и решалась в программе COPASI.

Результаты: С помощью проточной цитометрии мы получили, что десенсibilизация PAR1 является необратимой даже при активации обратимо связывающимся пептидом SFLLRN. Кроме того, полная десенсibilизация PAR1 пропорциональна концентрации SFLLRN в образце. Компьютерная модель продемонстрировала, что даже концентрации, заметно меньшие, чем константа диссоциации SFLLRN для связывания PAR1, в конечном итоге приводили к полной десенсibilизации PAR1.

Выводы. Десенсibilизация PAR1 необратима и не зависит от типа активатора.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-74-20087.

Ссылки:

1. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. S. Rajagopal, S. Shenoy. Cellular Signalling, 2018, 9-16, 41, 10.1016/j.cellsig.2017.01.024
2. Platelet functional responses and signalling: the molecular relationship. Part 2: receptors.. A. Martyanov, M. Panteleev. Systems Biology and Physiology Reports, 2021, 13-30, 1, 10.52455/sbpr.01.202103013

Агонисты Gi-сопряженных рецепторов - перспективные противозепилептические препараты

С. Г. Гайдин¹, А. В. Бережнов¹, В. П. Зинченко², А. М. Косенков¹, Д. П. Ларюшкин¹, С. А. Майоров¹

1. Лаборатория клеточных механизмов нейрпатологий, Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Россия
2. Лаборатория внутриклеточной сигнализации, Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Россия

Эпилепсия — одно из самых распространенных неврологических заболеваний, поражающее 1-1,5% населения земного шара. Фармакологическое лечение снижает частоту приступов, но применяемые противозепилептические препараты вызывают многочисленные побочные эффекты. Отсюда поиск наиболее селективных и эффективных лекарственных средств является актуальной задачей современной фармакологии и медицины. В качестве перспективных противозепилептических препаратов можно рассматривать агонисты различных Gi-связанных метаболитных рецепторов, таких как аденозиновые (A1R и A3R), каннабиноидные (CB1R), адренергические ($\alpha 2$ -AR), серотониновые рецепторы (5-HT1R). В данном исследовании мы оценили влияние агонистов этих рецепторов на активность нейронов в различных моделях гипервозбуждения *in vitro*. Все эксперименты проводили на смешанных нейрон-глиальных клеточных культурах (13-14 DIV), полученных из гиппокампа новорожденных крысят линии Вистар обоего пола. Гипервозбуждение нейронных сетей индуцировали путём аппликации NH₄Cl (8 мМ) или антагониста ГАМК(A)-рецепторов, бикакуллина. Эти воздействия вызывают синхронные высокоамплитудные колебания концентрации внутриклеточного Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) в нейронах и незначительно влияют на глиальные клетки. Изменения [Ca²⁺]_i оценивали методом флуоресцентной микроскопии с использованием Ca²⁺-чувствительных флуоресцентных зондов Fura-2 или Fluo-4. Мы обнаружили, что агонисты A1Rs и CB1Rs полностью подавляли осцилляции [Ca²⁺]_i в нейронах в обеих моделях гипервозбуждения. Агонисты $\alpha 2$ -AR подавляли колебания, индуцированные NH₄Cl, но были неэффективны против колебаний, индуцированных бикакуллином. В свою очередь, агонисты 5-HT1R и A3R были неэффективны в обеих моделях. Активация $\alpha 2$ -AR вызывает двухфазное повышение [Ca²⁺]_i в астроцитах, опосредованное каскадом Gi $\beta\gamma$ -PLC и приводящее к высвобождению ГАМК этими глиальными клетками. Мы полагаем, что высвобождение ГАМК астроцитами вносит значительный вклад в подавление индуцированных NH₄Cl колебаний [Ca²⁺]_i в нейронах. Отсутствие влияния агонистов $\alpha 2$ -AR на бикакуллин-индуцированные колебания объясняется тем, что в данной модели гипервозбуждения блокируются ГАМК(A)R, а вклад ГАМК(B)R, по-видимому, недостаточен. В случае агонистов A1R и CB1R двухфазный ответ не наблюдался, а подавление колебаний можно объяснить торможением секреции глутамата за счёт активации пресинаптических A1R и CB1R в нейронах.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания ПНЦБИ РАН № 075-01512-22-02/004-00 («Нейропротекторные препараты нового поколения»; шифр темы FMRM-2022-0034; руководитель Бережнов А.В.).

Особенности секреции серотонина вкусовыми клетками типа III

А. П. Черкашин¹, О. А. Рогачевская¹, С. С. Колесников¹

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Среди клеток вкусовой почки только вкусовые клетки типа III экспрессируют потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы и используют Ca^{2+} -зависимый экзоцитоз для высвобождения нейротрансмиттеров, в частности серотонина. Вкусовая почка представляет собой плотно упакованную клеточную структуру, в которой, по нашим представлениям, концентрация внеклеточного Ca^{2+} значительно изменяется при электрической активности вкусовых клеток. При этом о существовании механизма, обеспечивающего надежную работу синапса, управляемого входом Ca^{2+} , при изменяющемся уровне внеклеточного Ca^{2+} ранее не сообщалось. Мы проанализировали индуцированные деполяризацией Ca^{2+} -сигналы и высвобождение серотонина в изолированных клетках типа III при различных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} . Оказалось, что один и тот же деполяризующий стимул вызывал в этих клетках Ca^{2+} -сигналы, амплитуда которых не зависела от концентрации внеклеточного Ca^{2+} (0,5 – 5 мМ). Высвобождение серотонина из клеток типа III анализировали с помощью клеток НЕК-293, экспрессирующих рекомбинантный рецептор серотонина (5-HT₄) и генетически кодируемый сенсор cAMP (Pink Flamindo). С помощью такого клеточного биосенсора было показано, что вызванное деполяризацией высвобождение серотонина клетками типа III также не зависит от концентрации наружного Ca^{2+} . Таким образом, во вкусовых клетках типа III и Ca^{2+} -сигналы, обусловленные потенциал-зависимым входом Ca^{2+} , и вызванное деполяризацией высвобождение серотонина остаются неизменными при варьированном наружном Ca^{2+} . Этот феномен указывает на существование механизма отрицательной обратной связи, который регулирует потенциал-зависимый вход Ca^{2+} и делает высвобождение серотонина вкусовыми клетками типа III независимым от изменения наружного Ca^{2+} в физиологическом диапазоне концентраций.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-75-10068.

Индукцированная олигомицином передача сигналов кальция в тромбоцитах человека, выявленная с помощью непрерывной проточной цитометрии

А. А. Мишуков¹, А. Е. Болдова^{2,3}, А. Н. Свешникова¹⁻⁴

1. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
3. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
4. Федеральное Государственное Автономное Образовательное Учреждение Высшего Образования Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Введение: Митохондрии играют ключевую роль в регуляции продолжительности жизни тромбоцитов и индуцированного активацией некроза тромбоцитов. Потенциал митохондриальной мембраны является основным индикатором митохондриальной активности, и его можно измерить с помощью потенциал-зависимых флуоресцентных зондов. Олигомицин является ингибитором F₀F₁-АТФазы, который вызывает гиперполяризацию митохондрий, поэтому он является полезным инструментом для проверки протокола измерения потенциала митохондриальной мембраны. Однако реакции тромбоцитов на олигомицин плохо изучены.

Цели: Исследовать влияние олигомицина на тромбоциты человека. **Методы:** С помощью непрерывной проточной цитометрии (BD FACS Canto II) тромбоцитов здоровых доноров, загруженных кальций-чувствительным красителем Fura Red (2 мкМ) и потенциально-чувствительным красителем DiOC₃(6) (40 нМ), мы отслеживали цитоплазматический уровень кальция, форма, размер и потенциал митохондриальной мембраны (DiOC₃(6)) после добавления олигомицина (5, 1,25, 0,625, 0,31 и 0 мкг/мл). Было проведено две серии экспериментов с тремя здоровыми донорами в каждой серии. Все эксперименты проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Результаты: Мы установили протокол для одновременного измерения внутриклеточного потенциала кальция и митохондриальной мембраны в суспензии тромбоцитов. В первой серии экспериментов олигомицин дозозависимо индуцировал повышение флуоресценции DiOC₃(6). 5 мкг/мл вызывали увеличение флуоресценции примерно на 30% в течение 180 секунд после добавления, 1,25 мкг/мл вызывали увеличение флуоресценции примерно на 20% с более медленной кинетикой, более низкие дозы олигомицина не вызывали увеличения флуоресценции DiOC₃(6). Неожиданно мы наблюдали колоколообразное дозозависимое увеличение цитоплазматического кальция в ответ на олигомицин с максимальным ответом при концентрации 0,62 мкг/мл - 1,85±0,81-кратное увеличение коэффициента Fura Red. Наряду с этим мы наблюдали увеличение прямого рассеяния в 1,98±0,49 раза и уменьшение бокового рассеяния на 10±9% для олигомицина в концентрации 0,62 мкг/мл. Во второй серии экспериментов олигомицин индуцировал аналогичное дозозависимое увеличение флуоресценции DiOC₃(6), однако каких-либо изменений внутриклеточного кальция, размера и формы не наблюдалось.

Вывод: Хотя олигомицин воспроизводимо гиперполяризовывал митохондрии, эффекты олигомицина на внутриклеточный кальций, форму и размер тромбоцитов не воспроизводились между наборами, что требует дополнительных исследований.

Финансирование: Все части исследования выполнены при поддержке гранта РФФ 21-74-20087.

Сравнение методик измерения внутриклеточного кальция в суспензии тромбоцитов

А.А. Тараканова¹, А.А. Мартыанов^{2,3}, А.Н. Свешникова^{2,3}

1. Федеральное Государственное Автономное Образовательное Учреждение Высшего Образования Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия
2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
3. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

Актуальность: Функционирование тромбоцитов безъядерных клеток крови регулируется внутриклеточной передачей сигналов кальция. Таким образом, правильные измерения цитозольной концентрации кальция в ответ на активацию могут предоставить важную информацию о функциональности тромбоцитов. Концентрацию кальция в тромбоцитах, загруженных низкомолекулярным чувствительным к кальцию зондом, обычно измеряют с помощью спектрофлуориметрии, проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии.

Цель: сравнить точность и эффективность различных подходов к высокопроизводительным измерениям цитозольного кальция тромбоцитов.

Методы: Для измерения цитозольного кальция в тромбоцитах с помощью проточной цитометрии (BC NovoCyte/BD FACS Canto II) и спектрофлуориметрии (Agilent Cary Eclipse) использовали чувствительные к кальцию флуоресцентные зонды Fura-Red и Fura-2. Тромбоциты анализировали либо в богатой тромбоцитами плазме (PRP), либо после промывки путем последовательного центрифугирования. Средние значения интенсивности флуоресценции суспензии тромбоцитов пересчитывали в цитозольную концентрацию кальция по формуле Гринкевича [1] после последовательного добавления 1 мкМ иономицина и 10 мМ ЭГТА.

Результат: Концентрация кальция в поющих тромбоцитах здоровых доноров варьировала от 5 до 30 нМ при проточной цитометрии и от 10 до 100 нМ при спектрофлуориметрии, что соответствовало литературным данным. Форма кривой концентрации кальция в ответ на слабую активацию тромбоцитов (АДФ) была пикообразной как при проточной цитометрии, так и при спектрофлуориметрии. Однако, в то время как для проточной цитометрии его максимум находился в пределах от 50 до 150 нМ, для спектрофлуориметрии результаты пика варьировались от 50 до 500 нМ. Аналогичные результаты были получены для активации тромбоцитов тромбином.

Выводы: Спектрофлуориметрия уже давно является золотым стандартом в области измерения кальция, поскольку она проста и надежна. Однако оказалось, что проточная цитометрия дает более стабильные результаты.

Финансирование: Работа поддержана Грантом РНФ 21-74-20087.

Ссылки:

1. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. J Biol Chem, 1985, 3440-50, 260(6)

Природа патологических автоволновых процессов, возникающих в нервных сетях головного мозга при эпилепсии

В.П. Зинченко¹, Д.П. Ларюшкин¹, И.Ю. Теплов¹

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

При эпилепсии в мозге возникают особые синхронные колебания электрической активности, регистрируемые ЭЭГ. Клетки мозга, выделенные из эпилептических очагов, генерируют периодические высокоамплитудные гиперсинхронные разряды, в основе которых лежит триггерный механизм неизвестной природы. Это явление рассматривается как клеточный коррелят эпилептиформной активности нейрональной сети и получило название пароксизмальный деполяризационный сдвиг (PDS). С момента открытия PDS в 1960-х годах существование необычного режима электрической активности нейронов, в нейрональной сети было показано не только при эпилепсии, но и при ишемии, и ряде других нейродегенеративных заболеваниях.

Как минимум, три колебательные системы включены в формирование кластера PDS (рис.1) Колебания потенциалов действия (ПД) (1A), колебания PDS (1F) и колебания кластеров PDS (1B). Все три системы имеют автоволновую природу. Автоволновая природа ПД изучена достаточно подробно. Пейсмекерная клетка генерирует периодические автоволны ПД, постоянно деполяризуя мембрану (1A). Признаками автоволны являются: постоянство амплитуды импульсов, наличие медленной фазы между импульсами ПД, положительная обратная связь, усиливающая сигнал генератора, наличие ингибитора возбуждения, наличие источника энергии. При увеличении деполяризации частота генерации ПД может либо монотонно возрастать, либо формируется режим пачечной активности ПД, который получил название берсты. Внешне берсты похожи на кластеры PDS, но отличаются по амплитуде управляющей деполяризации. В кластере PDS максимальная амплитуда деполяризации может превышать потенциал реактивации Na^+ канала (1D,E). Предполагается, что начальное формирование пачки ПД происходит за счет импульса деполяризации, генерируемого низкопороговыми Ca^{2+} каналами. А преобразование в кластер PDS происходит вследствие потери ГАМК-зависимого торможения и гиперсинхронизации пачек ПД и импульсов Ca^{2+} . При этом, периодические кластеры PDS (1E,F) и сопутствующие им Ca^{2+} импульсы (1C) имеют все признаки и свойства автоволны. Поведение PDS в кластере также носит колебательный характер (1F). Неизвестный механизм открывает канал PDS, который обеспечивает быструю деполяризацию до уровня, превышающего потенциал реактивации Na^+ канала (1F). При высокой скорости деполяризации на переднем фронте PDS успевает сгенерироваться часто только один ПД (1E,F). Таким образом, PDS управляет частотой генерации ПД в пачке. Колебания PDS также имеют указанные выше признаки автоволны. В отличие от первых двух колебательных систем для PDS неизвестны ни природа каналов, ни механизмы их регуляции.

Установление природы ионных каналов, принимающих участие в формировании кластеров PDS, является важной задачей, решение которой необходимо для выявления новых мишеней для лечения неврологических заболеваний, связанных с гипервозбуждением. Сложность задачи заключается в том, что в формировании автоволн кластера PDS одновременно могут принимать участие различные ионные каналы.

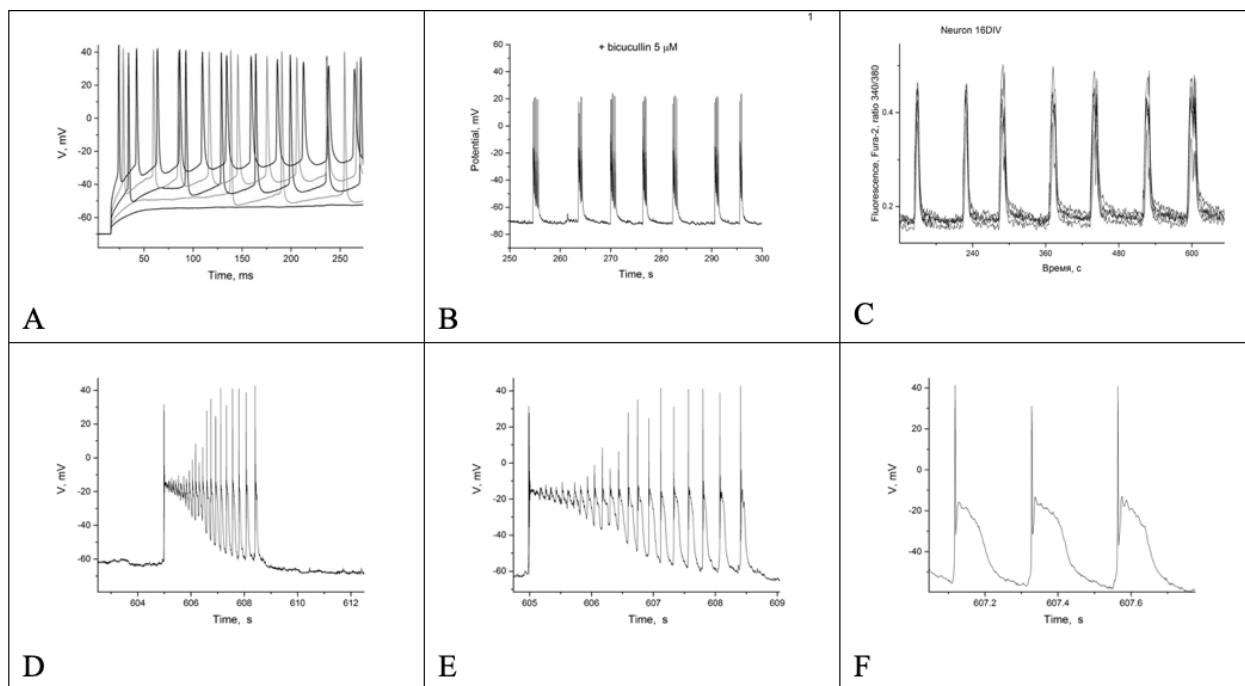


Рисунок 1. Формирование пачки ПД (А) и кластера PDS (В, D, Е) при деполяризации (А) и при снятии ГАМК-зависимого торможения (В). Колебания Ca^{2+} (С). Кластер PDS (D,Е) состоит из трех колебательных систем. Колебания PDS (F).

Вклад паракринных факторов в развитие гетерологической сенситизации мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Д.А. Степанова¹, В.И. Чечехин¹, К.Ю. Кулебякин¹, П.А. Тюрин-Кузьмин¹

1. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) – стволовые клетки стромы, способные к дифференцировке в остеобласты, миоциты, хондроциты, адипоциты, и к паракринной саморегуляции [1]. Ранее мы обнаружили присущий МСК феномен, при котором норадреналин и серотонин вызывают повышение чувствительности тех же клеток к норадреналину, который был назван гетерологической сенситизацией. Цель данной работы: определить вклад паракринных факторов в развитие гетерологической сенситизации МСК.

Сначала мы показали, что смена среды уменьшает степень развития сенситизации, вызванной гормонами. Для этого мы преинкубировали клетки с норадреналином или серотонином с последующей сменой среды в части лунок. В результате наблюдали повышение числа отвечающих кальцием клеток, подвергшихся длительной инкубации после воздействия гормонами, по сравнению с клетками, которые были отмыты от среды, содержащей паракринные факторы, что означает, что в формировании гетерологической сенситизации принимают участие не только внутриклеточные факторы, но и секретируемые паракринные факторы.

Потом мы показали, что механизм сенситизации зависит от факторов, выделенных клетками в среду, и эти факторы способны стимулировать наивные клетки на повышение их сенситизации. Для этого мы перенесли среду с клеток, стимулированных гормонами, на наивные клетки. В результате наблюдали, что в клетках, инкубированных в среде, содержащей паракринные факторы, наблюдалось повышение числа отвечающих кальцием клеток, по сравнению с наивными клетками, что означает вклад паракринных факторов в сенситизацию.

Таким образом, мы можем сделать вывод, что паракринные факторы играют значимую роль в развитии гетерологической сенситизации МСК.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках проекта № 21-15-00311.

Ссылки:

1. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. M. Pittenger, D. Discher, B. Péault, D. Phinney, J. Hare, A. Caplan. npj Regenerative Medicine, 2019, None, 4, 10.1038/s41536-019-0083-6

Секция: Цитоскелет и механочувствительность

Взаимодействие тромбоцитов с иммобилизованным фактором фон Виллебранда

С. И. Обыденный^{1,2}, О. Е. Ушакова², М. А. Пантелеев^{1,2}

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

Формирование тромба состоит из следующих этапов:

1. Адгезия тромбоцитов к месту повреждения;
2. Активация и формирование тромбоцитарного агрегата;
3. Коагуляция, стабилизация и контракция тромба.

Адгезия тромбоцитов осуществляется благодаря фактору фон Виллебранда, крупному мультимеру, секретируемому в кровь эндотелиальными клетками сосудов. Фактор фон Виллебранда чувствителен к механическому воздействию потока и способен разворачивается в зависимости от скорости сдвига. Он является посредником взаимодействия между тромбоцитарными рецепторами к фактору фон Виллебранда (комплексом гликопротеинов Ib-IX-V и интегрином $\alpha\text{IIb}\beta_3$) и коллагеном, присутствующим в месте повреждения сосуда, выполняя таким образом функцию замедления и адгезии тромбоцитов. Оказавшись возле места повреждения сосуда, тромбоцит взаимодействует со своими физиологическими активаторами, коллагеном и АДФ, приводящими к активации разными сигнальными путями. Вклад механического воздействия, а также разных сигнальных путей в процесс адгезии тромбоцита к месту повреждения не ясен.

Цель работы: Выявить влияние на адгезию тромбоцита механического воздействия (поток с разными скоростями сдвига).

Методы: Цельная кровь, набранная в гирудиновую пробирку, прокачивалась в плоскопараллельном канале с иммобилизованным фактором фон Виллебранда с различными скоростями сдвига. Съемка движущихся по подложке тромбоцитов производилась при помощи видеомикроскопии.

Результаты: Была обнаружена экспоненциальная зависимость средней скорости движения тромбоцитов по подложке с фактором фон Виллебранда от скорости сдвига. В диапазоне от 75 до 1500 с-1 скорость перемещения тромбоцитов была стабильна и составляла менее 5 мкм/мин. При повышении выше 1500 с-1 наблюдался экспоненциальный рост скорости перемещения тромбоцитов по подложке.

Выводы: Скорость движения тромбоцитов по фактору фон Виллебранда стабильна в широком интервале сдвиговых скоростей от 75 до 1500 с-1, это необходимо для успешной адгезии и активации тромбоцитов. Требуется дальнейшее исследование механизмов этих взаимодействий и выявление конкретных сигнальных путей, участвующих в первичной адгезии тромбоцитов.

Финансирование: Работа поддержана грантом МК-4997.2022.1.4

Роль кальций-активируемых калиевых каналов в процессах пролиферации, миграции и инвазии клеток миелоидной лейкемии человека

В.Ю. Васильева¹, А.В. Сударикова¹, З.М. Хайруллина¹, В.И. Чубинский-Надеждин¹

1. Институт Цитологии РАН, Санкт Петербург, Россия

Кальций-активируемые калиевые каналы (КСа) являются одними из важных участников процессов кальциевой сигнализации и передачи сигналов, так как способны активироваться при увеличении внутриклеточной концентрации свободного кальция в клетке. КСа каналы классифицируются в соответствии со значениями унитарной проводимости: каналы с высокой (BK), с промежуточной (IK) и с низкой (SK): SK1, SK2, SK3 - проводимостями. Было показано, что КСа каналы вовлечены в регуляцию различных процессов в клетках крови, как поддержание объема клеток, участие в кальций-регулируемых процессах и др. Ранее с помощью патч-кламп метода нами была зарегистрирована активность КСа в плазматической мембране клеток миелоидной лейкемии человека K562. В условиях близких к физиологическим проводимость КСа каналов была близка к IK и SK. Для однозначной идентификации КСа каналов мы применили whole-cell протокол электрофизиологических экспериментов с использованием высокоселективных ингибиторов каналов SK- апамина (300 нМ) и IK – TRAM-34 (1мкМ). Мы также провели эксперименты, направленные на разделение активности типов SK каналов, основываясь на различной чувствительности SK к селективному блокатору. Также, с помощью ОТ-ПЦР, мы подтвердили экспрессию SK2, SK3 и IK каналов в клетках K562 на уровне мРНК, в то время как мРНК SK1 не была обнаружена.

Данные литературы свидетельствуют о повышенной экспрессии КСа каналов в различных раковых клетках. Мы предположили, что идентифицированные SK и IK каналы могут участвовать в пролиферации, миграции и инвазии клеток K562. При инкубации клеток в культуральной среде, содержащей 300 нМ апамина или 5 мкМ TRAM-34, мы наблюдали значительное снижение количества клеток по сравнению с контролем, при этом не наблюдали изменений в уровне жизнеспособности клеток K562. Для выявления роли SK и IK каналов в миграционной и инвазивной активностях клеток были использованы полупроницаемые вставки (Transwell assay) без модификации (миграция), и с покрытием Matrigel (имитация внеклеточного матрикса, инвазия). Присутствие селективных ингибиторов значительно снижало как миграционную, так и инвазивную способность клеток K562, что может свидетельствовать о важной роли SK и IK каналов в исследуемых процессах.

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФИ №22-74-10037.

Экзогенный гемин и гематин вызывают сферизацию и гемолиз эритроцитов

Д.М. Михайлова¹, Т.О. Ружникова^{2,3}, Е.А. Скверчинская³, С.П. Гамбарян^{2,3},
Ю.С. Судницына³, Б.А. Герда^{2,3}, И.В. Миндукшев³

1. ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет, Санкт-Петербург, Россия
2. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
3. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Гемин (координационный ион – хлор) и гематин (координационный ион – гидроксид-ион) являются окисленными формами гема. Их концентрация в крови незначительна, что является результатом работы детоксификационной системы, включающей гемин-связывающие белки (альбумин и гемопексин) и фермент, вызывающий деградацию гемина, гемоксигеназу. При различных патологиях (малярия, внутрисосудистый гемолиз, гемоглобино- и мембранопатия) концентрация токсичных производных гема может превышать нейтрализующие возможности системы детоксификации, что приводит к серьезному повреждению клеток. Известно, что гемин вызывает значительные нарушения структуры эритроцитов, однако нет конкретных данных о концентрациях гемина и гематина, вызывающих данные нарушения. В связи с этим мы использовали оригинальный метод лазерной дифракции для определения концентраций гемина и гематина вызывающих сферизацию и гемолиз эритроцитов.

Цель исследования. Исследовать трансформацию эритроцитов под воздействием гемина и гематина методом лазерной дифракции.

Материалы и методы. Исследование проводили на отмытых эритроцитах человека, выделенных из крови здоровых доноров. Точность рабочих растворов гемина/гематина контролировали по методу молярной экстинкции. Эритроциты получали центрифугированием цельной крови и двукратной отмывкой в HEPES буфере. Трансформацию клеток при действии гемина/гематина регистрировали методом лазерной дифракции. Сферизацию эритроцитов регистрировали по снижению сигнала интенсивности светорассеяния в угле рассеяния 2.5° , и повышению сигнала в угле 12° . По полученным данным рассчитывали коэффициент сферичности для анализа изменения формы эритроцитов и процент гемолиза для описания лизиса.

Результаты. При концентрациях гематина и гемина 0.005–1 мкМ и 0.005–2 мкМ, соответственно, наблюдалась доза-зависимая сферизация клеток (EC_{50} гематина - 0.023 ± 0.003 мкМ, гемина – 0.041 ± 0.008 мкМ). Последующее повышение концентрации индуцировало гемолиз клеток (EC_{50} гематина 1.53 ± 0.10 мкМ, гемина – 2.24 ± 0.18 мкМ). При этом, выявлено, что скорость сферизации и гемолиза эритроцитов под воздействием гематина значительно выше, чем под воздействием гемина.

Закключение. Таким образом, гемин и гематин вызывают доза-зависимую сферизацию эритроцитов и их лизис. При этом скорость данных процессов под воздействием гематина значительно выше. Дальнейшее сравнение этих данных позволит более детально понять механизмы действия производных гема на клетки.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН в рамках научного проекта № 075-0152-22-00.

Роль цитоскелета в процессах становления и поддержания первичного морфогенетического градиента дрозофилы

А.В. Спиров¹

1. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия

Первичный морфогенетический градиент раннего эмбриона дрозофилы (градиент транскрипционного фактора бикоид, bicoid, bcd) является наиболее изученным, так что он служит экспериментальной моделью для исследования других морфогенетических градиентов, вплоть до таковых в эмбриогенезе млекопитающих и человека. Формирование, поддержание и функционирование градиента бикоид предполагает интеграцию нескольких ключевых клеточных процессов и механизмов, таких как активный транспорт моторами по элементам цитоскелета, токи цитоплазмы, реорганизация аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума. Нами с коллегами проанализировано поведение градиента бикоид в условиях гипоксии (когда затормаживаются многие процессы) и при обработке известными химическими агентами, влияющими на стабильность элементов цитоскелета. Исследовалось поведение мРНК bcd, белка бикоид и фактора Stauf, Stau (РНК-связывающий протеин, вовлеченный в транспорт и локализацию мРНК). Результаты количественной обработки конфокальных изображений таких ранних эмбрионов использованы для статистического анализа и для компьютерного моделирования средствами 2D моделей реакции-диффузии и 3D агентных моделей. Мы с соавторами показали чувствительность процессов перераспределения мРНК bcd и перераспределения фактора бикоид к целостности элементов цитоскелета. По результатам анализа мы пришли к заключению о периодических перераспределениях комплексов bcd+Stau в ходе раннего эмбрионального развития, как одному из ключевых характеристик активного транспорта мРНК бикоид [1]. Впервые такие периодические перераспределения вдоль главной оси эмбриона наблюдаются на стадии дробления, затем на стадии целлюляризации. Вместе с тем, наши наблюдения на живых эмбрионах gfp-Bcd подтвердили известные заключения классических работ, что в раннем эмбриогенезе наблюдаются периодические «фонтанные» токи цитоплазмы в головной части эмбриона, причем время и направления токов совпадают с таковыми для перераспределений bcd+Stau. Поэтому естественно ожидать, что эти токи также могут участвовать в перемещениях bcd+Stau. Сопоставление наших заключений с результатами других авторов (сравни [Cai et al., 2019]) позволяют предположить, что bcd+Stau способны связываться некоторыми клеточными структурами, по-видимому, через микротрубочки (MT). Мы, в частности, предполагаем, что перераспределения bcd+Stau на стадии раннего дробления связаны с реорганизациями и функционированием аппарата Гольджи в головной части раннего эмбриона. Предлагаемая молекулярно-биологическая машинерия может быть заимствована из известных процессов в оогенезе (MT, микрофиламенты, PAR-сети и токи цитоплазмы в транспорте мРНК). Мы полагаем, что ряд наблюдаемых процессов становления, поддержания и функционирования морфогенетического градиента бикоид являются консервативными и в той или иной форме могут быть прослежены вплоть до таковых для морфогенетических градиентов млекопитающих и человека.

Финансирование: Грант РФФИ №20-04-01015

Ссылки:

1. Quantification reveals early dynamics in Drosophila maternal gradients. Shlemov A, Alexandrov T, Golyandina N, Holloway D, Baumgartner S, Spirov AV. PLoS One. 2021 Aug 19;16(8):e0244701. doi: 10.1371/journal.pone.0244701.
2. Probing the Effect of Bulky Lesion-Induced Replication Fork Conformational Heterogeneity Using 4-Aminobiphenyl-Modified DNA. Cai A, Bian K, Chen F, Tang Q, Carley R, Li D, Cho BP. Molecules. 2019 Apr 20;24(8):1566. doi: 10.3390/molecules24081566.

Микровезикуляция, блеббинг и репарация плазматической мембраны: параллели и взаимосвязи

Т.И. Кадыров^{1,2}, А.Н. Свешникова²⁻⁴, М.А. Пантелеев^{1,2,4}

1. МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия
3. Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия
4. НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева, Москва, Россия

Внеклеточные везикулы сегодня признаются важным каналом передачи информации между различными клетками внутри и между организмами от архей [1] до человека в норме и патологии [2]. Тем не менее, на сегодняшний день нет понимания необходимых и достаточных механизмов образования внеклеточных везикул, которое могло бы использоваться в предсказательных целях. Микровезикулы – подкласс внеклеточных везикул, характеризующихся размером ~150-1000 нм и образующихся из клеточной мембраны. Знания о них в особенности ограничены. При этом в литературе описано множество процессов, влияющих на микровезикуляцию [3]. Целью настоящего исследования является ответ на вопрос, какие механизмы микровезикуляции известны на сегодняшний день и как можно восполнить существующие пробелы

Существует поверхностное сходство образования микровезикул с другим мембранным процессом – блеббингом. Он заключается в последовательном набухании и стягивании пузырей на поверхности мембраны [4]. Поскольку образование везикулы из мембранного пузыря требует стягивания его шейки, напрашивается также аналогия с одним из механизмов починки мембран, при котором происходит стягивание краёв отверстия в мембране [5].

В настоящем исследовании были проанализированы материалы ключевых работ, посвящённых этим процессам, за 1995-2021 гг., найденные в базе NCBI NIH PubMed [6]. Было показано, что параллели в механизмах этих трёх процессах идут глубже и вовлекают ряд регуляторных и эффекторных систем и участников, таких как: Ca^{2+} сигнализация малые GTPазы, в частности Rho и ROCK акто-миозиновые филаменты внутриклеточное гидростатическое давление изгибающие мембрану белки, такие как белки комплекса ESCRT сфинголипиды (обладающие конической формой) и сфингомиелиназа фосфолипидная асимметрия мембраны и её нарушение. Кроме того, эти процессы часто сопутствуют друг-другу. Они также объединены стохастичным и вынужденным характером, связанным с нарушением структур клеточной оболочки большей или меньшей степени. Это даёт основания для гипотез о том, почему у везикуляции и блеббинга обнаруживается множество ролей не только в физиологии, но и в патологии.

Накопленная биологическая и биофизическая информация по механизмам блеббинга и починки мембран подсказывает направления исследования и экспериментальные подходы, которые могут позволить собрать недостающую информацию о механизмах микровезикуляции, а также указывает на их ключевые факторы.

Ссылки:

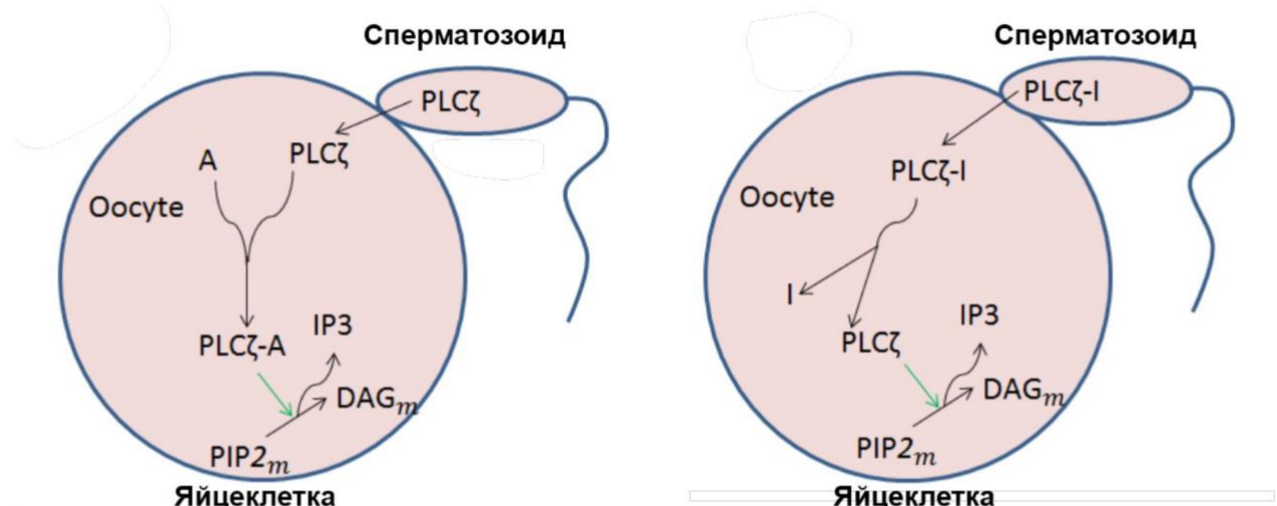
1. B. Deatherage, B. Cookson. *Infection and Immunity*, 2012, 1948-1957, 80
2. A. Yates, R. Pink, U. Erdbrügger, P. Siljander, E. Dellar, P. Pantazi, N. Akbar, W. Cooke, M. Vatish, E. Dias - Neto, D. Anthony, Y. Couch. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2022, 11, 10.1002/jev2.12190
3. M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, C. Théry. *Nature Cell Biology*, 2019, 9-17, 21, 10.1038/s41556-018-0250-9
4. G. Charras, M. Coughlin, T. Mitchison, L. Mahadevan. *Biophysical Journal*, 2008, 1836-1853, 94, 10.1529/biophysj.107.113605
5. Into the breach: how cells cope with wounds. M. Nakamura, A. Dominguez, J. Decker, A. Hull, J. Verboon, S. Parkhurst. *Open Biology*, 2018, 180135, 8, 10.1098/rsob.180135
6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Секция:
Клеточные Системы



Системно-биологический анализ внутриклеточной передачи сигнала и клеточный метаболизм:

- компьютерный и экспериментальный анализ передачи и интеграции клеточного сигнала
- исследования метаболической регуляции клеточной активности
- программируемая клеточная гибель
- теоретическое предсказание влияния новых фармакологических разработок на единичную клетку



Табачник **СБФ 2022**

Роль сердечного миозин-связывающего белка с в регуляции сократительной функции миокарда

С.Ю. Бершицкий¹, Г.В. Копылова¹, Д.В. Щепкин¹, А.М. Кочурова¹, Е.А. Бельдия¹,
А.М. Матюшенко², Д.С. Ямпольская²

1. Лаборатория биологической подвижности, ИИФ УрО РАН, Екатеринбург, Россия
2. Лаборатория структурной биохимии белков, ИБ им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

Сокращение миокарда является результатом взаимодействия молекул миозина с актином тонкой нити и контролируется Ca^{2+} -регуляторными белками – тропонином (Тн) и тропомиозином (Трм). Кроме них в активации сокращения миокарда участвует сердечный миозин-связывающий белок-С (сМуВР-С) [1]. Молекула сМуВР-С массой 140-150 кДа состоит из 8 иммуноглобулиновых и 3 фиброниктиновых доменов, от С0 на N-конце до С10 на С-конце [1]. Домены С0-С2 содержат сайты связывания миозина, в том числе его регуляторной лёгкой цепи, актина и Трм [1]. Миозин предсердий и желудочков различаются изоформным составом тяжёлых и лёгких цепей. С помощью *in vitro* подвижной системы (ИПС) мы впервые сравнили влияние N-концевых доменов сМуВР-С на Ca^{2+} регуляцию взаимодействия миозина предсердий и желудочков с актином. Предсердный и желудочковый миозин и Тн выделяли из миокарда свиньи, актин – из *m. psoas* кролика. Фрагменты С0, С0-С1 и С0-С2 человеческих сМуВР-С и α -Трм экспрессировали в *E. coli*. Влияние фрагментов сМуВР-С оценивали по кальциевой зависимости скорости скольжения тонких нитей, реконструированных из актина, Тн и Трм, по миозину в ИПС [2]. Зависимость аппроксимировали уравнением Хилла h и определяли: максимальную скорость движения нитей $V_{\max}$ при насыщающей концентрации Ca^{2+} , Ca^{2+} чувствительность, т.е. значение $p\text{Ca}$, при котором достигается полумаксимальная скорость, и коэффициент кооперативности Хилла. Сравнение проводили по U-критерию Манна–Уитни ($p < 0.05$).

Обнаружено, что N-концевые фрагменты сМуВР-С по-разному влияют на характеристики Ca^{2+} зависимости скорости скольжения тонких нитей по миозину предсердий и желудочков (рис. 1). Фрагмент С0-С2 примерно в 2 раза уменьшал $V_{\max}$ и h , но значительно увеличивал Ca^{2+} чувствительность скорости нитей по миозину желудочков, что согласуется с ранее полученными данными [3]. Однако на миозине предсердий С0-С2 фрагмент существенно уменьшал как $V_{\max}$, так и её Ca^{2+} чувствительность.

Этот результат может объясняться отличием взаимодействия С0-С2 фрагмента сМуВР-С с регуляторной лёгкой цепью, которые у миозина предсердий и желудочков различны. Особенности взаимодействия разных изоформ сократительных и регуляторных белков в желудочках и предсердиях служат осуществлению специфической сократительной функции разных камер сердца.

Финансирование: Работа поддержана грантом РНФ №22-14-00174 и выполнена на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН.

Ссылки:

1. MyBP-C: one protein to govern them all. L. Heling, M. Geeves, N. Kad. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2020, 91-101, 41, 10.1007/s10974-019-09567-1
2. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an *in vitro* motility assay. D. Shchepkin, G. Kopylova, L. Nikitina, L. Katsnelson, S. Bershitsky. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 159-163, 401, 10.1016/j.bbrc.2010.09.040
3. Myosin-binding protein C displaces tropomyosin to activate cardiac thin filaments and governs their speed by an independent mechanism. J. Mun, M. Previs, H. Yu, J. Gulick, L. Tobacman, S. Beck Previs, J. Robbins, D. Warshaw, R. Craig. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 2170-2175, 111, 10.1073/pnas.1316001111

Гольджи как центральный транспортный узел и нецентросомный МТОС

А. В. Бураков¹, И. Б. Бродский¹, А. И. Фокин^{1,2}, А. А. Ефремов¹, Е. С. Надеждина³

1. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. CNRS UMR168, Institut Curie, Paris, France
3. Институт белка РАН, Пущино, Россия

Важная роль микротрубочек в интерфазной животной клетке заключается в обеспечении путей для везикулярного транспорта с помощью моторных белков. Эффективность внутриклеточного транспорта во многом определяется архитектурой системы микротрубочек, которая, в свою очередь, зависит от функционирования МТОС. За последнее десятилетие было проведено много исследований нецентросомных МТОС, в частности, мембран Гольджи, определяющих архитектуру микротрубочек не только в нейронах, но и во многих других типах клеток. Молекулярные механизмы функционирования Гольджи как центра организации микротрубочек до сих пор неясны. В данной работе мы сравнили активность по организации микротрубочек в двух родственных клеточных линиях почки зеленой мартышки и обнаружили, что роль комплекса Гольджи как МТОС существенно различается в таких клетках. Мы обнаружили также, что эти различия не связаны с наиболее хорошо изученными белками, роль которых в организации микротрубочек на Гольджи была показана ранее. Наконец, мы идентифицировали несколько малоизученных белков, по-видимому, участвующих в этом процессе.

Финансирование: При поддержке гранта РНФ № 22-24-00578

Как фокальные контакты регулируются клеткой?

И.А. Воробьев^{1,2}, М. Тлегенова¹, А. Уразбаев¹, Ш. Кауанова², Г. Жургенбаева²

1. Назарбаев Университет, Астана, Казахстан
2. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Фокальные контакты (ФК) являются специализированными макромолекулярными структурами, которые необходимы для обеспечения прикрепления клеток к субстрату. В подвижных клетках ФК собираются и разбираются в процессе миграции клеток. Мы исследовали динамику ФК в линиях клеток A549 и U118 методом прижизненной флуоресцентной микроскопии после трансдукции клеток талином, связанным с RFP или трансфекции винкулином, связанным с GFP. ФК, возникающие на ведущем краю клетки, имеют вдвое меньшую продолжительность жизни (около 60 минут) по сравнению с ФК, возникающими в теле клетки и на заднем крае (150 минут), но сходный размер и интегральную яркость. Большинство (свыше 90%) долгоживущих ФК в клетках A549 перемещаются по направлению к центру клетки. Величина перемещения составляет от одного до нескольких мкм и коррелирует с продолжительностью жизни ФК. Периоды фаз роста и разборки всех групп ФК не различаются. Время сборки и разборки ФК варьирует, и составляет в среднем около 10 минут, что соответствует времени полувосстановления флуоресценции талина, определяемой методом FRAP (5-10 минут). Процесс разборки ФК непосредственно перед отрывом задней части клетки или при ошаривании клетки в митозе, также не отличается от разборки на ведущем краю клетки. Время жизни и интегральная яркость ФК на ведущем краю клетки возрастает при стабилизации паклитакселем или деполимеризации нокадазолом микротрубочек, однако продолжительность фаз роста и разборки ФК при этом не меняются. Ингибирование полимеризации актина (цитохалазин Д, латрункулин В в концентрации около 1 мкМ) приводит к полной разборке пучков актиновых филаментов, подавляет сборку новых ФК и приводит к изменению морфологии клетки. В первом и во втором случае разборка уже существующих ФК никак не ускоряется и происходит в течение примерно 30 минут. Сборка новых ФК также частично подавляется при ингибировании немышечного миозина II блеббистатином. При этом разборка ФК также не ускоряется. Новые ФК, появляющиеся в присутствии блеббистатина, имеют меньшую площадь и интегральную яркость, чем ФК в контрольных клетках. Мы полагаем, что регуляция ФК в клетке включает следующие элементы: стимуляция сборки при выдвигании ламеллиподий, быстрый обмен ФК на переднем краю клетки за счет взаимодействия с концами микротрубочек, стабилизация ФК под действием натяжения со стороны актиновых фибрилл, и постепенное перемещение ФК к центру клетки. Разборка ФК является стохастическим процессом, она может быть индуцирована разрушением актиновых пучков, но ее скорость не регулируется клеткой.

Финансирование: Грант Министерства высшего образования и науки Республики Казахстан, № AP14869915

Поддержание формы и сократимость эндотелиальной клетки в регуляции барьерной функции - сюита в исполнении всего цитоскелетного оркестра

И.Б. Алиева¹, А.С. Шахов¹

1. НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Эндотелиальные клетки (эндотелиоциты) – специализированные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность всех сосудов организма. В норме эндотелиоциты имеют уплощенную форму и плотно прилегают друг к другу, соединяясь посредством специализированных VE-кадгериновых контактов. Это позволяет им выполнять основную, барьерную, функцию эндотелия, заключающуюся в регуляции сосудистого тонуса и проницаемости сосудистой стенки, что обеспечивает регулируемый обмен между циркулирующей в сосудах кровью и тканевой жидкостью. Эндотелиальный барьер динамичен и крайне чувствителен к воздействию различных стимулов. Нарушение барьерной функции эндотелиальных клеток (дисфункция эндотелия) приводит к нерегулируемому перемещению жидкости, находящейся в просвете сосудов, в окружающие ткани, что нарушает работу соответствующих органов, приводя к различным патологиям, вплоть до летальных. Принято считать, что актиновый цитоскелет является главным игроком, ответственным за сокращение эндотелиоцитов при развитии барьерной дисфункции, и за их возвращение к нормальной форме при восстановлении барьерной функции. Однако, полученные в последние десятилетия данные, включая наши собственные, позволяют утверждать, что «первой скрипкой» в этом процессе являются микротрубочки – именно они первыми реагируют на сигналы, инициирующие каскад реакций, приводящих к нарушению эндотелиального барьера. Микротрубочки по-разному взаимодействуют с разнообразными цитоскелетными структурами, сформированными β - и γ -цитоплазматическими актинами. Образованные микротрубочками первичные реснички также реагируют на воздействие факторов, провоцирующих изменение эндотелиальной проницаемости. Общие регуляторные молекулы (малые ГТФазы) и белки-связки координируют взаимодействие всех фибриллярных структур эндотелиоцита, и промежуточные филаменты также вовлечены в этот процесс. Адгезивные структуры клетки являются полноценными участниками цитоскелетного оркестра, они реорганизуются по мере развития барьерной дисфункции и контролируются как фибриллярными компонентами цитоскелета, так и общими с ними регуляторными молекулами, а VE-кадгериновые контакты сами по себе играют важную регуляторную роль. Таким образом, все цитоскелетные структуры, имеющиеся в эндотелиоците, вовлечены в реализацию основной – барьерной – функции этих клеток, они взаимосвязаны, и эта связь координируется на структурном и регуляторном уровнях. Такой общий «оркестр», сложенный посредством общих белков-линкеров и дирижируемый общими регуляторными молекулами, способен обеспечить поддержание формы эндотелиоцитов и, в целом, эндотелиальной барьерной функции, а также их восстановление после повреждающих воздействий.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (№22-25-00663).

Роль эзрина в прогрессии плоскоклеточного рака головы и шеи

Г.В. Какурина^{1,2}, Е.Е. Середа^{1,2}, В.В. Великая¹, М.Н. Стахеева¹, О.В. Черемисина¹,
Е.Л. Чойнзонов¹, И.В. Кондакова¹

1. Научно-исследовательский институт онкологии, ТНИМЦ Российской академии наук, Томск, Россия
2. Кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Известно, что эзрин (EZR), являясь линкером между мембраной и цитоскелетом, участвует в канцерогенезе. Изменение его уровня связано с метастазированием при различных типах рака [1]. Однако данные о вкладе EZR в опухолевую прогрессию во многом противоречивы. Не определена роль EZR в прогрессии высоко агрессивного плоскоклеточного рака головы и шеи (ПРГШ). Поэтому целью работы явилось изучение участия эрина в прогрессии ПРГШ.

Материалы и методы: в исследование вошло 29 больных ПРГШ (T1-4N0-2M0), не получавших противоопухолевого лечения. Методом ИФА проводили определение уровня EZR в сыворотке крови больных ПРГШ (ELISA Kit for Cytovillin (Ezrin), Cloud-Clone Corp). Уровень мРНК EZR оценивали в парной ткани методом ОТ-ПЦР РВ методом 2ΔΔСТ по отношению к гену-рефери GAPDH. Количество экспрессирующих EZR циркулирующих опухолевых клеток (EZR+ЦОК) определяли методом проточной цитометрии на проточном цитометре BD FACS CANTO II (BD, США). Количество опухолевых клеток (Ezr_оп) и клеток микроокружения (Т и В-лимфоциты, макрофаги, фибробласты) в первичной опухоли определяли методом TSA -модифицированного иммуногистохимического анализа. Оценивались доля клеток с экспрессией EZR от всех клеток опухоли для ИГХ, и в % от пула ЦОК. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программ IBM SPSS и Statistics v.20.0

Результаты: Содержание EZR в сыворотке значимо было выше на 30% у больных ПРГШ, у которых произошло прогрессирование опухолевого процесса после противоопухолевого лечения в течении 12 месяцев ($p=0,02$). При этом уровень мРНК EZR в опухолевой ткани снижался почти в 3 раза, но изменения были на уровне тенденции ($p=0,09$). EZR+ЦОК было больше, чем EZR+ лейкоцитов ($p=0,001$), так же Ezr_оп было больше, чем других клеток микроокружения ($p=0,04$). ROC-анализ показал, что среди EZR -содержащих клеток наиболее подходящим для прогноза рецидивов были EZR+фибробласты ($AUC=0,69$, $Se=71\%$, $Sp=70\%$), а для прогноза метастазирования EZR+Т-лимфоциты ($AUC=0,75$, $Se=88\%$, $Sp=70\%$).

Заключение: Таким образом, EZR участвует в метастазировании и прогрессии ПРГШ. Причем диагностическую ценность могут иметь не только опухолевые клетки экспрессирующие его, но и клетки микроокружения. В целом результаты согласуются с литературными данными [2]. Эзрин важен для обеспечения опухолевой прогрессии, возможно, участвуя в более сложных сигнальных системах [1; 2]

Ссылки:

1. Ezrin Mediates Invasion and Metastasis in Tumorigenesis: A Review. Song Y, Ma X, Zhang M, Wang M, Wang G, Ye Y, Xia W. Front Cell Dev Biol. 2020 Nov 10;8:588801. doi: 10.3389/fcell.2020.588801
2. Expression of Genes Encoding Cell Motility Proteins during Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Kakurina GV, Kondakova IV, Spirina LV, Kolegova ES, Shashova EE, Cheremisina OV, Novikov VA, Choinzonov EL. Bull Exp Biol Med. 2018 Dec;166(2):250-252. doi: 10.1007/s10517-018-4325-1

Метаболические исследования быстрых изменений циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), инозитолтрифосфата (ИФ3) и диацилглицерола (ДАГ) в наружных сегментах фоторецепторов позвоночных

Н. О. Ерофеева¹, Д. А. Мешалкина¹, М. Л. Фирсов¹, М. В. Беляков^{1,2}

1. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия
2. НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Ленинградская обл., Россия

В фоторецепторах сетчатки позвоночных поглощение кванта света запускает каскад фототрансдукции. Вторичным мессенджером этого процесса является цГМФ, уровень которого в цитоплазме относительно высок в темноте и снижается при световой стимуляции. Хорошо известно, что работа каскада фототрансдукции регулируется кальцием, но некоторые косвенные данные указывают на то, что циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), инозитолтрифосфат (ИФ3) и диацилглицерин (ДАГ) также могут оказывать регулирующее действие и представлять собой высокоэффективные биологические усилители реакций между медиаторами и мембранными рецепторами фоторецепторных клеток. Характерное время этих процессов меньше секунды. Учитывая, что традиционные методы флуоресценции не могут применяться для измерения концентрации каких-либо сигнальных молекул в сетчатке. По этой причине мы создали установку, позволяющую проводить криофиксацию образцов сетчатки с необходимой скоростью, и разработали методологию анализа неканонических сигнальных молекул.

В рамках исследования взаимодействия регуляторных соединений в сетчатке разработаны аналитические методы измерения их массовой концентрации в сетчатке. В соответствии с проверяемой гипотезой в качестве аналитов были выбраны циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), инозитолтрифосфат (ИФ3) и различные диацилглицеролы (ДАГ) как возможные участники регуляторного механизма фотоадаптации сетчатки. Сложность задачи, заключающаяся в определении малых концентраций аналита в многокомпонентной матричной системе, а также в крайне малом количестве пробы (не более 1 мг), предъявляет дополнительные требования к методике анализа, от которой зависит точность и воспроизводимость результатов измерения. Методы измерения и идентификации тестируемых соединений основаны на одном из наиболее точных, селективных и высокочувствительных методов анализа многокомпонентных биологических образцов в настоящее время - высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-MS/MS HR). Высокая селективность анализа ВЭЖХ-MS/MS позволяет преодолеть мешающее влияние компонентов матрицы, экстрагируемых в растворитель, что делает этот метод пригодным для анализа биологических матриц. Точность измерения достигается с помощью внутренних стандартов с изотопной маркировкой. Результатом стали разработанные методы идентификации и определения цАМФ, ИФ3 и диацилглицеролов в сетчатке глаза, предел обнаружения всех соединений не более 1,0 нг/мл экстракта. Методики применялись в рамках пилотного исследования влияния интенсивности, продолжительности и цикличности освещения на содержание регуляторов фотоадаптации в сетчатке лягушек.

Финансирование: При поддержке гранта Российского научного фонда РНФ №22-25-00656

Метод регистрации пароксизмального деполяризационного сдвига при помощи метода локальной фиксации потенциала в конфигурации outside-out

Д.П. Ларюшкин¹⁻³, К.А. Крицкая³, А.М. Косенков³, С.Г. Гайдин³, В.П. Зинченко³

1. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия
2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия
3. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Эпилепсия — это одно из наиболее распространённых неврологических заболеваний, характеризующееся внезапно возникающими приступами судорог. Полагают, что в основе эпилепсии лежат нарушения баланса торможения и возбуждения нейрональных сетей, приводящие к сложной пространственно-временной структуре синхронизации и десинхронизации больших нейрональных ансамблей. Клеточным коррелятом эпилептиформной активности, регистрируемой при помощи ЭЭГ, является пароксизмальный деполяризационный сдвиг (ПДС). ПДС — это положительный сдвиг мембранного потенциала нейрона, достигающий — 15 мВ и длящийся до 400 мс, на фоне которого могут возникать от одного до нескольких потенциалов действия.

На сегодняшний день предложено несколько механизмов, которые могли бы объяснить явление гиперсинхронизации нейронов во время эпилепсии, таких как: высокая концентрация внеклеточного калия, уменьшение внеклеточного пространства и/или эфаптические связи. На ряду с этим, существуют данные, что гиперсинхронизация может происходить благодаря эндогенному электрическому полю, что подтверждается несколькими математическими моделями, однако экспериментов о роли электрического поля при возникновении ПДС проведено не было. Таким образом, мы предположили, что если мощности эндогенного электрического поля достаточно для деполяризации мембраны, то мы смогли бы зарегистрировать такое поле при помощи метода локальной фиксации потенциала.

Для экспериментов мы использовали смешанную нейроглиальную культуру гиппокампа крысы линии Вистар. Активацию эпилептиформной разрядов индуцировали бикикулином в концентрации 10 мкМ. Для регистрации сигнала использовали метод patch-clamp (с программным обеспечением pClamp10.2) в конфигурации whole-cell, а после того, как были записаны контрольные показатели (два кластера ПДС), мы переходили в конфигурацию outside-out, записывали два кластера и отводили электрод 1,25 μm и т.д., пока амплитуда ПДС была различима на фоне шума. Анализ данных производили при помощи языка программирования python3 с использованием пакетов numpy, scipy.signal, ruABF. В результате проведённых экспериментов нами было показано, что при помощи метода patch-clamp в конфигурации outside-out возможно зарегистрировать ПДС нейрональной сети в нейроглиальной культуре крысы, вызванных бикикулином. Полученные результаты могут быть использованы при исследовании эпилепсии на клеточном уровне.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания ИБК РАН № 075-01512-22-02/004-00 по теме: "Нейропротекторные препараты нового поколения" № 1022080100047-5-1.6.4

Стириловые производные для флуоресцентного мечения в биологии

М.А. Устимова¹, А.С. Ефимова^{1,2}, Н.С. Чмелюк³, Ю.В. Федоров¹, О.А. Федорова^{1,2}

1. Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН, Москва, Россия
2. Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва, Россия
3. Кафедра медицинских нанобиотехнологий, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Стириловые красители относятся к подклассу гемицианинов широко используемого в биологии класса цианиновых красителей [1]. Особенностью структуры таких красителей является наличие гетероцикла по одну сторону полиметиновой цепи и электронодонорного фрагмента по другую. В отличие от классических цианиновых красителей, они обладают большим Стоксовым сдвигом и более фотостабильны, что позволяет их рассматривать, как перспективные соединения для разработки реагентов для флуоресцентного мечения в биологии. В данной работе была разработана серия моно- и бис-стириловых красителей (Схема 1), где в качестве гетероциклического фрагмента был выбран пиридин, а в качестве донорного фрагмента – различные amino- и оксо- производные. Все красители поглощают в области 400-500 нм и флуоресцируют 580-650 нм. В водных растворах красители обладают низким квантовым выходом флуоресценции, однако в вязких средах и в окружении биомолекул (ДНК/РНК/альбумин) интенсивность флуоресценции многократно возрастает. Оптические исследования несимметричных бисстириловых красителей показали, что в полученных бисхромофорных системах реализуется резонансный перенос энергии (FRET).

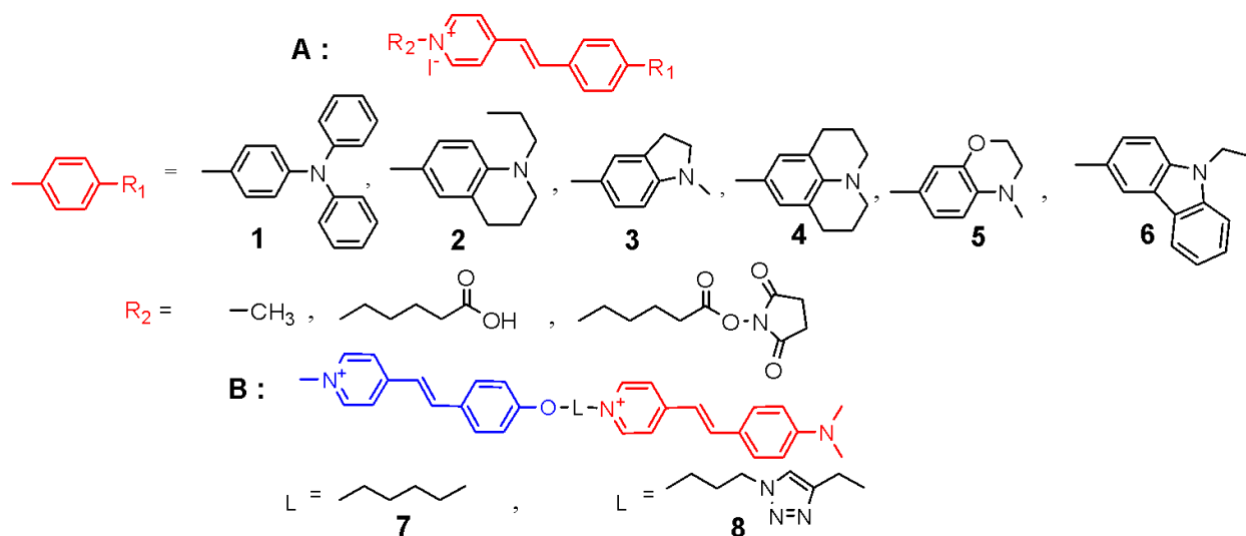


Схема 1. Структуры моностириловых красителей (А) и бисстириловых красителей (В).

Биологические эксперименты по локализации показали, что метиловые производные моностириловых красителей (1-6) локализуются в митохондриях клеток A549. Модификация красителей карбоксильной и NHS-эфирной группой позволило использование красителей для ковалентного мечения антител. Исследования бисстириловых красителей (7-8) на селективность связывания ДНК/РНК *in vitro* показали большую афинность соединений к ДНК.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ №21-73-20158).

Ссылки:

1. Chemistry of cyanine dyes-A review. G. Gopika, P. Prasad, A. Lekshmi, S. Lekshmypriya, S. Sreesaila, C. Arunima, M. Kumar, A. Anil, A. Sreekumar, Z. Pillai. Materials Today: Proceedings, 2021, 3102-3108, 46, 10.1016/j.matpr.2021.02.622

Исследование ионных каналов и мембранного потенциала тромбоцитов при активации рецептора PAR-1

А.Ю. Кохан¹, Ф.А. Балабин², Д. Рогатых², А.Н. Свешникова^{3,4}, Е.В. Шамова^{1,5}

1. ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии» НАН Беларуси, Минск, Беларусь
2. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
3. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
4. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
5. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Тромбоциты – небольшие безъядерные клетки, играющие ключевую роль в процессах гемостаза, а также участвующие в воспалительных и иммунных реакциях организма. Механизмы активации тромбоцитов многочисленны и зависят от типа физиологического либо патологического стимула. Известно, что при активации тромбоцитов проводимость ионных каналов и значение трансмембранного потенциала могут меняться, однако о роли данных изменений известно мало. В настоящей работе изучены токи через ионные каналы плазматической мембраны и кинетика мембранного потенциала тромбоцитов, при их активации тромбином. Составлена модель ионного транспорта в тромбоците при активации рецептора тромбина PAR-1. Моделирование процессов внутриклеточной сигнализации тромбоцитов проводили в программе Wolfram Mathematica 11.2. Основные реакции и их параметры взяты из литературных источников [1,2] и экспериментальных данных, полученных в данной работе. Исследование электрофизиологических параметров ионных каналов и мембранного потенциала тромбоцитов проводили с помощью метода пэтч-кламп [3]. При активации тромбоцитов тромбином наблюдались осцилляции трансмембранного потенциала. В конфигурации cell-attach зарегистрировано открытие 5 типов ионных каналов тромбоцитов при их активации тромбином. Среди зарегистрированных каналов с проводимостями около 2 пСм, 10 пСм и 21 пСм являются каналами калиевой проводимости, каналы с проводимостями около 4 пСм и 14 пСм, вероятно, являются каналами хлорной проводимости. Калиевый канал с проводимостью 21 пСм является каналом KCa 3.1, что подтверждается вычисленными временными характеристиками его нахождения в открытом и закрытом состоянии. Составлена математическая модель ионного транспорта через плазматическую мембрану тромбоцита, включающая в себя модуль сигнализации, вызываемой активацией рецептора тромбина PAR-1, модуль кальциевой сигнализации и модуль транспорта ионов натрия, калия и хлора через плазматическую мембрану. Моделирование транспорта ионов калия через каналы KCa 3.1 выполнено с применением непрерывной марковской модели с параметрами, полученными в эксперименте. Показано, что при активации PAR-1 происходят осцилляции мембранного потенциала, вызываемые стробированием канала KCa 3.1. Активация тромбоцитов тромбином сопровождается открытием ионных каналов плазматической мембраны калиевой и хлорной проводимости и осцилляциями трансмембранного потенциала. С помощью математической модели показано, что наблюдаемые осцилляции могут быть PAR-1 – опосредованной активацией канала KCa 3.1.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (Б23РНФ-162).

Ссылки:

1. L. Lenoci, M. Duvernay, S. Satchell, E. DiBenedetto, H. Hamm. Molecular BioSystems, 2011, 1129, 7, 10.1039/C0MB00250J
2. F. Balabin, D. Morozova, A. Mayorov, A. Martyanov, M. Panteleev, A. Sveshnikova. Moscow University Physics Bulletin, 2018, 526-533, 73, 10.3103/S0027134918050041
3. A. Kokhan, S. Zdanevich, I. Prokofev, I. Gorudko, E. Shamova. System Biology and Physiology Reports, 2021, 3-11, 1, 10.52455/sbpr.01.202101012

Журнал «Системная биология и физиология»

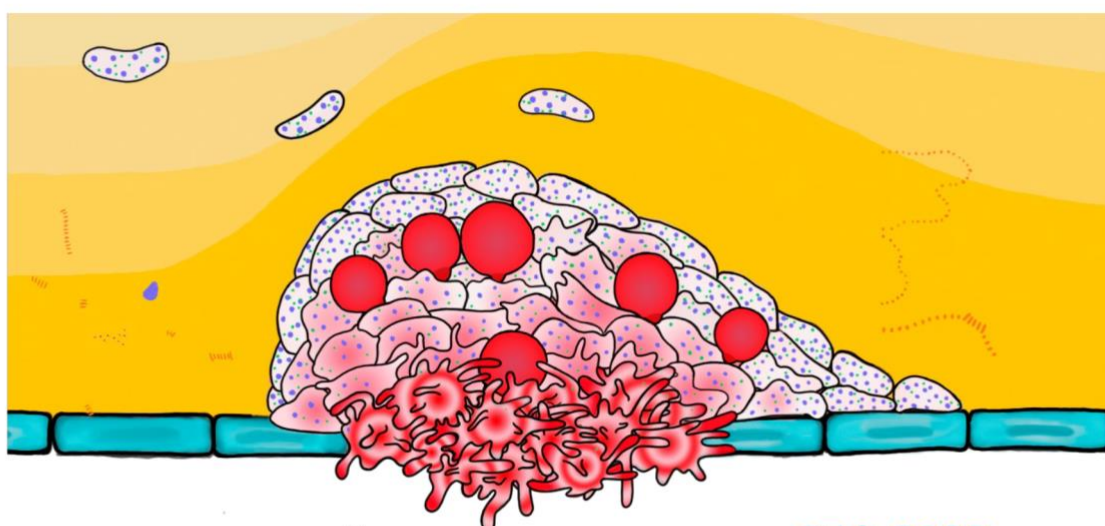
Секция:

Физиологические Системы



Анализ физиологически и патофизиологически значимых событий:

- **механистические исследования физиологических феноменов на уровне клеточных популяций**
- **исследования течения и распространения заболевания**
- **анализ влияния лекарств на течение заболевания**



Свешникова и соавт. **СБФ 2022**

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ:

BiVitrum



ЦТП ФХФ РАН

**Системная и биология
физиология**

Механоуправляемые каналы Piezo1 и их вклад в локальную передачу сигнала

В.И. Чубинский-Надеждин¹

1. Институт Цитологии РАН, Санкт Петербург, Россия

Клетки различных организмов и тканей в процессе жизни постоянно подвергаются разнообразным механическим воздействиям, что, в частности, приводит к генерации на плазматической мембране электрических сигналов - ключевому звену клеточной механотрансдукции. Использование электрофизиологического метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp), представляющего уникальные возможности для наблюдения активности ионных каналов в реальном масштабе времени, позволило обнаружить новый тип каналов, активность которых зависит от механического состояния клетки. Эти каналы были названы механочувствительными (МЧ, mechanosensitive) или механо-управляемыми (mechanogated). С точки зрения процессов клеточной сигнализации особый интерес представляют МЧ каналы, которые могут обеспечивать вход катионов, в (том числе двухвалентных) в ответ на изменения механического статуса клеток. Именно каналы катионного входа, как предполагается, опосредуют быстрые механозависимые ответы в клетках и тканях, а их проницаемость для ионов кальция, универсальных вторичных посредников, делает их ключевыми участниками процессов передачи сигнала с клеточной поверхности к цитоплазматическим структурам. В течение длительного времени молекулярная идентичность кальций-проницаемых МЧ каналов оставалась под вопросом. Настоящим прорывом стало открытие в 2010 году группой А. Патапутяна ранее неизвестных катионных каналов Piezo1/2, которые оказались уникальными с точки зрения молекулярной структуры при отсутствии гомологии с известными ранее канальными белками. Спустя 11 лет, в 2021 году Ардем Патапутян стал лауреатом Нобелевской премии за свое фундаментальное открытие, которое сформировало новейший этап в исследовании процессов механотрансдукции и клеточной механики. В наших электрофизиологических исследованиях был впервые показан феномен сопряженной активации МЧ/Piezo1 каналов и кальций-зависимых калиевых (КСа) каналов в плазматической мембране различных типов клеток. Мы обнаружили, что локальный вход кальция через МЧ кальций-проницаемые каналы стимулирует активность функционально со-локализованных с ними КСа каналов различной молекулярной природы. Механозависимые функциональные комплексы МЧ и КСа каналов, со-локализованных в участке мембраны, могут играть определяющую роль в ключевых физиологических реакциях живых клеток. Важными вопросами остается выявление клеточных и мембранных структур, опосредующих функциональное взаимодействие ионных каналов в составе механоуправляемых кластеров.

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФИ №22-74-10037

Протон-управляемые каналы семейства ASIC в физиологии ЦНС

Д.Б. Тихонов¹

1. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия

ASIC-каналы, активируемые внеклеточными протонами, широко распространены в центральных нейронах и способны генерировать большие деполяризующие токи. Хорошо задокументировано, что ASIC участвуют в различных физиологических и патологических процессах, включая синаптическую передачу и синаптическую пластичность. Действительно, синаптические ASIC могут активироваться во время передачи из-за содержания кислоты в синаптических везикулах. Однако зарегистрированные в экспериментах синаптические токи, опосредованные ASIC, слишком малы, чтобы объяснить их физиологическую роль *in vivo*. Этот парадокс до сих пор не разрешен, поэтому физиологическая роль ASIC в центральной нервной системе остается неясной. Для объяснения имеющихся данных можно рассмотреть две гипотезы. Первый предполагает, что существует неизвестный эндогенный лиганд ASIC, который потенцирует ответ ASIC. Эта фармакологическая гипотеза имеет четкую аналогию с ролью глицина в активации NMDA-рецепторов. Вторая гипотеза использует известный эффект ингибирования рецептора глутамата внеклеточными протонами. Таким образом, постсинаптические ASIC могут играть компенсаторную роль в глутаматергической передаче в случае выраженного закисления в синаптической щели.

Финансирование: При поддержке гранта РНФ 21-14-00280

Циклические нуклеотиды: основная сигнальная система ингибирования тромбоцитов

С.П. Гамбарян¹

1. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия

Циклические нуклеотиды (сAMP и сGMP) которые активируют соответствующие протеин киназы (РКА, РKG) являются основными механизмами ответственными за ингибирование тромбоцитов. Эндотелиальные клетки сосудов секретируют простациклин и NO, которые, в свою очередь, активируют аденилат и гуанилат циклазы, что приводит к синтезу сAMP и сGMP и активации РКА, РKG. В докладе будут рассмотрены механизмы и пути активации РКА включая канонический сAMP-зависимый путь и сAMP-независимые механизмы, связанные с активацией нуклеарного фактора κB (NFKB) и активацией апоптоза в тромбоцитах. Относительно сGMP/РKG системы в тромбоцитах имеются противоречивые данные. Так, до сих пор остаются не выясненными вопросы о том экспрессируется ли в тромбоцитах NO-синтаза, производят ли сами тромбоциты биологически активное NO, могут ли эритроциты экспрессировать NO, которое будет активировать гуанилат циклазу и ингибировать тромбоциты. Также в литературе появились данные о том, что сGMP/РKG система не ингибирует, а участвует в активации тромбоцитов, что противоречит всем клиническим данным. Детальный анализ этих противоречий будет рассмотрен в докладе.

Поломки ионных каналов, приводящие к заболеваниям: что можно сделать?

А.А. Василевский¹

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Заболевания, вызванные дисфункцией ионных каналов, получили общее название «каналопатии». В настоящее время происходит бурный рост известных каналопатий. Точнее говоря, становится понятна роль определенных ионных каналов в разнообразных патологиях, которые в таком случае пополняют список примеров каналопатий. В докладе я постараюсь рассказать о современном состоянии исследований в области, более пристально рассмотрев случаи неправильной работы потенциал-чувствительных натриевых каналов. Эти белки, обуславливая восходящую фазу потенциала действия, лежат в основе возбудимости, а потому мутации в их генах связаны с различными неврологическими, нервно-мышечными заболеваниями, сердечной аритмией. Для терапии каналопатий разрабатывается ряд подходов, один из которых связан с использованием специальных соединений-корректоров, способных воздействовать на мутантные формы каналов таким образом, чтобы их активность приближалась к каналам дикого типа. Оригинальный класс таких соединений представляют природные токсины. Оказывается, что в некоторых случаях действие токсинов на мутантные ионные каналы приводит к нужному эффекту коррекции.

Финансирование: При поддержке гранта РНФ № 22-14-00395

О взаимодействии альбумина с рецепторами

Д. А. Белинская¹, Н. В. Гончаров¹

1. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия

Будучи одним из главных белков в организме человека и многих видов животных, альбумин играет решающую роль в транспортировке различных ионов, электронейтральных молекул и в поддержании коллоидно-осмотического давления крови. Однако альбумин не только пассивный, но и активный участник фармакокинетических и токсикокинетических процессов. Его активность не ограничивается взаимодействием с другими молекулами, попадающими в кровь: большое значение имеет взаимодействие альбумина с клетками крови, кровеносных сосудов, а также с клетками тканей за пределами сосудистого русла. Он обладает свойствами ряда ферментов, а также лиганда некоторых рецепторов. Взаимодействие с эндотелиальным гликокаликсом и клетками эндотелия сосудов во многом определяет интегративную роль альбумина.

Для транцитоза альбумина через эндотелий микрососудов дермы необходимым и достаточным условием является экспрессия гликопротеина CD36, который известен как рецептор-скавенджер ("мусорщик") 3B класса (SR-B3), гликопротеин IV мембраны тромбоцитов (GPbIV), гликопротеин IIIb (GPbIIIb), рецептор тромбоспондина, рецептор коллагена, транслоказа жирных кислот (FAT) и даже как рецептор врожденного иммунитета. При связывании лиганда CD36 запускает сигнальный каскад, который опосредует широкий спектр провоспалительных ответов.

Конечные продукты гликирования (КПГ) вызывают множественные метаболические нарушения в стенке сосудов и могут привести к эндотелиальной дисфункции. Значительная часть КПГ представлена гликированным альбумином. Рецепторы КПГ (РКПГ, RAGE) играют важную роль в патогенезе таких заболеваний легких как фиброз, пневмония и острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС).

Сверхэкспрессия/гиперактивация RAGE усиливает негативное действие медиаторов ренин-ангиотензиновой системы на хронические заболевания, которые являются основными факторами риска при коронавирусной инфекции: диабет, заболевания почек и сердечно-сосудистой системы. КПГ вносят основной вклад в повреждение микрососудов мозга и нарушению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Клетки мозга оказались чрезвычайно уязвимы к действию альбумина благодаря наличию на астроцитах рецептора, еще недавно считавшегося специфичным к TGF- β , одному из минорных белков-цитокинов, регулирующих дифференцировку и апоптоз клеток. Разница в аффинности к рецептору компенсируется потенциальным превосходством в количестве молекул альбумина, которые могут получить доступ к рецепторам астроцитов при нарушении целостности ГЭБ. В связи с этим огромный интерес представляют цитотоксические характеристики редокс-модифицированного и гликированного альбумина не только по отношению к эндотелиальным клеткам кровеносных сосудов, но и по отношению к цитокиновым рецепторам астроцитов.

Финансирование: Работа выполнена в рамках госзадания № 075-0152-22-00.

Потенциал и мощность цитотоксического воздействия: новый алгоритм или новая парадигма?

А. Д. Надеев¹, Н. В. Гончаров²

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия
2. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия

Существующие принципы терапевтической коррекции предполагают воздействие на индивидуальные молекулы исходя из устаревшей гипотезы «один ген – один фенотип». Более двадцати лет назад были изложены принципы феномики и парадигма исследований стала меняться с оси «фенотип-генотип-геном» на ось «феном-геном-протеом». В связи с этим, возрастает актуальность методологических исследований с целью разработки и обоснования новых методов и алгоритмов оценки апоптоза и других механизмов клеточной гибели. В настоящее время используются в основном два термина для качественной и количественной оценки цитотоксического действия веществ. Одним из них является «апоптозный потенциал». Его значение, как правило, ограничивается констатацией способности вещества вызывать апоптоз: низкая или высокая. Для количественной оценки гибели клеток от апоптоза используют «апоптозный индекс». Понятие «апоптозный потенциал» - это некий упрощенный вариант «апоптозного индекса», не обладающий онтологическими признаками фундаментального естествознания. Мы обосновываем представление о биологическом смысле и количественных характеристиках цитотоксического потенциала в качестве обобщающей альтернативы существующим понятиям, характеризующим апоптоз и другие типы гибели клеток, а также предлагаем алгоритм расчета цитотоксического эффекта веществ на примере пероксида водорода по отношению к эндотелиальным клеткам (ЭК) пупочной вены в культуре.

Разработка нового алгоритма фактически оказалась сопряжена с разработкой новой концепции. Полученные данные по динамике экспрессии CD-молекул и корреляционных связях при воздействии пероксида водорода на ЭК получили оригинальную интерпретацию и представляются важными с точки зрения методологии изучения механизмов клеточной гибели и функциональных ответов в условиях оксидативного и других видов стресса, создания адекватной модели *in vitro* для фенотипирования клеток. Концепция важна для совершенствования методологии цитофизиологического скрининга препаратов, обладающих токсическим действием для одних клеток и не обладающих таким действием для других клеток, причем в одном и том же диапазоне доз, обоснованных либо диапазоном их физиологических концентраций (в случае того же пероксида водорода), либо дозами потенциально терапевтических/токсических препаратов. Концепция и представленные данные могут быть востребованы в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при сравнительном анализе эффективности антиоксидантов и противоопухолевых препаратов, интерпретации клинко-диагностических показателей.

Финансирование: Работа выполнена в рамках госзадания № 075-0152-22-00.

Сетевой анализ транскриптома периферической крови человека позволяет выявить наиболее перспективные мишени для панвирусной терапии

С. М. Иванов¹, О. А. Тарасова¹, В. В. Поройков¹

1. Лаборатория структурно-функционального конструирования лекарств, Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Вирусы имеют разные пути передачи и клетки-мишени и вызывают инфекционные заболевания различной продолжительности и степени тяжести. Кроме того, могут возникать новые ранее неизвестные вирусные инфекции, такие как COVID-19. Поэтому сложно создать прямую противовирусную терапию из-за различий в структуре и функциях вирусных мишеней. Таким образом, патогенетическая терапия может применяться для лечения тяжелых вирусных заболеваний. Несмотря на существенные различия в этиопатогенезе вирусных заболеваний, они часто связаны с существенно измененным иммунным ответом. В результате иммунная система не может эффективно уничтожать вирусы, что влияет на тяжесть, продолжительность заболевания и развитие вторичных инфекций. Таким образом, крайне важно определить общие патогенетические механизмы и наиболее перспективные мишени для различных вирусных инфекций, поскольку это выгодно для разработки новых эффективных панвирусных препаратов.

Целью нашего исследования является анализ данных транскриптомики острых и хронических вирусных заболеваний, вызывающих или усиливающих иммунную дисфункцию как неотъемлемую часть их патогенеза. Мы сравнили профили транскрипции в клетках крови при патологиях, вызванных девятью различными вирусами: цитомегаловирусом, вирусом Эпштейна-Барра, вирусом Т-клеточного лейкоза человека типа 1, вирусами гепатита В и С, вирусом иммунодефицита человека, вирусом денге, SARS-CoV и SARS-CoV-2. Мы сравнили профили транскрипции для девяти вирусных инфекций с применением обогащения и сетевого анализа и выявили общие пути, клеточные процессы и главные регуляторы. Мы обнаружили, что все девять вирусных инфекций вызывают иммунную активацию, истощение, нарушение клеточной пролиферации и повышенную восприимчивость к апоптозу. Применение сетевого анализа позволило нам идентифицировать рецепторы – мастер-регуляторы иммунных клеток, представляющие собой белки на вершине сигнальных путей, которые могут быть ответственны за наблюдаемые изменения транскрипции и, таким образом, ответственны за наблюдаемую иммунную дисфункцию. Выявленные взаимосвязи между некоторыми из них и вызванной вирусом иммунной дисфункцией являются новыми, в литературе мало информации или она вообще отсутствует, например, рецепторы для аутокринного фактора подвижности, инсулина, пролактина, ангиотензина II и иммуноглобулина эпсилон. Выявленные рецепторы могут быть исследованы в качестве потенциальных мишеней для лечения тяжелых вирусных инфекций.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках Программы фундаментальных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 гг.) (проект № 122030100170-6).

Новые ингибиторы, подавляющие репликацию SARS-CoV-2 в культуре клеток

А. В. Сулимов^{1,2}, И. С. Ильин^{1,2}, Д. К. Кутов^{1,2}, Х. С. Шихалиев³, Д. Н. Щербаков⁴,
О.В. Пьянков⁴, Н. В. Столповская³, С. М. Медведева³, В. Б. Сулимов^{1,2}

1. Dimonta, Ltd., Москва, Россия
2. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
3. Воронежский Государственный Университет, Воронеж, Россия
4. ГНЦ Вирусологии и Биотехнологии "Вектор", Кольцово, Россия

Важность докинга стала очевидной с началом пандемии COVID-19, когда появилось большое количество публикаций по поиску ингибиторов белков-мишеней SARS-CoV-2. База данных лекарственных-подобных низкомолекулярных соединений кафедры органической химии Воронежского государственного университета прошла скрининг с помощью программы докинга SOL [1] с последующей квантово-химической постобработкой для выбора лучших кандидатов-ингибиторов основной протеазы (Mpro). SARS-CoV-2. Всего для виртуального скрининга было использовано около 41 000 лигандов, представляющих различные трехмерные конформации примерно 19 000 соединений. Атомистическая модель Mpro была построена на основе комплекса 6W63 из Protein Data Bank. В постобработке для одной тысячи лигандов с лучшим показателем докинга энтальпия связывания белок-лиганд была рассчитана с использованием квантово-химического полуэмпирического метода PM7. Для экспериментальной проверки были отобраны 20 наиболее перспективных соединений с лучшим показателем докинга и самыми отрицательными значениями энтальпии связывания белок-лиганд [2]. Экспериментальное тестирование выявило несколько ингибиторов Mpro и несколько соединений, подавляющих репликацию SARS-CoV-2 в культуре клеток [3]. Создано несколько библиотек аналогов лучших ингибиторов, проведен их повторный скрининг, синтезированы лучшие соединения, 10 из них экспериментально подтверждены как ингибиторы SARS-CoV-2 в культуре клеток [4]. Эти соединения относятся к трем химическим классам. Наилучший ингибитор демонстрирует в культуре клеток Vero E6 EC50 = 0,51 мкМ, SI > 412, где SI = CC50/EC50 — индекс селективности. Этот результат соответствует лучшим опубликованным нековалентным ингибиторам. Эти 10 соединений не проявляли ингибирующей активности в отношении Mpro SARS-CoV-2.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, Соглашение №21–71–20031.

Ссылки:

1. Development of docking programs for Lomonosov supercomputer. Sulimov V.B., Ilin I.S., Kutov D.C., Sulimov A. V.. J. Turkish Chem. Soc. Sect. A Chem., 2020, 259–276, 1, 10.18596/jotcsa.634130
2. In Search of Non-covalent Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease: Computer Aided Drug Design Using Docking and Quantum Chemistry. Sulimov A. V., Kutov D.C., Taschilova A.S., Ilin I.S., Stolpovskaya N. V., Shikhaliev K.S., Sulimov V.B.. Supercomput. Front. Innov., 2020, 41–56, 3, 10.14529/jsfi200305
3. Development of antiviral drugs based on inhibitors of the SARS-COV-2 main protease. A. Sulimov, K. Shikhaliev, O. Pyankov, D. Shcherbakov, V. Chirkova, I. Ilin, D. Kutov, A. Tashchilova, M. Krysin, D. Krylskiy, N. Stolpovskaya, E. Volosnikova, S. Belenkaya, V. Sulimov. Biomeditsinskaya Khimiya, 2021, 259–267, 67, 10.18097/PBMC20216703259
4. New Chemicals Suppressing SARS-CoV-2 Replication in Cell Culture. A. Sulimov, I. Ilin, D. Kutov, K. Shikhaliev, D. Shcherbakov, O. Pyankov, N. Stolpovskaya, S. Medvedeva, V. Sulimov. Molecules, 2022, 5732, 27, 10.3390/molecules27175732

Активация РКС участвует в регуляции осмотической резистентности эритроцитов человека

**Т.О. Ружникова^{1,2}, Д.М. Михайлова¹, И.В. Миндукшев², С.П. Гамбарян^{1,2},
Ю.С. Судницына^{2,3}**

1. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
2. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия
3. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

Эритроциты млекопитающих чрезвычайно деформируемы, что позволяет им обеспечивать эффективную оксигенацию тканей и выживать при экстремальных напряжениях сдвига, которым они подвергаются в микроциркуляции. При таких патологиях как серповидно-клеточная анемия, сахарный диабет и др., деформируемость эритроцитов снижается, приводя к внутрисосудистому и внутрикапиллярному гемолизу, что, в свою очередь, может вызывать гипоксию и некроз тканей, тем самым осложняя течение основного заболевания. Однако механизмы регуляции деформируемости эритроцитов человека недостаточно изучены, в том числе мало изучена роль протеинкиназы C (РКС) в данном процессе. Одним из биомаркеров деформируемости мембраны эритроцитов является ее устойчивость при осмотическом стрессе. В связи с этим мы использовали модель гипоосмотического стресса для выявления роли РКС в регуляции деформируемости эритроцитов.

Исследование выполнено на отмытых эритроцитах человека, выделенных из крови здоровых доноров. РКС активировали форбол-12-мириостат-13-ацетатом (РМА, 0.1, 1 мкМ). Наличие активной РКС оценивали Вестерн-блоттингом по фосфорилированию РКС субстрата. В качестве позитивного контроля фосфорилирования использовали тромбоциты человека, активированные тромбином. Изменения деформируемости эритроцитов определяли осмотическим стресс-тестом в физиологической ХЕПЕС буфере, содержащем 2 мМ Ca^{2+} или 2 мМ EGTA, методом лазерной дифракции.

Вестерн-блот анализ лизатов эритроцитов выявил, что стимуляция РМА вызывает фосфорилирование ряда белков, основным из которых были белки молекулярной массой около 120 кДа, что подтверждает наличие активной РКС. Анализ протеома эритроцитов определил наиболее вероятные белки с молекулярной массой порядка 120 кДа как альфа-аддуцин [1] и фрагменты анкирина-R или спектрина [2]. Для выявления эффектов активации РКС на деформируемость эритроцитов использовали бескальциевый и кальцийсодержащий буфер. В бескальциевой среде с увеличением концентрации РМА осмотическая резистентность эритроцитов дозависимо увеличивалась, в сравнении с контролем, то есть клетки становились более ригидными. В кальциевой среде наблюдалась дозависимая от концентрации РМА обратная зависимость, 0.1 мкМ РМА достоверно увеличивал резистентность эритроцитов к гипоосмотической нагрузке, а увеличение концентрации РМА до 1 мкМ достоверно ее снижал, возвращая на уровень, близкий к контролю.

Таким образом, активация РКС вызывает доза-зависимое и разнонаправленное изменение деформируемости эритроцитов при гипоосмотической нагрузке в зависимости от наличия кальция в среде. Для более детального анализа роли РКС и выявления сигнальных путей регуляции деформируемости эритроцитов человека необходимы дальнейшие исследования.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-315-60015.

Исследование роли молекулярного пути STING в запуске апоптоза

И.А. Невзоров¹, Н.А. Барлев¹, А.А. Дакс¹

1. Институт Цитологии РАН, Санкт Петербург, Россия

Стимулятор генов интерферона (STING), кодируемый геном TMEM173, представляет собой сенсорный и адапторный белок, активирующийся при обнаружении чужеродной или повреждённой ДНК в цитоплазме клеток. Запускаемый белком STING сигнальный каскад активирует экспрессию многочисленных провоспалительных генов – интерферонов первого типа (IFNs) и провоспалительных цитокинов. Так же, классический провоспалительный сигнальный путь STING взаимодействует с белком NF-κB, который в свою очередь усиливает провоспалительный сигнал.

Известно, что помимо классического ответа (активируемого белком cGAS), STING активируется другими белками. В ряде исследований было показано, что при альтернативной активации STING способен принимать участие в таких клеточных процессах как пролиферация, регуляция клеточного цикла, опухолевая трансформация и апоптоз. Известно, что STING фосфорилирует белок TBK1, который в свою очередь активирует регуляторы интерферона 3 и 7 (IRF3, IRF7). Являясь транскрипционными факторами, IRF3 и IRF7 активируют экспрессию генов иммунного ответа и ряда других мишеней. Мы предположили, что данные факторы могут влиять на экспрессию генов, участвующих в регуляции запрограммированной клеточной гибели.

Выбор генов-мишеней для анализа осуществлялся на основании литературных данных, при этом промоторные и энхансерные последовательности были выбраны из баз данных GeneCards, Ensembl и EPDnew. При помощи программного обеспечения MEME suite был проведён сравнительный анализ 131 энхансерных и промоторных регионов проапоптотических генов и 66 аналогичных регионов антиапоптотических генов, для которых в общей сложности известно 59 уникальных сайтов связывания транскрипционными факторами IRF3 или IRF7. В результате сравнительного анализа нами было выявлено, что IRF3 и IRF7 потенциально могут регулировать гены, кодирующие как транскрипционный фактор TP53, являющийся главным онкосупрессорным белком человека, так и его мишени – PUMA, NOXA, BIM. Аналогично были обнаружены сайты связывания IRF3 и IRF7 с другими проапоптотическими и антиапоптотическими генами. Мы также предположили, что являясь мастер-регулятором про-апоптотических путей в клетках, p53 может участвовать в регуляции STING-каскада. Действительно, с помощью вестерн-блот анализа и количественной ОТ-ПЦР в реальном времени мы показали, что статус p53 влияет на активацию основных участников STING сигнального пути в ответ на генотоксический стресс, вызванный ингибитором топоизомеразы II доксорубицином.

Таким образом, на основании полученных нами данных можно сделать вывод, что сигнальный каскад STING участвует в регуляции про-апоптотических регуляторных путей в раковых клетках в ответ на генотоксический стресс, и данная регуляция тесно связана с активностью транскрипционного фактора p53.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №19-75-10059.

Ссылки:

1. STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3. N. Li, H. Zhou, H. Wu, Q. Wu, M. Duan, W. Deng, Q. Tang. *Redox Biology*, 2019, 101215, 24, 10.1016/j.redox.2019.101215
2. STING promotes senescence, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via the NF-κB signaling pathway. Q. Guo, X. Chen, J. Chen, G. Zheng, C. Xie, H. Wu, Z. Miao, Y. Lin, X. Wang, W. Gao, X. Zheng, Z. Pan, Y. Zhou, Y. Wu, X. Zhang. *Cell Death & Disease*, 2021, None, 12, 10.1038/s41419-020-03341-9
3. STING Signaling Promotes Apoptosis, Necrosis, and Cell Death: An Overview and Update. S. Liu, W. Guan. *Mediators of Inflammation*, 2018, 1-4, 2018, 10.1155/2018/1202797

Запрограммированная клеточная гибель мегакариоцитов у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича

С.И. Обыденный^{1,2}, С.А. Кузнецова^{1,2}, О.С. Федянина^{1,2}, А.Л. Хорева¹, К. А. Воронин¹, А.В. Мазуров³, А. Глухова², Е.О. Артеменко^{1,2}, Ф.И. Атауллаханов^{1,2,4}, А.А. Масчан¹, Г.А. Новичкова¹, А.Ю. Щербина¹, М.А. Пантелеев^{1,2,4}

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
3. Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр Кардиологии имени академика Е.И. Чазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
4. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение: Синдром Вискотта-Олдрича (СВО, WAS) представляет собой X-сцепленное рецессивное заболевание, вызванное мутациями гена WAS, приводящими к дефектам гемопоэтических/иммунных клеток. Микротромбоцитопения является универсальным признаком пациентов с СВО. Это приводит к высокой смертности из-за кровотечений. В недавних исследованиях сообщалось об ускоренной гибели тромбоцитов пациентов с СВО, а также Т- и В-лимфоцитов, однако данных о патофизиологии мегакариоцитов (МК) и их роли в развитии тромбоцитопении при СВО в литературе мало. Целью данного исследования было оценить жизнеспособность и морфологию МК пациентов с СВО, а также влияние лечения ромиплостимом, агонистом рецептора тромбопоэтина, на характеристики МК.

Методы: МК захватывали из аспиратов костного мозга фрагментом (F(ab')₂) моноклонального антитела против GP IIb-IIIa, иммобилизованным на прозрачном пластиковом биочипе. Стадию созревания и размер МК определяли при помощи световой микроскопии и окрашивания по Май-Грюнвальду-Гимзе. Конфокальную микроскопию живых мегакариоцитов, прикрепленных к биочипу, применяли для оценки жизнеспособности по экспозиции фосфатидилсерина (PS) и/или потенциалу митохондриальной мембраны.

Результаты: Мы исследовали аспираты костного мозга 25 пациентов с СВО и 14 здоровых доноров. Созревание МК у пациентов с СВО значительно отличалось от нормального контроля. $40 \pm 22\%$ мегакариоцитов с СВО по сравнению с $23 \pm 11\%$ нормальных мегакариоцитов находились на стадии зрелости 3 ($p = 0,02$), тогда как $24 \pm 20\%$ в WAS и $39 \pm 14\%$ в нормальном контроле находились на стадии мегакариобластов ($p = 0,05$). Терапия ромиплостимом пациентов с СВО привела к нормализации распределения мегакариоцитов по стадиям созревания.

Доля иммобилизованных фосфатидилсерин-положительных (ФС+) МК при СВО была достоверно выше ($21 \pm 21\%$, среднее $\pm$ SD), чем у здоровых доноров ($2 \pm 4\%$, среднее $\pm$ SD), $p < 0,01$. Среди пациентов с СВО фракция ФС-положительных МК была значительно выше у пациентов с более сильными мутациями белка WASp и более высокой оценкой тяжести заболевания (критерий Спирмена $r = 0,6$, $p < 0,003$). При помощи видеомикроскопии было получено, что выходу ФС в мегакариоцитах пациентов с СВО предшествовало падение потенциала митохондриальной мембраны.

Выводы: Мегакариоциты пациентов с СВО имеют повышенную тенденцию к гибели клеток, что может приводить к их аномальному созреванию и способствовать тромбоцитопении.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-75-00109.

Компьютерный анализ регуляции апоптоза при ВИЧ-инфекции

О. А. Тарасова¹, Н. Ю. Бизюкова¹, Л. С. Передкова², С. М. Иванов^{1,2}, В. В. Поройков¹

1. Лаборатория структурно-функционального конструирования лекарств, Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия
2. Кафедра биоинформатики, Российский Научно-Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова

Инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), прогрессивно повреждает иммунную систему и при отсутствии лечения приводит к развитию различных сопутствующих заболеваний. Прогрессирование ВИЧ-инфекции затрагивает множество различных путей и процессов передачи сигнала, включая регуляцию апоптоза, аутофагию, окислительное фосфорилирование, процессинг и презентацию антигена. Регуляция клеточного цикла и апоптоза необходимы для жизнеспособности иммунных клеток и могут влиять на скорость прогрессирования ВИЧ-инфекции. Целью нашего исследования является проведение *in silico* анализа регуляции апоптоза в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) с использованием исследования их транскриптома в сочетании с автоматизированным анализом научных тезисов. Мы проанализировали данные о транскриптомных профилях в РВМС, полученные из NCBI Gene Expression Omnibus (NCBI GEO). Данные включали выборки пациентов с ВИЧ-инфекцией до начала антиретровирусной терапии (АРТ), пациентов, ранее не получавших АРТ, и серонегативных лиц. Мы идентифицировали дифференциально экспрессируемые гены и провели анализ обогащения путей. В результате мы обнаружили, что гиперэкспрессия генов, связанных с регуляцией апоптоза, опосредованной естественными клетками-киллерами цитотоксичностью и окислительным фосфорилированием, наблюдалась в группе образцов, полученных от пациентов с успешным исходом ВРТ, но не была связана с группой, принадлежащей к неблагоприятному исходу ВРТ. Эти результаты могут свидетельствовать о влиянии апоптоза на прогрессирование ВИЧ-инфекции на ранних стадиях и на результат лечения. Для проверки результатов обработки транскриптомных данных использовали анализ текстов тезисов. Мы собрали тексты, относящиеся к протеканию ВИЧ-инфекции на первой стадии заболевания (острая ВИЧ-инфекция), и извлекли из них названия белков и генов. Верификацию названий выделенных белков и генов проводили с помощью автоматизированных запросов к базе данных Uniprot. Таким образом, мы идентифицировали наиболее распространенные белки, которые можно рассматривать как участвующие в регуляции апоптоза на первой стадии ВИЧ-инфекции, в том числе белок 1, содержащий интерферон-индуцированную геликазу С-домен, экспортин-1, убиквитин D. Эти молекулы можно рассматривать в качестве ключевых целей в разработке новых терапевтических стратегий лечения и лечения ВИЧ-инфекции.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-75-10097.

TGFβ-1 и внеклеточный матрикс фибробластов индуцируют обратимую сенесценцию мезенхимных стромальных клеток человека

М.А. Виговский^{1,2}, Н.А. Басалова¹, У.Д. Дьячкова², М.С. Арбатский², О.А. Григорьева¹, А.Ю. Ефименко¹

1. Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова, 119192 Москва, Россия
2. Кафедра биохимии и молекулярной медицины факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются ключевыми тканевыми регуляторами процессов регенерации и репарации ткани после повреждения. Секретом МСК, в частности фракция внеклеточных везикул (ВВ), обладают выраженным антифибротическим эффектом во многом за счет способности подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Но в условиях уже развивающегося фиброза ткани при воздействии трансформирующего фактора роста TGFβ-1 и ремоделированного внеклеточного матрикса (ВКМ) местные МСК могут утрачивать свой антифибротический потенциал, приобретая при этом признаки сенесцентных клеток, что нам удалось выявить в модели *in vitro*. Методом анализа транскриптома единичных клеток образца МСК из жировой ткани человека, культивированных на ВКМ фибробластов в присутствии TGFβ-1, было показано изменение экспрессии генов, отвечающих за арест клеточного цикла, метаболические перестройки, переключение эпигенетических программ и изменение состава ядерной мембраны, что указывает на приобретение клетками сенесцентного фенотипа. Экспрессия гена CDKN2A (p16) была повышена в 4,3 раза при незначительном повышении CDKN1A (p21) по сравнению с контролем. По данным литературы, накопление p21 при развитии сенесценции может носить транзитный характер и наблюдается на начальных этапах, в то время как наличие p16 является признаком глубокой сенесценции. Иммуоцитохимическое мечение p21 выявило увеличение доли p21+ клеток по сравнению с контрольными МСК, при этом ВВ МСК утрачивали способность подавлять TGFβ-1- индуцированную дифференцировку фибробластов в миофибробласты *in vitro*, что говорит об утрате МСК антифибротического потенциала при индукции сенесцентного фенотипа. В *in vivo* модели при введении ВВ МСК мышам с блеомицин-индуцированным фиброзом легких, ВВ сенесцентных МСК не снижали степень выраженности фиброза по шкале Эшкрофта при действии на старых 2 летних мышей, но не на молодых, что указывает на роль системных изменений в терапевтическом действии ВВ. Замена среды после индукции сенесценции и дальнейшее культивирование МСК в течении 14 дней приводило к снижению доли p21+ клеток относительно контроля, а ВВ восстанавливали способность эффективно подавлять дифференцировку фибробластов. При этом в референсной модели индукции сенесценции перекисью водорода сенесценция не носила транзитного характера и антифибротический потенциал ВВ МСК не восстанавливался при длительном культивировании. Таким образом мы полагаем, что сенесцентный фенотип МСК, индуцированный культивированием на ВКМ фибробластов в присутствии TGFβ-1, может быть обратим при удалении провоцирующих факторов, а для закрепления глубокой сенесценции требуется более сильный или продолжительный стимул.

Финансирование: Исследование было выполнено при поддержке РФФИ (№19-29-04172).

Антидепрессантные свойства ГСБ-106 опосредуются за счет активации BDNF/TrkB пути

Ю.В. Вахитова¹, Л.Ф. Зайнуллина¹, А.Ю. Луста¹, Т.А. Гудашева¹, С.Б. Середенин¹

1. Институт Фармакологии им. Закусова, Москва, Россия

BDNF/TrkB сигнальный путь является одним из ключевых каскадов в механизме депрессии [1], что привело к нескольким предложенным подходам терапии депрессии, направленным на восстановление или усиление передачи сигналов нейротрофинов либо взаимодействия с рецептором TrkB. В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был разработан перорально доступный гомодимерный дипептид ГСБ-106 (бис-(N-моносукцинил-L-серил-L-лизин)гексаметилендиамид), миметик 4-й петли BDNF. На сегодняшний день известно, что ГСБ-106 обладает антидепрессивными свойствами в ряде поведенческих тестов и моделей [1]. Однако ранее не было исследований, в которых был бы охарактеризован профиль активности ГСБ-106 как лиганда TrkB и проведенных на животной трансляционно релевантной модели депрессии при *per os* хроническом введении ГСБ-106. Эксперименты *in vitro* проводили на клетках человека SH-SY5Y в бессывороточных условиях. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью МТТ. Для изучения уровней белка BDNF, сайт-специфического фосфорилирования TrkB (pTyr706/707, pTyr515, pTyr816) при предварительной обработке K252a (500 нМ), PP2 (100 мкМ) в клетках или в различных областях мозга был проведен Вестерн-блоттинг. Антидепрессанто-подобный эффект хронического *per os* введения ГСБ-106 (1 мг/кг, 26 дней) оценивали в модели непредсказуемого хронического умеренного стресса (НХУС) у мышей Balb/c. Полученные данные свидетельствуют о том, что выживаемость клеток в бессывороточных условиях зависит от собственной трофической активности ГСБ-106. Конкурентный анализ показал, что ГСБ-106 в присутствии насыщающей концентрации BDNF подавлял эффект BDNF на $39,02 \pm 1,8\%$, что позволяет предположить, что ГСБ-106 проявляет свойства частичного агониста. ГСБ-106 индуцировал временное и подобное BDNF фосфорилирование Tyr706/707, Tyr816 и Tyr515, которое почти полностью подавлялось K252a. PP2 предпочтительно снижал как BDNF, так и ГСБ-106-опосредованное фосфорилирование Tyr816 и Tyr515, что является доказательством того, что; активация TrkB с помощью ГСБ-106 была, по крайней мере, частично зависимой от трансактивации рецептора, связанной с киназами Src. У мышей, подвергшихся длительному стрессу (54 дня), сопутствующее хроническое введение ГСБ-106 уменьшило время иммобилизации в 2,9 раза (тест Порсолта). Кроме того, НХУС одновременно с длительным введением ГСБ-106 приводил к увеличению содержания BDNF в префронтальной коре и гиппокампе и индукции фосфорилирования сайтов Tyr706/707 и Tyr816, но не сайта Tyr515, таким образом имитируя картину характерную для большинства антидепрессантов [2,3].

Ссылки:

1. Activation of the TrkB Neurotrophin Receptor Is Induced by Antidepressant Drugs and Is Required for Antidepressant-Induced Behavioral Effects. T. Saarelainen, P. Hendolin, G. Lucas, E. Koponen, M. Sairanen, E. MacDonald, K. Agerman, A. Haapasalo, H. Nawa, R. Aloyz, P. Ernfors, E. Castrén. The Journal of Neuroscience, 2003, 349-357, 23, 10.1523/JNEUROSCI.23-01-00349.2003
2. The Low Molecular Weight Brain-derived Neurotrophic Factor Mimetics with Antidepressant-like Activity. T. Gudasheva, P. Povarnina, A. Tarasiuk, S. Seredenin. Current Pharmaceutical Design, 2019, 729-737, 25, 10.2174/1381612825666190329122852
3. Pharmacologically Diverse Antidepressants Rapidly Activate Brain-Derived Neurotrophic Factor Receptor TrkB and Induce Phospholipase-C γ Signaling Pathways in Mouse Brain. T. Rantamäki, P. Hendolin, A. Kankaanpää, J. Mijatovic, P. Piepponen, E. Domenici, M. Chao, P. Männistö, E. Castrén. Neuropsychopharmacology, 2007, 2152-2162, 32, 10.1038/sj.npp.1301345

Накопление PAI-1 во внеклеточном матриксе сенесцентных мезенхимальных стромальных клеток *in vitro*

Д.К. Матвеева¹, Д.Н. Каширина¹, М.И. Ездакова¹, А.Ю. Ратушный¹

1. Отдел молекулярно-клеточной биомедицины, ГНЦ РФ- ИМБП РАН, Москва, Россия

Способность мезенхимальных стромальных клеток (МСК) продуцировать биологически активные медиаторы и внеклеточный матрикс (ВКМ) позволяет сформулировать основные принципы участия МСК в физиологических и репаративных процессах. Ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1) представляет собой многофункциональный белок, обладающий способностью не только регулировать фибринолиз, но и сигнальные события в клетках, которые оказывают прямое влияние на их функциональную активность. Недавние исследования показывают, что старение клеток ассоциировано с увеличением концентрации PAI-1 в кондиционированной среде. Задача нашего исследования заключалась в оценке накопления PAI-1 и функционально связанных с ним белков в ВКМ сенесцентных МСК. Для получения сенесцентных МСК (линия ASC52telo) применяли подход стресс-индуцированного старения с помощью митомицина C (МмС). После 10 дней культивирования, необходимых для «старения» МСК и формирования ВКМ, монослои «молодых» (МмС-) и сенесцентных (МмС+) МСК децеллюляризировали с помощью Triton-X100+NH₄OH. Далее проводили масс-спектрометрический анализ белков в экстракте децеллюляризованного ВКМ (дцВКМ), клеточных лизатах и кондиционированной среде. Количественный анализ, выполненный методом спектрального подсчета, позволил статистически значимо определить увеличенное количество PAI-1 как в кондиционированной среде, так и в экстракте дцВКМ сенесцентных МСК. Также отмечено увеличение продукции и накопление в ВКМ ряда других молекул, которые участвуют в регуляции активности плазмина (PAI2, GDN, A2M) и витронектина (VTN), который взаимодействует с PAI-1 и стабилизирует его в активной форме. При исследовании клеточных лизатов только у МмС+ МСК идентифицированы рецепторы к урокиназному активатору плазминогена (PLAUR) и MRC2, контролирующий внеклеточный уровень PLAUR /PLAU. Таким образом, в ВКМ сенесцентных МСК был обнаружен увеличенный уровень белков PAI-ассоциированного каскада. Это может повышать вероятность активации старения в клетках при децеллюляризации на сенесцентный дцВКМ. Дальнейшие исследования клеток позволят расширить понимание вклада ВКМ как компонента ниши МСК в процессах старения.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-75-10117.

Секция: Тирозинкиназная и другая протеинкиназная сигнализация

HIF-1-зависимый сигнальный путь как мишень действия циклопролилглицина

Л. Ф. Зайнуллина¹, Ю.В. Вахитова¹, Т.А. Гудашева², С.Б. Середенин¹

1. Лаборатория фармакологической генетики, НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, 125315, Москва, Россия
2. Отдел химии лекарственных средств, НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, 125315, Москва, Россия

Циклопролилглицин (цПГ) является эндогенный пептидом, выполняющим функции ноотропного фактора в головном мозге. цПГ образуется из IGF-I (инсулиноподобного фактора роста 1) и оказывает нейропротекторное действие в модели; ишемии головного мозга у крыс [1]. цПГ структурно подобен; ноопепту (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролил-глицина), одобренному в России в качестве ноотропа [2]. Недавно было показано, что Ноопепт вовлечен в модуляцию HIF1-зависимого пути [3]. Чтобы установить механизмы нейротропных эффектов цПГ, мы сосредоточились на исследовании HIF-1-зависимого пути, который является одной из ключевых мишеней в патогенезе нейродегенерации, ишемии и когнитивного дефицита при некоторых нейродегенеративных заболеваниях [4]. Для этой цели клетки SH-SY5Y были транзигентно трансфицированы репортерной люциферазной конструкцией, содержащей сайт связывания транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (HRE-Luc), а для мониторинга стабилизации фактора транскрипции - плазмидой, экспрессирующей C-конец кислород-зависимого домена (ODD) HIF1 α (ODD-Luc). В качестве фармакологического миметика гипоксии *in vitro* использовали дефероксамин. Уровни мРНК гена HIF-1 α и HIF-1 α -регулируемых генов оценивали с помощью qRT-PCR. Для определения уровней белков HIF-1 α , PHD2 (пролилгидроксилаза 2 HIF) и FIH1 (фактор, ингибирующий HIF-1) применяли вестерн-блот-анализ. Статистическую значимость устанавливали с помощью критерия Вилкоксона. Нами было обнаружено, что цПГ (0,1 мМ, 24 часа) увеличивает связывание HIF1-ДНК в условиях нормоксии и гипоксии соответственно. При оценке влияния цПГ на HIF1-ODD-Luc было показано увеличение люминесцентного сигнала репортера до 45%. При анализе механизма HIF-1 - положительных эффектов цПГ было выявлено снижение мРНК гена HIF-1 α в SH-SY5Y при гипоксии. Кроме того, в тех же экспериментальных условиях было обнаружено повышение уровня белка HIF-1 α на 30%. Также было показано, что цПГ способствует снижению относительного уровня PHD2 как в условиях нормоксии, так и гипоксии. В аналогичных условиях цПГ уменьшал относительное количество белка FIH1. Кроме того, экспрессия HIF-1 α -зависимых генов, таких как EPO, VEGF и PDK1, также индуцировалась цПГ в условиях гипоксии. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что циклопролилглицин модулирует активность HIF-1- сигналинга путем стабилизации HIF-1 α , вероятно, посредством ингибирования пролилгидроксилазы HIF1, что в конечном итоге приводит к усилению экспрессии HIF-зависимых генов.

Ссылки:

1. Peripheral administration of a novel diketopiperazine, NNZ 2591, prevents brain injury and improves somatosensory-motor function following hypoxia-ischemia in adult rats. J. Guan, S. Mathai, P. Harris, J. Wen, R. Zhang, M. Brimble, P. Gluckman. *Neuropharmacology*, 2007, 749-762, 53, 10.1016/j.neuropharm.2007.08.010
2. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cycloprolylglycine in rat brain. T. Gudasheva, S. Boyko, V. Akparov, R. Ostrovskaya, S. Skoldinov, G. Rozantsev, T. Voronina, V. Zherdev, S. Seredenin. *FEBS Letters*, 1996, 149-152, 391, 10.1016/0014-5793(96)00722-3
3. Molecular Mechanism Underlying the Action of Substituted Pro-Gly Dipeptide Noopept.. Vakhitova YV, Sadovnikov SV, Borisevich SS, Ostrovskaya RU, A Gudasheva T, Seredenin SB.. *Acta Naturae*, 2016, 82-9, 8(1), None
4. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. J. Lee, J. Ko, C. Ju, H. Eltzschig. *Experimental & Molecular Medicine*, 2019, 1-13, 51, 10.1038/s12276-019-0235-1

***In vitro* и *in silico* исследование CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах пациентов с Капошиформной гемангиоэндотелиомой**

А.А. Мартьянов^{1,2}, И.П. Тесаков¹, О.И. Ан^{1,2}, Е. Юшкова², Н.А. Подоппелова^{1,2}, Л.А. Хачатрян¹, А.Н. Свешникова^{1,2}

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия
2. Центр теоретических проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия

Введение: Капошиформная гемангиоэндотелиома (КГЭ) – редкая сосудистая опухоль, которая в 70% случаев может привести к развитию синдрома Казабаха-Мерритт (СКМ): тромбоцитопении и гиперкоагуляции. Тромбоциты активно вовлечены в патогенез КГЭ/СКМ: было показано, что КГЭ может «захватывать» тромбоциты, выставляя в кровотоке подопланин, который связывается с тромбоцитарным рецептором CLEC-2. Предполагается, что это приводит к секреции тромбоцитарных гранул, содержащих большое количество факторов роста, способствующих росту и пролиферации опухоли. Анализ механизмов влияния КГЭ/СКМ на функционирование тромбоцитов позволит идентифицировать новые подходы для терапии коагулопатии при данном редком заболевании.

Цели: Проанализировать механизмы влияния КГЭ/СКМ на внутриклеточную сигнализацию и функционирование тромбоцитов.

Методы: 7 пациентов с КГЭ/СКМ были включены в исследование, и было проведено сравнение с соответствующими по возрасту педиатрическими здоровыми донорами. Тромбоциты пациентов с КГЭ/СКМ были проанализированы посредством проточной цитометрии, а также иммунофлуоресцентной микроскопии мазков крови. Для анализа полученных результатов была использована компьютерная модель активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 из работы [1].

Результаты: Анализ кальциевой сигнализации в тромбоцитах показал, что при активации тромбоцитов пациентов с КГЭ/СКМ не наблюдается значительных отклонений при использовании конвенциональных агонистов: АДФ, CRP, TRAP-6. С другой стороны, было получено, что активация тромбоцитов родоцитином – агонистом тромбоцитарного рецептора CLEC-2 – значительно ослаблена в тромбоцитах пациентов. Так как в сигнальных каскадах тромбоцитарных рецепторов CLEC-2 и GPVI большинство элементов схожи, было сделано предположение, что на тромбоцитах пациентов с КГЭ/СКМ наблюдается дефект непосредственно в функционировании рецептора CLEC-2. Данный результат был также предсказан с помощью модели, а затем подтверждён с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии мазков крови: было показано, что на тромбоцитах пациентов количество рецепторов CLEC-2 значительно понижено.

Заключение: Активация тромбоцитов пациентов с КГЭ/СКМ через рецептор CLEC-2 значительно ослаблена по причине его дефицита на их поверхности. Предположительно, опухоль у пациента «фильтрует» тромбоциты с нормальной экспрессией, из-за чего в кровотоке остаются только тромбоциты с низкой экспрессией рецепторов.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-74-20087.

Ссылки:

1. Control of Platelet CLEC-2-Mediated Activation by Receptor Clustering and Tyrosine Kinase Signaling. Martyanov AA, Balabin FA, Dunster JL, Panteleev MA, Gibbins JM, Sveshnikova AN. Biophys J. 2020 Jun 2;118(11):2641-2655. doi: 10.1016/j.bpj.2020.04.023

Роль метилтрансферазы Set7/9 в ответе клеток рака молочной железы на терапию тирозинкиназными ингибиторами

**А.А. Дакс¹, О.Ю. Шувалов¹, О.М. Семенов¹, О.А. Федорова¹, С.Е. Парфеньев¹,
Н.А. Барлев¹**

1. Институт Цитологии РАН, Санкт Петербург, Россия

Белок HER2 (наряду с EGFR, HER3 и HER4) представляет собой тирозинкиназный рецептор семейства рецепторов эпидермального фактора роста (семейство EGFR или ErbB). HER2 отличается от остальных членов данного семейства белков тем, что не имеет известного лиганда, однако является предпочтительным партнером для гетеродимеризации с активированными связыванием с EGF рецепторами HER3 и HER4. Димеризация вызывает активацию множества нижележащих сигнальных каскадов, включая такие как MAP-киназный и PI3-киназный молекулярные пути, отвечающие за клеточную пролиферацию, выживаемость, миграцию, инвазию и дифференцировку. Оверэкспрессия HER2, в основном вызванная амплификацией гена ERBB2, кодирующего данный рецептор, наблюдается в 20-30% случаев инвазивного РМЖ. При этом HER2-позитивная форма РМЖ отличается агрессивным течением, неблагоприятным прогнозом и повышенной вероятностью развития резистентности к стандартным химиотерапевтическим препаратам. На сегодняшний день в клинической практике применяются HER2-направленные антитела (например, трастузумаб) и низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназной активности HER2 – нератиниб, афатиниб и лапатиниб. Нами было обнаружено, что положительный статус HER2 ассоциирован с повышенной экспрессией лизин-специфической метилтрансферазы Set7/9 в клетках РМЖ. Данный фермент непосредственно участвует в таких клеточных процессах как регуляция клеточного ответа на генотоксический стресс, клеточный цикл и апоптоз. Set7/9 метилирует гистон H3, а также множество транскрипционных факторов, таких как p53, E2F1, YAP, эстрогеновый рецептор ER, NFκB и других. Мы также показали, что как снижение уровня экспрессии Set7/9, так и подавление метилтрансферазной активности данного фермента способствует формированию устойчивости клеток РМЖ к терапии тирозинкиназными ингибиторами. В результате биоинформатического анализа нами было выявлено, что повышенный уровень экспрессии Set7/9 является благоприятным прогностическим маркером для пациентов с HER2-позитивной формой РМЖ, в то время как в случае HER2-негативного РМЖ высокий уровень Set7/9 ассоциирован с менее благоприятным прогнозом. Мы также продемонстрировали, что применение генотоксической терапии в сочетании с тирозинкиназными ингибиторами способствует преодолению устойчивости клеток с нокадауном Set7/9 к афатинибу и нератинибу. Таким образом, полученные нами данные позволяют рассматривать Set7/9 как биомаркер, анализ экспрессии которого может способствовать выбору более эффективных схем лекарственной терапии HER2-политивных форм РМЖ.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-75-10076.

Рецептор ЭФР и его лиганды: регуляция на уровне эндоцитоза

Е.С. Корнилова^{1,2}, Р. С. Каменцева², М. В. Харченко²

1. Биологический факультет СПбГУ, Санкт Петербург, Россия
2. Институт Цитологии РАН, Санкт Петербург, Россия

Считается установленным, что тирозинкиназный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) вовлечен в регуляцию ряда важнейших внутриклеточных программ, таких как эмбриогенез, пролиферация, дифференцировка, клеточная подвижность и апоптоз. Эти программы, часто разнонаправленные, подразумевают, что один и тот же рецептор способен каким-то образом диверсифицировать генерируемые им сигналы, например, «коллаборируя» с другими сигнальными системами. Кроме того, пластичность ЭФР-рецепторного сигналинга может обеспечиваться как взаимодействием с другими рецепторами с-ErbB-семейства, так и особенностями активации рецептора его лигандами, различающимися, в частности, по аффинности и pH-зависимости формируемых лиганд-рецепторных комплексов. Последний фактор считается существенным для определения внутриклеточной судьбы рецептора, т. к. интернализированный EGFR попадает в эндосомы, внутреннее пространство которых закисляется на пути от ранних к поздним эндосомам и лизосомам. Мы сравнили поведение рецептора при воздействии высокоаффинных лигандов EGF и TGF- α и низкоаффинного амфирегулина (AREG) на клетки карциномы линии HeLa. Показано, что EGF и TGF- α стимулировали интернализацию рецептора в ранний EEA1-положительный эндосомный компартмент, однако TGF- α приводил к рециклированию рецептора, тогда как EGF в комплексе с рецептором доставлялся в лизосомы и деградировал там. Интересно, что третий лиганд, AREG, вызывая активацию тирозинкиназы рецептора, не приводил к интернализации лиганд-рецепторного комплекса. Хотя иммортализованные клеточные линии опухолевого происхождения широко используются для анализа EGFR-зависимого сигналинга, ни EGF, ни TGF- α не стимулировали пролиферацию клеток HeLa, в отличие от неинтернализующего AREG, но активировали при этом основные сигнальные каскады. Используя МСК эндометрия (enMSC) и пульпы зуба (MSC-DP) человека как модель нетрансформированных пролиферирующих клеток, мы проанализировали действие трех лигандов EGFR. Обнаружили, AREG, как и в предыдущем случае, не приводит к интернализации рецептора, тогда как EGF и TGF- α в enMSC доставляют рецептор в лизосомы и стимулируют пролиферацию этих клеток в течение первых 5 суток после добавления ростовых факторов. Интересно, что в обеих линиях МСК рецептор выявлялся в мелких эндосомах, не колокализующихся с EEA1, в течение нескольких часов после интернализации, но в конце концов попадал в Lamp1-положительные лизосомы. Если в HeLa EGF-зависимая даун-регуляция рецептора была обратима, то в enMSC уровень падал под действием как EGF, так и TGF- α , и не восстанавливался в течение следующих нескольких суток. Эти данные говорят о том, что пластичность EGFR-зависимого сигналинга может обеспечиваться как различающимися свойствами рецепторных лигандов, так и на уровне регуляции эндоцитозного этапа процессинга EGFR.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-04-00927.

Сигналинг к адаптации: деконволюция сигнальных сетей обратными и боковыми связями

А.В. Воротников¹, П.А. Тюрин-Кузьмин²

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр Кардиологии имени академика Е.И. Чазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
2. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Многообразие сигнальных молекул обеспечивает сетевую организацию сигнальной системы клетки. Наличие обратных и боковых связей позволяет клетке адаптировать реакции к изменению внешних условий и поддерживать интенсивность реакций во времени. На примере движения фибробластов и мезенхимальных стромальных клеток (МСК) мы иллюстрируем как сигнализация от рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGF) задействует обратные связи с участием НАДФН-оксидаз и образуемого ими пероксида водорода для поддержания хемотактической сигнализации и ускорения движения клеток. Подавление продукции H_2O_2 с помощью апоцинина или PEG-каталазы устраняет активирующий эффект PDGF на PI3-киназный каскад и миграцию клеток, но не влияет на активацию Erk1/2 MAP-киназ. В отличие от PDGF, эпидермальный фактор роста (EGF) не повышает продукцию H_2O_2 , не активирует PI3-киназный каскад и не ускоряет миграции фибробластов и МСК, хотя так же активирует Erk1/2. Используя внутриклеточный биосенсор к продукту PI3-киназной реакции (PIP3) и к H_2O_2 мы обнаружили, что локальная активация PI3-киназы и накопление H_2O_2 на переднем крае мигрирующих фибробластов поддерживают ламеллиподиальную активность и рост псевдоподий в направлении движения клеток, пролонгируя сигнализацию от рецепторов PDGF к PI3-киназе и образованию PIP3. Избирательное выключение НАДФН-оксидаз с помощью sh-RNA или CRISPR-Cas9 приводит к потере способности фибробластов генерировать H_2O_2 и ускорять миграцию в ответ на PDGF. Таким образом, НАДФН-оксидазы опосредуют специфический механизм обратной/боковой связи с участием H_2O_2 для поддержания активности PI3-киназного каскада, локализованного синтеза PIP3 и миграции фибробластов и МСК.