

ISSN 0233-4755

Том 41, Номер 4

Июль-Август 2024



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Журналу

40

лет

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 41, номер 4, 2024

ОБЗОРЫ

- Экспрессия миоглобина опухолевыми клетками и его роль в развитии заболевания
Г. Б. Постникова, Е. А. Шеховцова 283
- Донорство митохондрий как механизм участия мезенхимных стромальных клеток в регенеративных процессах
А. Д. Крупнова, Д. А. Цомартова, Е. В. Черешнева, М. Ю. Иванова, Э. С. Цомартова, Т. А. Ломановская, М. С. Павлова, О. В. Паюшина 297
- ***
- Катионные и ионизируемые амфифилы на основе дигексадецилового эфира *L*-глутаминовой кислоты для липосомального транспорта РНК
Г. А. Бухарин, У. А. Буданова, З. Г. Дениева, Е. В. Дубровин, Ю. Л. Себякин 309
- Сезонные изменения содержания жирных кислот в скелетных мышцах длиннохвостого суслика *Urocyon volutus*
Т. П. Кулагина, И. М. Вихлянцева, А. В. Ариповский, С. С. Попова, А. Б. Ганиев 322
- Распределение рецепторов прогестерона и мембранного компонента рецептора прогестерона в различных органах и тканях самцов и самок крыс
А. Д. Дмитриева, И. А. Морозов, А. М. Кархов, П. М. Рубцов, О. В. Смирнова, Т. А. Щелкунова 333
-
-

CONTENTS

Vol. 41, No. 4, 2024

REVIEWS

- Expression of Myoglobin by Tumor Cells and Its Role in Progression of Malignancy
G. B. Postnikova, E. A. Shekhovtsova 283
- Mitochondrial Donation as a Mechanism of Participation by Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Processes
A. D. Krupnova, D. A. Tsomartova, E. V. Cheresheva, M. Yu. Ivanova, E. S. Tsomartova, T. A. Lomanovskaya, M. S. Pavlova, O. V. Payushina 297
- ***
- Cationic and Ionizable Amphiphiles Based on Di-Hexadecyl Ester of *L*-Glutamic Acid for Liposomal Transport of RNA
G. A. Bukharin, U. A. Budanova, Z. G. Denieva, E. V. Dubrovin, Yu. L. Sebyakin 309
- Seasonal Changes in the Content of Fatty Acids in the Skeletal Muscles of the Long-Tailed Ground Squirrel *Uroditellus undulatus*
T. P. Kulagina, I. M. Vikhlyantsev, A. V. Aripovsky, S. S. Popova, A. B. Gapeyev 322
- Distribution of Progesterone Receptors and the Membrane Component of Progesterone Receptor in Various Organs and Tissues of Male and Female Rats
A. D. Dmitrieva, I. A. Morozov, A. M. Karhov, P. M. Rubtsov, O. V. Smirnova, T. A. Shchelkunova 333
-
-

УДК 577.3

ЭКСПРЕССИЯ МИОГЛОБИНА ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ И ЕГО РОЛЬ В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© 2024 г. Г. Б. Постникова^а, Е. А. Шеховцова^{а,*}

^аИнститут биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: shekhovtsova.ekaterina@mail.ru

Поступила в редакцию 20.03.2024

После доработки 04.06.2024

Принята к печати 06.06.2024

В обзоре рассмотрены имеющиеся в литературе данные об экспрессии миоглобина в различных опухолях и клеточных линиях опухолевых клеток немышечной природы и о влиянии на этот процесс гипоксии, активных форм кислорода и азота, гормонов, факторов роста, пола и возраста. Проанализированы также данные о влиянии опухолевого миоглобина на процессы, протекающие в клетках – окислительный стресс, ингибирование митохондриального дыхания оксидом азота и метаболизм жирных кислот, как в случае собственной эндогенной экспрессии небольших количеств (~ 1 мкМ) миоглобина, так и при сверхэкспрессии белка (~ 150 мкМ) посредством встроенного в геном опухолевой клетки миоглобинового гена. Сделано заключение, что индуцируемая гипоксией собственная экспрессия малых концентраций миоглобина благодаря его способности утилизировать активные формы кислорода и азота, которые могут повредить опухолевые клетки, обеспечивает их лучшее выживание, способствуя прогрессии опухоли и ее метастазированию. Соответственно, эта экспрессия миоглобина связана, как правило, с более агрессивным типом опухоли, плохим прогнозом течения и исхода заболевания и может, таким образом, служить «маркером» агрессивного злокачественного образования. Напротив, искусственная сверхэкспрессия миоглобина способна значительно ингибировать развитие опухоли и улучшить течение болезни за счет переключения метаболизма раковых клеток с гликолиза, характерного для опухоли, на окислительное фосфорилирование, присущее здоровой ткани. Сверхэкспрессия миоглобина может, таким образом, быть эффективным терапевтическим средством в онкологии.

Ключевые слова: миоглобин, опухоль, гипоксия, окислительный стресс, прогноз заболевания

DOI: 10.31857/S0233475524040011, **EDN:** axjysw

ВВЕДЕНИЕ

Первые данные о том, что синтез миоглобина не ограничен лишь типами опухолей, возникших из мышечной ткани, такими как саркома и карцинома человека, а происходит и в раковых клетках немышечных органов, появились в 1984 году в работе Смита и Дэвидсона [1].

Хотя затем это было подтверждено исследованиями других авторов, эту экспрессию миоглобина в немышечных опухолях долгое время ассоциировали исключительно с рабдомиоидной дифференциацией раковых клеток, а миоглобин рассматривался как маркер рабдомиоидной дифференциации раковой ткани [2, 3]. Более того, предполагали, что источником миоглобина

Список сокращений: Mb – миоглобин; MbO₂ – физиологически активный оксимиоглобин; метMb – окисленный миоглобин; NO – оксид азота; Ngb – нейроглобин; Cgb – цитоглобин; HIF-1/2α – фактор, индуцируемый гипоксией; АФК – активные формы кислорода; EGF – эпидермальный фактор роста; VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста; CAIX – карбоангидраза IX; GLUT1 – транспортер глюкозы; FASN – синтетаза жирных кислот; pO₂ – парциальное давление кислорода; p₅₀ – значение pO₂, при котором Mb оксигенирован наполовину.

в опухолях немышечной природы, как например, рака груди, является окружающая мускулатура [4].

Проблема была окончательно решена в 2009 году, когда экспрессия миоглобина и миоглобиновой мРНК была показана в различных клеточных линиях опухолей груди, легких, желудка, поджелудочной железы, ободочной кишки и костной ткани, но миоглобин не обнаруживался ни в линиях здоровых клеток, ни в тканевых образцах [5]. На сегодня экспрессия миоглобина исследована в самых разнообразных опухолях немышечных органов и клеточных линиях, включая опухоли яичников, простаты, почек, легких, головы и шеи человека, а также мозга [6–12]. Она обнаруживается в доброкачественных, и особенно, в злокачественных образованиях как при первичной опухоли, так и в случае рецидива. Соседняя же с опухолью здоровая ткань совсем не содержит или содержит очень мало миоглобина. Как и в случае здоровой ткани, миоглобин локализован в цитозоле опухолевых клеток иногда в виде характерных мозаичных структур, однако в некоторых случаях наблюдалось его присутствие в мембранах и (или) ядрах [10, 12]. Концентрация миоглобина в опухолях (~ 1 мкМ) гораздо меньше, чем в мышцах (200–300 мкМ). Количество миоглобина оценивали в лизатах опухолевых клеток и/или гистохимических срезах опухолевой ткани с помощью иммунохимических методов вестерн-блоттинг и ELISA с использованием моноклональных антител к миоглобину с присоединенными к ним спектральными (по поглощению и флуоресценции) или радиоактивными метками. Содержание миоглобиновой мРНК определяли количественным методом ПЦР.

Установлено, что синтез миоглобина в опухолях индуцирован гипоксией, которая является, по-видимому, общей природой опухолевых клеток [7, 8, 13]. Уже на ранней стадии развития опухоли ограничивается локальный доступ крови, а в процессе малигнизации образуются области с низким содержанием кислорода (очаговая гипоксия) [14]. В этих гипоксических участках (очагах) опухоли наблюдаются сильная дезорганизация сосудистой структуры ткани и изменение состояния самих кровеносных сосудов (ангиогенез), а клеточный метаболизм сдвигается от аэробного дыхания к гликолизу с образованием лактата и закислением среды (ацидоз) [14]. Гипоксия и переход к гликолизу как результат активации онкогенов являются, очевидно, преимущественно раковых клеток и необходимы для ракового роста, так как гликолиз

сохраняется даже при избытке кислорода при нормоксии (аэробный гликолиз) [13, 14]. Гипоксия и ацидоз снижают цитотоксический эффект иммунных клеток, проникающих в опухоль, делая ее иммунорезистентной и способствуя ее прогрессии и метастазированию. Гипоксия является также препятствием для радиационной терапии и некоторых видов антираковых препаратов, для фармацевтического эффекта которых нужен кислород.

Найдено, что помимо гипоксии на экспрессию миоглобина влияют активные формы кислорода и азота, уровень жирных кислот, гормоны, факторы роста и другие белковые факторы, а также пол и возраст [5, 6, 8, 10, 15]. Однако на сегодня биологическая функция и физиологическая роль опухолевого миоглобина до конца не выяснены. Согласно одним авторам, экспрессия миоглобина увеличивает скорость пролиферации и подвижность опухолевых клеток, что способствует лучшему выживанию и экспансии опухоли [5, 7, 9, 12, 16]. В то же время другие исследователи показывают, что в присутствии миоглобина рост опухолевой ткани уменьшается, а инвазия и метастазирование ингибируются, обеспечивая лучший прогноз течения и исхода заболевания [6, 10, 11, 15].

МИОГЛОБИН И ЕГО СВОЙСТВА

Миоглобин сердечной и скелетных мышц позвоночных животных и человека относится к большому семейству глобинов, глобулярных белков, содержащих в качестве простетической группы железопорфириновый комплекс – гем. Мономерные и олигомерные мио- и гемоглобины млекопитающих, рыб, птиц, членистоногих, моллюсков, насекомых и азотфиксирующих клубеньков бобовых растений сильно различаются по первичной аминокислотной последовательности, но имеют гомологичную пространственную структуру и сходные спектральные характеристики, обусловленные гемовой группой. Последняя встроена в гидрофобную полость глобина, где пятым лигандом атома Fe служит инвариантный гистидин F-спирали, His F8, а шестое лигандное место либо свободно, либо может быть занято внешним лигандом. Остальные четыре из шести координационных вакансий атома Fe гема постоянно заняты атомами азота порфиринового кольца. Все глобины способны обратимо связывать газообразные лиганды O₂, CO и NO. Очень важную роль в глобинах играет инвариантный дистальный гистидин E-спирали, His E7, в гемовой полости,

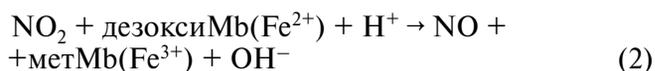
который образует водородную связь с лигандом O_2 , стабилизируя кислородный комплекс ферромиоглобина.

Основная функция миоглобина млекопитающих состоит в обеспечении кислородом цитохром С-оксидазы митохондрий во время мышечных сокращений, когда доставка O_2 кровью уменьшается. Особенно велико содержание миоглобина в мышцах высокогорных животных и морских ныряльщиков (киты, тюлени), достигая концентрации 200–300 мкМ. Со времен работ Хилла и Милликана [17, 18] бытовало представление, которое и сейчас еще очень распространено, о том, что оксимиоглобин (MbO_2) является пассивным хранителем резервного запаса O_2 в клетке, «депо кислорода», освобождая его при наступлении гипоксии. В отличие от этого, нами было доказано, что отщепление кислорода от MbO_2 происходит лишь при взаимодействии белка с «дышащими» митохондриями, а если MbO_2 отделен от митохондрий полупроницаемой мембраной, то никакого отщепления кислорода от MbO_2 не наблюдается даже при очень низких значениях $pO_2 < 1$ мм рт. ст. [19]. Детально изучен механизм миоглобин-митохондриального взаимодействия [20–23] и показано, что MbO_2 в процессе дезоксигенации связывается с фосфолипидными участками внешней мембраны митохондрий. То есть миоглобин является не пассивным «депо», средство которого к O_2 считалось постоянным, а активным переносчиком O_2 , средство которого к лиганду, как и у других белков-переносчиков, регулируется его взаимодействием с мишенью – митохондриями, дыхательная активность которых полностью определяет скорость дезоксигенации MbO_2 . Новый механизм функционирования миоглобина, с одной стороны, свободен от серьезных противоречий, с которыми сталкиваются механизмы «депо кислорода» и «облегченной диффузии» [24–26], а с другой – позволяет объяснить его роль в обеспечении кислородом каких-либо важных зависимых от кислорода процессов в клетке даже при малых концентрациях белка.

Наряду с функцией связывания кислорода в последние годы были открыты и изучены другие важнейшие свойства миоглобина, которые могут иметь физиологическое значение. Найдено, что *in vitro* ферро- и ферримиоглобины могут взаимодействовать с супероксид-анионом (O_2^-) и перекисью водорода как конечным продуктом его диспропорционирования [27]. Так как активные формы кислорода (АФК) являются важнейшим фактором разрушения тканей в процессе

окислительного стресса, пероксидазная активность миоглобина может заключаться в устранении АФК и антиоксидантной защите клеток [28].

Показано также, что MbO_2 проявляет NO-диоксигеназную активность, окисляя NO до нитрата и образуя метMb (уравнение (1)). В связи с этим предполагается, что в работающей мышце NO может связываться с гемовым центром MbO_2 , предотвращая ингибирование оксидом азота митохондриального дыхания, и влиять, таким образом, на процесс окислительного фосфорилирования [29]. В свою очередь, дезоксиMb(Fe^{2+}), как было найдено, способен работать как потенциальная нитрит-редуктаза с образованием NO и метMb(Fe^{3+}), сдвигая функцию белка от утилизации NO к его образованию (уравнение (2)).



Показано, что нитрит сам по себе не влияет на дыхание изолированных митохондрий, а в присутствии миоглобина он ингибирует дыхательную цепь в кардиомиоцитах [30]. Обе роли миоглобина в образовании NO и его утилизации регулируются уровнем pO_2 в клетке, близким к p_{50} миоглобина [31].

Наконец, хорошо изучена способность разных лигандных форм этого белка связывать жирные кислоты, что позволяет говорить о возможном участии миоглобина в их транспорте и метаболизме [32–34]. При этом показано, что безлигандный дезоксиMb и окисленный метMb практически полностью теряют способность связывать жирные кислоты (связывают их на 60–70% меньше по сравнению с MbO_2).

Следует отметить, что в животных организмах найдены новые представители глобинового семейства: мономерный нейроглобин (Ngb), который вырабатывается в малых количествах в мозге, и димерный цитоглобин (Cgb), присутствующий практически во всех немышечных тканях [35–38]. Эти глобины в отличие от пятикоординированного мышечного миоглобина и гемоглобина крови содержат шестикоординированный гем, где в качестве шестого лиганда атома Fe выступает дистальный His E7 белка. Несмотря на то что Ngb и Cgb способны связывать кислород, они из-за их малой концентрации, в особенности Ngb, по-видимому, не играют особой роли в клеточном потреблении

кислорода. В качестве основной своей функции Ngb и Cgb, как полагают, имеют антиоксидантную защиту клеток, а не снабжение их кислородом.

Оба глобина, Ngb и Cgb, экспрессируются в малых концентрациях порядка 1 мкМ также в опухолях. Синтез Ngb наряду с миоглобином был исследован в образцах ткани рака легкого и панелях раковых клеточных линий [39]. Экспрессия Cgb обнаружена в карциномах груди и легких, где сопровождалась уменьшением роста опухоли [40]. Экспрессия Ngb и Cgb наряду с миоглобином и гемоглобином, а также соответствующих мРНК показана также в плотных опухолях и панелях клеток рака груди человека [41] и в тканевых образцах и клеточных линиях глиобластомы мозга [42]. Как и в случае миоглобина, синтез этих глобинов в опухолях индуцируется гипоксией и коррелирует с уровнем факторов гипоксии HIF-1/2.

Интересен тот факт, что и миоглобин в малых концентрациях может синтезироваться здоровыми немышечными клетками в ответ на гипоксию. Представление о том, что этот белок является продуктом исключительно сократительных мышц, было опровергнуто в 2006 году, когда было показано, что устойчивый к гипоксии карп *Cyprinus carpio* содержит миоглобин не только в мышцах, но и в других метаболически активных тканях, включая, печень, жабры и мозг [43]. При этом были найдены два разных транскрипта миоглобиновой мРНК, MbI и MbII, кодируемых разными генами, и экспрессия одного из них сильно увеличивалась в условиях длительного недостатка кислорода.

СИНТЕЗ МИОГЛОБИНА В ОПУХОЛЯХ

Активация миоглобинового гена при гипоксии, присутствие альтернативных промоторов

В панелях опухолевых клеточных линий человека различного типа и локализации (груди, легких, ободочной кишки, желудка, поджелудочной железы, сетчатки глаза) обнаружено содержание миоглобиновой мРНК, количество которой сильно (в 30–1000 раз) отличалось в зависимости от генетики клеточной линии [5]. Активация гена миоглобина связана, как отмечалось, с гипоксией, наличие которой доказывали с помощью маркера экзогенной гипоксии пимонидозола [44]. О гипоксии свидетельствует также

присутствие в опухолях активатора клеточного ответа на гипоксию – белкового фактора HIF [45]. Индуцируемые гипоксией гетеродимерные транскрипционные белковые факторы HIF (HIF-1, HIF-2 и HIF-3) инициируют экспрессию транспортера глюкозы, гликолитических ферментов и ингибиторов метаболизма митохондрий и играют ключевую роль в опухолевом метаболизме и онкогенезе [14]. Они содержат чувствительную к кислороду α -субъединицу, которая стабильна при гипоксии в условиях эксперимента, но деградирует в протеосоме при нормоксии.

При изучении активации гена миоглобина в клетках линии рака груди MDA-Mb-468 человека под действием факторов HIF-1/2 было обнаружено присутствие нескольких транскриптов миоглобиновой мРНК, содержащих различные 5'-нетранслируемые области, что свидетельствовало о том, что транскрипция гена ведется с разных промоторов [7]. Наряду со стандартным транскриптом Mb-S, который доминирует в сердечной и скелетных мышцах млекопитающих, авторы обнаружили альтернативный транскрипт Mb-A. При нормальном pO_2 этого транскрипта синтезировалось в 300 раз больше, чем Mb-S, а в условиях гипоксии его количество увеличивалось еще в 2.2 раза, тогда как содержание Mb-S не изменялось. Оба варианта транскрипта миоглобиновой мРНК экспрессируются также в раковой ткани опухолей груди человека [7]. На основании полученных данных был сделан вывод, что Mb-A является специфическим транскриптом раковых клеток, и его синтез активируется в условиях гипоксии факторами HIF-1/2. Поскольку при гипоксии в здоровых немышечных тканях карпа *Cyprinus carpio*, как отмечалось, также наблюдается синтез двух разных миоглобинов, возможно, что транскрипт Mb-A не является специфичным лишь для опухолей, а активируется под влиянием гипоксии и в здоровой ткани.

Позднее при изучении экспрессии миоглобина в клеточной линии MDA-Mb-468 и линии рака ободочной кишки DLD-1 были обнаружены четыре альтернативных транскрипта миоглобиновой мРНК, которые синтезируются в ответ на гипоксию и транскрибируются с альтернативных промоторов, отличающихся от промотора гена миоглобина [12]. Эти транскрипты миоглобиновой мРНК были найдены также в клеточных линиях глиобластомы мозга [42].

Влияние различных факторов на экспрессию миоглобина опухолевыми клетками

Гипоксия, корреляция с факторами HIF-1/2 α и маркерами гипоксии. Количество миоглобина и миоглобиновой мРНК в опухолях коррелирует с содержанием O₂ в среде и длительностью гипоксии, а также с содержанием мРНК и белков – маркеров гипоксии, синтез которых регулируется HIF-1/2 (табл. 1). Согласно данным разных авторов, содержание миоглобиновой мРНК и белка в опухолевых клетках рака груди линий MDA-Mb-231, MDA-Mb-468 и MCF-7 увеличивается в 2–4 раза за сутки при 1% O₂ и еще более возрастает при более длительной гипоксии, а также при уменьшении концентрации O₂ в среде. Значительное увеличение содержания миоглобиновой мРНК и миоглобина в этих линиях клеток рака груди (в 3–7 раз) при длительной (24–48 ч) гипоксии (1% O₂) отмечается также в работе Флонта и соавт. [5], а также для различных клеточных линий карциномы почек [8]. В случае рака легкого увеличение содержания миоглобиновой мРНК через 48 ч при 1% O₂ сильно различалось для разных клеточных линий от 2-кратного для линии COR-L88 до 9-кратного для линии UTB-182 и совсем не изменялась в клетках линии DMS-53, также как в случае линии шейной карциномы HeLa (табл. 1). По мнению авторов, синтез миоглобина может регулироваться не только на уровне миоглобиновой мРНК, но и на уровне белка, который в этих экспериментах не контролировался.

В клетках разных линий рака груди наблюдалась естественная корреляция индуцируемой гипоксией экспрессии миоглобиновой мРНК и миоглобина с содержанием факторов HIF-1/2 α , тогда как в опухолевых клетках рака легкого уровень HIF-1/2 α оставался постоянным, не изменяясь под влиянием гипоксии (табл. 1). Это может быть связано с нестабильностью фактора HIF-1/2 α в условиях эксперимента, так как содержание других маркеров гипоксии, карбоангидразы IX (CAIX) и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), увеличивалось в 10 и 5–6 раз соответственно. Корреляция экспрессии миоглобиновой мРНК и миоглобина с содержанием факторов HIF-1/2 α была показана позднее для клеток рака мозга [12]. При этом наблюдалась также корреляция с маркерами гипоксии – лактатдегидрогеназой и CAIX. Корреляция индуцируемого гипоксией синтеза миоглобина с содержанием CAIX, VEGF и транспортера глюкозы (GLUT1) исследована также на разных клеточных линиях рака груди, легкого и гепатомы человека (табл. 1).

Активные формы кислорода и азота. АФК, которые продуцируются митохондриями, играют активную роль в формировании окислительного стресса в патогенезе опухолей, а также участвуют в том числе в качестве сигнальных молекул в развитии патологии [46–48]. На модели клеточной линии рака груди человека MCF-7 показано [5], что окислительный стресс, вызываемый добавлением перекиси водорода (0.5–1.0 ммоль/л), является основным сигналом, который в условиях гипоксии (1% O₂) запускает экспрессию миоглобина выше основного уровня (24 нг на 10⁶ клеток).

В условиях гипоксии (1% O₂) содержание миоглобина в раковых клетках линии MCF-7 увеличивалось также в присутствии донора NO S-нитрозо-N-ацетилпенициллина (0.1–0.3 мМ) [5]. Известно, что NO вызывает ингибирование цитохром С-оксидазы митохондрий и митохондриального дыхания, стимулируя выработку АФК [49]. Роль NO в развитии рака до конца не изучена. С одной стороны, имеются данные, что NO в микромолярных концентрациях убивает раковые клетки, инициируя апоптоз, а с другой – что при малых концентрациях NO может вносить вклад в прогрессию опухоли, усиливать пролиферацию и трансформацию раковых клеток [50, 51]. Стабилизируя фактор HIF-1 α и имитируя гипоксию, NO «запускает» генетическую программу, которая помогает опухоли выживать и расти, в частности, стимулируя ангиогенез [52]. Поскольку и АФК, и NO стабилизируют уровень фактора HIF-1 α , их эффект на рост экспрессии миоглобина в опухолевых клетках может быть связан с усилением гипоксии [53].

Гормоны, факторы роста, пол и возраст. Экспрессия миоглобина коррелирует с синтезом стероидных гормонов. Так, на клеточной линии рака груди MCF-7 было показано, что недостаток эстрогена индуцирует выработку миоглобиновой мРНК, а эстрогеновая терапия ингибирует ее образование [6]. Аналогично, на клетках линии рака простаты LNCaP было показано, что недостаток андрогенов способен индуцировать, а их назначение подавлять экспрессию миоглобиновой мРНК [15]. Синтез миоглобина в клеточной линии MCF-7 индуцировался также добавлением эпидермального фактора роста (EGF) [5] и VEGF в клеточной линии LNCaP [15].

Корреляция между экспрессией миоглобина и возрастом, и полом была обнаружена в карциномах ротовой полости, глотки и гортани [10]. У более молодых пациентов наблюдали

Таблица 1. Влияние гипоксии на экспрессию миоглобина опухолевыми клетками рака груди, рака легкого, гепатомы и шейной карциномы человека

Вид опухоли, клеточная линия	% O ₂	Время, ч	Мб мРНК	Мб белок	HIF-1/2α мРНК	CAIX мРНК	VEGF мРНК	GLUT1 мРНК	Ссылка
			отн. ед.						
Рак груди человека MCF-7	20	72	1.0	1.0	—	1.0	—	—	[7]
	1.0	24	3.6 ± 0.5	2.3 ± 0.4	—	27 ± 12	—	—	
	1.0	48	4.2 ± 0.6	3.4 ± 0.1	—	—	—	—	
	1.0	72	5.0 ± 0.5	5.1 ± 0.3	—	—	—	—	
	18.6	16	1.0 ± 0.1	—	—	—	—	1.0 ± 0.2	[41]
	1.0	16	1.15 ± 0.11	—	—	—	—	1.1 ± 0.1	
	0.1–0.2	16	1.3 ± 0.13	—	—	—	—	2.9 ± 0.4	
	MDA-Мб-468	20	72	—	1.0	1.0	—	—	—
1.0		24	—	1.6 ± 0.4	2.0 ± 0.3	—	—	—	
1.0		48	—	4.1 ± 0.6	4.0 ± 0.5	—	—	—	
1.0		72	—	4.6 ± 0.7	4.2 ± 1.3	—	—	—	
21		72	1.0	—	1.0	—	—	—	[16]
1.0	24	2.7 ± 0.6	—	1.3 ± 0.8	—	—	—		
Рак легкого COR-L88	20	48	1.0	—	1.0 ± 0.01	1.0	1.0	—	[39]
	1.0	48	1.8 ± 0.1	—	1.1 ± 0.2	11.0 ± 0.01	60.0 ± 0.01	—	
	20	48	1.0	—	1.0 ± 0.01	1.0	1.0	—	
	НТВ-182	1.0	48	9.0 ± 2.0	—	0.9 ± 0.01	10.0 ± 0.1	6.0 ± 0.01	—
		20	48	1.0	—	1.0 ± 0.01	1.0	1.0	—
	DMS-53	1.0	48	1.0 ± 0.1	—	1.0 ± 0.01	11 ± 0.1	5.0 ± 0.01	—
1.0		48	1.0 ± 0.1	—	1.0 ± 0.01	11 ± 0.1	5.0 ± 0.01	—	
Гепатома Hep3B	18.6	16	1.0 ± 0.3	—	—	—	—	1.0	[41]
	1.0	16	2.0 ± 1.0	—	—	—	—	2.0 ± 0.5	
	0.1–0.2	16	1.5 ± 0.5	—	—	—	—	4.0 ± 0.6	
Шейная карцинома HeLa	18.6	16	1.0 ± 0.05	—	—	—	—	1.0	[41]
	1.0	16	0.9 ± 0.05	—	—	—	—	1.8 ± 0.8	
	0.1–0.2	16	0.8 ± 0.2	—	—	—	—	3.4 ± 0.6	

более высокую экспрессию миоглобина, которая уменьшалась с возрастом, а также была более выражена у женщин, чем у мужчин. При этом более высокая экспрессия миоглобина детектировалась в ротовой полости и глотке, а более низкая — в гортани. Корреляция экспрессии миоглобина с возрастом наблюдалась при раке груди у женщин, возможно, из-за гормонального уровня у пациенток в периоды пре- или постменопаузы, а обратная зависимость наблюдалась в популяции мужчин с раком простаты. Не наблюдалось какой-либо связи экспрессии миоглобина с полом, возрастом при раке легкого [39].

ВЛИЯНИЕ МИОГЛОБИНА НА ПРОЦЕССЫ, ПРОТЕКАЮЩИЕ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Гипоксия, активные формы кислорода и азота

Поскольку главной функцией миоглобина млекопитающих является доставка O₂ к митохондриям, исследовали влияние опухолевого миоглобина на снабжение клеток опухоли кислородом. Показано, что в клетках линии рака груди MDA-Мб-468, синтезирующих миоглобин, уровень фактора HIF-1α был существенно ниже, чем в клетках этой линии без миоглобина, синтез которого блокировали с помощью

антисмысловой миоглобиновой мРНК [16]. Это могло свидетельствовать о сдвиге клеточного метаболизма в раковых клетках, синтезирующих миоглобин, в сторону аэробного дыхания. Однако более вероятно, что, как и *Ngb* и *Cygb* в немышечных тканях, опухолевый миоглобин выполняет роль, прямо не связанную с запасанием и транспортом O_2 [7].

Экспрессия миоглобина, по-видимому, призвана защитить раковую клетку от окислительного стресса благодаря способности белка удалять АФК. Действительно, после блокирования синтеза миоглобина в опухолевых клетках линии MDA-Mb-468 уровень АФК в них был значительно выше, чем в контрольных клетках этой линии, а обработка их H_2O_2 приводила к значительному увеличению зоны центрального некроза опухоли. Обработка клеток линии MDA-Mb-468, содержащих миоглобин, оксидом азота сопровождалась значительным уменьшением некротических участков, что можно объяснить способностью MbO_2 утилизировать NO. После блокады синтеза миоглобина в раковых клетках этой линии размер очагов некроза увеличивался, в том числе в условиях нормоксии [16].

Метаболизм жирных кислот

Помимо утилизации активных форм кислорода и азота функция опухолевого миоглобина может состоять в регуляции метаболизма жирных кислот [6, 54]. Рост большого количества опухолей связан с увеличением синтеза жирных кислот. В опухолях груди и простаты человека синтез миоглобина коррелирует с экспрессией синтетазы жирных кислот (FASN), а ингибирование FASN уменьшает экспрессию миоглобина в клетках рака груди, указывая на то, что миоглобин может быть причастен к синтезу жирных кислот *in vivo* в качестве переносчика [6, 54]. Об этом же свидетельствуют солокализация миоглобина и FASN в цитоплазме, а также тот факт, что миоглобин облегчает диффузию жирных кислот, которая необходима для липогенеза с участием FASN [55].

В большинстве исследований делается вывод, что синтезируемый миоглобин является частью адаптивной системы опухолей, обеспечивающей их прогрессию и метастазирование [5, 7, 9, 12, 16, 39, 42]. С этим согласуются и результаты наблюдений, что экспрессия миоглобина связана с более агрессивным клеточным фенотипом и худшим прогнозом течения и исхода заболевания у пациентов. Однако имеется и альтернативная точка зрения, что экспрессия миоглобина может

быть связана с ослаблением опухолевого роста и лучшим прогнозом течения заболевания, что наблюдалось у пациентов при раке груди, простаты, карциномах ротовой полости, глотки и гортани [6, 10, 11, 15, 56, 57]. В экспериментах *in vitro* было также показано, что экспрессия миоглобина в клетках линий MDA-Mb-231, MDA-Mb-468 и MCF-7 приводила к блокировке митотического клеточного цикла при переходе от G1- к S-фазе и ингибированию клеточной пролиферации и роста опухоли [11]. Как полагают, ингибирующий эффект экспрессии миоглобина может объясняться тем, что, утилизируя активные формы кислорода и азота, он не только снимает окислительный стресс и поддерживает митохондриальную активность и аэробный метаболизм, но и выполняет регуляторную функцию, предотвращая активацию сигнального каскада, необходимого для опухолевого перерождения и роста опухоли [6, 11].

Искусственная модель экспрессии миоглобина в опухолях

Функциональная роль экспрессируемого раковыми клетками миоглобина изучалась на Mb-отрицательных клетках линии карциномы легких человека A-549, в которые с помощью генной инженерии был введен ген миоглобина мыши, что позволило им «дышать» даже в гипоксическом окружении [13]. Содержание миоглобина в раковых клетках этой линии многократно (~ 150 раз) превышало обычно синтезирующуюся в опухолях концентрацию порядка 1 мкМ. Сверхэкспрессия миоглобина не оказывала токсического эффекта на раковые клетки линии A-549. Клетки, экспрессирующие миоглобин, росли с той же скоростью, как и клетки контрольной линии (табл. 2).

В выращенных в условиях гипоксии клетках линии A-Mb O_2 -549 со сверхэкспрессией миоглобина увеличивалось потребление кислорода (на 37%) и содержание АТФ (на 17%), а также существенно (в 2 раза) уменьшалось содержание лактата (табл. 2). После инкубации в течение 3 ч в условиях снижения концентрации кислорода (21, 3, 1 и 0.1% O_2) синтезирующие миоглобин клетки линии A-549 обнаруживали существенно более низкие уровни HIF-1 α , чем контрольные, указывая на то, что миоглобин уменьшает гипоксический ответ раковых клеток, увеличивая их оксигенацию.

В экспериментальных опухолях легких у мышей миоглобиновой группы, образование которых было индуцировано введением животным

Таблица 2. Влияние сверхэкспрессии миоглобина на свойства опухолевых клеток линии А-549 карциномы легких человека [13]

Клеточная линия	% O ₂ (время)	Потребление O ₂ , нмоль/мин/10 ⁶ клеток	АТР, отн.ед.	Лактат, мг/10 ⁶ клеток
А-549	21 (24 ч)	3.0 ± 0.2	8.2 ± 0.1	3.0 ± 0.2
	1.0 (24 ч)	1.9 ± 0.1	6.8 ± 0.1	7.0 ± 1.0
А-МбO ₂ -549	21 (24 ч)	3.2 ± 0.4	8.4 ± 0.2	2.6 ± 0.5
	1.0 (24 ч)	2.8 ± 0.2	8.0 ± 0.2	4.6 ± 0.6

Таблица 3. Влияние сверхэкспрессии миоглобина на экспериментальные опухоли легких мышей, инъецированных клетками линии карциномы легких человека А-549. Показатели были определены через 5 недель после инъекции [13]

Клетки инъекции	Среднее время формирования опухоли, дни	Вес опухоли, мг	pO ₂ внутри опухоли, мм рт.ст. (% O ₂)	HIF-1α*, отн. ед.	AI**	PI***	Спонтанное метастазирование****
Здоровые легкие мыши	—	—	30.9 ± 10.0 (4.1%)	—	—	—	—
А-549	6	791 ± 161	5.5 ± 2.7 (0.7%)	73 ± 21	0.163 ± 0.059	0.372 ± 0.028	45.6 ± 1.6
А-МбO ₂ -549	18	163 ± 41	21.6 ± 9.9 (3.0%)	7.0 ± 3.0	0.024 ± 0.018	0.175 ± 0.062	5.2 ± 3.3
А-[His F8(Tyr)-метМб]-549	6	1089 ± 321	5.4 ± 2.9 (0.7%)	85 ± 26	—	—	77.4 ± 14.4
А-[His F8(Ala)-His E7(Ala)-метМб]-549	6	1107 ± 297	5.1 ± 3.1 (0.7%)	71 ± 19	—	—	103.2 ± 17.9

* HIF-1α экспрессию измеряли по количеству HIF-1α положительных клеток на поле методом иммунофлуоресценции.

** AI — апоптотический индекс, определяли иммуногистохимически в срезах опухоли с помощью окрашивания очагов некроза.

*** PI—пролиферативный индекс, определяли иммуногистохимически в срезах опухоли с использованием антител против митотического маркера Ki67.

**** Измерено по содержанию копий *gfp*-гена геномной ДНК легких модели мышей.

клеток линии A-MbO₂-549, содержание O₂ было более, чем в 4 раза выше по сравнению с контролем, они содержали почти в 10 раз меньше HIF-1α – положительных и метастатических клеток, чем в контрольной группе (табл. 3). То есть сверхэкспрессия миоглобина приводила к уменьшению инвазии и метастазирования, и в соответствии с этим существенно замедлялось формирование экспериментальной опухоли и ее рост; в этих опухолях также регистрировались более низкие по сравнению с контролем пролиферативный и апоптотический индексы (табл. 3).

Способность сверхэкспрессии миоглобина ингибировать метастазирование экспериментальных опухолей была подтверждена также на двух других моделях мышей с использованием клеток линий меланомы человека MDA-Mb-435-HGF и карциномы молочной железы мыши TSA. Гистологический анализ опухолевой ткани мышей, синтезирующей миоглобин, показал, что она содержит гораздо меньше (в ~ 7 раз) некротических областей с недостаточным уровнем O₂ и лучше дифференцирована, напоминая легочную структуру здоровых легких мышей. Опухолевая ткань мышей со сверхэкспрессией миоглобина сильно отличалась от опухолевой ткани мышей контрольной линии, содержащей некротические области недифференцированных клеток.

Чтобы проверить, связан ли биологический эффект сверхэкспрессии миоглобина только с его кислородтранспортной функцией, была исследована также сверхэкспрессия мутантных форм миоглобина, в которых инвариантный проксимальный His F8 был замещен на тирозин, линия A-[His F8(Tyr)-метMb]-549, или оба инвариантных остатка, проксимальный His F8 и дистальный His E7, заменены на аланин, линия A-[His F8(Ala)-His E7(Ala)-метMb]-549. Оба мутантных миоглобина постоянно находятся в окисленной мет-форме (Fe³⁺) и неспособны связывать кислород. Опухолевые клетки линии рака легких A-549, экспрессирующие мутантные миоглобины, росли и развивались так же, как контрольные клетки, экспрессирующие миоглобин дикого типа, однако они обнаруживали более высокую способность утилизировать АФК по сравнению с диким типом, что согласуется с более высокой пероксидазной активностью метMb.

В опытах с использованием химического донора NO опухолевые клетки, экспрессирующие первый мутант, проявляли меньшую по сравнению с диким типом способность к нейтрализации NO в соответствии с тем, что метMb,

в отличие от MbO₂, не обладает NO-диоксигеназной активностью. Однако клетки линии A-549, экспрессирующие второй мутантный миоглобин, были так же эффективны в отношении утилизации NO, как и клетки дикого типа, подтверждая тот факт, что замена дистального His E7 неполярной аминокислотой сильно увеличивает сродство метMb к NO [58].

На экспериментальных опухолях мышей *in vivo* никакого ингибирующего эффекта экспрессии мутантных миоглобинов на их рост и метастазирование не наблюдалось (табл. 3), то есть этот эффект связан только с кислородтранспортной функцией миоглобина. Напротив, экспрессия обоих мутантных миоглобинов способствовала лучшему росту опухоли и инвазии, так как эти белки, неспособные связывать O₂, успешно защищали раковые клетки от окислительного стресса благодаря своей пероксидазной и NO-диоксигеназной активности. Как видно из табл. 3, в обоих случаях на ~ 40% увеличивался вес опухоли и в 1.5–2 раза возрастало спонтанное метастазирование по сравнению с исходным безмиоглобиновым A-549 типом опухоли, при этом концентрация O₂ и уровень HIF-1α в них практически не изменялись. Во всех случаях сверхэкспрессия миоглобина дикого типа сопровождалась подавлением роста экспериментальной опухоли и уменьшением метастазирования по сравнению с контролем, в то время как сверхэкспрессия мутантных миоглобинов, неспособных связывать кислород, но сохраняющих пероксидажную и NO-диоксигенажную активности, способствовала росту и метастазированию опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, полученные при изучении экспрессии миоглобина опухолями, показали, что пероксидазная и NO-диоксигеназная активности белка, которые были давно и детально исследованы в химических экспериментах *in vitro* и рассматривались как возможно имеющие физиологическое значение, действительно играют важнейшую роль в физиологии клетки. Это убедительно продемонстрировано в опытах по блокированию синтеза миоглобина в опухолевых клетках с помощью антисмысловой миоглобиновой мРНК [16] и в опытах с мутантными миоглобинами, неспособными связывать кислород [13].

Активные формы кислорода, супероксид-анион O₂⁻ и H₂O₂ как конечный продукт его диспропорционирования, продуцируются в процессе окислительного фосфорилирования из-за «утечки» электронов из электрон-транспортной

цепи. Этот процесс особенно активизируется при гипоксии в условиях недостатка конечного акцептора электронов O_2 для цитохром С-оксидазы. Роль миоглобина, таким образом, состоит в том, что он предотвращает образование АФК, доставляя кислород в нужном количестве в митохондрии, и в то же время обезвреживает АФК благодаря своей пероксидазной активности.

В биологии рака свободные радикалы кислорода играют двоякую роль: с одной стороны, они являются сигнальными молекулами для развития опухоли, а с другой – повреждают важные компоненты опухолевой клетки, приводя к ее гибели. Поэтому пероксидазная функция миоглобина очень важна для ее выживания и развития. Оксид азота, ингибируя цитохром С-оксидазу и каталазу, также способствует выработке АФК митохондриями, поэтому NO-диоксигеназная функция миоглобина также очень важна для клетки. Именно благодаря способности миоглобина утилизировать АФК и NO экспериментальные опухоли рака легких у мышей, в которых имела место сверхэкспрессия мутантных миоглобинов, развивались и метастазировали даже лучше, чем в контрольной группе, не содержащей миоглобина, и намного (в 6–7 раз) эффективнее, чем при сверхэкспрессии MbO₂ дикого типа, где процессы роста и метастазирования опухоли ингибировались. Очевидно, что экспрессия миоглобина не является единственным способом обеспечения лучшего выживания опухолевых клеток, так как миоглобин синтезируется не во всех опухолях и клеточных линиях, а в случае однотипных видов опухолей его синтез детектируется только у 40–60% пациентов [55].

Поскольку с помощью мутантных миоглобинов убедительно показано, что подавление роста опухоли связано только с кислородтранспортной функцией миоглобина, благоприятное влияние экспрессии малых количеств эндогенного белка на исход заболевания, который в основном наблюдали в случае гормон-зависимых опухолей (грудь, простата), по-видимому, обусловлен другими факторами, не связанными с функциями миоглобина. Рак является сложным многостадийным патологическим состоянием, основным характерным признаком которого является гипоксия, а также связанные с гипоксией типичные признаки, такие как ангиогенез, гликолиз, неконтролируемый рост, иммунорезистентность, инвазивность и метастазирование. Возможно, что в описанных случаях благоприятного влияния синтеза собственного миоглобина на течение и исход заболевания, «миоглобиновой» защиты раковых клеток

недостаточно, а решающее значение имеют сопряженные с экспрессией миоглобина другие факторы, возможно, связанные с гормональной регуляцией и липогенезом, которые приводят к подавлению опухолевого роста, скорее всего, из-за продукции избыточного количества активных форм кислорода и азота [11, 55].

Таким образом, роль миоглобина в функционировании клетки зависит от характера клеточного метаболизма: при аэробном дыхании и нормальном pO_2 основной является кислородтранспортная функция миоглобина, а в условиях гипоксии, когда концентрация O_2 мала и имеет место гликолиз, главными становятся его пероксидазная и NO-диоксигеназная активности. Поэтому ситуация в здоровых мышечных клетках и опухолевых клетках со сверхэкспрессией миоглобина, содержащих большие количества белка, и тех клетках, в которых миоглобина мало, принципиально различается. В первом случае с помощью MbO₂ поддерживается митохондриальное дыхание и аэробный метаболизм, характерные для здоровой ткани, но не для опухоли, что способствует подавлению ее роста. С этим согласуется тот факт, что сердечная и скелетные мышцы животных, содержащие много миоглобина, меньше подвержены опухолевому перерождению по сравнению с другими органами без миоглобина.

В случае низкой концентрации миоглобина, когда его кислородтранспортная функция неэффективна (или малоэффективна), на первый план выходят пероксидазная и NO-диоксигеназная активности белка, способные защитить клетки от гибели. В мозге и почти всех мышечных органах с развитой системой кровеносных сосудов, обеспечивающих бесперебойную доставку кислорода, тем не менее, показан синтез небольших количеств (порядка 1 мкМ) родственных миоглобину белков, Ngb и Cgb, основной функцией которых, как полагают, является антиоксидантная защита клеток. И миоглобин, как отмечалось выше, также присутствует в мышечных органах устойчивых к гипоксии организмов [43, 55].

Индукцируемая гипоксией экспрессия миоглобина в опухолевых клетках также должна, очевидно, способствовать прогрессии опухоли и ее метастазированию. Это действительно характерно для большого числа исследованных опухолей и связано, как правило, с более агрессивным типом опухоли и плохим прогнозом течения и исхода заболевания [5, 7, 9, 12, 16, 39, 42]. Экспрессия опухолевого миоглобина, таким

образом, может служить «маркером» агрессивного злокачественного образования. В свою очередь, сверхэкспрессия миоглобина в опухоли способна значительно улучшить течение болезни за счет переключения метаболизма раковой клетки с гликолиза на окислительное фосфорилирование, то есть служить терапевтическим средством [59–61].

Вопрос об участии миоглобина в качестве переносчика в метаболизме жирных кислот в клетке пока остается открытым, хотя данные о его совместной локализации с FASN и о том, что ингибирование FASN уменьшает экспрессию миоглобина в клетках рака груди, могут указывать на такую возможность [6, 54]. Следует отметить, что миоглобин был открыт почти сто лет назад [17, 18] и, так как он может быть получен в больших количествах и легко кристаллизуется, был первым белком, пространственная структура которого была расшифрована с атомарным разрешением [62]. Свойства миоглобина детально изучены с помощью самых разных экспериментальных и теоретических методов физикохимии белков, в том числе новейших современных подходов, апробация которых проводится, как правило, на миоглобине. И, тем не менее, этот белок до сих пор остается интересным объектом для исследователей, которые открывают и изучают все новые особенности этого гемопротейна. Поскольку даже при нормоксии миоглобин присутствует в немышечных клетках в очень малых пикомолярных концентрациях (как например, концентрация при раке груди составляет 4 пМ [6]), то, учитывая его способность активно взаимодействовать с фосфолипидными мембранами, нельзя исключить возможности его функционирования в качестве сигнальной молекулы для инициации и/или ингибирования каких-либо клеточных процессов.

Вклад авторов. Г. Б. Постникова — концепция и руководство работой, написание текста; Е. А. Шеховцова — написание текста, редактирование текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов в финансовой или какой-либо другой сфере.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания от 07.02.2024 г. № 075–00609–24–01 на 2024–2026 гг.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith T.W., Davidson R.I. 1984. Medullomyoblastoma. A histologic, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Cancer*. **54**, 323–332.
2. Emoto M., Iwasaki H., Kikuchi M., Shirakawa K. 1993. Characteristics of cloned cells of mixed müllerian tumor of the human uterus. Carcinoma cells showing myogenic differentiation in vitro. *Cancer*. **71**, 3065–3075.
3. Carda C., Ferrer J., Vilanova M., Peydró A., Llobart-Bosch A. 2005. Anaplastic carcinoma of the thyroid with rhabdomyosarcomatous differentiation: a report of two cases. *Virchows Arch*. **446**, 46–51.
4. Eusebi V., Bondi A., Rosai J. 1984. Immunohistochemical localization of myoglobin in nonmuscular cells. *Am.J. Surg. Pathol.* **8**, 51–55.
5. Flonta S.E., Arena S., Pisacane A., Michieli P., Bardelli A. 2009. Expression and functional regulation of myoglobin in epithelial cancers. *Am.J. Pathol.* **175**, 201–206.
6. Kristiansen G., Rose M., Geisler C., Fritzsche F.R., Gerhardt J., Luke C., Ladhoff A.M., Knuchel R., Dietel M., Moch H., Varga Z., Theurillat J.P., Gorr T.A., Dahl E. 2010. Endogenous myoglobin in human breast cancer is a hallmark of luminal cancer phenotype. *Br.J. Cancer*. **102**, 1736–1745.
7. Kristiansen G., Hu J., Wichmann D., Stiehl D.P., Rose M., Gerhardt J., Bohnerdt A., ten Haaf A., Moch H., Raleigh J., Varia M.A., Subarsky P., Scandurra F.M., Gnaiger E., Gleixner E., Bicker A., Gassmann M., Hankeln Th., Dahl E., Gorr, Th.A. 2011. Endogenous myoglobin in breast cancer is hypoxia-inducible by alternative transcription and functions to impair mitochondrial activity. A role in tumor suppression? *J. Biol. Chem.* **286**, 43417–43428.
8. Behnes C.L., Bedke J., Schneider S., Küffer S., Strauss A., Bremmer S., Ströbel P., Radzun H.J. 2013. Myoglobin expression in renal cell carcinoma is regulated by hypoxia. *Exp. Mol. Pathol.* **95**, 307–312.
9. Bicker A., Brahmer A.M., Meller S., Kristiansen G., Gorr T.A., Hankeln T. 2015. The distinct gene regulatory network of myoglobin in prostate and breast cancer. *PLoS One*. **10**, e0142662.
10. Meller S., van Ellen A., Gevensleben H., Bicker A., Hankeln Th., Gorr Th.A., Sailer V., Dröge F., Schröck F., Bootz F., Schröck A., Perner S., Dietrich D., Kristiansen G. 2016. Ectopic myoglobin expression is associated with a favourable outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Research*. **36**, 6235–6242.
11. Braganza A., Quesnelle K., Bickta J., Reyes Ch., Wang Y., Jessup M., St. Croix C., Scott J., Singh Sh.V., Shiva S. 2019. Myoglobin induces mitochondrial fusion thereby inhibiting breast cancer cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **294**, 7269–7282.
12. Elsherbiny M.E., Shaaban M., El-Tohamy R., Elkholi I., Hammam O.A., Magdy M., Allalunis-Turner J., Emara M. 2021. Expression of myoglobin in normal

- and cancer brain tissues: correlation with hypoxia markers. *Frontiers in Oncology*. **11**, 590771.
13. Galluzzo M., Pennacchietti S., Rosano S., Comoglio P.M., Michielli P. 2009. Prevention of hypoxia by myoglobin expression in human tumor cells promotes differentiation and inhibits metastasis. *J. Clin. Invest.* **119**, 865–875.
 14. Hsu P.P., Sabatini D.M. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. **134**, 703–707.
 15. Meller S., Bicker A., Montani M., Ikenberg K., Rostamzadeh B., Sailer V., Wild P., Dietrich D., Uhl B., Sulser T., Moch H., Gorr T.A., Stephan C., Jung K., Hankeln T., Kristiansen G. 2014. Myoglobin expression in prostate cancer is correlated to androgen receptor expression and markers of tumor hypoxia. *Virchows Arch.* **465**, 419–427.
 16. Quinting Th., Heymann A.K., Bicker A., Nauth Th., Bernardini A., Hankeln Th., Fandrey J., Schreiber T. 2021. Myoglobin protects breast cancer cells due to its ROS and NO scavenging properties. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. **12**, 732190.
 17. Hill R.L. 1933. Oxygen affinity of muscle haemoglobin. *Nature*. **132**, 897–898.
 18. Millikan G.A. 1939. Muscle hemoglobin. *Physiol. Rev.* **19**, 503–523.
 19. Postnikova G.B., Shekhovtsova E.A. 2013. Myoglobin and mitochondria: How does the «oxygen store» work? *J. Phys. Chem. Biophys.* **3**, 126.
 20. Postnikova G.B., Shekhovtsova E.A. 2014. The interaction of myoglobin with neutral and negatively charged artificial bilayer phospholipid membranes. Their effect on conformation of myoglobin and its affinity for oxygen. *Physiol. Sci.* **1**, 1–11.
 21. Postnikova G.B., and Shekhovtsova E.A. 2014. Myoglobin acts as the oxygen carrier to mitochondria. *Physiol. Sci.* **1**, 12–16.
 22. Postnikova G.B., Shekhovtsova E.A. 2015. The effect of mitochondrial and artificial bilayer phospholipid membranes on conformation of myoglobin and its affinity for oxygen. *Am.J. Biol. Chem.* **3**, 16–32.
 23. Postnikova G.B., Shekhovtsova E.A. 2018. Myoglobin: Oxygen depot or oxygen transporter to mitochondria? A novel mechanism of myoglobin deoxygenation in cells. *Biochemistry (Moscow)*. **83**, 168–183.
 24. Jones D.P., Kennedy F.G. 1982. Intracellular O₂ gradients in cardiac myocytes. Lack of a role for myoglobin in facilitation of intracellular O₂ diffusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 419–424.
 25. Jurgens K.D., Papadopoulos S., Peters T., and Gross G. 2000. Myoglobin: Just an oxygen store or also an oxygen transporter? *News Physiol. Sci.* **15**, 269–274.
 26. Wittenberg J.B., Wittenberg B.A. 2003. Myoglobin function reassessed. *J. Experim. Biol.* **206**, 2011–2020.
 27. Sievers G., Ponnberg M. 1978. Study of the pseudo-peroxidatic activity of soybean leghemoglobin and sperm whale myoglobin. *Biochim. Biophys. Acta.* **533**, 293–301.
 28. Flogel U., Godecke A., Klotz L.O., Shrader J. 2004. Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *FASEB J.* **18**, 1156–1158.
 29. Brunori M. 2001. Nitric oxide, cytochrome c oxidase and myoglobin. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 21–23.
 30. Doeller J.E., Wittenberg B.A. 1991. Myoglobin function and energy metabolism of isolated cardiac myocytes: Effect of sodium nitrite. *Am.J. Physiol.* **261**, 53–62.
 31. Jour'd'heuil D., Mills L., Miles A.M., Grisham M.B. 1998. Effect of nitric oxide on hemoprotein-catalyzed oxidative reactions. *Nitric Oxide*. **2**, 37–44.
 32. Götz F.M., Hertel M., Gröschel-Stewart U. 1994. Fatty acid binding of myoglobin depends on its oxygenation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **375**, 387–392.
 33. Shih L., Chung Y., Sriram R., Jue T. 2014. Palmitate interaction with physiological states of myoglobin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1840**, 656–666.
 34. Sriram R., Kreutzer U., Shih L., Jue T. 2008. Fatty acid binding to myoglobin. *FEBS Lett.* **582**, 3643–3649.
 35. Pesce A., Bolognesi M., Bocedi A., Ascenzi P., Dewide S., Moens L., Hankeln Th., Burmester Th. 2002. Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep.* **3**, 1146–1151.
 36. Riggs A.F., Gorr Th.A. 2006. A globin in every cell? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 2469–2470.
 37. Burmester Th., Gerlach F., Hankeln Th. 2007. Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia. *Edv. Exp. Med. Biol.* **618**, 169–180.
 38. D'Aprile A., Scrima R., Quarato G., Tataranni T., Falzetti F., Di Ianni M. 2014. Hematopoietic stem/progenitor cells express myoglobin and neuroglobin: Adaptation to hypoxia or prevention from oxidative stress? *Stem Cells.* **32**, 1267–1277.
 39. Oleksiewicz U., Daskoulidou N., Liloglou T., Taspoulou K., Bryan J., Gosney J.R., Field J.K., Xinarianos G. 2011. Neuroglobin and myoglobin in non-small cell lung cancer: expression, regulation and prognosis. *Lung Cancer.* **74**, 411–418.
 40. Shivapurkar N., Stastny V., Okumura N., Girard L., Xie Y., Prinsen C., Thunnissen F.B., Wistuba I.I., Czerniak B., Frenkel E., Roth J.A., Liloglou T., Xinarianos G., Field J.K., Minna J.D., Gazdar A.F. 2008. Cytoglobin, the newest member of the globin family, functions as a tumor suppressor gene. *Cancer Res.* **68**, 7448–7456.
 41. Gorr T.A., Wichmann D., Pilarsky C., Theurillat J.-P., Fabrizio A., Laufs T., Bauer T., Koslowski M., Horn S., Burmester T., Hankeln T., Kristiansen G. 2011. Old proteins – new locations: Myoglobin, haemoglobin, neuroglobin and cytoglobin in solid tumours and cancer cells. *Acta Physiologica.* **202**, 563–581.
 42. El-Tohamy R., Elkholi I., Elsherbiny M.E., Magdy M., Hammam O., Allalunis-Turner J., Emara M.

2020. Myoglobin variants are expressed in human glioblastoma cells-hypoxia effect? *Oncology Reports*. **43**, 975–985.
43. Fraser J., Vieira de Mello L., Ward D., Rees H.H., Williams D.R., Fang Y., Brass A., Gracey A.Y., and Cossing A.R. 2006. Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 2977–2981.
44. Arcasoy M.O., Amin K., Karayal A.F., Chou S.C., Raleigh J.A., Varia M.A., Haroon Z.A. 2002. Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab. Invest*. **82**, 911–918.
45. Zhukova A.G., Kazitskaya A.S., Sazontova T.G., Mikhailova N.N. 2019. Hypoxia-inducible factor (HIF): Structure, function and genetic polymorphism. *Hygiene and Sanitation*. **98**, 723–728.
46. Bensaad K., Tsuruta A., Selak M.A., Nieves Calvo Vidal M., Nakano K., Bartrons R., Gottlieb E., Vousden K.H. 2006. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*. **126**, 107–120.
47. Konstantinov A.A., Peskin A.V., Popova E., Khomutov G.B., Ruuge E.K. 1987. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. **894**, 1–10.
48. Kaelin W.G. Jr. 2005. ROS: Really involved in oxygen sensing. *Cell Metab*. 357–358.
49. Borutaite V., Brown G.C. 1996. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem. J*. **315** (Pt 1), 295–299.
50. Salimian Rizi B., Caneba C., Nowicka A., Nabyar A.W., Liu X., Chen K., Klopp A., Nagrath D. 2015. Nitric oxide mediates metabolic coupling of omentum-derived adipose stroma to ovarian and endometrial cancer cells. *Cancer Res*. **75**, 456–471.
51. Kim J.K., Jeon H.M., Jeon H.Y., Oh S.Y., Kim E.J., Jin X., Kim S.H., Jin X., Kim H. 2018. Conversion of glioma cells to glioma stem-like cells by angiocrine factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **496**, 1013–1018.
52. Quintero M., Brennan P.A., Thomas G.J., Moncada S. 2006. Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1 alpha in cancer: Role of free radical formation. *Cancer Res*. **66**, 770–774.
53. Simon M.C. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF alpha stabilization. *Adv. Exp. Med. Biol*. **588**, 165–170.
54. Hendgen-Cotta U.B., Esfeld S., Coman C., Ahrends R., Klein-Hitpass L., Flögel U., Rassaf T., Totzeck M. 2017. A novel physiological role for cardiac myoglobin in lipid metabolism. *Scientific Reports*. **7**, 43219.
55. Elkholi I.E., Elsherbiny M.E., Emara M. 2022. Myoglobin: From physiological roles to potential implication in cancer. *BBA – Reviews on cancer*. **1877**, 188706.
56. Aboouf M.A., Armbruster J., Thiersch M., Guscetti F., Kristiansen G., Schraml P., Bicker A., Petry R., Hankeln Th., Gassmann M., Gorr T.A. 2022. Proapoptotic and anti-invasive properties underscore the tumor-suppressing impact of myoglobin on a subset of human breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci*. **23**, 11483.
57. Aboouf M.A., Armbruster J., Guscetti F., Thiersch M., Boss A., Gödescke A., Winning S., Padberg C., Fandrey J., Kristiansen G., Bicker A., Hankeln Th., Gassmann M., Gorr T.A. 2023. Endogenous myoglobin expression in mouse models of mammary carcinoma reduces hypoxia and metastasis in PyMT mice. *Sci. Rep*. **13**, 7530.
58. Eich R.F., Li T., Lemon D.D., Doherty D.H., Curry Sh. R., Aitken J.F., Mathews A.J., Johnson K.A., Smith R.D., Phillips G.N., Jr., Olson J.S. 1996. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*. **35**, 6976–6983.
59. Yamada T., Morita Y., Takada R., Funamoto M., Okamoto W., Kohno M., Komatsu T. 2023. Zinc substituted myoglobin-albumin fusion protein: A photosensitizer for cancer therapy. *Chemistry*. **29**, e202203952.
60. Ma X., Liang X., Yao M., Gao Y., Luo Q., Li X., Yu Y., Sun Y., Cheng M.H.Y., Chen J., Zheng G., Shi J., Wang F. 2023. Myoglobin-loaded gadolinium nanotexaphyrins for oxygen synergy and imaging-guided radiosensitization therapy. *Nat. Commun*. **14**, 6187.
61. Zhang L., Yang L., Du K., Yang Y. 2024. Myoglobin improves doxycycline sensitivity in pancreatic cancer through promoting heme oxygenase-1-mediated ferroptosis. *Environ. Toxicol*. **39**, 2166–2181.
62. Kendrew J.C., Dickerson R.T., Strandberg B.E., Hart R.G., Davis D.R., Phillips D.C., Shore V.C. 1960. Structure of myoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature (London)*. **185**, 422–427.

Expression of Myoglobin by Tumor Cells and Its Role in Progression of Malignancy

G. B. Postnikova¹, E. A. Shekhovtsova^{1,*}

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

The review examines available literature data on the expression of myoglobin in various tumors and tumor cell lines of non-muscle nature, and the effect of hypoxia, reactive oxygen and nitrogen species, hormones, growth factors, gender and age on this process. The influence of tumor myoglobin on processes occurring in cells – oxidative stress, inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide and fatty acid metabolism is also analyzed, both in the case of intrinsic endogenous (ectopic) expression of small amounts ($\sim 1 \mu\text{M}$) of myoglobin and overexpression of the protein ($\sim 150 \mu\text{M}$) via the myoglobin gene embedded in the tumour cell genome. It is concluded that hypoxia-induced intrinsic expression of low concentrations of myoglobin, due to its ability to utilise reactive oxygen and nitrogen species that can damage tumour cells, ensures their better survival, promoting tumour progression and metastasis. Accordingly, this myoglobin expression is generally associated with a more aggressive tumour type and poor prognosis for the course and outcome of the disease, and may thus serve as a “marker” of an aggressive malignancy. In contrast, artificial overexpression of myoglobin can significantly inhibit tumour development and improve disease course by switching cancer cell metabolism from tumour-specific glycolysis to oxidative phosphorylation inherent in healthy tissue. Myoglobin overexpression may thus be an effective therapeutic tool in oncology.

Keywords: myoglobin, tumor, hypoxia, oxidative stress, patient survival

УДК 576.311.346:576.54

ДОНОРСТВО МИТОХОНДРИЙ КАК МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

© 2024 г. А. Д. Крупнова^а, Д. А. Цомартова^а, Е. В. Черешнева^а, М. Ю. Иванова^а,
Э. С. Цомартова^а, Т. А. Ломановская^а, М. С. Павлова^а, О. В. Паюшина^{а,*}

^аПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), Москва, 119991 Россия

*e-mail: payushina@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2024

После доработки 03.06.2024

Принята к печати 04.06.2024

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются универсальными регуляторами регенеративных процессов благодаря способности к паракринному высвобождению регуляторных молекул или замещению погибших клеток путем дифференцировки в соответствующем направлении. Относительно недавно был открыт еще один механизм благотворного влияния МСК на поврежденную ткань – перенос митохондрий в ее клетки в ответ на сигналы стресса. МСК могут передавать митохондрии по туннельным нанотрубкам, образующим связующий мост между клетками, через щелевые контакты, путем высвобождения в составе внеклеточных везикул или в свободном виде, а также в результате полного или частичного слияния с клетками-реципиентами. В поврежденных клетках, получивших митохондрии от МСК, восстанавливается нарушенный энергетический метаболизм и уменьшается окислительный стресс, что сопровождается повышением выживаемости, а в ряде случаев также усилением пролиферации или изменением дифференцировочного статуса. Восстановление энергетики после переноса митохондрий от МСК оказывает благотворное влияние на функциональную активность клеток-реципиентов и способствует подавлению воспалительных реакций. На моделях повреждения различных органов у экспериментальных животных было неоднократно продемонстрировано, что перенос митохондрий из МСК в клетки-мишени вносит значительный вклад в терапевтическую эффективность МСК. Поэтому в настоящее время ведется поиск методов, позволяющих усилить процесс донорства митохондрий. Однако необходимо учитывать, что МСК способны передавать митохондрии малигнизированным клеткам, тем самым стимулируя рост опухоли и повышая ее устойчивость к химиотерапии. Эти данные заставляют с осторожностью относиться к перспективам применения МСК в клеточной терапии, но, с другой стороны, они могут служить основой для поиска новых терапевтических мишеней при лечении онкологических заболеваний.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, перенос митохондрий, регенерация, опухоли

DOI: 10.31857/S0233475524040026, EDN: axeihp

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) на протяжении уже более трех десятилетий привлекают к себе внимание исследователей как универсальные регуляторы физиологической и репаративной регенерации и перспективный ресурс для клеточных технологий, направленных на восстановление функциональности поврежденных тканей и органов при широком спектре

заболеваний. Прорегенеративные эффекты МСК связаны главным образом с паракринным высвобождением растворимых молекул (факторов роста, цитокинов, хемокинов) и внеклеточных везикул, стимулирующих выживание и пролиферацию клеток, а также модулирующих воспаление, ангиогенез и фиброгенез. Кроме того, в ряде случаев МСК замещают погибшие клеточные элементы ткани, дифференцируясь в соответствующем направлении [1].

Относительно недавно был открыт еще один механизм благотворного влияния МСК на поврежденную ткань – перенос митохондрий в ее клетки. Являясь главным источником энергии для клеток, митохондрии играют фундаментальную роль в активации как катаболических, так и анаболических процессов. В них происходит окисление пирувата, жирных кислот и аминокислот, в результате чего электроны направляются в электрон-транспортную цепь с последующим синтезом АТФ. По всей видимости, активация функций митохондрий сопровождается увеличением количества активных форм кислорода (АФК) и кислородных радикалов. Кроме того, эти органеллы участвуют в биосинтезе белков, липидов и углеводов [2]. Очевидно, нарушение их функционирования негативно сказывается на жизнеспособности клеток, восстановить которую можно путем введения митохондрий извне. В экспериментах по прямой инъекции митохондриальной массы в зону ишемического поражения сердца была показана быстрая интернализация экзогенных митохондрий кардиомиоцитами и фибробластами, приводившая к уменьшению зоны инфаркта и улучшению функции миокарда [3]. Возможность внедрения в клетки донорских митохондрий продемонстрирована также при их внутривенном введении крысам, реанимированным после остановки сердца. В этом случае введенные митохондрии, включившись в клетки мозга, почек и селезенки, улучшали выживаемость животных и неврологическое восстановление [4].

В многочисленных экспериментах *in vitro* и на модельных животных МСК продемонстрировали способность к межклеточному переносу митохондрий в ответ на сигналы стресса, такие как высвобождение из клеток-реципиентов поврежденных митохондрий и их компонентов, в частности митохондриальной ДНК, а также повышенные уровни АФК [5]. Способность к донорству митохондрий показана и для других клеток, таких, например, как астроциты, передающие их поврежденным нейронам [6], но именно МСК с учетом их регенеративного потенциала и широких перспектив применения в медицине представляют наибольший интерес с этой точки зрения. В настоящем обзоре будут рассмотрены механизмы переноса митохондрий из МСК в клетки-реципиенты, влияние этого процесса на состояние клеток и тканей и подходы к изменению его эффективности в терапевтических целях.

МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА МИТОХОНДРИЙ

Туннельные нанотрубки. Туннельные нанотрубки (ТНТ) представляют собой ограниченные плазматической мембраной тонкие выросты цитоплазмы диаметром 50–1000 нм, образующие связующий мост между клетками. ТНТ имеют цитоскелет, состоящий в основном из фибриллярного актина и тубулина [7, 8]. Их образование показано как между однотипными клетками, например, в культуре почечного эпителия [9] или клеток глиобластомы [10], так и при сокультивировании разных клеточных популяций – в частности, МСК с эндотелиоцитами [11–13], фибробластами [14], кардиомиоцитами [15], нейральными стволовыми клетками [16], клетками эпителия роговицы [17] или пульпозного ядра межпозвонкового диска [18]. Формирование ТНТ стимулируется различными стрессовыми факторами, такими как гипоксия, изменение рН, воспаление или недостаток питательных веществ [19]. В эксперименте оно может быть вызвано, например, облучением [10], снижением концентраций глюкозы и кислорода [11], бактериальным липополисахаридом (ЛПС) [20] или такими токсинами, как ротенон [17], зеоцин [9], цитарабин [12].

Известны два способа образования ТНТ. При одном из них две клетки сближаются и частично сливаются, после чего расходятся с сохранением цитоплазматического мостика, который преобразуется в ТНТ. Второй способ, не требующий подвижности клеток, – образование клеткой-донором выроста, конец которого достигает мембраны клетки-мишени с последующим слиянием [21]. На первом этапе этого процесса в плазмалемме принимающей клетки изменяется пространственное распределение молекул фосфатидилсерина, которые выступают в качестве сигналов для распознавания клеткой-донором [11]. Образование ТНТ требует полимеризации актина и не происходит при ее ингибировании [9, 14, 16, 22]. Показано, что в формировании ТНТ важную роль играет p53, усиление экспрессии которого в стрессированных клетках ведет к активации сигнального пути АКТ-PI3K-mTOR, следствием чего является индукция синтеза белка M-Sec [23]. Этот белок способствует появлению выростов плазмалеммы, впоследствии становящихся ТНТ [24]. Кроме того, в клетках, инициирующих образование ТНТ, p53 активирует каспазу-3, что приводит к расщеплению белка S100A4 и уменьшению его концентрации. Создающийся при этом градиент концентрации

S100A4 – от низкой в иницирующей клетке к высокой в клетке-мишени – определяет направление роста ТНТ [25].

ТНТ способны транспортировать между клетками ионы, РНК, транспортные везикулы и органеллы, включая митохондрии [9, 15, 19]. В переносе митохондрий по ТНТ активно участвуют малые GTP-азы Miro1 и Miro2, локализованные в наружной митохондриальной мембране. Они связывают митохондрии с кинезином и динеином, регулируя их перемещение вдоль микротрубочек [26]. Кроме того, белки Miro способны взаимодействовать с миозином XIX, обеспечивая движение митохондрий вдоль актиновых филаментов [19]. При совместном культивировании МСК со сверхэкспрессией Miro1 с поврежденными клетками наблюдалось усиленное формирование ТНТ наряду с увеличением числа транспортируемых митохондрий [17, 27], тогда как нокаут гена Miro1 в МСК, напротив, подавлял перемещение митохондрий [18]. Что же касается Miro2, то он, по-видимому, играет доминирующую роль в передаче на короткие расстояния и в большей степени, чем Miro1, участвует в модуляции связи митохондрий с актиновым цитоскелетом [28].

Хотя белки Miro способны обеспечивать транспорт митохондрий по ТНТ в обоих направлениях [19], перенос происходит в основном из здоровых клеток в поврежденные [11, 18, 27]. Очевидно, передача функционально нормальных митохондрий из МСК направлена на восстановление энергетического статуса принимающих клеток. В то же время в условиях стресса описано и обратное перемещение митохондрий через ТНТ от поврежденных клеток в МСК для их деградации путем митофагии [29]. В этом случае поврежденные митохондрии могут выступать в качестве сигнала об опасности, стимулируя в МСК экспрессию цитопротективного фермента гемоксигеназы-1 и биогенез их собственных митохондрий для более эффективной передачи последних клеткам-реципиентам [30, 31].

Щелевые контакты. Щелевые контакты образованы коннексаонами, состоящими из шести идентичных молекул трансмембранного белка коннексина и соединяющими цитоплазму двух клеток сквозным каналом. У позвоночных известно более 20 изоформ коннексина, наиболее широко экспрессируемой и тщательно изученной из которых является коннексин-43 [28]. Каналы щелевых контактов позволяют клеткам обмениваться ионами (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и другими),

вторичными мессенджерами (например, инозитол-3-фосфатом, cAMP, cGMP) и другими малыми молекулами [32]. О возможности переноса митохондрий через щелевые каналы свидетельствуют результаты исследования, в котором в легкие мышей, поврежденные ЛПС, вводили МСК, после чего наблюдали образование щелевых контактов между МСК и альвеолоцитами и появление донорских митохондрий в последних. При введении МСК с мутацией в гене коннексина 43, неспособных образовывать функциональные щелевые контакты, передачи митохондрий не происходило [20]. Имеются данные, что при ингибировании образования щелевых контактов подавляется перенос митохондрий из МСК в сокультивируемые с ними клетки – эпителиоциты бронхов [33], нейроны [34, 35], подвергнутые различным стрессовым воздействиям хондроциты [36], а также в клетки линии A549 (полученной из карциномы легкого), лишенные митохондрий путем обработки бромистым этидием [37]. Показано также, что в костном мозге в ответ на введение ЛПС или бактериальную инфекцию увеличивается количество митохондрий в кроветворных стволовых клетках, получающих их от МСК через щелевые контакты. При этом открытие щелевых контактов индуцируется АФК посредством активации фосфоинозитид-3-киназы [38].

Внеклеточные везикулы. Внеклеточные везикулы представляют собой ограниченные двуслойной фосфолипидной мембраной сферические образования, содержащие белки, нуклеиновые кислоты и другие химические и структурные компоненты клетки [39]. Основные их типы – это микровезикулы, отпочковывающиеся с поверхности клетки и имеющие диаметр 20–1000 нм, и экзосомы диаметром 40–100 нм, имеющие эндосомальное происхождение [40]. Слияние мембран везикул с плазмалеммой клетки-мишени позволяет доставлять их содержимое в цитоплазму без необходимости непосредственного межклеточного контакта.

Ряд авторов полагают, что из-за малого размера экзосомы вряд ли могут переносить целые митохондрии между клетками, в то время как микровезикулы, сопоставимые по размеру с митохондриями, вполне подходят для их переноса [2, 8]. Однако в некоторых работах все же была показана возможность межклеточного переноса митохондрий с помощью экзосом [41].

Участие внеклеточных везикул в переносе митохондрий от МСК в клетки, нуждающиеся в восстановлении энергетики, было

неоднократно показано экспериментально. В частности, в вышеупомянутой работе по введению МСК мышам с индуцированным ЛПС повреждением легких альвеолоциты получали донорские митохондрии не только через щелевые контакты, но и путем поглощения отщепляющихся от МСК микровезикул [20]. Передача митохондрий была обнаружена при добавлении полученных от МСК внеклеточных везикул к культивируемым нейронам [35] или хондроцитам с митохондриальной дисфункцией, индуцированной ротеноном и антимицином [42], а также при непрямом сокультивировании МСК с лишенными митохондрий клетками A549 [37], причем в последнем случае она не происходила при ингибировании эндоцитоза. У макрофагов, обработанных внеклеточными везикулами от МСК, усиливались противовоспалительные свойства; о роли митохондрий в этом эффекте свидетельствует его отсутствие в случае подавления окислительного фосфорилирования в макрофагах или использования везикул от МСК с митохондриальной дисфункцией [43]. В то же время в условиях окислительного стресса МСК могут передавать макрофагам в микровезикулах и частично деполяризованные митохондрии, которые в цитоплазме макрофага восстанавливают свою функциональную активность за счет слияния с его собственными митохондриями. Такая передача, с одной стороны, повышает выживаемость клетки-донора, избавляя ее от поврежденных органелл, с другой — улучшает энергетический статус клетки-реципиента [44].

Экзоцитоз и эндоцитоз митохондрий. Результаты ряда исследований свидетельствуют о возможности высвобождения митохондрий из клеток не только в составе внеклеточных везикул, но и в свободном виде, как в поврежденном или неактивном состоянии, так и с сохранением функциональной активности [45]. Митохондриальный экзоцитоз (митохондриальный экзоцитоз) может служить для поддержания митохондриального гомеостаза клетки в стрессовых условиях. При этом поврежденные митохондрии заключаются в мембранные структуры, называемые миграсомами, и впоследствии удаляются из клетки [46]. Сохранение поврежденных митохондрий обуславливает накопление большого количества АФК, и при таких обстоятельствах клетки склонны вытеснять митохондрии в межклеточное пространство. Митохондрии или их компоненты также могут быть экстрадированы и интернализованы другими клетками без носителя посредством процессов экзоцитоза и эндоцитоза [47]. Внеклеточные митохондрии могут выступать

в качестве сигналов опасности при взаимодействии с другими клетками, влияя, в частности, на активность иммунной системы [45]. Однако их энергетическая активность и функциональность подвергаются сомнению [48], и остается неизвестным, происходит ли выброс из МСК во внеклеточную среду интактных митохондрий, способных восстанавливать биоэнергетику поврежденных клеток-реципиентов.

Слияние клеток. Слияние клеток, при котором временно или постоянно объединяются их органеллы и цитоплазматические компоненты, у высших эукариот редко происходит в физиологических условиях, но может быть индуцировано повреждением или воспалением и вносить свой вклад в передачу митохондрий [28]. МСК, трансплантированные в организм реципиента, способны сливаться с гепатоцитами, нейронами и кардиомиоцитами с образованием многоядерных клеток [49]. В совместной культуре МСК и кардиомиоцитов обнаружены случаи не только полного слияния с исчезновением границ между клетками и равномерным распределением митохондрий МСК в цитоплазме гибридной клетки, но и частичного, при котором митохондрии мигрировали через область контакта и локализовались вокруг ядра кардиомиоцита [15]. Было показано, что межклеточные структуры, образующиеся между МСК и кардиомиоцитами при частичном слиянии и обеспечивающие передачу митохондрий, содержат микротрубочки и актиновые микрофиламенты [50], что свидетельствует о вероятном участии белков Mito в транспорте митохондрий по этим структурам. В экспериментах по искусственно вызванному частичному слиянию фибробластов было показано, что эффективность переноса митохондрий тем выше, чем короче область соединения клеток, однако единичные митохондрии могут проходить и через туннели длиной 10 мкм [51].

Во многих случаях МСК сочетают несколько способов донорства митохондрий, при этом их соотношение неодинаково для разных клеток. Так, в исследовании [33] МСК костного мозга передавали митохондрии сокультивируемому с ними эпителиальным клеткам бронхов через ТНТ, микровезикулы и щелевые контакты, а МСК, выделенные из ткани легкого, — только через ТНТ и микровезикулы. Главными путями переноса митохондрий от высокоочищенных МСК костного мозга к клеткам линии A549 являлись внеклеточные везикулы и щелевые контакты [37]. В то же время МСК из пульпы молочных зубов передавали митохондрии

эмбриональным стволовым клеткам через ТНТ, но не через щелевые контакты или везикулы [52]. Следует также отметить, что различные механизмы переноса митохондрий не являются полностью независимыми друг от друга. В частности, ТНТ могут соединяться с принимающей клеткой через щелевые контакты [2]. Показано также, что белок щелевых контактов коннексин-43 играет роль в переносе митохондрий как через ТНТ, так и с помощью микровезикул [20].

ВЛИЯНИЕ ДОНОРСТВА МИТОХОНДРИЙ НА КЛЕТКИ-МИШЕНИ

В поврежденных клетках, получивших тем или иным способом митохондрии от МСК, восстанавливается нарушенный энергетический метаболизм, о чем свидетельствуют повышение мембранного потенциала митохондрий [13, 14, 16, 18, 22, 34, 53, 54] и активности компонентов электрон-транспортной цепи [18, 55], усиление потребления кислорода [14, 17, 22, 55] и продукции АТР [13, 14, 22, 34, 53, 54–55]. При этом снижается содержание АФК [14, 18, 22, 54] и усиливается экспрессия антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [53, 54]. Уменьшение окислительного стресса сопровождается повышением выживаемости клеток [16, 17, 35, 55]. Клетки, получившие митохондрии от МСК, демонстрируют повышенную устойчивость не только к апоптозу [11–14, 18, 22, 34, 53, 54, 56, 57], который, как известно, может быть индуцирован окислительным стрессом и деполяризацией мембран митохондрий [22], но и к гибели путем пироптоза [58] и ферроптоза [59].

Перенос митохондрий от МСК способен стимулировать пролиферацию клеток-мишеней. В частности, это было показано для астроцитов [27], фибробластов [14], эндотелиоцитов [12, 54], теноцитов [22]. Интересно, что и сами МСК при сокультивировании с дифференцированными клетками, такими как гладкие миоциты, могут усиливать свою пролиферативную активность под влиянием получаемых от них митохондрий [60].

По некоторым данным, в определенных условиях донорство митохондрий может изменять дифференцировочный статус клетки-реципиента. Сообщалось, что частичное слияние МСК со зрелыми кардиомиоцитами приводит к перепрограммированию последних в клетки с характеристиками ранних предшественников сердечной мышечной ткани, экспрессирующие такие маркеры, как GATA-4, MEF-2C и Nkx2.5,

и теряющие маркеры дифференцированных кардиомиоцитов. Перепрограммирование не происходило, если МСК были лишены функционально активных митохондрий путем обработки бромистым этидием [50]. О способности переносимых между клетками митохондрий влиять на дифференцировку свидетельствуют также результаты эксперимента по сокультивированию МСК с клетками почечных канальцев. В этом случае перенос происходил по ТНТ преимущественно в направлении МСК и вызывал приобретение ими фенотипических признаков эпителия канальцев [61]. Однако вклад донорских митохондрий в наблюдаемые изменения состояния клеток остается не вполне ясным, так как в обеих работах клетки-реципиенты получали от МСК не только митохондрии, но и другие компоненты цитоплазмы.

Восстановление энергетики после переноса митохондрий от МСК оказывает благотворное влияние на функциональную активность клеток-реципиентов, прежде всего на энергозависимые процессы, такие, например, как рост аксонов мотонейронов [56], фагоцитарная активность макрофагов [43], секреция компонентов хрящевого матрикса хондроцитами [53] и инсулина β-клетками панкреатических островков [62]. Многие данные свидетельствуют о том, что противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты МСК также по крайней мере отчасти опосредованы переносом митохондрий как в поврежденные клетки тканей, так и в специализированные клетки иммунной системы. В частности, было показано, что клетки эндотелия почечных клубочков, поврежденные высоким уровнем глюкозы, при получении митохондрий от МСК снижают уровень экспрессии провоспалительных цитокинов [54], макрофаги активируются в направлении противовоспалительного фенотипа M2 [43, 63], Т-хелперы субпопуляции Th17 уменьшают выработку интерлейкина-17 [64], а у Т-регуляторных клеток усиливается способность подавлять иммунные реакции [65, 66].

ЭФФЕКТЫ ПЕРЕНОСА МИТОХОНДРИЙ ОТ МСК *IN VIVO*

Роль донорства митохондрий в прорегенеративных эффектах МСК была неоднократно продемонстрирована на моделях повреждения различных органов у экспериментальных животных. Так, трансплантация МСК мышам с острым поражением легких, индуцированным ЛПС, уменьшала выраженность патологических

изменений, причем защитный эффект не наблюдался при использовании МСК с дисфункциональными митохондриями [20] или подавлении образования ТНТ [13]. На той же модели было показано, что воспаление и повреждение легких уменьшаются после введения животным макрофагов, предварительно прокультивированных с внеклеточными везикулами от МСК, содержащими функционально активные митохондрии [43]. В случае введения МСК мышам с бактериальной пневмонией также наблюдали перенос митохондрий в альвеолярные макрофаги, приводящий к усилению фагоцитарной активности последних, но при ингибировании образования ТНТ МСК не оказывали антимикробного действия [67].

На модели диабетической нефропатии введение под капсулу почки выделенных из МСК митохондрий улучшало морфологию клеток канальцевого эпителия, структуру базальной мембраны и щеточной каемки [68], а макрофаги, к которым эти митохондрии были добавлены *in vitro*, при введении животным вызывали снижение уровней провоспалительных цитокинов в сыворотке и гистологических признаков повреждения почки. Обработка МСК ротеноном, нарушающим функции митохондрий, отменяла эффект макрофагов [63].

Благотворное действие полученных от МСК митохондрий было продемонстрировано и при различных повреждениях нервной ткани. У крыс с травмой спинного мозга трансплантация в область повреждения как МСК, так и изолированных митохондрий улучшала восстановление двигательных функций [34]. Уменьшение неврологического дефицита было показано и при введении МСК животным с экспериментальным ишемическим инсультом, причем МСК со сверхэкспрессией *Miro1*, обеспечивающего транспорт митохондрий по ТНТ, оказывали более выраженный эффект [27]. При введении МСК в стекловидное тело глаза мышей с генетически обусловленной дегенерацией ганглионарных клеток сетчатки улучшались выживаемость ганглионарных клеток и функции сетчатки, но лишь при наличии в МСК функционально активных митохондрий [69].

Имеются также данные о противовоспалительном эффекте трансплантации МСК крысам с индуцированной коллагеназой тендинопатией ахиллова сухожилия, который предотвращался при подавлении переноса митохондрий цитохалазином [22]. О возможном вкладе переноса митохондрий в регенеративные процессы

свидетельствуют и результаты экспериментов по трансплантации МСК в область химического ожога роговицы [17] и в печень мышей с неалкогольным стеатогепатитом [70], а также по введению Т-регуляторных клеток, предварительно культивированных совместно с МСК, мышам с реакцией трансплантат против хозяина [65]. В этих случаях улучшение состояния поврежденных тканей сопровождалось появлением в клетках донорских митохондрий.

ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОНОРСТВА МИТОХОНДРИЙ

Поскольку перенос митохондрий из МСК в клетки-мишени вносит значительный вклад в терапевтическую эффективность МСК, ведется поиск методов усиления этого процесса. Повысить эффективность переноса митохондрий возможно путем стимуляции их образования в клетках-донорах. В частности, МСК могут быть обработаны *in vitro* фармакологическими агентами, усиливающими экспрессию АМР-активируемой протеинкиназы – ключевого регулятора биогенеза митохондрий [71]. Возможно фармакологическое воздействие и на молекулярные механизмы, обеспечивающие сам процесс переноса. Показано, например, что стимуляция межклеточной коммуникации через щелевые контакты с помощью ретиноевой кислоты приводит к увеличению числа митохондрий, переносимых из МСК в культивируемые совместно с ними поврежденные нейроны [34]. В соответствии с данными о роли сигналинга через фактор некроза опухолей- α (TNF- α) в образовании ТНТ [58] активация этого пути также приводит к усилению межклеточного транспорта митохондрий, что было показано при сокультивировании МСК с фибробластами в условиях метаболического стресса [72]. Число ТНТ, содержание митохондрий и интенсивность их передачи стрессированным клеткам увеличивались также при обработке МСК антиоксидантами, такими как N-ацетил-L-цистеин и 2-фосфо-L-аскорбат [73].

Способность МСК к переносу митохондрий можно усилить путем генетической модификации, в частности, сверхэкспрессии генов, кодирующих коннексин-43 [74], *Miro1* [16, 27, 75], а также мембранный гликопротеин CD157, предположительно регулирующий экзоцитоз и интернализацию митохондрий [56].

Еще одна стратегия может заключаться в preconditionировании МСК, предназначенных

для трансплантации реципиенту, путем совместного культивирования с клетками той ткани, для лечения которой они предназначены. Так, было показано, что после взаимодействия с нейронами *in vitro*, сопровождавшегося передачей митохондрий, МСК усиливают экспрессию *Miro1* и способность уменьшать повреждение мозга при трансплантации крысам с экспериментальным ишемическим инсультом [76]. Прекодиционирование МСК различными цитокинами, фармакологическими препаратами или физическими факторами, призванное сделать клетки более устойчивыми к неблагоприятным условиям патологически измененного микроокружения, также рассматривается в качестве способа повышения их эффективности в качестве доноров митохондрий. В частности, высказываются предположения о целесообразности трансплантации таких МСК при ассоциированной с ожирением астме, в патогенезе которой, как известно, играет роль митохондриальная дисфункция [77].

Наконец, для терапевтического применения могут быть отобраны популяции МСК, обладающие наиболее высокой способностью к донорству митохондрий. Сообщалось, что выделенные из костного мозга человека путем сортировки отдельных клеток высокоочищенные клоны МСК, характеризующихся быстрым размножением и высокой степенью функциональной однородности, переносят в клетки-реципиенты больше митохондрий, чем несортированные МСК из того же источника [37, 78]. Для МСК, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, также была показана повышенная по сравнению с МСК из костного мозга эффективность переноса митохондрий в кардиомиоциты как *in vitro*, так и в сердце мышей с кардиомиопатией, в связи с усиленной экспрессией этими клетками *Miro1* и их повышенной чувствительностью к *TNF-α* [79].

Кроме того, возможна непосредственная трансплантация пациенту митохондрий, в том числе выделенных из МСК, путем совместной инкубации с его стволовыми клетками, прямой инъекции в пораженный орган, внутриартериального, ингаляционного или назального введения, доставки в спинной мозг. Точечный иммуноферментный анализ (ELISpot), иммуноферментный анализ (ELISA), активируемая флуоресценцией сортировка клеток (FACS) и мультиплексный анализ показывают отсутствие прямого или косвенного иммунного ответа и воспалительных эффектов, связанных с трансплантацией митохондрий [80].

РОЛЬ ДОНОРСТВА МИТОХОНДРИЙ В РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕЙ

Способность МСК передавать митохондрии клеткам-мишеням не только обуславливает их благотворное влияние на поврежденные ткани, но и может представлять серьезную проблему в случае онкологических заболеваний. МСК способны включаться в строю злокачественных опухолей, приобретая характеристики ассоциированных с раком фибробластов (CAF) [81]. Передавая митохондрии малигнизированным клеткам, они стимулируют рост и инвазию опухоли [82, 83] и повышают ее устойчивость к химиотерапии [84, 85]. Получаемые от МСК митохондрии оказывают на клетки опухоли те же эффекты, что и на любые клетки в стрессовых условиях – усиливают энергетический метаболизм [82, 84, 85], снижают уровень АФК [84], предотвращают апоптоз [81, 83], стимулируют пролиферативную активность [85]. В основе повышения химиорезистентности опухолевых клеток может также лежать перестройка их метаболизма. Так, клетки глиобластомы под действием митохондрий из МСК переходят с питания глюкозой на использование глутамина и усиливают синтез пиримидинов и пуринов, что придает им устойчивость к противоопухолевому препарату темозоломиду, нарушающему синтез ДНК [85].

Эти данные заставляют с определенной осторожностью относиться к перспективам применения МСК в клеточной терапии, но, с другой стороны, они могут служить основой для поиска новых терапевтических мишеней при лечении онкологических заболеваний. Показано, в частности, что подавление митохондриального переноса в опухолевые клетки путем различных воздействий, направленных на ингибирование биогенеза митохондрий в МСК [83], предотвращение полимеризации тубулина [81] или экспрессии поверхностного гликопротеина CD38, контролирующего образование ТНТ [86], способно замедлить рост опухоли у экспериментальных животных и улучшить их выживаемость.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Донорство митохондрий представляет собой сложный процесс, который осуществляется с помощью нескольких механизмов обмена между клетками и стимулируется различными факторами внутренней и внешней среды. Данные многочисленных исследований, полученные как *in vitro* при сокультивировании различных клеточных популяций, так и *in vivo* при экспериментальном

повреждении тканей и органов, свидетельствуют о том, что антиапоптотические, иммуномодулирующие и прорегенеративные эффекты МСК по крайней мере отчасти могут быть связаны с передачей митохондрий поврежденным клеткам, хотя соотношение этого механизма с паракринной продукцией регуляторных факторов остается не вполне ясным и, вероятно, неодинаково в разных ситуациях. Дальнейшего исследования требуют такие вопросы, как роль транспортируемых митохондрий в качестве сигнальных оргanelл, передающих информацию между клетками, молекулярные механизмы, определяющие направление переноса митохондрий, длительность сохранения донорских митохондрий в клетках-реципиентах. Можно надеяться, что детальное изучение механизмов передачи митохондрий и стимулирующих этот процесс факторов позволит углубить понимание биологической роли МСК как регуляторов тканевой регенерации, а совершенствование стратегий управления межклеточным транспортом митохондрий (его усиления для восстановления биоэнергетики поврежденных клеток или подавления при онкологических заболеваниях) станет основой для разработки новых подходов к лечению многих патологических состояний. Особенно актуальным представляется проведение клинических исследований для оценки эффективности и безопасности применения методов регуляции митохондриального переноса в клеточной терапии различных заболеваний.

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

Источники финансирования. Работа выполнена за счет бюджетных средств Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M. 2019. Concise review: Mesenchymal stem cells: From roots to boost. *Stem Cells*. **37** (7), 855–864.
- Bagheri H.S., Bani F., Tasoglu S., Zarebkohan A., Rahbarghazi R., Sokullu E. 2020. Mitochondrial donation in translational medicine; from imagination to reality. *J. Transl. Med.* **18** (1), 367.
- Cowan D.B., Yao R., Akurathi V., Snay E.R., Thedsanamoorthy J.K., Zurakowski D., Ericsson M., Friehs I., Wu Y., Levitsky S., Del Nido P.J., Packard A.B., McCully J.D. 2016. Intracoronary delivery of mitochondria to the ischemic heart for cardioprotection. *PLoS One*. **11** (8), e0160889.
- Hayashida K., Takegawa R., Endo Y., Yin T., Choudhary R.C., Aoki T., Nishikimi M., Murao A., Nakamura E., Shoaib M., Kuschner C., Miyara S.J., Kim J., Shinozaki K., Wang P., Becker L.B. Exogenous mitochondrial transplantation improves survival and neurological outcomes after resuscitation from cardiac arrest. 2023. *BMC Med.* **21** (1), 56.
- Paliwal S., Chaudhuri R., Agrawal A., Mohanty S. 2018. Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer. *J. Biomed. Sci.* **25** (1), 31.
- Cheng X.Y., Biswas S., Li J., Mao C.J., Chechneva O., Chen J., Li K., Li J., Zhang J.R., Liu C.F., Deng W.B. 2020. Human iPSCs derived astrocytes rescue rotenone-induced mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration *in vitro* by donating functional mitochondria. *Transl. Neurodegener.* **9** (1), 13.
- Sahinbegovic H., Jelinek T., Hrdinka M., Bago J.R., Turi M., Sevcikova T., Kurtovic-Kozaric A., Hajek R., Simicek M. 2020. Intercellular mitochondrial transfer in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. **12** (7), 1787.
- Кит О.И., Франциянц Е.М., Шихлярова А.И., Нескубина И.В. 2023. Механизмы естественного переноса митохондрий в норме и при онкопатологии. *Ульяновский медико-биологический журнал*. (3), 14–29.
- Domhan S., Ma L., Tai A., Anaya Z., Beheshti A., Zeier M., Hlatky L., Abdollahi A. 2011. Intercellular communication by exchange of cytoplasmic material via tunneling nano-tube like structures in primary human renal epithelial cells. *PLoS One*. **6** (6), e21283.
- Pinto G., Saenz-de-Santa-Maria I., Chastagner P., Perthame E., Delmas C., Toulas C. 2021. Patient-derived glioblastoma stem cells transfer mitochondria through tunneling nanotubes in tumor organoids. *Biochem. J.* **478** (1), 21–39.
- Liu K., Ji K., Guo L., Wu W., Lu H., Shan P., Yan C. 2014. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an *in vitro* ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc. Res.* **92**, 10–18.
- Feng Y., Zhu R., Shen J., Wu J., Lu W., Zhang J., Zhang J., Liu K. 2019. Human bone marrow mesenchymal stem cells rescue endothelial cells experiencing chemotherapy stress by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. *Stem Cells Dev.* **28** (10), 674–682.
- Zhang F., Zheng X., Zhao F., Li L., Ren Y., Li L., Huang H., Yin H. 2023. TFAM-Mediated mitochondrial transfer of MSCs improved the permeability barrier in sepsis-associated acute lung injury. *Apoptosis*. **28** (7–8), 1048–1059.
- Lin T.K., Chen S.D., Chuang Y.C., Lan M.Y., Chuang J.H., Wang P.W., Hsu T.Y., Wang F.S., Tsai M.H., Huang S.T., Wang X.W., Tsai P.C., Lin H.Y., Liou C.W. 2019. Mitochondrial transfer of Wharton's jelly mesenchymal stem cells eliminates

- mutation burden and rescues mitochondrial bioenergetics in rotenone-stressed MELAS fibroblasts. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 9537504.
15. Ma Z., Yang H., Liu H., Xu M., Runyan R.B., Eisenberg C.A., Markwald R.R., Borg T.K., Gao B.Z. 2013. Mesenchymal stem cell-cardiomyocyte interactions under defined contact modes on laser-patterned biochips. *PLoS One.* **8** (2), e56554.
 16. Boukelmoune N., Chiu G.S., Kavelaars A., Heijnen C.J. 2018. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to neural stem cells protects against the neurotoxic effects of cisplatin. *Acta Neuropathol. Commun.* **6** (1), 139.
 17. Jiang D., Gao F., Zhang Y., Wong D.S., Li Q., Tse H.F., Xu G., Yu Z., Lian Q. 2016. Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage. *Cell Death Dis.* **7** (11), e2467.
 18. Yang F., Zhang Y., Liu S., Xiao J., He Y., Shao Z. 2022. Nanotube-mediated mitochondrial tunneling rescues nucleus pulposus cells from mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2022**, 3613319.
 19. Nahacka Z., Novak J., Zobalova R., Neuzil J. 2022. Miro proteins and their role in mitochondrial transfer in cancer and beyond. *Front. Cell. Dev. Biol.* **10**, 937753.
 20. Islam M.N., Das S.R., Emin M.T., Wei M., Sun L., Westphalen K., Rowlands D.J., Quadri S.K., Bhattacharya S., Bhattacharya J. 2012. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* **18** (5), 759.
 21. Matejka N., Reindl J. 2019. Perspectives of cellular communication through tunneling nanotubes in cancer cells and the connection to radiation effects. *Radiat. Oncol.* **14** (1), 218.
 22. Wei B., Ji M., Lin Y., Wang S., Liu Y., Geng R., Hu X., Xu L., Li Z., Zhang W., Lu J. 2023. Mitochondrial transfer from bone mesenchymal stem cells protects against tendinopathy both *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cell Res. Ther.* **14** (1), 104.
 23. Wang Y., Cui J., Sun X., Zhang Y. 2011. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ.* **18** (4), 732–742.
 24. Hase K., Kimura S., Takatsu H., Ohmae M., Kawano S., Kitamura H., Ito M., Watarai H., Hazelett C.C., Yeaman C., Ohno H. 2009. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat. Cell Biol.* **11** (12), 1427–1432.
 25. Sun X., Wang Y., Zhang J., Tu J., Wang X.J., Su X.D., Wang L., Zhang Y. 2012. Tunneling-nanotube direction determination in neurons and astrocytes. *Cell Death Dis.* **3** (12), e438.
 26. López-Doménech G., Covill-Cooke C., Ivankovic D., Half E.F., Sheehan D.F., Norkett R., Birsá N., Kitter J.T. 2018. Miro proteins coordinate microtubule- and actin-dependent mitochondrial transport and distribution. *EMBO J.* **37** (3), 321–336.
 27. Babenko V.A., Silachev D.N., Popkov V.A., Zorova L.D., Pevzner I.B., Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T., Zorov D.B. 2018. Miro1 enhances mitochondria transfer from multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) to neural cells and improves the efficacy of cell recovery. *Molecules.* **23** (3), 687.
 28. Guo X., Can C., Liu W., Wei Y., Yang X., Liu J., Jia H., Jia W., Wu H., Ma D. 2023. Mitochondrial transfer in hematological malignancies. *Biomark. Res.* **11** (1), 89.
 29. Rodriguez A.M., Nakhle J., Griessinger E., Vignais M.L. 2018. Intercellular mitochondria trafficking highlighting the dual role of mesenchymal stem cells as both sensors and rescuers of tissue injury. *Cell Cycle.* **17** (6), 712–721.
 30. Mahrouf-Yorgov M., Augeul L., Da Silva C.C., Jourdan M., Rigolet M., Manin S., Ferrera R., Ovize M., Henry A., Guguin A., Meningaud J.P., Dubois-Randé J.L., Motterlini R., Foresti R., Rodriguez A.M. 2017. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death Differ.* **24** (7), 1224–1238.
 31. Murray L.M. A., Krasnodembskaya A.D. 2019. Concise review: Intercellular communication via organelle transfer in the biology and therapeutic applications of stem cells. *Stem cells.* **37** (1), 14–25.
 32. Beyer E.C., Berthoud V.M. 2018. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1860** (1), 5–8.
 33. Sinclair K.A., Yerkovich S.T., Hopkins P.M., Chambers D.C. 2016. Characterization of intercellular communication and mitochondrial donation by mesenchymal stromal cells derived from the human lung. *Stem Cell Res. Ther.* **7** (1), 91.
 34. Li H., Wang C., He T., Zhao T., Chen Y.Y., Shen Y.L., Zhang X., Wang L.L. 2019. Mitochondrial transfer from bone marrow mesenchymal stem cells to motor neurons in spinal cord injury rats via gap junction. *Theranostics.* **9** (7), 2017–2035.
 35. Tarasiuk O., Ballarini E., Donzelli E., Rodriguez-Menendez V., Bossi M., Cavaletti G., Scuteri A. 2022. Making connections: Mesenchymal stem cells manifold ways to interact with neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (10), 5791.
 36. Fahey M., Bennett M., Thomas M., Montney K., Vivancos-Koopman I., Pugliese B., Browning L., Bonassar L.J., Delco M. 2022. Mesenchymal stromal cells donate mitochondria to articular chondrocytes exposed to mitochondrial, environmental, and mechanical stress. *Sci. Rep.* **12** (1), 21525.
 37. Yang J., Liu L., Oda Y., Wada K., Ago M., Matsuda S., Hattori M., Goto T., Ishibashi S., Kawashima-Sonoyama Y., Matsuzaki Y., Taketani T. 2023. Extracellular vesicles and Cx43-gap junction channels are the main routes for mitochondrial transfer from ultra-purified mesenchymal stem cells, RECs. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (12), 10294.
 38. Mistry J.J., Marlein C.R., Moore J.A., Hellmich C., Wojtowicz E.E., Smith J.G.W., Macaulay I., Sun Y., Morfakis A., Patterson A., Horton R.H., Divekar D., Morris C.J., Haestier A., Di Palma F., Beraza N., Bowles K.M., Rushworth S.A. 2019. ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response

- to infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116** (49), 24610–24619.
39. Foo J.B., Looi Q.H., Chong P.P., Hassan N.H., Yeo G.E. C., Ng C.Y., Koh B., How C.W., Lee S.H., Law J. X. 2021. Comparing the therapeutic potential of stem cells and their secretory products in regenerative medicine. *Stem Cells Int*. **2021**, 2616807.
 40. Шевелева О.Н. Домарацкая Е.И., Паюшина О.В. 2019. Внеклеточные везикулы и перспективы их использования для регенерации тканей. *Биол. мембраны*. **36** (1), 3–14.
 41. Hough K.P., Trevor J.L., Strenkowski J.G., Wang Y., Chacko V.K., Tousif S., Chanda D., Steele C., Antony V.B., Dokland T., Ouyang X., Zhang J., Duncan S.R., Thannickal V.J., Darley-Usmar V.M., Deshane J.S. 2018. Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox Biol*. **18**, 54–64.
 42. Thomas M.A., Fahey M.J., Pugliese B.R., Irwin R.M., Antonyak M.A., Delco M.L. 2022. Human mesenchymal stromal cells release functional mitochondria in extracellular vesicles. *Front. Bioeng. Biotechnol*. **10**, 870193.
 43. Morrison T.J., Jackson M.V., Cunningham E.K., Kissenpfennig A., McAuley D.F., O’Kane C.M., Krasnodembskaya A.D. 2017. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. *Am.J. Respir. Crit. Care Med*. **196** (10), 1275–1286.
 44. Phinney D.G., Di Giuseppe M., Njah J., Sala E., Shiva S., St Croix C.M., Stolz D.B., Watkins S.C., Di Y.P., Leikauf G.D., Kolls J., Riches D.W., Deiuliis G., Kaminski N., Boregowda S.V., McKenna D.H., Ortiz L.A. 2015. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat. Commun*. **6**, 8472.
 45. Caicedo A., Zambrano K., Sanon S., Luis Vélez J., Montalvo M., Jara F., Moscoso S.A., Vélez P., Maldonado A., Velarde G. 2021. The diversity and co-existence of extracellular mitochondria in circulation: A friend or foe of the immune system. *Mitochondrion*. **58**, 270–284.
 46. Jiao H., Jiang D., Hu X., Du W., Ji L., Yang Y., Li X., Sho T., Wang X., Li Y., Wu Y.T., Wei Y.H., Hu X., Yu L. 2021. Mitocytosis, a migrasome-mediated mitochondrial quality-control process. *Cell*. **184** (11), 2896–2910.e13.
 47. Liu D., Gao Y., Liu J., Huang Y., Yin J., Feng Y., Shi L., Meloni B.P., Zhang C., Zheng M., Gao J. 2021. Intercellular mitochondrial transfer as a means of tissue revitalization. *Signal Transduct. Target Ther*. **6** (1), 65.
 48. Stier A. 2021. Human blood contains circulating cell-free mitochondria, but are they really functional? *Am.J. Physiol. Metab*. **320**, e859–863.
 49. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J., Alvarez-Buylla A. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. **425** (6961), 968–973.
 50. Acquistapace A., Bru T., Lesault P.F., Figeac F., Couderc A.E., le Coz O., Christov C., Baudin X., Auber F., Yiou R., Dubois-Randé J.L., Rodriguez A.M. 2011. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem Cells*. **29** (5), 812–824.
 51. Wada K.I., Hosokawa K., Ito Y., Maeda M. 2017. Quantitative control of mitochondria transfer between live single cells using a microfluidic device. *Biol. Open*. **6** (12), 1960–1965.
 52. Karbalaie K., Kiani-Esfahani A., Rasouli K., Hossein Nasr-Esfahani M. 2022. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) have mitochondrial transfer ability in stromal-derived inducing activity (SDIA) co-culture system. *Neurosci. Lett*. **769**, 136392.
 53. Wang R., Maimaitijuma T., Ma Y.Y., Jiao Y., Cao Y.P. 2020. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells to chondrocytes protects against cartilage degenerative mitochondrial dysfunction in rats chondrocytes. *Chin. Med. J. (Engl)*. **134** (2), 212–218.
 54. Tang L.X., Wei B., Jiang L.Y., Ying Y.Y., Li K., Chen T.X., Huang R.F., Shi M.J., Xu H. 2022. Intercellular mitochondrial transfer as a means of revitalizing injured glomerular endothelial cells. *World J. Stem Cells*. **14** (9), 729–743.
 55. Lin H.Y., Liou C.W., Chen S.D., Hsu T.Y., Chuang J.H., Wang P.W., Huang S.T., Tiao M.M., Chen J.B., Lin T.K., Chuang Y.C. 2015. Mitochondrial transfer from Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells to mitochondria-defective cells recaptures impaired mitochondrial function. *Mitochondrion*. **22**, 31–44.
 56. Li J., Li H., Cai S., Bai S., Cai H., Zhang X. 2021. CD157 in bone marrow mesenchymal stem cells mediates mitochondrial production and transfer to improve neuronal apoptosis and functional recovery after spinal cord injury. *Stem Cell Res. Ther*. **12** (1), 289.
 57. Michaeloudes C., Li X., Mak J.C.W., Bhavsar P.K. 2021. Study of mesenchymal stem cell-mediated mitochondrial transfer in *in vitro* models of oxidant-mediated airway epithelial and smooth muscle cell injury. *Methods Mol. Biol*. **2269**, 93–105.
 58. Wang K., Zhou L., Mao H., Liu J., Chen Z., Zhang L. 2023. Intercellular mitochondrial transfer alleviates pyroptosis in dental pulp damage. *Cell Prolif*. **56** (9), e13442.
 59. Yao S., Pang M., Wang Y., Wang X., Lin Y., Lv Y., Xie Z., Hou J., Du C., Qiu Y., Guan Y., Liu B., Wang J., Xiang A.P., Rong L. 2023. Mesenchymal stem cell attenuates spinal cord injury by inhibiting mitochondrial quality control-associated neuronal ferroptosis. *Redox Biol*. **67**, 102871.
 60. Vallabhaneni K.C., Haller H., Dumler I. 2012. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. *Stem Cells Dev*. **21** (17), 3104–3113.
 61. Plotnikov E.Y., Khryapenkova T.G., Galkina S.I., Sukhikh G.T., Zorov D.B. 2010. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Exp. Cell Res*. **316** (15), 2447–2455.
 62. Rackham C.L., Hubber E.L., Czajka A., Malik A.N., King A.J.F., Jones P.M. 2020. Optimizing beta cell

- function through mesenchymal stromal cell-mediated mitochondria transfer. *Stem Cells*. **38** (4), 574–584.
63. Yuan Y., Yuan L., Li L., Liu F., Liu J., Chen Y., Cheng J., Lu Y. 2021. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to macrophages restricts inflammation and alleviates kidney injury in diabetic nephropathy mice via PGC-1 α activation. *Stem Cells*. **39** (7), 913–928.
 64. Luz-Crawford P., Hernandez J., Djouad F., Luque-Campos N., Caicedo A., Carrère-Kremer S., Brondello J.M., Vignais M.L., Pène J., Jorgensen C. 2019. Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. *Stem Cell Res. Ther.* **10** (1), 232.
 65. Do J.S., Zwick D., Kenyon J.D., Zhong F., Askew D., Huang A.Y., Van't Hof W., Finney M., Laughlin M.J. 2021. Mesenchymal stromal cell mitochondrial transfer to human induced T-regulatory cells mediates FOXP3 stability. *Sci. Rep.* **11** (1), 10676.
 66. Piekarska K., Urban-Wójciuk Z., Kurkowiak M., Pelikant-Małecka I., Schumacher A., Sakowska J., Spodnik J.H., Arcimowicz Ł., Zielińska H., Tymoniuk B., Renkielska A., Siebert J., Słomińska E., Trzonkowski P., Hupp T., Marek-Trzonkowska N.M. 2022. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to allogeneic Tregs in an HLA-dependent manner improving their immunosuppressive activity. *Nat. Commun.* **13** (1), 856.
 67. Jackson M.V., Morrison T.J., Doherty D.F., McAuley D.F., Matthay M.A., Kissenpennig A., O’Kane C.M., Krasnodembskaya A.D. 2016. Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the *in vitro* and *in vivo* models of ARDS. *Stem Cells*. **34** (8), 2210–2223.
 68. Konari N., Nagaishi K., Kikuchi S., Fujimiya M. 2019. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy *in vivo*. *Sci. Rep.* **9** (1), 5184.
 69. Jiang D., Xiong G., Feng H., Zhang Z., Chen P., Yan B., Chen L., Gandhervin K., Ma C., Li C., Han S., Zhang Y., Liao C., Lee T.L., Tse H.F., Fu Q.L., Chiu K., Lian Q. 2019. Donation of mitochondria by iPSC-derived mesenchymal stem cells protects retinal ganglion cells against mitochondrial complex I defect-induced degeneration. *Theranostics*. **9** (8), 2395–2410.
 70. Nickel S., Christ M., Schmidt S., Kosacka J., Kühne H., Roderfeld M., Longrich T., Tietze L., Bosse I., Hsu M.J., Stock P., Roeb E., Christ B. 2022. Human mesenchymal stromal cells resolve lipid load in high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice by mitochondria donation. *Cells*. **11** (11), 1829.
 71. Jorgensen C., Khoury M. 2021. Musculoskeletal progenitor/stromal cell-derived mitochondria modulate cell differentiation and therapeutical function. *Front. Immunol.* **12**, 606781.
 72. Melcher M., Danhauser K., Seibt A., Degistirici Ö., Baertling F., Kondadi A.K., Reichert A.S., Koopman W.J.H., Willems P.H.G.M., Rodenburg R.J., Mayatepek E., Meisel P., Distelmaier F. 2017. Modulation of oxidative phosphorylation and redox homeostasis in mitochondrial NDUFS4 deficiency via mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **8** (1), 150.
 73. Li C.J., Chen P.K., Sun L.Y., Pang C.Y. 2017. Enhancement of mitochondrial transfer by antioxidants in human mesenchymal stem cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 8510805.
 74. Yao Y., Fan X.L., Jiang D., Zhang Y., Li X., Xu Z.B., Fang S.B., Chiu S., Tse H.F., Lian Q., Fu Q.L. 2018. Connexin 43-mediated mitochondrial transfer of iPSC-MSCs alleviates asthma inflammation. *Stem Cell Reports*. **11** (5), 1120–1135.
 75. Lin Y.H., Lin K.L., Wang X.W., Lee J.J., Wang F.S., Wang P.W., Lan M.Y., Liou C.W., Lin T.K. 2024. Miro1 improves the exogenous engraftment efficiency and therapeutic potential of mitochondria transfer using Wharton’s jelly mesenchymal stem cells. *Mitochondrion*. **76**, 101856.
 76. Babenko V.A., Silachev D.N., Zorova L.D., Pevzner I.B., Khutornenko A.A., Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T., Zorov D.B. 2015. Improving the post-stroke therapeutic potency of mesenchymal multipotent stromal cells by cocultivation with cortical neurons: The role of crosstalk between cells. *Stem Cells Transl. Med.* **4** (9), 1011–1020.
 77. Hartsoe P., Holguin F., Chu H.W. 2024. Mitochondrial dysfunction and metabolic reprogramming in obesity and asthma. *Int. J. Mol. Sci.* **25** (5), 2944.
 78. Yang J., Liu L., Oda Y., Wada K., Ago M., Matsuda S., Hattori M., Goto T., Kawashima Y., Matsuzaki Y., Taketani T. 2023. Highly-purified rapidly expanding clones, RECs, are superior for functional-mitochondrial transfer. *Stem Cell Res. Ther.* **14** (1), 40.
 79. Zhang Y., Yu Z., Jiang D., Liang X., Liao S., Zhang Z., Yue W., Li X., Chiu S.M., Chai Y.H., Liang Y., Chow Y., Han S., Xu A., Tse H.F., Lian Q. 2016. iPSC-MSCs with high intrinsic MIRO1 and sensitivity to TNF- α yield efficacious mitochondrial transfer to rescue anthracycline-induced cardiomyopathy. *Stem Cell Reports*. **7** (4), 749–763.
 80. McCully J.D., Del Nido P.J., Emani S.M. 2023. Mitochondrial transplantation: The advance to therapeutic application and molecular modulation. *Front. Cardiovasc. Med.* **10**, 1268814.
 81. Burt R., Dey A., Aref S., Aguiar M., Akarca A., Bailey K., Day W., Hooper S., Kirkwood A., Kirschner K., Lee S.W., Lo Celso C., Manji J., Mansour M.R., Marafioti T., Mitchell R.J., Muirhead R.C., Cheuk Yan Ng K., Pospori C., Puccio I., Zuborne-Alapi K., Sahai E., Fielding A.K. 2019. Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood*. **134** (17), 1415–1429.
 82. Caicedo A., Fritz V., Brondello J.M., Ayala M., Dennemont I., Abdellaoui N., de Fraipont F., Moisan A., Prouteau C.A., Boukhaddaoui H., Jorgensen C., Vignais M.L. 2015. MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Sci. Rep.* **5**, 9073.
 83. Kumar P.R., Saad M., Hellmich C., Mistry J.J., Moore J.A., Conway S., Morris C.J., Bowles K.M., Moncrieff M.D., Rushworth S.A. 2022. PGC-1 α induced mitochondrial biogenesis in stromal cells

- underpins mitochondrial transfer to melanoma. *Br.J. Cancer.* **127** (1), 69–78.
84. Matula Z., Mikala G., Lukácsi S., Matkó J., Kovács T., Monostori É., Uher F., Vályi-Nagy I. 2021. Stromal cells serve drug resistance for multiple myeloma via mitochondrial transfer: A study on primary myeloma and stromal cells. *Cancers (Basel)*. **13** (14), 3461.
85. Nakhle J., Khattar K., Özkan T., Boughlita A., Abba Moussa D., Darlix A., Lorcy F., Rigau V., Bauchet L., Gerbal-Chaloin S., Daujat-Chavanieu M., Bellvert F., Turchi L., Virolle T., Hugnot J.P., Buisine N., Galloni M., Dardalhon V., Rodriguez A.M., Vignais M.L. 2023. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells confers chemoresistance to glioblastoma stem cells through metabolic rewiring. *Cancer Res. Commun.* **3** (6), 1041–1056.
86. Marlein C.R., Piddock R.E., Mistry J.J., Zaitseva L., Hellmich C., Horton R.H., Zhou Z., Auger M.J., Bowles K.M., Rushworth S.A. 2019. CD38-driven mitochondrial trafficking promotes bioenergetic plasticity in multiple myeloma. *Cancer Res.* **79** (9), 2285–2297.

Mitochondrial Donation as a Mechanism of Participation by Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Processes

A. D. Krupnova¹, D. A. Tsomartova¹, E. V. Chereshneva¹, M. Yu. Ivanova¹, E. S. Tsomartova¹, T. A. Lomanovskaya¹, M. S. Pavlova¹, O. V. Payushina^{1,*}

¹Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

*e-mail: payushina@mail.ru

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are universal regulators of regenerative processes due to their ability to secrete regulatory molecules or replace dead cells through differentiation in the appropriate direction. Recently, another mechanism for the beneficial effects of MSCs on damaged tissue has been discovered, such as the transfer of mitochondria into its cells in response to stress signals. MSCs can transfer mitochondria through tunneling nanotubes that form a communication bridge between cells, through gap junctions, by release as part of extracellular vesicles or in free form, and as a result of complete or partial fusion with recipient cells. In damaged cells that received mitochondria from MSCs, impaired energy metabolism is restored and oxidative stress is reduced, which is accompanied by increased survival, and in some cases also increased proliferation or a change in differentiation status. The restoration of energy after the transfer of mitochondria from MSCs has a beneficial effect on the functional activity of recipient cells and suppresses inflammatory reactions. A significant contribution of the MSC mitochondrial donation to the therapeutic efficacy of MSCs has been repeatedly demonstrated in models of damage to various organs in experimental animals. This stimulates the search for methods to enhance the process of mitochondrial donation. However, it should be taken into account that MSCs are able to transfer mitochondria to malignant cells as well, thereby stimulating tumor growth and increasing its resistance to chemotherapy. These data make it necessary to evaluate the prospects for the use of MSCs in cell therapy with caution. On the other hand, they can serve as a basis for the search for new therapeutic targets in the treatment of oncological diseases.

Keywords: mesenchymal stromal cells, transfer of mitochondria, mitochondrial donation, regeneration, tumors

УДК 577.112.345:577.112.384.4:577.115

КАТИОННЫЕ И ИОНИЗИРУЕМЫЕ АМФИФИЛЫ НА ОСНОВЕ ДИГЕКСАДЕЦИЛОВОГО ЭФИРА *L*-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА РНК¹

© 2024 г. Г. А. Бухарин^а, У. А. Буданова^а, З. Г. Дениева^{б,*}, Е. В. Дубровин^{б,с}, Ю. Л. Себякин^а

^аМИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

^бИнститут физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва 119071, Россия

^сМосковский государственный университет им. М. В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: zaret03@mail.ru

Поступила в редакцию 01.05.2024

После доработки 24.06.2024

Принята к печати 14.07.2024

В настоящее время различные варианты РНК являются одними из наиболее многообещающих и активно развивающихся терапевтических средств для лечения опухолей, инфекционных заболеваний и ряда других патологий, ассоциированных с нарушением функционирования специфических генов. Для эффективной доставки РНК в клетки-мишени применяют различные наноносители, среди которых можно выделить липосомальные средства доставки на основе катионных и/или ионизируемых амфифилов. Катионные амфифилы содержат постоянно протонированную аминогруппу и существуют в виде солей в водной среде. Ионизируемые амфифилы являются новым поколением катионных липидов, которые проявляют пониженную токсичность и иммуногенность и подвергаются ионизации только в кислой среде внутри клетки. В данной работе нами разработана схема получения и осуществлен синтез новых катионных и ионизируемых амфифилов на основе природных аминокислот (*L*-глутаминовой кислоты, глицина, бета-аланина и гамма-аминомасляной кислоты). На основе полученных соединений в смеси с природными липидами (фосфатидилхолином и холестерином) были сформированы катионные и ионизируемые липосомы и определены их физико-химические характеристики: размер частиц, дзета-потенциал, стабильность при хранении. Стабильные в течение 5–7 суток частицы имеют средний диаметр, не превышающий 100 нм. Дзета-потенциал катионных и ионизируемых липосом составляет примерно 30 и 1 мВ, соответственно. Полученные липосомальные частицы были использованы для формирования комплексов с молекулами РНК. Такие комплексы с РНК были охарактеризованы с помощью атомно-силовой микроскопии, и определена их применимость для транспорта нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: ионизируемые аминокислоты, катионные липопептиды, диэфир *L*-глутаминовой кислоты, липосомы, комплексы с РНК, атомно-силовая микроскопия

DOI: 10.31857/S0233475524040035, **EDN:** axdmxq

ВВЕДЕНИЕ

Липосомы – средства доставки биологически активных соединений в клетки. Они могут инкапсулировать различные биологически активные вещества, в том числе генетический материал, распределяя их в водной среде или в гидрофобном слое в зависимости от их полярности [1–3]. Липосомальный транспорт РНК в эукариотические клетки уже используется в современной медицине и ориентирован на лечение

патологий различного рода путем исправления мутаций или дефектов в структуре ДНК, поражения ДНК вирусами и др. [4, 5]. В настоящее время такая таргетная доставка препаратов на основе синтетических липидов применяется для лечения различных заболеваний. Например, доставка специфической малой интерферирующей РНК (миРНК) в клетки вызывает подавление генов матричной РНК (мРНК), ассоциированной с опухолями, тем самым ингибируя пролиферацию раковых клеток, предотвращая

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде: <https://doi.org/10.31857/S0233475524040035>

метастазирование опухоли и индуцируя апоптоз раковых клеток [6]. Еще одним примером служит использование липидных наночастиц в совместной доставке нескольких молекул нуклеиновых кислот (например, мРНК CRISPR-Cas9 и единой направляющей РНК) для лечения транстиретинового амилоидоза [7]. Успешное применение в клинике мРНК-вакцин на основе липосомальных носителей от компаний Pfizer-BioNTech и Moderna против коронавирусной инфекции COVID-19 продемонстрировали их большой потенциал в области создания подобных лекарственных средств [8, 9].

На эффективность системы доставки терапевтических молекул влияют состав и физико-химические свойства липосом, поэтому при их разработке важно контролировать такие параметры, как размер частиц, поверхностный заряд, липидный состав, возможность модификации поверхности липосом и т.д. [10]. В ряде работ было показано, что включение природных и синтетических липидов с углеводородными цепями длиной C16 и больше повышает эффективность инкапсуляции гидрофобных лекарственных средств в бислои и увеличивает время удерживания лекарственных средств в частице [11–13]. Кроме того, подход к конструированию липосомальной системы с учетом упомянутых критериев позволяет снизить фоновую токсичность препарата по отношению к здоровым клеткам [10]. Токсичность липидов тесно связана со структурой их полярной головной группы, поэтому модифицируя их химический состав возможно добиться низкой токсичности для организма [14]. Ранее нами было показано, что такой подход к подбору составных компонентов липосом позволяет создавать средства доставки, эффективные в условиях *in vitro* [15, 16].

Катионные и ионизируемые липосомы получают путем комбинации природных фосфолипидов и соответствующих синтетических липидов в составе транспортных систем. Катионные липосомы несут постоянный положительный заряд на поверхности. Такие липосомы широко используются в качестве агентов трансфекции, а также в рецептуре липосомальных вакцинных адъювантов благодаря их иммуностимулирующим свойствам [17]. Однако в результате электростатических взаимодействий между положительно заряженной липидной мембраной липосомы и отрицательно заряженными молекулами вблизи поверхности клеточных мембран катионные липосомы неспецифически проникают в клетки организма. Ионизируемые липосомы, в отличие от катионных и незаряженных

липосом, протонируются и депротонируются в зависимости от кислотности окружающей среды [18]. Благодаря их физическим и функциональным свойствам, они представляются более перспективными наноносителями для транспорта РНК [19, 20]. В кровотоке, где рН близок к нейтральному, поверхностный заряд таких наночастиц отсутствует, но при попадании внутрь клетки в процессе эндоцитоза или межклеточное пространство клеток, где рН имеет более низкие значения, они способны протонироваться. Такое изменение в структуре липосом повышает активность их захвата клетками. Эффекты ионизируемых липосом в терапии различных заболеваний пока мало изучены, однако появляются все больше экспериментальных данных, которые свидетельствуют о том, что их применение обеспечивает значительные преимущества по сравнению с другими типами терапевтических методов [21–23].

Целью данной работы было разработать схему синтеза, а также получить новые катионные и ионизируемые амфифилы на основе природных аминокислот как составных компонентов липосомальных транспортных систем доставки нуклеиновых кислот. На основе синтезированных соединений были сформированы липосомы и изучены их физико-химические свойства (размер частиц и стабильность при хранении), а также оценена возможность связывать молекулы РНК методом атомно-силовой микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Все реактивы, которые применяли в ходе синтеза, коммерчески доступны и были использованы без дополнительной очистки: глицин (Sigma-Aldrich), β-аланин (Sigma-Aldrich), γ-аминомасляная кислота (ГАМК, Sigma-Aldrich), муравьиная кислота (Sigma-Aldrich), формальдегид (Sigma-Aldrich), N-гидроксисукцинимид (HONSu, Sigma-Aldrich), 1,3-дициклогексилкарбодиимид (DCC, Sigma-Aldrich), 4-диметиламинопиридин (DMAP, Sigma-Aldrich), ди-*трет*-бутилдикарбонат (Coc_2O , Sigma-Aldrich), трифторуксусная кислота (ТФУК, Biochem, Франция), тетрагидрофуран (ТГФ, Химмед, Россия), NaHCO_3 (Русхим, Россия), Na_2SO_4 безводный (Русхим), фосфатидилхолин (PC, Lipoid S100, чистота > 94%, CAS97281–47–5, Германия), холестерин (Chol, Acros Organics, чистота 95%, CAS57–88–5, Бельгия).

^1H -ЯМР-спектры регистрировали в дейтерированном хлороформе (CDCl_3) на

ЯМР-спектрометре «Bruker DPX-300» с рабочей частотой 300 МГц. Внутренний стандарт — гексаметилдисилоксан.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках с силикагелем (Silufol, Чехия) в системах растворителей (об/об): (А) толуол: этилацетат 1:2, (Б) толуол: этилацетат 2:1, (В) хлороформ: метанол 10:1. Препаративную тонкослойную хроматографию проводили на силикагеле 60 с размером частиц 2–25 мкм (Sigma-Aldrich). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле 60 с размером частиц 40–63 мкм (Merck, Германия). Для обнаружения пятен веществ на ТСХ использовали следующие проявители: 1) вещества, содержащие свободную аминогруппу, обнаруживали 3%-ным раствором нингидрина с последующим нагреванием до 55–75°C; 2) третичные амины проявляли в среде реактива Драгендорфа; 3) иные вещества проявляли в среде паров йода.

Методы. Синтез катионных и ионизируемых амфифилов проводили стандартными методами пептидной и липидной химии. Методы получения соединений (**1**) и **2(а-с)** описаны в наших предыдущих работах [24] и [25] соответственно.

Дигексадециловый эфир N-[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этанол] L-глутаминовой кислоты (3а**).** К раствору 32 мг (0.18 ммоль) соединения **2а**, 38 мг (0.18 ммоль) DCC и каталитического количества DMAP в 5 мл безводного хлористого метилена при перемешивании добавляли раствор 100 мг (0.17 ммоль) соединения **1** в 5 мл безводного хлористого метилена. Реакционную смесь выдерживали при интенсивном перемешивании в течение 19 ч при 0°C. После завершения реакции реакцию массу отфильтровывали от выпавшего осадка дициклогексилмочевины, а растворитель удаляли в вакууме. Продукт выделяли с помощью препаративной ТСХ в системе (Б). Выход продукта **3а** составил 102 мг (81%). Rf (Б) 0.51.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.88 (6H, т, 6.7 Гц, CH₃); 1.27 (52H, уш.с, (CH₂)₁₃CH₃); 1.45 (9H, с, CCH₃); 1.56–1.70 (4H, м, COOCH₂CH₂); 1.91–2.09 (2H, м, CHCH₂), 2.29–2.50 (2H, м, CH₂C=O); 3.64 (0.7H, т, 6.5 Гц, NHCH₂); 3.82 (2H, дд, 5.2 Гц, NHCH₂); 4.08 (4H, дт, 13.6 Гц, 6.8 Гц, COOCH₂CH₂); 4.58–4.68 (1H, м, CH); 5.10 (1H, уш.с, NHCH).

Дигексадециловый эфир N-[3-(*трет*-бутоксикарбониламино)пропанол] L-глутаминовой кислоты (3б**).** Раствор смеси соединения **2б** 152 мг (0.80 ммоль), 93 мг (0.81 ммоль) HONSu и 166 мг (0.81 ммоль) DCC в 20 мл ТГФ перемешивали

при 0°C в течение 30 мин. Выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, и к фильтрату добавляли раствор 400 мг (0.67 ммоль) соединения **1** в 20 мл ТГФ и выдерживали при интенсивном перемешивании 5 ч при комнатной температуре. После окончания реакции ТГФ удаляли в вакууме. Продукт реакции выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в системе (А). Выход продукта **3б** составил 55 мг (83%). Rf (Б) 0.49.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.88 (6H, т, CH₃); 1.27 (52H, с, CH₂CH₃); 1.44 (9H, с, CCH₃); 1.57–1.70 (4H, м, COOCH₂CH₂); 2.41–2.49 (2H, т, NHCH₂CH₂); 2.73–3.14 (2H, дд, CHCH₂CH₂COO); 3.38–3.48 (2H, кв, NHCH₂CH₂); 4.04–4.22 (4H, дт, COOCH₂); 4.82–4.94 (1H, м, CH); 5.17–5.34 (1H, м, OCNHCH); 6.51–6.63 (1H, д, OCNHCH₂).

Дигексадециловый эфир N-[4-(*трет*-бутоксикарбониламино)бутанол] L-глутаминовой кислоты (3с**).** Реакцию проводили аналогично методу получения соединения **3а**. Из 131 мг (0.65 ммоль) соединения **2с** и 320 мг (0.54 ммоль) соединения **1** получали 84 мг (80%) продукта **3с**. Rf (Б) 0.51.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.88 (6H, т, CH₃); 1.27 (52H, с, CH₂CH₃); 1.44 (9H, с, CCH₃); 1.57–1.70 (4H, м, COOCH₂CH₂); 1.81 (2H, п, CH₂CH₂CH₂); 2.41–2.49 (2H, т, NHCH₂CH₂); 2.73–3.14 (2H, дд, CHCH₂CH₂COO); 3.38–3.48 (2H, кв, NHCH₂CH₂); 4.04–4.22 (4H, дт, COOCH₂); 4.82–4.94 (1H, м, CH); 5.17–5.34 (1H, м, OCNHCH); 6.51–6.63 (1H, д, OCNHCH₂).

Дигексадециловый эфир N-[2-аминоэтанол]-L-глутаминовой кислоты трифторацетат (4а**).** К раствору 20 мг (0.027 ммоль) соединения **3а** в 2 мл безводного хлористого метилена добавляли 1 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при комнатной температуре. После окончания реакции растворитель с избытком ТФУК удаляли в вакууме, остаток растворяли в хлороформе и промывали водой (2 × 50 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄, растворитель отгоняли в вакууме. Выход продукта **4а** составил 15 мг (75%). Rf (В) 0.17.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.88 (6H, т, 6.7 Гц, CH₃); 1.27 (52H, уш.с, (CH₂)₁₃CH₃); 1.57–1.71 (4H, м, COOCH₂CH₂); 1.88–2.07 (2H, м, CHCH₂), 2.30–2.48 (2H, м, CH₂C=O); 3.88 (2H, с, NH₃CH₂); 4.10 (4H, дт, 13.6 Гц, 6.8 Гц, COOCH₂CH₂); 4.58–4.68 (1H, м, CH); 5.12 (1H, уш.с, NHCH); 6.73 (0.65H, уш.д., 6.6 Гц, NHCH₂).

ESI-MS: 690.6 [M+K-2H]⁻.

Дигексадециловый эфир N-[3-аминопропаноил]-L-глутаминовой кислоты трифторацетат (4b). Реакцию проводили аналогично методу получения соединения **4a**. Из 55 мг соединения **3b** получали 21 мг (78%) продукта **4b**. Rf (B) 0.18.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.84–0.96 (6H, м, CH₃); 1.26 (52H, с, CH₂CH₃); 1.52–1.73 (4H, м, COOCH₂CH₂); 1.77–1.96 (4H, м, CHCH₂CH₂COO); 2.27–2.49 (2H, м CH₂CONH); 3.08 (1H, уш.с., NH₃); 3.64 (2H, т, 6.6 Гц, NH₃CH₂); 3.96–4.27 (4H, м, COOCH₂CH₂); 3.41–3.54 (2H, м, NHCH₂CH₂); 4.56–4.68 (1H, м, CH); 5.30 (1H, с, OCNHCH).

ESI-MS: 666.6 [M-H]⁻.

Дигексадециловый эфир N-[4-аминобутаноил]-L-глутаминовой кислоты трифторацетат (4c). Реакцию проводили аналогично методу получения соединения **4a**. Из 84 мг соединения **3c** получали 30 мг (81%) продукта **4c**. Rf (B) 0.20.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.88 (6H, т, CH₃); 1.26 (52H, с, CH₂CH₃); 1.51–1.74 (4H, м, COOCH₂CH₂); 1.89 (2H, п, CH₂CH₂CH₂); 2.42–2.47 (2H, т, NHCH₂CH₂); 2.73–3.04 (2H, ддд, CHCH₂CH₂COO); 3.43–3.55 (2H, кв, NHCH₂CH₂); 3.95–4.27 (4H, дт, COOCH₂); 4.79–4.90 (1H, м, CH); 5.26–5.39 (1H, м, OCNHCH); 6.50 (2H, уш.с., NH₂).

ESI-MS: 681.7 [M]⁺.

Дигексадециловый эфир N,N-диметил-[2-аминоэтаноил]-L-глутаминовой кислоты (5a). Раствор соединения **4a** промывали 5%-ным раствором NaHCO₃ (2 × 50 мл) до pH 7. Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄ и растворитель отгоняли в вакууме. К 18 мг (0.018 ммоль) полученного остатка, содержащего первичную аминогруппу, добавляли 1 мл 30%-ного формальдегида и перемешивали в течение 5 мин при 0°C. Далее в растворе добавляли 1 мл муравьиной кислоты и выдерживали при интенсивном перемешивании 5 ч при 100°C. Полученную реакцию массу экстрагировали хлороформом (2 × 10 мл). Органическую фазу последовательно промывали 5%-ным раствором NaHCO₃ (3 × 10 мл) и водой (2 × 10 мл), после чего сушили на складчатом фильтре, смоченном безводным хлороформом. Растворитель удаляли на роторном испарителе. Получали 22 мг (87%) продукта **5a**. Rf (B) 0.71.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.88 (6H, т, CH₃); 1.27 (52H, с, CH₂CH₃); 1.55–1.68 (4H, м, COOCH₂CH₂); 2.12–2.93 (12H, м, (CH₃)₂NCH₂, CHCH₂CH₂); 4.09–4.27 (4H, м, COOCH₂CH₂); 4.32–4.43 (1H, м, CH); 6.05 (1H, с, NH).

ESI-MS: 729.7 [M+CH₃OH+H]⁺.

Дигексадециловый эфир N,N-диметил-[3-аминопропаноил]-L-глутаминовой кислоты (5b). Реакцию проводили аналогично методу получения соединения **5a**. Из 21 мг (0.032 ммоль) соединения **4b** получали 32 мг (70%) продукта **5b**. Rf (B) 0.72

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.88 (6H, т, CH₃); 1.26 (52H, с, CH₂CH₃); 1.49–1.73 (6H, м, COOCH₂CH₂, NHCH₂CH₂); 2.09 (6H, уш.с., (CH₃)₂N); 3.54 (2H, т, 6.6 Гц, COOCH₂); 3.64 (2H, т, 6.6 Гц, COOCH₂); 4.16 (2H, т, 6.4 Гц, NCH₂); 4.22–4.32 (1H, м, CH); 4.76 (1H, с, NHCH).

ESI-MS: 741.7 [M+CH₃OH+H]⁺.

Дигексадециловый эфир N,N-диметил-[4-аминобутаноил]-L-глутаминовой кислоты (5c). Реакцию проводили аналогично методу получения соединения **5a**. Из 45 мг (0.063 ммоль) **4c** получали 49 мг (50%) продукта **5c**. Rf (B) 0.76.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.88 (6H, т, CH₃); 1.26 (52H, с, CH₂CH₃); 1.39 (4H, м, COOCH₂CH₂); 1.87–2.08 (8H, м, NHCH₂CH₂); 3.12 (6H, уш.с., (CH₃)₂N); 4.02–4.20 (4H, м, COOCH₂); 4.23–4.37 (1H, м, CH); 4.72 (1H, с, OCNHCH).

ESI-MS: 755.6 [M+CHOH+H]⁺.

Получение липосомальных дисперсий. Синтезированные соединения **4a-c** и **5a-c** (3 мг) и липиды PC (3 мг) и Chol (1.8 мг) растворяли в смеси хлороформ: метанол (1.5:1 об/об) в круглодонной колбе. Растворители медленно удаляли на роторном испарителе при 35°C до образования тонкой липидной пленки на стенках колбы и сушили под вакуумом в течение 30 мин. К полученной пленке добавляли 3 мл воды, выдерживали 30 мин при комнатной температуре, после чего интенсивно встряхивали при 60°C. Далее в ультразвуковой ванне (УЗВ-1.3 «ПКФ Сапфир») получали липосомальную дисперсию с конечной концентрацией амфифилов 2.6 мг/мл (3 × 10 мин с перерывом 5 мин). В результате были получены дисперсии с составами катионный/ионизируемый липид: PC: Chol = 5:5:3 масс.%. Процесс приготовления дисперсий повторяли минимум 3 раза. Соотношения липидов выбирали исходя из возможности образования стабильных дисперсий [26, 27].

Определение размера и дзета-потенциала липосом. Распределение частиц по размерам и значения дзета-потенциала оценивали методом фотонно-корреляционной спектроскопии, основанным на принципах динамического рассеяния света. Измерения проводили на приборе типа «Zetasizer Nano ZS» (Malvern Panalytical,

Великобритания), оснащенном He-Ne-лазером мощностью 4 мВт (длина волны 633 нм) при 25°C. Были оценены значения показателя преломления и вязкости для каждого образца суспензии липосом. Каждое измерение включало 3–5 чтений по 10 с. Корреляционные функции были проанализированы с использованием программного обеспечения Dispersion Technology Software. Размеры и дзета-потенциал были определены для трех повторов приготовления липосомальных дисперсий.

Стабильность при хранении. Стабильность липосомальных дисперсий при хранении при комнатной температуре оценивали по изменению значений показателя оптической плотности при длине волны 400 нм в течение 7 дней с момента приготовления дисперсий на фотокolorиметре Экотест-2020 «Эконикс». В качестве фонового значения среды использовали значение оптической плотности дистиллированной воды.

Приготовление липосомального комплекса с РНК. Стоковый раствор РНК (Type VI from Torula yeast) с концентрацией 23 мкг/мл готовили в воде без нуклеаз. Липосомальный комплекс с РНК получали при смешивании липосомальной дисперсии и раствора РНК в итоговом соотношении катионный/ионизируемый липид: РНК (N:P) = 1:32. В качестве контроля использовали раствор РНК без липосом.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). АСМ-исследования проводили на микроскопе Nanoscope-V (Bruker, США) в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием кантилеверов HA_NC (Типснано, Россия). Частота сканирования составляла 2 строки в секунду на изображении 512 × 512 пикселей. Обработку АСМ-изображений проводили с помощью программного обеспечения Фемтоскан (Центр перспективных технологий, Россия).

Для АСМ-исследования молекул РНК 10 мкл раствора РНК с концентрацией 12 мкг/мл в растворе 20 mM NaCl, 1 mM MgSO₄ наносили на поверхность свежесколотой слюды на 10 мин, затем промывали в деионизованной воде 40 мин и высушивали в потоке воздуха.

Для АСМ-исследования липосомальных комплексов с РНК всех исследованных образцов 5 мкл раствора комплексов в воде с концентрацией 0.5 г/л (по катионному/ионизируемому липиду) наносили на свежесколотую слюду на 5 мин, после чего промывали деионизованной водой и высушивали в потоке воздуха. Для АСМ-исследования комплексов, содержащих ионизируемый липид **5a**, процедуру приготовления

образца также проводили вторым способом: 2 мкл раствора комплекса с РНК в воде с концентрацией 0.01 г/л (по ионизируемому липиду) наносили на свежесколотую слюду до полного высыхания на воздухе.

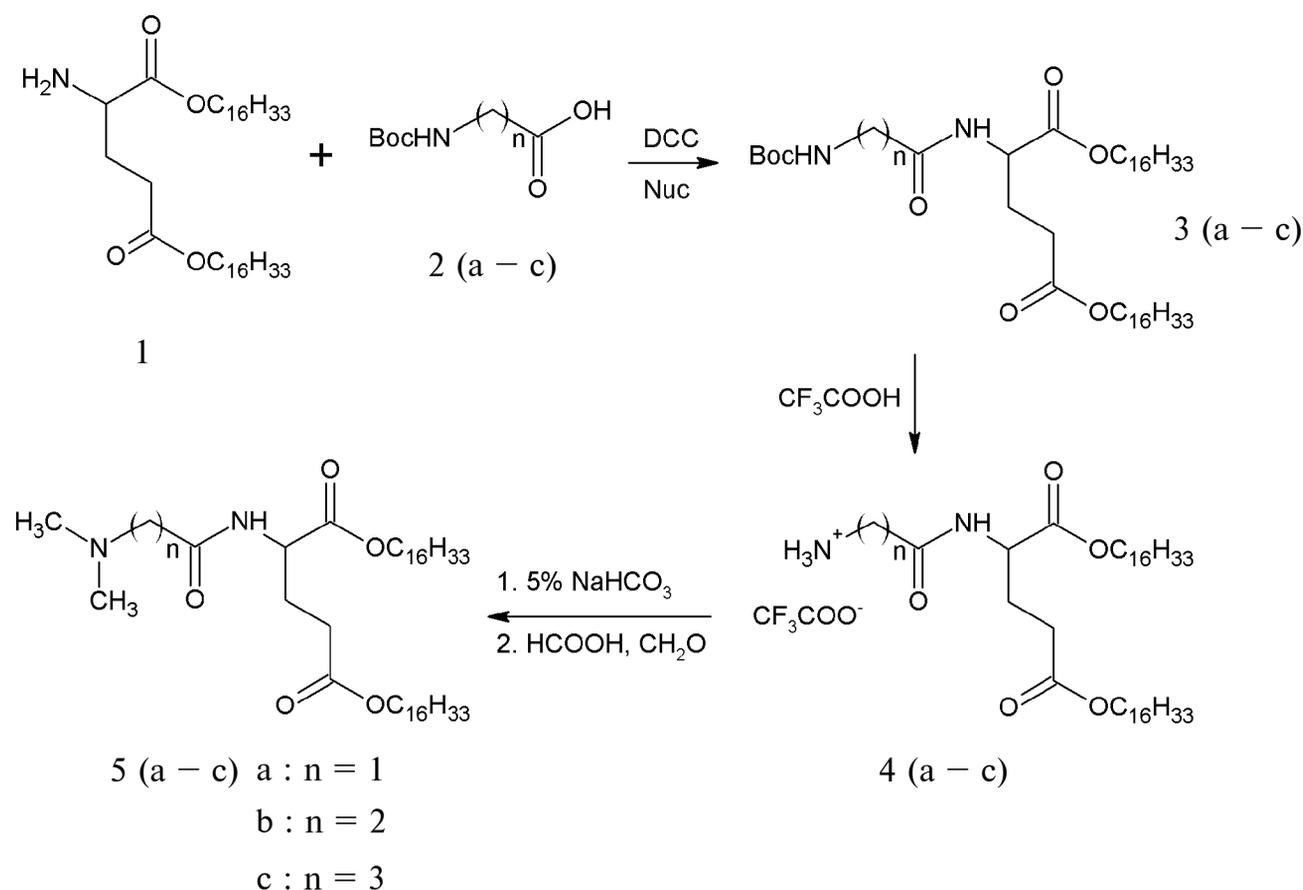
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез целевых амфифилов

Лекарственные препараты на основе липосом используются для направленной доставки в клетки организма терапевтических молекул, например противоопухолевых агентов или нуклеиновых кислот [28, 29]. Известно, что состав липосом влияет на эффективность всей системы доставки. Среди перспективных компонентов липосом можно выделить ионизируемые амфифилы, которые повышают уровень трансфекции мРНК в раковые клетки *in vivo* за счет более продолжительного циркулирования в кровотоке по сравнению с катионными липидами, а также за счет стимулирования высвобождения трансфицируемого агента из эндосом при понижении pH [30].

В данной работе нами разработана схема и осуществлен синтез новых катионных (**4a-c**) и ионизируемых амфифилов (**5a-c**), содержащих в составе полярной головной группы свободную аминогруппу или протонируемый в физиологических условиях третичный атом азота, соответственно (схема 1). Полярный блок в синтезированных структурах представлены алифатическими аминокислотами, которые различаются количеством метиленовых звеньев (от 1 до 3). В качестве основы амфифилов выступает *L*-глутаминовая кислота, производные которой способны обеспечивать уровень трансфекции нуклеиновых кислот, сопоставимый с коммерчески доступными агентами [16, 24]. Из синтезированных веществ были получены суспензии липосом и изучены их физико-химические свойства.

Гидрофобный блок **1** получали путем сплавления *L*-глутаминовой кислоты с гексадециловым спиртом в присутствии пара-толуолсульфонокислоты при 130 °C согласно методу, описанному в [24, 25]. Для формирования полярного блока амфифилов предварительно синтезировали Вос-защищенные аминокислоты **2(a-c)** классическим методом пептидного синтеза [31]. Промежуточные продукты **3(a-c)** получали реакцией Вос-защищенных аминокислот **2(a-c)** с дигексадециловым эфиром *L*-глутаминовой кислоты **1** в присутствии активирующего



агента DCC и нуклеофильной добавки (DMAP для **3a** и **3c**; HONSu для **3b**). Защищенные липодипептиды **3(a-c)** выделяли из реакционной массы с помощью колоночной и/или препаративной тонкослойной хроматографии на силикагеле, а структуры полученных соединений подтверждали данными ¹H-ЯМР-спектроскопии. В спектрах ЯМР присутствовали характерные сигналы протонов углеводородных цепей остатков гексадецилового спирта, сигнал, характерный для остатка *tert*-бутильной группы, а также сигналы протонов углеводородного остова аминокислот. Далее проводили удаление Boc-защитной группы действием трифторуксусной кислоты в среде безводного хлористого метилена с получением целевых катионных амфифилов **4(a-c)**. Для синтеза ионизируемых амфифилов **5(a-c)** трифторацетатные соли липодипептидов **4(a-c)** обрабатывали 5%-ным раствором NaHCO₃ для получения промежуточных продуктов, содержащих свободную аминогруппу. Далее

проводили реакцию метилирования свободных аминогрупп полученных соединений по реакции Эшвайлера–Кларка смесью формальдегида и муравьиной кислоты [32]. Целевые продукты **5(a-c)** выделяли из реакционной смеси экстракцией хлороформом или препаративной ТСХ на силикагеле. Структуры полученных соединений подтверждали данными ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии (см. Дополнительные материалы). В масс-спектрах присутствовали пики молекулярных ионов.

Мембранообразующие свойства синтезированных амфифилов

Амфифильные молекулы способны самопроизвольно упорядочиваться в частицы различной формы в водной среде. Эта форма зависит от геометрических параметров молекулы амфифила, которые можно описать с помощью критического параметра упаковки (КПУ) [33, 34]. При

значениях КПУ, близких к 1, наиболее вероятно образование амфифилом бислоя. При значениях, сильно отличающихся от 1, амфирил будет образовывать мицеллярные структуры в водной среде. Значение КПУ можно рассчитать по формуле:

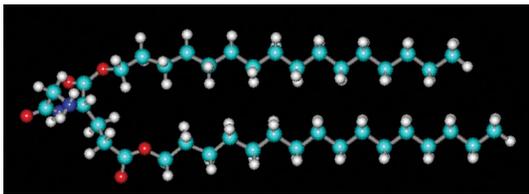
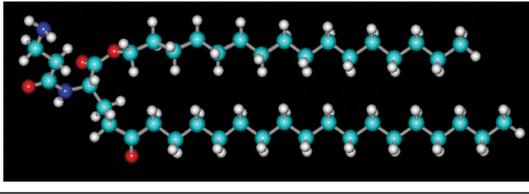
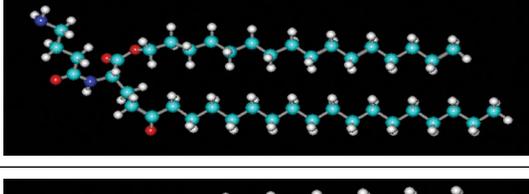
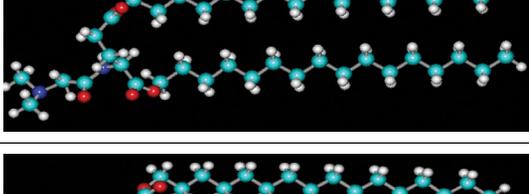
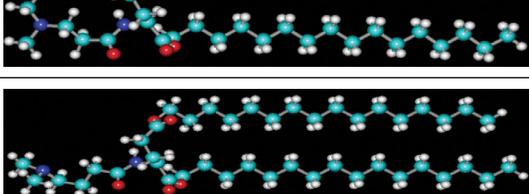
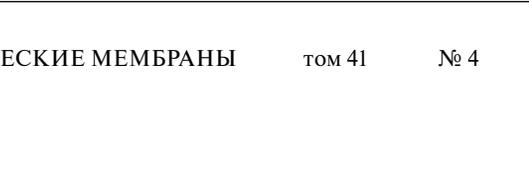
$$\text{КПУ} = \frac{V}{h \times S} = \frac{h \times \pi R_1^2}{h \times \pi R_2^2},$$

где V/h – площадь поперечного сечения углеводородной области молекулы (V – молекулярный объем углеводородной области молекулы, h – максимальная длина углеводородной цепи), S – площадь поверхности для размещения полярной головки липида, R_1 – радиус основания

цилиндра, образованного гидрофобной областью молекулы, R_2 – радиус сферы, образованной полярной головной группой.

Для расчета значений КПУ синтезированных соединений **4(a-c)** и **5(a-c)** было проведено 3D-моделирование структур (с учетом и оптимизацией возможных конформаций) с помощью пакета программ «ACD/Labs, 3D Viewer» и «HyperChem» (табл. 1) [35, 36]. Полученные величины КПУ позволяют предположить, что среди катионных амфифилов **4(a-c)** только для вещества **4c** вероятно образование липидного бислоя в водной среде, тогда как для соединений **4a** и **4b** характерно формирование обратных

Таблица 1. Результаты расчета значений КПУ амфифилов **4(a-c)** и **5(a-c)**. Цвета атомов в 3D-моделях структур: водород – белый, углерод – циановый, кислород – красный, азот – синий

Шифр	3D-модель структуры	$R_1, \text{Å}$	$R_2, \text{Å}$	КПУ	Форма агрегатов
4a		3.98	2.48	2.56	Обратная мицелла
4b		3.99	3.20	1.53	Обратная мицелла
4c		3.99	3.85	1.07	Бислой
5a		3.96	3.02	1.70	Обратная мицелла
5b		3.97	3.79	1.10	Бислой
5c		3.97	3.87	1.05	Бислой

мицелл. В ряду ионизируемых амфифилов **5(a-c)** для соединений **5b** и **5c** наиболее вероятным является образование липидного бислоя в водной среде. Для соединения **5a** будет характерно образование обратных мицелл в водной среде.

Из синтезированных соединений были получены суспензии липосом в смеси с природными фосфолипидом фосфатидилхолином (PC) и холестеринном (Chol), способными стабилизировать коллоидные частицы в агрегаты сферической формы. Для этого липиды были взяты в соотношении катионный/ионизируемый липид: PC: Chol = 5:5:3 масс.%.

Методом динамического рассеяния света (ДРС) был определен гидродинамический радиус и оценен диаметр частиц полученных суспензий липосом. Результаты показали, что размеры липосом на основе всех синтезированных веществ не превышают 110 нм. Такие значения находятся в пределах допустимых значений (до 300 нм), что может способствовать их эффективно проникновению к целевым мишеням в организме за счет пассивного нацеливания (табл. 2) [37]. Диаметр частиц на основе соединений **4a**, **4b** и **5a**, которые образуют в растворе агрегаты в виде обратных мицелл, практически в 2 раза превышает размер частиц на основе соединений **4c**, **5b** и **5c**, формирующих липидный бислой. Наиболее компактными везикулами являются липосомы на основе амфифила **4c**, средний диаметр которых составляет 22.3 нм.

Также методом ДРС были определены значения дзета-потенциала для полученных агрегатов. Средние значения дзета-потенциала катионных липосом на основе соединений **4(a-c)** оказались приблизительно равны 30 мВ, тогда как для ионизируемых липидов – около 1 мВ (табл. 2).

Данные значения согласуются с литературными данными, полученными для липосом на основе катионных и ионизируемых [38] липидов.

Для полученных агрегатов была изучена стабильность при хранении при комнатной температуре по изменению оптической плотности суспензии (рис. 1). Результаты измерений показали, что только липосомальные системы на основе амфифилов **4c**, **5a** и **5c** стабильны в течение не менее 7 суток. Показатель оптической плотности для них не менялся в пределах погрешности измерений (10%). Для остальных суспензий наблюдалась агрегация частиц уже на 2–5-е сутки. Нестабильные липосомальные системы не рассматривались для дальнейших исследований.

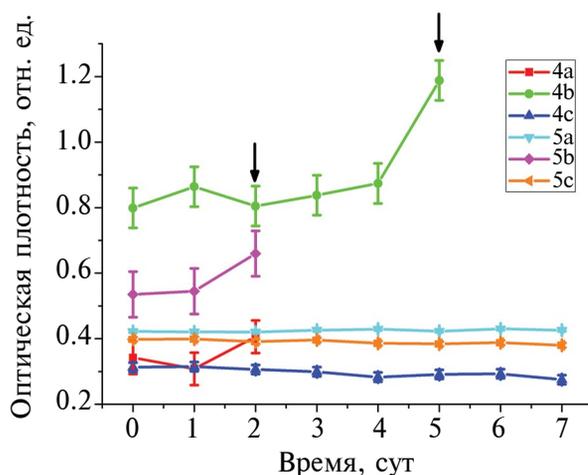


Рис. 1. Изменение оптической плотности липосомальных суспензий (амфирил: PC: Chol 5:5:3 масс.%) при хранении при комнатной температуре. Черными стрелками обозначены временные точки начала агрегации липосом на основе соединений **4a**, **4b** и **5b**.

Таблица 2. Диаметр частиц суспензий липосом (амфирил: PC: Chol 5:5:3 масс.%), определенный методом ДРС

Амфирил	Диаметр частиц, нм	Дзета-потенциал, мВ
4a	101.7 ± 34.9	32.5 ± 2.8
4b	108.4 ± 76.4	30.1 ± 2.7
4c	23.6 ± 7.2	30.8 ± 3.1
5a	95.5 ± 23	1.3 ± 1.0
5b	60.3 ± 27	1.6 ± 0.7
5c	32.4 ± 19	2.1 ± 0.4

Примечание. Погрешность для диаметра частиц отображает возможный разброс размеров частиц в липосомальной дисперсии, найденный по распределению Гаусса. Погрешность для дзета-потенциала соответствует среднеквадратичному отклонению по 5 измерениям.

Исследование методом атомно-силовой микроскопии (АСМ)

Форма и размер комплексов, формируемых липосомами с нуклеиновыми кислотами, может влиять на эффективность проникновения липосомальных систем в клетки организма [39, 40]. Для определения морфологии полученных агрегатов было проведено исследование их структуры с помощью атомно-силовой микроскопии. Для этого формировали комплексы липосом (с составом амфирил: РС: Chol 5:5:3 масс.%) с РНК (Type VI from *Torula yeast*) в соотношении катионный/ионизируемый липид: РНК (N:P) = 1:32. Полученные комплексы наносили на свежесколотую слюду и высушивали на воздухе. Изображения интактных молекул РНК, адсорбированных на поверхности слюды, приведены на рис. 2. Это нитевидные структуры высотой около 0.5 нм, имеющие утолщения и ветвления, что, скорее всего, является отображением вторичной структуры молекулы.

Типичные АСМ-изображения липосомальных комплексов с РНК представлены на рис. 3, где справа (панели 3*в*, 3*е*, 3*и*) также приведены примеры вертикального профиля каждого вида комплексов. На образцах 5*а* и 5*с* явно наблюдаются нитевидные структуры РНК, расположенные внутри или поверх участка, сформированного молекулами липидов. Свободной РНК, не связанной с амфифилами, не наблюдается. Комплексы на основе соединения 4*с* (рис. 3*а-б*) на поверхности слюды выглядят глобулами высотой 15–20 нм и диаметром 50–100 нм (вероятно, РНК находится внутри этих комплексов). Морфология таких частиц соответствует размерам липосом, определенным методом ДРС. Комплексы на основе ионизируемого липида 5*а* (рис. 3*г-д*) представляют полностью плоские, высотой 0.5–0.6 нм, или частично глобулярные, высотой до 7 нм, объекты в зависимости от процедуры нанесения на поверхность слюды. Плоские структуры образуются при наличии стадии промывки образца в ходе его приготовления. В этом случае как по краям, так и внутри плоского слоя различимы нитевидные структуры, скорее всего, являющиеся молекулами РНК. Более высокие структуры образуются, когда образец не промывался водой. Можно предположить, что такой вариант приготовления образца приводит к лучшему сохранению трехмерной формы комплексов липосом с РНК. В этих структурах также можно наблюдать нитевидные структуры РНК по периметру липосом. В результате обоих вариантов приготовления образца образуются комплексы,

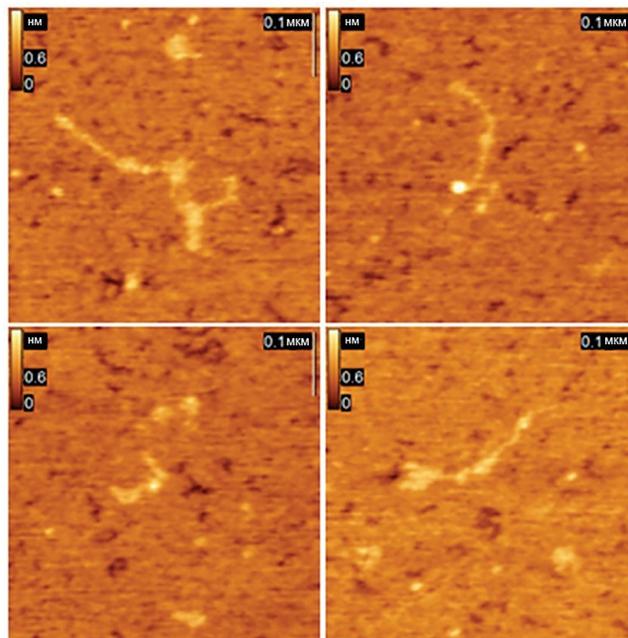


Рис. 2. Подборка АСМ-изображений молекул РНК (Type VI from *Torula yeast*), адсорбированных на поверхности слюды.

существенным образом отличающиеся от липосом без РНК. Это может быть результатом компактизации амфифильных структур при взаимодействии с нуклеиновой кислотой. Комплексы на основе амфирила 5*с* (рис. 3*ж-з*), для которого размер частиц был сопоставим с размером липосом на основе образца 4*с*, также имеют схожую, но более плоскую морфологию. На данных комплексах различимы два уровня: первый высотой около 6 нм является плоским и образует структуры примерно округлой формы диаметром от 50 до 200 нм; он может соответствовать липидному бислою, сформировавшемуся на слюде после адсорбции комплекса. Сверху на этом слое и внутри него находятся фибриллярные структуры высотой около 4 нм относительно данного слоя, которые могут соответствовать молекулам РНК, окруженным липидами. По полученным результатам видно, что все три синтезированных амфирила способны связываться с молекулами РНК из раствора. Это является одним из основных условий применимости липосомальных систем в качестве средств доставки нуклеиновых кислот в клетки организма.

Таким образом, в данной работе были синтезированы новые амфифилы на основе дигексадецилового диэфира *L*-глутаминовой кислоты и алифатических аминокислот (глицин, β-аланин и γ-аминомасляная кислота) как

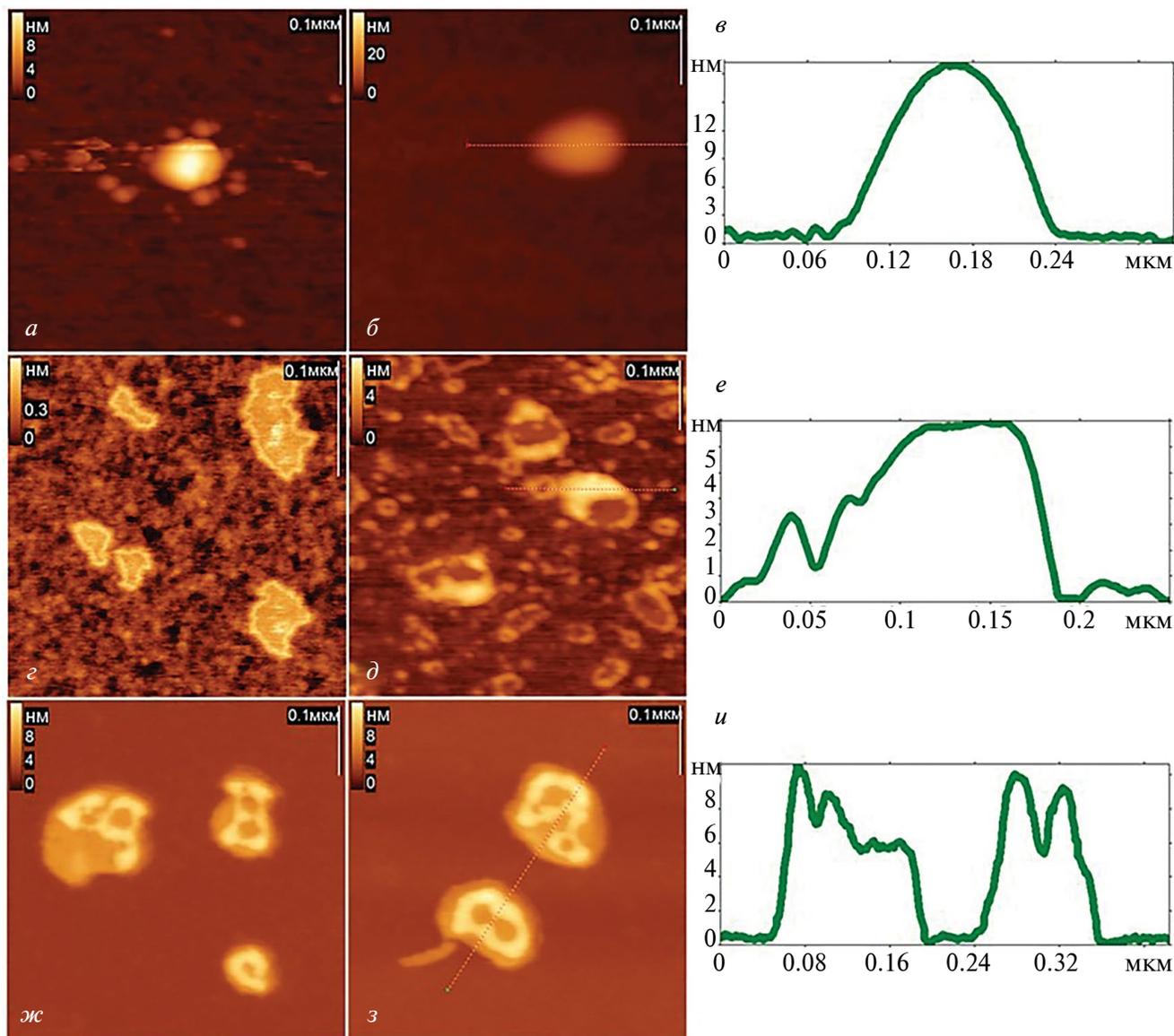


Рис. 3. *а-б, в-д, ж-з* – АСМ-изображения комплексов РНК с липосомами на основе **4а** (*а-б*), **5а** (*в-д*) и **5с** (*ж-з*), нанесенных на поверхность слюды. *в, е, и* – Вертикальный профиль поверхности, проведенный вдоль линий на соответствующих АСМ-изображениях (*б, д, з*). Размеры изображений $500 \times 500 \text{ nm}^2$ (*а-б, д, ж-з*) и $300 \times 300 \text{ nm}^2$ (*в*).

структурные компоненты катионных/ионизируемых липосом для транспорта нуклеиновых кислот в клетки. На основе полученных соединений были сформированы липосомальные частицы, средний диаметр которых оказался около 100 нм. Такое значение размера коллоидных частиц находится в пределах допустимого диапазона значений (до 300 нм), что может увеличивать их проникающую способность к целевым мишеням в организме. Данные по изучению стабильности полученных липосом показали возможность их хранения в течение 5–7 суток при комнатной температуре. С помощью метода

атомно-силовой микроскопии было показано, что полученные липосомальные частицы могут связывать и компактизировать молекулы РНК из раствора, формируя соответствующие комплексы для доставки нуклеиновых кислот в клетки. Таким образом, полученные комплексы имеют потенциал для дальнейшего изучения в качестве средств доставки терапевтических молекул к мишеням и могут быть использованы для экспериментов *in vitro* на клеточных культурах.

Вклад авторов. Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

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

Источники финансирования. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА при поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения № 075–15–2021–689 от 01.09.2021 г.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gonzalez G.A., Hosseinidoust Z. 2020. Liposomes for antibiotic encapsulation and delivery. *ACS Infect. Dis.* **6** (5), 896.
- Guimarães D., Cavaco-Paulo A., Nogueira E. 2021. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *Int. J. Pharm.* **601**, 120571.
- Jahn A., Vreeland W.N., DeVoe D.L., Locascio L.E., Gaitan M. 2007. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir.* **23** (11), 6289–6293.
- Wang L., Xing H., Guo S., Cao W., Zhang Z., Huang L., Xin S., Luo Y., Wang Y., Yang J. 2023. Negatively charged phospholipids doped liposome delivery system for mRNA with high transfection efficiency and low cytotoxicity. *Drug Deliv.* **30** (1), 2219869.
- Пашков Е.А., Коротышева М.О., Пак А.В., Файзулов Е.Б., Сидоров А.В., Поддубиков А.В., Быстрицкая Е.П., Дронина Ю.Е., Солнцева В.К., Зайцева Т.А., Пашков Е.П., Быков А.С., Свищич О.А., Зверев В.В. Исследование противогриппозной активности комплексов миРНК против клеточных генов FLT4, Nup98 и Nup205 на модели *in vitro*. 2022. *Тонкие Химические Технологии.* **17** (2), 140.
- Wang H., Yuan Y., Qin L., Yue M., Xue J., Cui Z., Zhan X., Gai J., Zhang X., Guan J., Mao S. 2024. Tunable rigidity of PLGA shell-lipid core nanoparticles for enhanced pulmonary siRNA delivery in 2D and 3D lung cancer cell models. *JCR.* **366**, 746.
- Haase F., Pohmerer J., Yazdi M., Grau M., Zeyn Y., Wilk U., Burghardt T., Höhn M., Hieber C., Bros M., Wagner E., Berger S. 2024. Lipoamino bundle LNPs for efficient mRNA transfection of dendritic cells and macrophages show high spleen selectivity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **194**, 95.
- Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Perez Marc G., Moreira E.D., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Roychoudhury S., Koury K., Li P., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W. Jr, Hammit L.L., Tureci O., Nell H., Schaefer A., Unal S., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Sahin U., Jansen K.U., Gruber W.C., Group C.C.T. 2020. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **383**, 26032615.
- Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Roupheal N., Creech C.B., McGettigan J., Khetan S., Segall N., Solis J., Brosz A., Fierro C., Schwartz H., Neuzil K., Corey L., Gilbert P., Janes H., Follmann D., Marovich M., Mascola J., Polakowski L., Ledgerwood J., Graham B.S., Bennett H., Pajon R., Knightly C., Leav B., Deng W., Zhou H., Han S., Ivarsson M., Miller J., Zaks T., Group C.S. 2021. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **384**, 403.
- He H., Yuan D., Wu Y., Cao Y. 2019. Pharmacokinetics and pharmacodynamics modeling and simulation systems to support the development and regulation of liposomal drugs. *Pharmaceutics.* **11**(3), 110.
- Maritim S., Boulas P., Lin Y. 2021. Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes. *Int. J. Pharm.* **592**, 1200051.
- Sakuma T., Makino K., Terada H., Takeuchi I., Mitova V., Troev K. 2023. Synthesis and characterization of amphiphilic diblock polyphosphoesters containing lactic acid units for potential drug delivery applications. *Molecules.* **28** (13), 5243.
- Kheoane P.S., Enslin G.M., Tarirai C. 2023. Formulation and characterization of liposomes containing drug absorption enhancers for optimized anti-HIV and antimalarial drug delivery. *Drug Deliv. Transl. Res.* **13** (5), 1358–1371.
- Cui S., Wang Y., Gong Y., Lin X., Zhao Y., Zhi D., Zhou Q., Zhang S. 2018. Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups. *Toxicol. Res. (Camb).* **7** (3), 473–479.
- Denieva Z.G., Koloskova O.O., Gileva A.M., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. 2023. Mixed cationic liposomes based on L-amino acids as efficient delivery systems of therapeutic molecules into cells. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A.* **17**, 136–147.
- Gileva A.M., Koloskova O.O., Nosova A.S., Vishniakova L.I., Egorenkov E.A., Smirnov V.V., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L., Khaitov, M.R., Markvicheva, E.A. 2023. Transfection efficacy and drug release depends upon the PEG derivative in cationic lipoplexes: Evaluation in 3D *in vitro* model and *in vivo*. *J. Biomed. Mater. Res. B.* **111** (9), 1614–1628.
- Inoh Y., Hirose T., Yokoi A., Yokawa S., Furuno T. 2020. Effects of lipid composition in cationic liposomes on suppression of mast cell activation. *Chem. Phys. Lipids.* **231**, 104948.

18. Rana S., Bhatnagar A., Singh S., Prabhakar N. 2022. Evaluation of liver specific ionizable lipid nanocarrier in the delivery of siRNA. *Chem. Phys. Lipids*. **246**, 105207.
19. Settanni G., Brill W., Haas H., Schmid F. 2022. pH-dependent behavior of ionizable cationic lipids in mRNA-carrying lipoplexes investigated by molecular dynamics simulations. *Macromol Rapid Commun.* **43** (12), e2100683.
20. Sun Y., Zhao Y., Zhao X., Lee R.J., Teng L., Zhou C. 2017. Enhancing the therapeutic delivery of oligonucleotides by chemical modification and nanoparticle encapsulation. *Molecules*. **22** (10), 1724.
21. Pandey H., Rani R., Agarwal V. Liposome and their applications in cancer therapy. 2016. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **59**, e16150477.
22. Liu H.M., Zhang Y.F., Xie Y.D., Cai Y.F., Li B.Y., Li W., Zeng L.Y., Li Y.L., Yu R.T. Hypoxia-responsive ionizable liposome delivery siRNA for glioma therapy. 2017. *Int. J. Nanomed.* **12**, 1065–1083.
23. Liu Y., Huang L. 2010. Designer lipids advance systemic siRNA delivery. *Mol. Ther.* **18** (4), 669–670.
24. Koloskova O.O., Nikonova A.A., Budanova U.A. 2016. Synthesis and evaluation of novel lipopeptide as a vehicle for efficient gene delivery and gene silencing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **102**, 159–167.
25. Filatova S.M., Denieva Z.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. 2020. Synthesis of low-molecular-weight antibacterial peptide mimetics based on dialkyl- and diacylamines. *Moscow Univ. Chem. Bull.* **75**, 320–327.
26. Shantanu P. 2023. Liposomes for drug delivery: review of vesicular composition, factors affecting drug release and drug loading in liposomes. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **51** (1), 428–440.
27. Briuglia M.L., Rotella C., McFarlane A., Lamprou D.A. 2015 Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv. Transl. Res.* **5**, 231–242.
28. Nakhaei P., Margiana R., Bokov D.O., Abdelbasset W.K., Jadidi Kouhbanani M.A., Varma R.S., Marofi F., Jarahian M., Beheshtkhoo N. 2021. Liposomes: Structure, biomedical applications, and stability parameters with emphasis on cholesterol. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 705886.
29. Jeong M., Lee Y., Park J., Jung H., Lee H. 2023. Lipid nanoparticles (LNPs) for in vivo RNA delivery and their breakthrough technology for future applications. *Adv. Drug Del. Rev.* **200**, 114990.
30. El Moukhtari S.H., Garbayo E., Amundarain A., Pascual-Gil S., Carrasco-León A., Prosper F., Agirre X., Blanco-Prieto M.J. 2023. Lipid nanoparticles for siRNA delivery in cancer treatment. *JCR.* **361**, 130–146.
31. Denieva Z.G., Romanova N.A., Bodrova T.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. 2019. Synthesis of amphiphilic peptidomimetics based on the aliphatic derivatives of natural amino acids. *Moscow Univ. Chem. Bull.* **74**, 300–305.
32. Xu G., Chen B., Guo B., He D., Yao S. 2011. Detection of intermediates for the Eschweiler-Clarke reaction by liquid-phase reactive desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst.* **136** (11), 2385–2390.
33. Waghule T., Saha R.N., Alexander A., Singhvi G. 2022. Tailoring the multi-functional properties of phospholipids for simple to complex self-assemblies. *JCR.* **349**, 460–474.
34. Khalil R.A., Zarrari A.A. 2014. Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Appl. Surf. Sci.* **318**, 85–89.
35. Denieva Z.G., Budanova U.A., Sebyakin Y.L. 2021. Irregular cationic lipotetrapeptides for pharmaceutical multifunctional transport systems. *Mend. Commun.* **31** (4), 509–511.
36. Fondjo E.S., Njoya A.S., Tamokou J.D., Doungmo G., Lenta B.N., Simon P.F.W., Tsopmo A., Kuate J.-R. 2022. Synthesis, characterization and antimicrobial properties of two derivatives of pyrrolidine-2,5-dione fused at positions-3,4 to a dibenzobarrelene backbone. *BMC Chemistry.* **16**, 8.
37. Liu Y., Castro Bravo K.M., Liu J. 2021. Targeted liposomal drug delivery: a nanoscience and biophysical perspective. *Nanoscale Horiz.* **6** (2), 78–94.
38. Carrasco M.J., Alishetty S., Alameh M.G., Said H., Wright L., Paige M., Soliman O., Weissman D., Cleveland T.E. IV, Grishaev A., Buschmann M.D. 2021. Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. *Commun. Biol.* **4**, 956.
39. Ma B., Zhang S., Jiang H., Zhao B., Lv H. 2007. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *JCR.* **123** (3), 184–194.
40. Inoh Y., Nagai M., Matsushita K., Nakanishi M., Furuno T. 2017. Gene transfection efficiency into dendritic cells is influenced by the size of cationic liposomes/DNA complexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **102**, 230–236.

Cationic and Ionizable Amphiphiles Based on Di-Hexadecyl Ester of *L*-Glutamic Acid for Liposomal Transport of RNA

G. A. Bukharin^a, U. A. Budanova^a, Z. G. Denieva^{b, *}, E. V. Dubrovin^{b, c}, Yu. L. Sebyakin^a

^aMIREA – Russian Technological University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

^bFrumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^cLomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: zaret03@mail.ru

Various RNAs are among the most promising and actively developed therapeutic agents for the treatment of tumors, infectious diseases and a number of other pathologies associated with the dysfunction of specific genes. Some nanocarriers are used for the effective delivery of RNAs to target cells, including liposomes based on cationic and/or ionizable amphiphiles. Cationic amphiphiles contain a protonated amino group and exist as salts in an aqueous environment. Ionizable amphiphiles are a new generation of cationic lipids that exhibit reduced toxicity and immunogenicity and undergo ionization only in the acidic environment of the cell. In this work we developed a scheme for the preparation and carried out the synthesis of new cationic and ionizable amphiphiles based on natural amino acids (*L*-glutamic acid, glycine, beta-alanine, and gamma-aminobutyric acid). Cationic and ionizable liposomes were formed based on the obtained compounds, mixed with natural lipids (phosphatidylcholine and cholesterol), and their physicochemical characteristics (particle size, zeta potential, and storage stability) were determined. Average diameter of particles stable for 5–7 days did not exceed 100 nm. Zeta potential of cationic and ionizable liposomes was about 30 and 1 mV, respectively. The liposomal particles were used to form complexes with RNA molecules. Such RNA complexes were characterized by atomic force microscopy and their applicability for nucleic acid transport was determined.

Keywords: ionizable aminolipids, cationic lipopeptides, di-ester of *L*-glutamic acid, liposomes, RNA complexes, atomic force microscopy.

УДК 577.125.3:577.115.3

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА *Urocitellus undulatus*

© 2024 г. Т. П. Кулагина^а, *, И. М. Вихлянецв^б, А. В. Ариповский^с, С. С. Попова^б, А. Б. Гапеев^а

^аИнститут биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушино, 142290 Россия

^бИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, 142290 Россия

^сНаучно-производственная компания «А-БИО»,

Пушино, 142290 Россия

*e-mail: tpkulagina@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.03.2024

После доработки 02.05.2024

Принята к печати 06.05.2024

Исследованы сезонные изменения жирнокислотного состава в четырех скелетных мышцах истинного гибернанта якутского длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus*. Исследования проводили на животных четырех экспериментальных групп: летние активные, осенние активные, зимние спящие и зимние активные. Обнаружено увеличение общего количества жирных кислот в зимний период в четырехглавой мышце бедра (*m. vastus lateralis*), трехглавой мышце предплечья (*m. triceps*) и поясничной мышце (*m. psoas*). В зимний период наблюдалось уменьшение суммарного количества насыщенных жирных кислот во всех мышцах, включая икроножную (*m. gastrocnemius*). Увеличение суммарного количества моновенасыщенных жирных кислот у зимних спящих животных происходило в четырехглавой мышце бедра, трехглавой мышце предплечья и в поясничной мышце. У зимних активных животных увеличивалось суммарное содержание полиненасыщенных жирных кислот в четырехглавой мышце бедра и поясничной мышце. Статистически значимое уменьшение содержания пальмитиновой кислоты у спящих и зимних активных сусликов по сравнению с летними и осенними животными обнаружено во всех исследованных мышцах. Количество пальмитолеиновой кислоты увеличивалось у спящих животных в четырехглавой мышце бедра и поясничной мышце. В трехглавой мышце предплечья количество пальмитолеиновой кислоты повышалось у осенних активных и зимних спящих особей. Количество олеиновой кислоты было повышено во всех мышцах у зимних спящих животных по отношению к активным осенним животным. Содержание линолевой кислоты возрастало у зимних активных сусликов во всех мышцах, кроме икроножной. В осенний период во всех мышцах возрастало количество дигомо-гамма-линоленовой кислоты с уменьшением ее содержания у зимних спящих и зимних активных животных до уровня летнего (сезонного) контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что большинство изменений жирнокислотного состава имеют одинаковую направленность во всех четырех исследованных скелетных мышцах длиннохвостого суслика. Обсуждается возможная роль сезонных изменений жирнокислотного состава и участия жирных кислот в биохимических процессах в мышечной ткани длиннохвостого суслика.

Ключевые слова: гибернация, длиннохвостый суслик *Urocitellus undulatus*, скелетные мышцы, жирные кислоты

DOI: 10.31857/S0233475524040041, EDN: axcznz

ВВЕДЕНИЕ

Исследование биохимических механизмов гипобиоза важно для экспериментальной биологии и медицины [1, 2]. Зимнеспящие животные являются удобной моделью для изучения биохимических процессов, происходящих в организме

в период подготовки к спячке и во время самой спячки. Спячка появилась у различных видов млекопитающих как адаптивная стратегия выживания в суровых зимних условиях окружающей среды, включая низкие температуры и нехватку пищи. Чтобы сохранить энергию в течение длительного периода зимнего голодания,

у впадающих в спячку особей происходит снижение скорости метаболизма в течение длительных периодов глубокого оцепенения, характеризующихся отсутствием физической активности, снижением частоты сердечных сокращений и дыхания, а также снижением температуры тела [3, 4]. Состояние гибернации характеризуется биохимическими перестройками, которые включают переход от окисления углеводов к окислению липидов. Липиды являются основным энергетическим топливом во время гибернации. В этой ситуации триацилглицериды гидролизуются из жировых запасов и жирные кислоты (ЖК) высвобождаются в кровоток [5]. Увеличение окисления ЖК во время гибернации поддерживается активацией генов и белков в мышцах сусликов [6–8]. Скелетные мышцы составляют примерно 40% массы тела и обеспечивают около 30% расхода энергии в состоянии покоя [9]. Это основной орган окисления ЖК и углеводов [10]. Исследование сезонных изменений содержания ЖК, которые участвуют во многих физиологических процессах в организме, важно для понимания молекулярных механизмов адаптации мышечной ткани и организма в целом к условиям гибернации [11–13].

Целью исследования является определение сезонных изменений содержания ЖК в четырех скелетных мышцах длиннохвостого якутского суслика *Urocyon undulatus*: в икроножной мышце (*m. gastrocnemius*), четырехглавой мышце бедра (*m. vastus lateralis*), трехглавой мышце предплечья (*m. triceps*) и поясничной мышце (*m. psoas*). Мышцы задних (*m. vastus lateralis*, *m. gastrocnemius*) и передних (*m. triceps*) конечностей функционально неактивны в период гибернации и претерпевают атрофические изменения, а поясничная мышца *m. psoas*, предположительно, участвует в поддержании позы тела суслика в период спячки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на истинном гибернанте длиннохвостом якутском суслике *Urocyon undulatus*. Животные были отловлены в окрестностях города Якутска (долина реки Лена, Якутия) и содержались в виварии ИБК РАН в индивидуальных клетках при свободном доступе к воде и пище, естественном освещении, температуре воздуха 20–21°C и влажности 65–70% [14]. В экспериментах использовали животных обоих полов массой 550–750 г. В исследованиях использовали четыре группы животных: «Летние активные» (июнь–июль,

температура тела +38°C, $n = 7$); «Осенние активные» (октябрь–ноябрь, температура тела +38°C, $n = 7$); «Зимние спящие» (январь–февраль, глубокое оцепенение, температура сердечной мышцы 1.5–2.0°C, температура тела +4°C, продолжительность периода гипотермии 5–11 сут, $n = 7$); «Зимние активные» (январь–февраль, нормотермия/межбавтная активность, 36–37°C. Животных выводили из спячки путем перемещения в лабораторную комнату с температурой воздуха $19.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$, взятие материала проводили через 5–14 ч эутермного состояния после пробуждения, $n = 7$). Процедура мониторинга и отбора животных проводилась сотрудниками лаборатории механизмов природного и искусственного гипобиоза (ИБК РАН, рук. лаб. Н.М. Захарова) и подробно описана в работе [15]. Спящих животных декапитировали с помощью гильотины. Активные суслики предварительно подвергались анестезии зоветилом (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) (4 мг/кг, внутримышечно).

Отбирали образцы следующих скелетных мышц: *m. psoas* (поясничная мышца, расположена в латеральной поясничной области между позвоночником и краем малого таза, участвует в сгибании поясничного отдела позвоночника); *m. vastus lateralis* (четырёхглавая мышца бедра, латеральная широкая мышца бедра, участвует в разгибании коленного сустава и перемещении голени вперед); *m. gastrocnemius* (икроножная мышца, мышца задней поверхности голени, участвует в сгибании стопы в голеностопном суставе и сгибании конечности в коленном суставе); *m. triceps* (трехглавая мышца плеча, мышца-разгибатель задней группы плеча, принимает участие в разгибании предплечья). Образцы мышечной ткани замораживали в жидком азоте и хранили при -75°C .

Подготовка образцов для хроматографии, а также определение состава и содержания ЖК в мышцах на аналитическом газовом хроматографе описаны ранее [16]. Определяли общее количество свободных и связанных ЖК в тканях суммированием количества всех индивидуальных ЖК в каждом образце и выражали в мкг/мг ткани. Содержание каждой индивидуальной кислоты выражали в процентах от общего количества ЖК в ткани. Нормальность распределения данных оценивали по тесту Шапиро–Уилка. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характерной особенностью скелетных мышц являлось статистически значимое увеличение общего количества ЖК (в мкг/мг ткани) в зимний период в четырехглавой мышце бедра, трехглавой мышце предплечья и поясничной мышце (табл. 2–4). В икроножной мышце увеличения общего количества ЖК не происходило. В зимний период также происходило уменьшение суммарного содержания насыщенных жирных кислот (НЖК) во всех мышцах (табл. 1–4). У спящих особей наблюдалось увеличение суммарного количества мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) в четырехглавой мышце бедра, трехглавой мышце предсердия и поясничной мышце (табл. 2–4). В икроножной мышце увеличения количества МНЖК не происходило (табл. 1). Суммарное количество полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) увеличивалось у зимних активных животных в четырехглавой мышце бедра (табл. 2) и поясничной мышце (табл. 4). Во всех исследованных мышцах наблюдалось статистически значимое снижение количества пальмитиновой кислоты у спящих и зимних активных сусликов по сравнению с летними и осенними животными (табл. 1–4). Количество пальмитолеиновой кислоты увеличивалось у спящих животных в четырехглавой (табл. 2), трехглавой (табл. 3) и поясничной (табл. 4) мышцах. В трехглавой мышце предплечья количество этой кислоты увеличивалось также и у осенних активных сусликов (табл. 3). В поясничной мышце обнаружено статистически значимое увеличение содержания стеариновой кислоты в осенний период по отношению к летним, спящим и зимним активным животным (табл. 4). Количество олеиновой кислоты было повышено во всех мышцах у спящих сусликов по отношению к осенним активным животным (табл. 1–4). Содержание линолевой кислоты возрастало у зимних активных сусликов во всех мышцах, кроме икроножной (табл. 2–4). Увеличение содержания α -линоленовой кислоты происходило только в икроножной мышце у зимних активных животных (табл. 1). Количество дигомо-гамма-линоленовой кислоты (ДГЛК) возрастало во всех мышцах в осенний период со снижением у спящих и зимних активных животных до уровня летних особей (табл. 1–4). Содержание арахидоновой кислоты увеличивалось в поясничной мышце только в осенний период (табл. 4). У спящих и зимних активных сусликов наблюдалось статистически значимое уменьшение количества ω -6 докозатетраеновой и ω -6 докозопентаеновой кислот по сравнению

с летними и/или с осенними животными соответственно (табл. 1–4). Количество ω -3 докозопентаеновой кислоты возрастало в икроножной (табл. 1), четырехглавой (табл. 2) и поясничной (табл. 4) мышцах у осенних активных животных по отношению к летним. Содержание ω -3 докозопентаеновой кислоты увеличивалось у осенних активных животных только в поясничной мышце (табл. 4), тогда как в других скелетных мышцах сезонных изменений ее количества не наблюдалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение количества ЖК в четырехглавой мышце бедра, трехглавой мышце предплечья и поясничной мышце (табл. 2–4) у сусликов в зимний период, вероятно, обусловлено снижением скорости метаболизма, отсутствием физической активности и снижением температуры тела с сопутствующим увеличением энергосбережения [3, 4]. Снижение суммарного количества НЖК в зимний период в скелетных мышцах якутских сусликов, вероятно, связано с тем, что мелкие гетеротермные млекопитающие имеют тенденцию обогащать свои ткани и мембраны ПНЖК перед гибернацией [17, 18]. Полиненасыщенные жирные кислоты могут оказывать сильное влияние на спячку и дневное оцепенение у млекопитающих. Было обнаружено, что высокое содержание ПНЖК в рационе зимне спящих животных повышает предрасположенность к оцепенению, снижает температуру тела, продлевает продолжительность приступов оцепенения и замедляет потерю массы во время гибернации. У свободноживущих альпийских сурков (*Marmota marmota*) доля ω -6 ПНЖК в фосфолипидах мембран увеличивается непосредственно перед гибернацией, демонстрируя высокое количество этих ЖК в фосфолипидах зимой [18]. Серые мышинные лемуры (*M. murinus*) также преимущественно сохраняют ПНЖК в тканях и мембранах своего тела во время зимнего сезона, что выражается в усилении оцепенения в ответ на ограничение калорийности [19]. Наши результаты, свидетельствующие о стабильном содержании ПНЖК в икроножной мышце (табл. 1) и трехглавой мышце предплечья (табл. 3) у длиннохвостого суслика на протяжении всего годового цикла, не противоречат выше процитированным данным. Полагают, что ω -6 ПНЖК не используются для окисления, а сохраняются в тканях и мембранах гибернантов для увеличения энергосбережения во время гибернации за счет более глубоких и продолжительных периодов оцепенения [17, 18]. Кроме того, некоторые

Таблица 1. Сезонные изменения жирнокислотного состава в икроножной мышце (*m. gastrocnemius*) сусликов. Содержание ЖК представлено в % от их общего количества в ткани

Жирная кислота	Сезонное состояние животных			
	Летние активные	Осенние активные	Зимние спящие	Зимние активные
Пальмитиновая C16:0	15.15 ± 0.79	14.87 ± 0.62	10.49 ± 0.23***а, б	8.16 ± 0.56***а, б
Пальмитолеиновая C16:1 (ω-7)	3.59 ± 0.65	3.11 ± 0.48	4.80 ± 0.51	5.02 ± 0.39
Стеариновая C18:0	13.17 ± 1.63	14.38 ± 1.07	12.31 ± 0.89	12.22 ± 0.99
Олеиновая C18:1 (ω-9)	22.90 ± 4.06	18.18 ± 2.04	27.29 ± 1.54**б	25.96 ± 1.81*б
Вакценовая C18:1 (ω-11)	2.49 ± 0.42	3.15 ± 0.83	3.15 ± 0.12	2.98 ± 0.87
Линолевая C18:2 (ω-6)	25.44 ± 1.62	27.30 ± 0.64	26.39 ± 1.38	29.78 ± 1.14
α-линоленовая C18:3 (ω-3)	1.60 ± 0.50	1.59 ± 0.49	2.39 ± 0.79	4.07 ± 0.32***а, б
Дигомо-γ-линоленовая C20:3 (ω-6)	0.38 ± 0.05	0.71 ± 0.07***а	0.45 ± 0.04**б	0.35 ± 0.04***б
Арахидоновая C24:4 (ω-6)	9.80 ± 1.58	9.29 ± 0.89	8.37 ± 0.76	8.38 ± 0.88
Докозатетраеновая C22:4 (ω-6)	0.52 ± 0.08	0.54 ± 0.08	0.24 ± 0.05**а, б	0.22 ± 0.02**а, б
Докозапентаеновая C22:5 (ω-6)	1.23 ± 0.35	0.49 ± 0.10	0.33 ± 0.08**а	0.21 ± 0.02***а
Докозапентаеновая C22:5 (ω-3)	1.52 ± 0.25	2.79 ± 0.35***а	1.40 ± 0.15**б	1.57 ± 0.21**б
Докозагексаеновая C22:6 (ω-3)	2.62 ± 0.47	3.21 ± 0.40	2.36 ± 0.22	1.99 ± 0.21
Сумма НЖК	28.32 ± 2.28	29.24 ± 1.00	22.80 ± 0.78	20.38 ± 0.78**а, б
Сумма МНЖК	28.97 ± 4.66	24.44 ± 2.51	35.24 ± 2.03	33.96 ± 2.10
Сумма ПНЖК	42.71 ± 2.85	45.91 ± 2.09	41.93 ± 1.43	46.57 ± 1.71
Количество ЖК, мкг/мг ткани	19.10 ± 2.43	17.64 ± 2.84	23.09 ± 1.78	25.84 ± 1.86

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ^а – различия достоверны по отношению к летним животным; ^б – различия достоверны по отношению к осенним животным. $n = 7$.

ω-6 и ω-3 ЖК из мембранных фосфолипидов являются пулами-предшественниками, которые служат субстратами для ферментов эйкозаноидного каскада в большинстве тканей [20]. Обращает на себя внимание сравнительно высокое содержание ω-6 полиненасыщенной линолевой кислоты в скелетных мышцах длиннохвостого суслика в течение всего годового цикла, а также увеличение содержания этой кислоты во всех исследованных мышцах в период зимней активности (табл. 1–4). Полагают, что гибернанты с высоким уровнем линолевой кислоты могут предотвращать развитие воспалительных процессов посредством активации сигнального механизма NF-κB в тканях [21]. Высокое содержание ω-6

линолевой кислоты, обнаруженное нами в скелетных мышцах длиннохвостого суслика, не сопровождалось увеличением содержания арахидоновой кислоты, предшественником синтеза которой она является (табл. 1–4). Увеличение содержания арахидоновой кислоты наблюдалось только в поясничной мышце у осенних активных животных с последующим уменьшением содержания этой кислоты до уровня летнего (сезонного) контроля (табл. 4). Отсутствие изменений количества арахидоновой кислоты в мышцах спящих и зимних активных животных может свидетельствовать о том, что в мышечной ткани сусликов не происходит увеличения провоспалительных эйкозаноидов [22, 23].

Таблица 2. Сезонные изменения жирнокислотного состава в четырехглавой мышце бедра (*m. vastus lateralis*) сусликов. Содержание ЖК представлено в % от их общего количества в ткани

Жирная кислота	Сезонное состояние животных			
	Летние активные	Осенние активные	Зимние спящие	Зимние активные
Пальмитиновая C16:0	16.09 ± 1.00	14.63 ± 0.42	9.33 ± 0.96***а, б	9.56 ± 0.36***а, **б
Пальмитолеиновая C16:1 (ω-7)	2.75 ± 0.21	3.21 ± 0.32	4.44 ± 0.52**а, *б	3.71 ± 0.17
Стеариновая C18:0	12.78 ± 1.30	14.01 ± 0.47	13.11 ± 1.26	13.66 ± 0.44
Олеиновая C18:1 (ω-9)	23.38 ± 2.68	18.77 ± 1.13	26.95 ± 1.64*б	22.64 ± 0.78
Вакценовая C18:1 (ω-11)	2.51 ± 0.42	3.22 ± 0.12	3.08 ± 0.16	3.28 ± 0.19
Линолевая C18:2 (ω-6)	24.92 ± 0.65	27.86 ± 0.70	27.01 ± 1.30	30.26 ± 1.17***а
α-линоленовая C18:3 (ω-3)	1.15 ± 0.27	1.97 ± 0.70	1.96 ± 0.57	2.79 ± 0.44
Дигомо-γ-линоленовая C20:3 (ω-6)	0.36 ± 0.03	0.66 ± 0.07***а	0.43 ± 0.04***б	0.36 ± 0.03***б
Арахидоновая C24:4 (ω-6)	10.09 ± 0.93	8.67 ± 0.37	9.01 ± 1.23	9.38 ± 0.46
Докозатетраеновая C22:4 (ω-6)	0.50 ± 0.05	0.60 ± 0.09	0.25 ± 0.05*б	0.34 ± 0.09
Докозапентаеновая C22:5 (ω-6)	1.01 ± 0.11	0.41 ± 0.05***а	0.40 ± 0.12***а	0.29 ± 0.04***а
Докозапентаеновая C22:5 (ω-3)	1.48 ± 0.16	2.46 ± 0.20**а	1.66 ± 0.23*б	1.81 ± 0.18*б
Докозагексаеновая C22:6 (ω-3)	2.62 ± 0.35	2.83 ± 0.19	2.46 ± 0.33	2.25 ± 0.15
Сумма НЖК	28.86 ± 2.20	28.64 ± 0.86	22.44 ± 1.09*а, *б	23.21 ± 0.36*а, *б
Сумма МНЖК	28.64 ± 2.83	25.20 ± 1.41	34.47 ± 2.13*б	29.63 ± 0.82
Сумма ПНЖК	42.13 ± 1.10	45.46 ± 0.82	43.19 ± 1.60	47.48 ± 0.84**а, *в
Количество ЖК, мкг/мг ткани	14.48 ± 1.93	15.24 ± 1.47	23.08 ± 2.48*а, *б	22.01 ± 1.47

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ^а – различия достоверны по отношению к летним животным; ^б – различия достоверны по отношению к осенним животным; ^в – различия достоверны по отношению к зимним спящим животным. $n = 7$.

Во всех исследуемых скелетных мышцах длиннохвостого суслика в период осенней активности наблюдалось увеличение количества ω-6 ДГЛК. Она образуется в результате метаболизма гамма-линоленовой кислоты (ω-6, 18:3) и может включаться преимущественно в состав фосфолипидов клеточных мембран. Механизмы действия ДГЛК на клеточном уровне еще недостаточно изучены. Известно, что при активации клеток мембраносвязанная ДГЛК высвобождается под действием фермента фосфолипазы А₂ и является субстратом циклооксигеназы-2 (СОХ-2) для синтеза простагландинов первой серии, обладающих противовоспалительными свойствами. Показано, что при введении ДГЛК

в рацион человека и животных происходило избирательное увеличение синтеза простагландинов, в частности противовоспалительного простагландина Е1. Связываясь через G-белок с соответствующими рецепторами простагландин Е1 запускает сигнальные механизмы, стимулирующие экспрессию ряда генов путем активации транскрипционных факторов, что оказывает положительные эффекты при ряде заболеваний. Помимо простагландинов серии 1 ДГЛК превращается в лейкотриены серии 3, которые также обладают противовоспалительными свойствами [24, 25]. На клеточных линиях человека и мыши показано, что ДГЛК ослабляет управляемую хемокинами миграцию моноцитов, влияет

Таблица 3. Сезонные изменения жирнокислотного состава в трехглавой мышце предплечья (m. triceps) сусликов. Содержание ЖК представлено в % от их общего количества в ткани

Жирная кислота	Сезонное состояние животных			
	Летние активные	Осенние активные	Зимние спящие	Зимние активные
Пальмитиновая C16:0	15.14 ± 0.50	13.58 ± 0.61	9.63 ± 0.67**a	9.44 ± 0.82***a
Пальмитолеиновая C16:1 (ω-7)	1.87 ± 0.10	3.31 ± 0.57*а	3.66 ± 0.43*а	2.76 ± 0.39
Стеариновая C18:0	13.83 ± 0.98	13.98 ± 0.92	13.29 ± 0.92	13.80 ± 0.79
Олеиновая C18:1 (ω-9)	22.96 ± 1.86	19.23 ± 2.22	26.75 ± 1.54*б	21.98 ± 0.70
Вакценовая C18:1(ω-11)	2.51 ± 0.34	3.15 ± 0.13	3.08 ± 0.19	2.98 ± 0.22
Линолевая C18:2 (ω-6)	25.68 ± 0.60	29.42 ± 0.79	27.45 ± 1.15	32.45 ± 1.43***a,**b
α-Линоленовая C18:3 (ω-3)	0.65 ± 0.11	1.68 ± 0.56	2.67 ± 1.14	2.11 ± 0.36
Дигомо-γ-линоленовая C20:3 (ω-6)	0.39 ± 0.05	0.71 ± 0.08***a	0.46 ± 0.05**б	0.36 ± 0.03***б
Арахидоновая C20:4 (ω-6)	10.34 ± 0.39	8.22 ± 0.78	8.42 ± 0.85	8.92 ± 0.63
Докозатетраеновая C22:4 (ω-6)	0.62 ± 0.03	0.55 ± 0.08	0.29 ± 0.06***a,**б	0.27 ± 0.02***a,**б
Докозапентаеновая C22:5 (ω-6)	1.29 ± 0.11	0.44 ± 0.05***a	0.43 ± 0.12***a	0.36 ± 0.05***a
Докозапентаеновая C22:5 (ω-3)	1.85 ± 0.25	2.54 ± 0.31	1.50 ± 0.16*б	1.81 ± 0.19
Докозагексаеновая C22:6 (ω-3)	2.53 ± 0.35	2.74 ± 0.37	2.24 ± 0.24	2.01 ± 0.14
Сумма НЖК	28.97 ± 1.11	27.57 ± 1.22	22.91 ± 1.18***a,*б	23.25 ± 0.77***a,*б
Сумма МНЖК	27.34 ± 1.94	25.69 ± 2.77	33.49 ± 1.96*б	27.72 ± 0.87
Сумма ПНЖК	43.35 ± 0.89	46.28 ± 1.83	43.47 ± 1.94	48.29 ± 1.43
Количество ЖК, мкг/мг ткани	13.21 ± 0.98	15.94 ± 2.58	22.49 ± 1.78***a	22.93 ± 1.90***a

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ^a – различия достоверны по отношению к летним животным; ^б – различия достоверны по отношению к осенним животным; ^в – различия достоверны по отношению к зимним спящим животным. $n = 7$.

на передачу сигналов γ-интерферона, улучшает биоэнергетический профиль митохондрий макрофагов [26]. Обнаруженное нами повышенное содержание ω-6 ДГЛК в четырех скелетных мышцах длиннохвостого суслика в период осенней активности возможно связано с изменениями, происходящими в этот период в сократительном аппарате мышечных волокон. В частности, в скелетных мышцах длиннохвостого суслика обнаружены так называемые «fast-to-slow» изменения в изоформном составе основного сократительного белка миозина, сопровождающиеся увеличением доли «медленной» изоформы I тяжелой цепи этого белка [27].

Обсуждая полученные результаты о содержании докозатетраеновой и докозапентаеновой кислот, предшественником синтеза которых является арахидоновая кислота, следует обратить внимание на уменьшение содержания этих кислот в мышцах суслика в зимний период, в особенности, в период зимней спячки (табл. 1–4). Показано, что ω-6- и ω-3-формы докозапентаеновой кислоты являются сильными ингибиторами индуцированного сфингозилфосфорилхолином спазма гладких мышц сосудов и, в частности, гладкой мускулатуры коронарной артерии человека [28]. Известно также, что уменьшение содержания этих кислот может быть следствием неферментативного окисления, в частности

Таблица 4. Сезонные изменения количества жирных кислот в поясничной мышце (*m. psoas*) сусликов. Содержание ЖК представлено в % от их общего количества в ткани

Жирная кислота	Сезонное состояние животных			
	Летние активные	Осенние активные	Зимние спящие	Зимние активные
Пальмитиновая C16:0	14.76 ± 0.70	14.59 ± 0.63	9.50 ± 0.49***а, б	11.49 ± 0.29***а, б,*в
Пальмитолеиновая C16:1 (ω-7)	3.16 ± 0.41	2.81 ± 0.46	5.24 ± 0.47**а, б	3.99 ± 0.32*в
Стеариновая C18:0	8.32 ± 0.75	13.34 ± 1.12***а	9.69 ± 0.46**б	9.69 ± 0.54**б
Олеиновая C18:1(ω-9)	31.49 ± 3.03	20.36 ± 2.20***а	34.76 ± 1.14***б	25.72 ± 2.10*в
Вакценовая C18:1(ω-11)	3.55 ± 0.30	3.40 ± 0.31	4.20 ± 0.12	3.75 ± 0.23
Линолевая C18:2 (ω-6)	28.09 ± 1.42	29.70 ± 1.17	27.13 ± 1.40	34.34 ± 1.62*а, б,**в
α-Линоленовая (ω-3)	1.02 ± 0.19	1.17 ± 0.38	1.54 ± 0.60	2.05 ± 0.28
Дигомо-γ-линоленовая C20:3 (ω-6)	0.26 ± 0.01	0.71 ± 0.05***а	0.33 ± 0.03***б	0.27 ± 0.02***б
Арахидоновая C20:4 (ω-6)	5.42 ± 1.00	7.76 ± 0.55*а	5.12 ± 0.54*б	5.63 ± 0.37*б
Докозатетраеновая C22:4 (ω-6)	0.42 ± 0.07	0.59 ± 0.08*а	0.23 ± 0.03***а, б	0.20 ± 0.02***а, б
Докозапентаеновая C22:5 (ω-6)	0.71 ± 0.13	0.42 ± 0.06*а	0.35 ± 0.07**а	0.24 ± 0.03***а, б,*в
Докозапентаеновая C22:5 (ω-3)	1.15 ± 0.17	2.57 ± 0.34***а	0.99 ± 0.11***б	1.29 ± 0.18***б
Докозагексаеновая C22:6 (ω-3)	1.58 ± 0.28	2.45 ± 0.35*а	1.39 ± 0.17**б	1.36 ± 0.14**б
Сумма НЖК	23.07 ± 1.18	27.93 ± 1.23***а	19.19 ± 0.45*а,***б	21.17 ± 0.72***б
Сумма МНЖК	38.21 ± 3.27	26.56 ± 2.53***а	44.19 ± 1.42***б	33.47 ± 2.17**в
Сумма ПНЖК	38.66 ± 2.57	45.38 ± 2.01	37.08 ± 1.81*б	45.39 ± 1.74*в
Количество ЖК, мкг/мг ткани	19.94 ± 2.57	13.65 ± 1.79	31.86 ± 3.38*а,***б	29.46 ± 2.13**б

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ^а – различия достоверны по отношению к летним животным; ^б – различия достоверны по отношению к осенним животным; ^в – различия достоверны по отношению к зимним спящим животным. $n = 7$.

докозатетраеновой кислоты, с последующим образованием изопростаноидов. Эти вещества являются важными липидными медиаторами в биологических процессах, таких как восстановление тканей, свертывание крови, проницаемость кровеносных сосудов, воспаление, а также регуляция иммунитета [29]. Показано, что в коронарных артериях крупного рогатого скота докозатетраеновая кислота вызывает эндотелий-зависимую релаксацию, опосредованную циклооксигеназой и метаболитами цитохрома P-450 [30]. Можно предположить, что пониженное содержание вышеуказанных ЖК, обнаруженное нами в скелетных мышцах суслика в период спячки, играет роль в поддержании

необходимого уровня сократительной активности гладких мышц сосудов и, таким образом, поддержании нужного уровня кровотока в период гипотермии.

Достоверное снижение количества насыщенной пальмитиновой кислоты во всех исследованных скелетных мышцах длиннохвостого суслика в зимний период может свидетельствовать об одинаковом характере процессов, протекающих в них. Однако какова конкретная роль этих изменений сказать сложно, поскольку пальмитиновая кислота участвует во многих процессах, протекающих в организме млекопитающих [31–33]. В частности, она может использоваться в качестве энергетического субстрата в цикле

лимонной кислоты. На изолированных сердцах сусликов Ричардсона показано, что вклад окисления пальмитата как источника ацетил-КоА был значительно выше в сердце животных в период гипотермии [34]. Учитывая обнаруженное нами уменьшение содержания насыщенной пальмитиновой кислоты во всех исследованных скелетных мышцах длиннохвостого суслика в период гибернации (табл. 1–4), можно предположить, что эта кислота используется в качестве одного из основных энергетических субстратов. Хотя в экспериментах на ночных летучих мышах (*Nyctalus noctu*) показано, что в качестве окислительного топлива как во время их оцепенения, так и во время их пробуждения используется в большей мере линолевая, а не пальмитиновая кислота [35]. Тем не менее, эти данные не исключают правомерность высказанного выше предположения относительно длиннохвостого суслика, поскольку содержание пальмитиновой кислоты и ее роль в мышечной ткани в зимний период, по-видимому, отличается у разных видов зимнеящих животных. Так, в плазме и мышечной ткани бурого медведя доля пальмитиновой кислоты была значительно выше во время зимнего сна по сравнению с летним периодом [36]. Пальмитат также может играть некую роль в процессах протеолиза, снижения синтеза мышечных белков и активности mTORC1 [37]. В частности, показано, что пальмитиновая кислота участвует в развитии стресса эндоплазматического ретикулума, который, в свою очередь, запускает запрограммированную гибель клеток посредством апоптоза. При этом имеются данные, полученные на культуре миобластов, что активация стресса эндоплазматического ретикулума сопровождается не только усилением апоптоза, но и увеличивает образование миофибрилл [38]. Учитывая ранее опубликованные данные о том, что оборот (turnover) гигантских мышечных белков активируется в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика в период зимней активности [39], можно полагать, что пальмитиновая кислота играет некую роль в обновлении саркомерных белков и восстановлении их сниженного содержания в период спячки.

Увеличение суммарного количества МНЖК у зимних спящих животных обусловлено увеличением содержания в этот период пальмитолеиновой и олеиновой кислот. Пальмитолеиновая кислота (16:1, ω -7) синтезируется из пальмитиновой кислоты под действием стеарилоил-КоА-дегидрогеназы-1. Эта кислота участвует в регуляции многих биологических функций *in vitro* и *in vivo*. Она участвует в метаболических

процессах подавления экспрессии провоспалительных генов, в первую очередь за счет инактивации главного провоспалительного фактора транскрипции NF- κ B, снижая, таким образом, продукцию цитокинов и предотвращая воспаление тканей [40]. Ее количество определяется активностью сигнального пути mTOR, который является центральным регулятором липогенеза на уровне транскрипции [41]. Показано, что пальмитолеиновая кислота является положительным модулятором липолиза белого жира посредством механизма, который включает увеличение содержания липазы триглицеридов жировой ткани и требует активации ядерного рецептора PPAR α [42]. Показано, что в фосфолипидах митохондрий печени тринадцатиполосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) обнаружено увеличение содержания пальмитолеиновой кислоты в межбаутный период, которое положительно коррелировало с митохондриальным дыханием [43]. Учитывая эти данные и полученные нами результаты, можно предположить, что накопление пальмитолеиновой кислоты в мышцах длиннохвостого суслика в период гипотермии и некоторое ее повышенное содержание в период зимней (межбаутной) активности может быть связано с ремоделированием фосфолипидов мембран митохондрий.

Обсуждая повышенное содержание мононенасыщенной олеиновой кислоты в скелетных мышцах якутского суслика в период зимней спячки, следует отметить следующие данные. Показано, что увеличение количества олеиновой кислоты в рационе желто-соснового бурундука *Eutamias amoenus* приводило к увеличению продолжительности оцепенения (баута спячки), а также к снижению температуры тела во время оцепенения [44]. Подобные эффекты эта кислота оказывает, по-видимому, и при спячке бурого медведя [36]. На мухах (*Sarcophaga crassipalpis*) показано, что олеиновая кислота способствует текучести клеточных мембран при низкой температуре, а также позволяет им сохранять жидкокристаллическое состояние при повышении температуры [45]. Таким образом, повышенное содержание олеиновой кислоты в мышцах длиннохвостого суслика, по всей вероятности, имеет важное значение как в период оцепенения, способствуя увеличению продолжительности бауты спячки, так и в период выхода из этого состояния, способствуя адаптации клеточных мембран к повышению температуры. Однако у ехидны *Tachyglossus aculeatus* (*Monotremata*) в отличие от мелких зимнеящих млекопитающих после 5 месяцев гибернации количество

пальмитолеиновой и олеиновой кислот снижалось. Вероятно, в отличие от зимнеящих грызунов впадающие в спячку ехидны в значительной степени используют МНЖК в качестве топлива для зимней спячки [46]. Эти данные указывают на различия в способах получения энергии у разных видов зимнеящих животных.

Полученные нами данные свидетельствуют о значительных сезонных изменениях содержания ЖК в скелетных мышцах истинного гибернанта длиннохвостого суслика. Анализ сезонных изменений содержания ЖК на основе имеющихся литературных данных позволяет говорить о роли ЖК не только в качестве источников энергии, но и в качестве важных регуляторов различных биохимических процессов в период гибернации. Результаты данного исследования свидетельствуют о согласованности изменений количественного содержания ЖК в разных скелетных мышцах длиннохвостого суслика, что только подтверждает важную роль ЖК в адаптации мышечной системы и организма в целом к условиям зимней спячки. Однако для более детального выяснения роли индивидуальных ЖК в механизмах зимней спячки необходимы дальнейшие исследования.

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

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках Госзадания № 075–00609–24–01 на 2024–2026 гг. от 07.02.2024 г. и № 075–00224–24–03 на 2024–2026 гг.

В работе использованы материалы Экспериментального генетического криобанка Института биофизики клетки РАН (г. Пущино, Московской обл.).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Самойлов А.С., Ушаков И.Б., Сапеецкий А.О., Сапееcki Н.В., Тимофеев Н.Н. 2017. Перспективы применения искусственной гибернации в медицине экстремальных ситуаций. *Медицина экстремальных ситуаций*. **59** (1), 78–88.
- Макаров А.Ф., Ткачук Ю.В., Тоньшин А.А., Бухтияров И.В. 2023. Искусственный гипобиоз как способ защиты организма в условиях острой гипобарической гипоксии. *Медицина труда и промышленная экология*. **63** (2), 102–108.
- Ruf T., Geiser F. 2015. Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **90** (3), 891–926.
- Giroud S., Habolde C., Nespolo R.F., Mejías C., Terrien J., Logan S.M., Henning R.H., Storey K.B. 2020. The torpid state: Recent advances in metabolic adaptations and protective mechanisms. *Front Physiol.* **11**, 623665.
- Chazarin B., Storey K.B., Ziemianin A., Chanon S., Plumel M., Chery I. Durand C., Evans A.L., Arnetto J.M., Zedrosser A., Swenson J.E., Gauquelin-Koch G., Simon C., Blanc S., Lefai E., Bertile F. 2019. Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle. *Front Zool.* **16**, 12.
- Yan J., Barnes B.M., Kohl F., Marr T.G. 2008. Modulation of gene expression in hibernating arctic ground squirrels. *Physiol Genomics*. **32** (2), 170–181.
- Vermillion K.L., Anderson K.J., Hampton M., Andrews M.T. 2015. Gene expression changes controlling distinct adaptations in the heart and skeletal muscle of a hibernating mammal. *Physiol. Genomics*. **47** (3), 58–74.
- Anderson K.J., Vermillion K.L., Jagtap P., Johnson J.E., Griffin T.J., Andrews M.T. 2016. Proteogenomic analysis of a hibernating mammal indicates contribution of skeletal muscle physiology to the hibernation phenotype. *J. Proteome Res.* **15** (4), 1253–1261.
- Frampton J., Murphy K.G., Frost G., Chambers E.S. 2020. Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nat. Metab.* **2** (9), 840–848.
- Erickson M.L., Esser K.A., Kraus W.E., Buford T.W., Redman L.M. 2021. A role for exercise to counter skeletal muscle clock disruption. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **49** (1), 35–41.
- Rosa Neto J.C., Calder P.C., Curi R., Newsholme P., Sethi J.K., Silveira L.S. 2021. The immunometabolic roles of various fatty acids in macrophages and lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (16), 8460.
- Harwood J.L. 2023. Polyunsaturated fatty acids: Conversion to lipid mediators. roles in inflammatory diseases and dietary sources. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(10), 8838.
- Sánchez-Alegría K., Arias C. 2023. Functional consequences of brain exposure to saturated fatty acids: From energy metabolism and insulin resistance to neuronal damage. *Endocrinol. Diabetes Metab.* **6** (1), e386.
- Карадудева Е.И., Санталова И.М., Захарова Н.М. 2014. Особенности молекулярных и морфологических изменений в кардиомиоцитах зимнеящих сусликов в разные периоды годового цикла. *Биофизика*. **59** (5), 926–932.
- Захарова Н.М. 2014. Некоторые особенности разогрева гибернирующих сусликов *Spermophilus undulatus* при вызванном пробуждении. *Фундаментальные исследования*. № 6, 1401–1405.
- Кулагина Т.П., Грицына Ю.И., Ариповский А.И., Жалимов В.К., Вихлянцев И.М. 2018. Содержание жирных кислот в поперечно-полосатых мышцах хронически-алкоголизованных крыс. *Биофизика*. **63** (5), 1004–1013.

17. Ruf T., Arnold W. 2008. Effects of polyunsaturated fatty acids on hibernation and torpor: a review and hypothesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294** (3), R1044–R1052. doi 10.1152/ajpregu.00688.2007
18. Arnold W., Ruf T., Frey-Roos F., Bruns U. 2011. Diet-independent remodeling of cellular membranes precedes seasonally changing body temperature in a hibernator. *PLoS One.* **6** (4), e18641.
19. Giroud S., Perret M., Gilbert C., Zahariev A., Goudable J., Le Maho Y., Oudart H., Momken I., Aujard F., Blanc S. 2009. Dietary palmitate and linoleate oxidations, oxidative stress, and DNA damage differ according to season in mouse lemurs exposed to a chronic food deprivation. *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* **297**, R950–R959.
20. Giroud S., Evans A.L., Chery I., Bertile F., Tascher G., Bertrand-Michel J., Gauquelin-Koch G., Arnemo J.M., Swenson J.E., Lefai E., Blanc S. 2018. Seasonal changes in eicosanoid metabolism in the brown bear. *Naturwissenschaften.* **105** (9–10), 58.
21. Logan S.M., Watts A.J., Posautz A., Küber-Heiss A., Painer J., Stalder G., Giroud S. Storey K.B. 2020. The ratio of linoleic and linolenic acid in the pre-hibernation diet influences NF- κ B signaling in garden dormice during torpor. *Front Mol. Biosci.* **7**, 97.
22. Rett B.S., Whelan J. 2011. Increasing dietary linoleic acid does not increase tissue arachidonic acid content in adults consuming Western-type diets: A systematic review. *Nutr. Metab.(Lond.).* **8**, 36.
23. Innes J. K., Calder P. C. 2018. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* **132**, 41–48.
24. Sergeant S., Rahbar E., Chilton F.H. 2016. Gamma-linolenic acid, dihomogamma-linolenic acid, eicosanoids and inflammatory processes. *Eur. J. Pharmacol.* **785**, 77–86.
25. Wang X., Lin H., Gu Y. 2012. Multiple roles of dihomogamma-linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids Health Dis.* **11**, 25. doi 10.1186/1476–511X-11–25
26. Gallagher H., Williams J.O., Ferekidis N., Ismail A., Chan Y.H., Michael D.R., Guschina I.A., Tyrrell V.J., O'Donnell V.B., Harwood J.L., Khozin-Goldberg I., Boussiba S., Ramji D.P. 2019. Dihomo- γ -linolenic acid inhibits several key cellular processes associated with atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1865** (9), 2538–2550.
27. Лазарева М.В., Трапезникова К.О., Вихлянец И.М., Бобылев А.Г., Климов А.А., Подлубная З.А. 2012. Сезонные изменения изоформного состава тяжелых цепей миозина скелетных мышц зимоспящего суслика *Spermophilus undulatus*. *Биофизика.* **57** (6), 982–987.
28. Zhang Y., Zhang M., Lyu B., Kishi H., Kobayashi S. 2017. Omega-3 and omega-6 DPA equally inhibit the sphingosylphosphorylcholine-induced Ca²⁺-sensitization of vascular smooth muscle contraction via inhibiting Rho-kinase activation and translocation. *Sci. Rep.* **7**, 36368. doi 10.1038/srep36368
29. Galano J-M., Lee J.C.-Y., Gladine C., Comte B., Le Guennec J.-Y., Oger C., Durand T. 2015. Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of adrenic, docosahexaenoic, eicosapentaenoic and α -linolenic acids; bioactivities and potential use as biomarkers. *Biochim Biophys Acta.* **1851** (4), 446–455.
30. Yi X.Y., Gauthier K.M., Cui L., Nithipatikom K., Falck J.R., Campbell W.B. 2007. Metabolism of adrenic acid to vasodilatory 1 α ,1 β -dihomo-epoxyeicosatrienoic acids by bovine coronary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292** (5), H2265–H2274.
31. Murru E., Manca C., Carta G., Banni S. 2022. Impact of dietary palmitic acid on lipid metabolism. *Front Nutr.* **9**, 861664.
32. Seufert A.L., Napier B.A. 2023. A new frontier for fat: dietary palmitic acid induces innate immune memory. *Immunometabolism (Cobham).* **5** (2), e00021.
33. Yang X., Chatterjee V., Ma Y., Zheng E., Yuan S.Y. 2020. Protein palmitoylation in leukocyte signaling and function. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 600368. doi 10.3389/fcell.2020.600368
34. Belke D.D., Wang L.C., Lopaschuk G.D. 1998. Acetyl-CoA carboxylase control of fatty acid oxidation in hearts from hibernating Richardson's ground squirrels. *Biochim. Biophys. Acta.* **1391** (1), 25–36.
35. Rosner E., Voigt C.C. 2018. Oxidation of linoleic and palmitic acid in pre-hibernating and hibernating common noctule bats revealed by 13C breath testing. *J. Exp. Biol.* **221** (4), jeb168096.
36. Giroud S., Chery I., Bertile F., Bertrand-Michel J., Tascher G., Gauquelin-Koch G., Arnemo J.M., Swenson J.E., Singh N.J., Lefai E., Evans A.L., Simon C., Blanc S. 2019. Lipidomics reveals seasonal shifts in a large-bodied hibernator, the brown bear. *Front. Physiol.* **10**, 389.
37. Deldicque L., Cani P.D., Philp A., Raymackers J.M., Meakin P.J., Ashford M.L., Delzenne N.M., Francaux M., Baar K. 2010. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: Potential role in the downregulation of protein synthesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E695–E705.
38. Nakanishi K., Dohmae N., Morishima N. 2007. Endoplasmic reticulum stress increases myofiber formation in vitro. *FASEB J.* **21** (11), 2994–3003.
39. Popova S., Ulanova A., Gritsyna Y., Salmov N., Rogachevsky V., Mikhailova G., Bobylev A., Bobyleva L., Yutskevich Y., Morenkov O., Zakharova N., Vkhlyantsev I. 2020. Predominant synthesis of giant myofibrillar proteins in striated muscles of the long-tailed ground squirrel *Urocyon undulatus* during interbout arousal. *Sci Rep.* **10** (1), 15185.
40. Souza C.O., Teixeira A.A., Biondo L.A., Silveira L.S., Calder P.C., Neto J.C.R. 2017. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NF κ B, independently of PPARs. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **44** (5), 566–575. doi 10.1111/1440–1681.12736
41. Yin G., Wang Y., Cen X.-M., Yang Y., Yang M., Xie Q.-B. 2017. Identification of palmitoleic acid controlled by mTOR signaling as a biomarker of polymyositis. *J. Immunol. Res.* **2017**, 3262384. doi 10.1155/2017/3262384
42. Bolsoni-Lopes A., Festuccia W.T., Farias T.S.M., Chimin P., Torres-Leal F.L., Derogis P.B.M., de Andrade P.B., Miyamoto S., Lima F.B., Curi R.,

- Alonso-Vale M.I.C. 2013. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR α -dependent manner. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305** (9), E1093–E1102.
43. Armstrong A., Thomas R.H., Price E.R., Guglielmo C.G., Staples J.F. 2011. Remodeling mitochondrial membranes during arousal from hibernation. *Physiol. Biochem. Zool.* **84** (4), 438–449. doi 10.1086/660892
44. Geiser F., McAllan B. M., Kenagy G. J. 1994. The degree of dietary fatty acid unsaturation affects torpor patterns and lipid composition of a hibernator. *J. Comp. Physiol. B.* **164** (4), 299–305.
45. Michaud M.R., Denlinger D.L. 2006. Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect. Physiol.* **52** (10), 1073–1082.
46. Falkenstein F., Körtner G., Watson K., Geiser F. 2001. Dietary fats and body lipid composition in relation to hibernation in free-ranging echidnas. *J. Comp. Physiol. B.* **171** (3), 189–194.

Seasonal Changes in the Content of Fatty Acids in the Skeletal Muscles of the Long-Tailed Ground Squirrel *Urocitellus undulatus*

T. P. Kulagina^{1,*}, I. M. Vikhlyantsev², A. V. Aripovsky³, S. S. Popova², A. B. Gapeyev¹

¹*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences – a separate division of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research” of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

²*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

³*Research and production company “A-BIO”, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia 142290*

*e-mail: tpkulagina@rambler.ru

Seasonal changes in the fatty acid composition in four skeletal muscles of the true hibernant Yakut long-tailed ground squirrel *Urocitellus undulatus* were studied. Measurements were taken on animals of four experimental groups: summer active, autumn active, winter dormant, and winter active. An increase in the total amount of fatty acids was found in winter in the quadriceps muscle of the thigh (*m. vastus lateralis*), the triceps muscle of the forearm (*m. triceps*), and the psoas muscle (*m. psoas*). In all muscles, including *m. gastrocnemius*, a decrease in the total amount of saturated fatty acids was observed in winter. An increase in the total amount of monounsaturated fatty acids in winter hibernating animals occurred in the quadriceps femoris muscle, triceps muscle of the forearm, and in the psoas muscle. In winter active animals, the total content of polyunsaturated fatty acids in the quadriceps femoris and psoas muscles increased. A significant decrease in palmitic acid content in sleeping and winter active ground squirrels compared to summer and autumn animals was found in all muscles studied. The amount of palmitoleic acid significantly increased in sleeping animals in the quadriceps femoris and psoas muscles. In the triceps muscle of the forearm, the amount of palmitoleic acid increased in autumn active and winter dormant individuals. The amount of oleic acid was increased in all muscles of winter hibernating animals relative to active autumn animals. The content of linoleic acid significantly increased in winter active ground squirrels in all muscles except the gastrocnemius. In the autumn period the amount of dihomo-gamma-linolenic acid also increased in all muscles, with a significant decrease in its content in winter sleeping and winter active animals to the level of summer (seasonal) control. The results obtained indicate that most changes in fatty acid composition have the same direction in all four studied skeletal muscles of the long-tailed ground squirrel. Possible roles of seasonal changes in fatty acid composition and the participation of fatty acids in biochemical processes in the muscle tissue of the long-tailed ground squirrel are discussed.

Keywords: hibernation, long-tailed ground squirrel, *Urocitellus undulatus*, skeletal muscles, fatty acids

УДК 577.175.6

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА И МЕМБРАННОГО КОМПОНЕНТА РЕЦЕПТОРА ПРОГЕСТЕРОНА В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ И ТКАНЯХ САМЦОВ И САМОК КРЫС

© 2024 г. А. Д. Дмитриева^а, И. А. Морозов^б, А. М. Кархов^а, П. М. Рубцов^б, О. В. Смирнова^а, Т. А. Щелкунова^{а,*}

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: schelkunova-t@mail.ru

Поступила в редакцию 06.06.2024

После доработки 28.06.2024

Принята к печати 02.07.2024

Прогестерон регулирует репродуктивные процессы и влияет на многие функции различных нерепродуктивных органов. Его эффекты в организме млекопитающих и человека опосредуются ядерными (nPRs) и мембранными рецепторами прогестерона (mPRs). Действие прогестерона через разные типы рецепторов существенно различается, а также имеет тканеспецифические особенности. Экспрессия известных типов и подтипов рецепторов прогестерона в тканях самцов и самок крыс изучена фрагментарно. Целью нашей работы было изучение экспрессии пяти генов mPRs, а также гена nPRs и мембранного компонента рецептора прогестерона PGRMC I в репродуктивных органах и в 17 нерепродуктивных тканях самцов и самок крыс методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени. В данной работе было показано, что высокий уровень экспрессии гена nPRs у крыс обнаруживается не только в репродуктивных органах самок (матка, яичник, молочные железы), но и в семенных пузырьках самцов, в мозге и в трахее у обоих полов, в сосудах и в поджелудочной железе самок. Самый высокий уровень экспрессии генов mPRs всех субтипов обнаружен в семенниках, а экспрессия гена, кодирующего nPRs, в них практически не выявляется. В печени и селезенке самцов и самок крыс также была выявлена экспрессия генов, кодирующих mPRs, а экспрессия гена, кодирующего nPRs, была на фоновом уровне. Не выявляется экспрессия генов nPRs, mPRs и мембранного компонента прогестеронового рецептора (PGRMC I) в мышцах, очень низок ее уровень в сердце у животных обоего пола. Было показано, что экспрессия mPRs ядерных и мембранных рецепторов у крыс в нерепродуктивных тканях зависит от пола. У самок преобладает транскрипция nPRs и трех субтипов mPRs (α , β , δ), а у самцов двух субтипов mPRs (γ , ϵ). Данные о наличии рецепторов прогестерона в тканях, не участвующих в репродукции, подтверждают действие прогестерона на эти органы. Высокие уровни mPRs различных рецепторов прогестерона в тканях самцов крыс, таких как поджелудочная железа, легкие, почка, трахея, свидетельствуют о важной физиологической роли прогестина не только у самок, но и у самцов, которая пока мало изучена. В работе также обсуждаются известные функции рецепторов прогестерона в исследованных тканях.

Ключевые слова: прогестерон, мембранные рецепторы прогестерона, ядерные рецепторы прогестерона, мембранный компонент рецептора прогестерона I, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0233475524040052, EDN: awxmcv

ВВЕДЕНИЕ

Прогестерон первоначально был известен как половой гормон, регулирующий функции женских репродуктивных органов и играющий ключевую роль в развитии и сохранении беременности. Позже выяснилось, что этот гормон влияет на нервные процессы, модулируя поведение, эмоции, регулируя нейрогенез, пластичность

нейронов, миелинизацию, осуществляя нейропротекцию [1, 2]. У мужчин прогестерон контролирует сперматогенез, акросомную реакцию и уровень биосинтеза тестостерона [3, 4]. Он оказывает действие на иммунную систему, на эндокринные клетки, метаболизм жира, ремоделинг костной ткани и на широкий спектр других нерепродуктивных тканей, регулируя пролиферативные процессы и гибель клеток [5–7].

Действие этого гормона тканеспецифично, на одни и те же процессы в разных тканях этот гормон может действовать противоположным образом. Так, на пролиферацию клеток эндометрия матки прогестерон действует подавляюще, но стимулирует пролиферацию гормончувствительных клеток молочной железы и клеток нервной системы — олигодендроцитов, Шванновских клеток [8]. Главным местом синтеза прогестерона у самок млекопитающих является желтое тело яичника и плацента, а у самцов — семенники и кора надпочечников. Классическим способом действия этого гормона является активация ядерных рецепторов (nPRs) — факторов транскрипции, которые непосредственно регулируют экспрессию генов мишеней. Позже идентифицированы мембранные рецепторы прогестерона (mPRs), которые относятся к *adipoQ* семейству рецепторов (PAQR) и включают mPR α (PAQR7), mPR β (PAQR8), mPR γ (PAQR5), mPR δ (PAQR6) и mPR ϵ (PAQR9) [9, 10]. Белки mPR α , β и γ обычно оказывают действие через чувствительные к коклюшному токсину ингибиторные G-белки (Gi), которые подавляют активность аденилатциклазы, что приводит к снижению уровня cAMP. Напротив, mPR δ и ϵ связаны со стимуляторными G-белками (Gs), которые активируют аденилатциклазу и увеличивают уровни cAMP [10]. В действии прогестерона участвует также мембранный компонент прогестеронового рецептора — PGRMC I, который, по-видимому, является адаптерным белком для mPR α и других рецепторов стероидных гормонов, переносящим их на мембрану клетки [11]. Локализация и функции nPRs изучены сравнительно неплохо за более чем полувековую историю исследований. Роль mPRs в организме, их распределение в тканях, механизм действия исследуются интенсивно в последние годы, но эта работа пока далека от завершения.

После идентификации mPRs в 2003 году [9] было проведено много исследований по изучению функций этих белков. Было показано, что через этот тип рецепторов прогестерон осуществляет регуляцию секреции гонадотропин-рилизинг гормона в клетках гипоталамуса и пролактина в лактотрофах гипофиза [12, 13], а также глюкагоноподобного пептида 1 в энтероэндокринных клетках, индуцирует созревание ооцитов у рыб, стимулирует активность и подвижность сперматозоидов, регулирует сократительную активность миомерия [14–16], модулирует работу иммунных клеток, в эндотелии сосудов регулирует продукцию оксида азота, влияет на пролиферацию и метастазирование опухолевых

клеток [17, 18]. Однако роль этих рецепторов в организме изучена мало. Изучение функции мембранных рецепторов прогестерона *in vivo* затруднено тем фактом, что их экспрессия часто осуществляется в тех же клетках, что и экспрессия ядерных рецепторов. В литературе есть примеры разнонаправленного действия прогестерона через эти разные типы рецепторов, например, на сократительную активность клеток миомерия [16]. Для выявления роли mPRs в живом организме одним из подходов является использование селективных лигандов этих рецепторов. Другим подходом к изучению функции этих белков может служить изучение эффектов прогестерона в тканях, клетки которых не содержат ядерных рецепторов. Действие прогестерона в них может быть обусловлено активацией мембранных рецепторов. Примером таких клеток являются Т-лимфоциты, в которых прогестерон через мембранные рецепторы регулирует продукцию цитокинов [5, 19]. Для исследования функций mPRs в организме полезно знать распределение рецепторов в разных тканях. Выявление тканей, клетки которых содержат максимальное количество mPRs, но не имеют nPRs, позволяет изучать эффекты прогестерона, осуществляемые через альтернативный неклассический сигналинг. Кроме того, изучение экспрессии генов mPRs в разных тканях позволяет прогнозировать эффективность действия селективных лигандов этих рецепторов в конкретных органах. Наоборот, эффекты прогестерона с малой степенью вероятности ожидаемы в клетках, где нет экспрессии генов его рецепторов. Экспрессия генов PAQR мало изучена в тканях крыс. Исследовалось наличие mPR α и β в селезенке, сердце, легких, почках, печени, кишечнике и различных отделах головного мозга без количественной оценки [20]. Проведена работа по изучению локализации этих рецепторов в разных отделах центральной нервной системы у самок крыс [20–23], в желтом теле [24] и в матке [25]. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение и количественное сравнение уровня экспрессии генов всех типов рецепторов прогестерона и мембранного компонента в 20 тканях самцов и самок крыс для последующего исследования тканеспецифического и полспецифического действия прогестерона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе образцы тканей получали от 3–5 самок и самцов крыс Wistar. Животных наркотизировали смесью раствора золетила и ксилазина (Virbac, Франция, «Ксиланит»,

ООО «НИТА-ФАРМ», Россия) и подвергали декапитации. Образцы тканей поджелудочной железы, легких, почки, печени, селезенки, надпочечников, сердца, мочевого пузыря, скелетных мышц, кожи, желудка, тонкого и толстого кишечника, жировой ткани, сосудов, трахеи, мозга, семенника, семенных пузырьков, простаты, яичника, матки и молочных желез измельчали и гомогенизировали в реагенте TRIzol (Invitrogen, США) с использованием гомогенизатора тефлон/стекло. Выделение РНК проводили в соответствии с протоколом производителя (Invitrogen, США). Выделенную РНК обрабатывали RQ1 RNase-Free DNase (Promega, США). Чистоту РНК подтверждали путем определения оптической плотности (ОП) при поглощении 260, 280 и 230 нм, и только образцы с соотношением 260/280 и 260/230 между 1.8 и 2.1 использовали в качестве матрицы для синтеза комплементарной ДНК (кДНК). Синтез проводили с помощью набора ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, США) согласно инструкции производителя. Для проверки отсутствия геномной ДНК в препаратах использовали «негативные контроли» без добавления обратной транскриптазы. На «негативных контролях» при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени не образовывалось продукта реакции, либо он образовывался позже на 10 и более циклов ПЦР, чем на соответствующей пробе с синтезированной кДНК. ПЦР проводили с помощью набора с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Синтол, Россия). В работе использовали праймеры, представленные в табл. 1. ПЦР проводилась в следующем режиме: 95°C – 3 мин (общая денатурация); 40 циклов: 95°C – 10 с; 58°C – 20 с; 72°C – 40 с. После фазы амплификации были сняты кривые плавления с шагом 0.5°C от 72 до 95°C, что позволило нам подтвердить амплификацию одного продукта с каждой парой праймеров. Специфичность анализа RTqPCR была установлена путем секвенирования продукта реакции. ПЦР проводили на приборе Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc). Диапазон эффективности реакции амплификации составлял 95–110% для всех используемых пар праймеров. Относительные количества мРНК рассчитывали, используя метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [26] с нормировкой на средние геометрические уровни мРНК двух референсных генов – *GAPDH* и *Sdha* [27]. Для этих генов обнаружилась относительно высокая стабильность экспрессии во всех тканях, в то время как третий выбранный референсный ген *Rsp29* оказался нестабилен и был исключен из расчетов. В качестве калибратора, на который

пересчитывались результаты экспериментов, использовался образец, представляющий из себя смесь РНК всех рассматриваемых тканей самки в равных количествах, на которой синтезировалась кДНК. В калибраторе относительный уровень мРНК каждого целевого гена также рассчитывался по отношению к среднему геометрическому уровню транскриптов референсных генов. Эти значения использовались для нормирования результатов, полученных на образцах изучаемых тканей.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась в программе GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software Inc.США). Данные были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) тестом Краскела–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения по Данну (Dunn's multiple comparisons test). Различия считались достоверными при $p < 0.05$. Значения относительных уровней экспрессии целевых генов в тканях самцов и самок сравнивались при помощи критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Самый высокий уровень экспрессии гена, кодирующего nPRs (рис. 1) наблюдался в матке. Высокий уровень (выше 100% относительно калибратора) был обнаружен у самок в репродуктивных органах – в яичниках, в молочных железах и у самцов – в семенных пузырьках. В нерепродуктивных тканях высокий уровень мРНК nPRs у обоих полов – в мозге и трахее, у самок – в сосудах и поджелудочной железе.

Средний уровень транскриптов nPRs (от 10 до 100% относительно калибратора) обнаружен у обоих полов в легких, у самцов в поджелудочной железе, у самок в почках, мочевом пузыре, коже, жировой ткани.

Экспрессия гена *PGR*, кодирующего nPRs, на низком уровне (2–7% относительно калибратора) у обоих полов наблюдалась в надпочечниках и желудке. Кроме того, в таком диапазоне экспрессия nPRs у самцов выявлялась в ряде органов, в которых у самок она обнаруживалась в значительно более высоких количествах. Это почки, мочевой пузырь, кожа и сосуды. Также низкая экспрессия nPRs у самцов наблюдалась в простате.

Фоновые уровни мРНК nPRs в нерепродуктивных тканях крыс обоих полов были в печени, селезенке, в сердце, мышцах, в тонком и толстом кишечнике. Семенники и жировая ткань самцов также отличались фоновым уровнем мРНК nPRs.

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени

Название праймеров и рецепторов	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер продукта, п.н.	Номер последовательности мРНК в GenBank
GADPH for GADPH rev	5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' 5'-CCTGTTGCTGTAGCCATATTC-3'	201	NM_017008.4
Sdha for Sdha rev	5'-TACACCGAATAAGAGCAAAGAAC-3' 5'-CAGCCAGCACCATAGATACC-3'	184	NM_130428.1
Rsp29 for Rsp29 rev	5'-CTGAAGGCAAGATGGGTAC-3' 5'-GTCGCTTAGTCCAACCTAATGAAG-3'	187	NM_012876.2
PAQR5 for PAQR5 rev mPR γ	5'-ACTATGGTGCAGTCAATCTC-3' 5'-TGGAGTTCAAGAAACCTGGAG-3'	172	NM_001014092.1
PAQR6 for PAQR6 rev mPR δ	5'-GTCTCAAGCTGCCTCAACTC-3' 5'-CGTCTCGTTAGTCATCTGGAAG-3'	140	NM_001191077.1
PAQR7 for PAQR7 rev mPR α	5'-TTCTTGGACTATGTGGGTGTG-3' 5'-CTTCTGGCTGTACTTGTGTAG-3'	174	NM_001415929.1
PAQR8 for PAQR8 rev mPR β	5'-AGTGGCGTTACTACTTCTTCAG-3' 5'-TGAGGTAAGTGATTGACGACAG-3'	189	NM_001014099.1
PAQR9 for PAQR9 rev mPR ϵ	5'-TTCTACCGCCGCTACTTCTG-3' 5'-CATAGATGCTGAGGAAGGTGAAG-3'	142	NM_001271152.2
Pgr for Pgr rev nPRs	5'-GGAGGTCGTAAGTTTAAGAAGTTC-3' 5'-ATGAGCAGGTTGATGAGTGG-3'	173	NM_022847.2
PGRMC I for PGRMC I rev	5'-CTAAGGCGATACGATGGAGTC-3' 5'-GCAGGAGTGAGGTCAGAAAG-3'	212	NM_021766.2

Статистическая достоверность различий в уровне экспрессии мембранных рецепторов и PGRMC I в разных тканях приведена в табл. 2 и 3.

Экспрессия гена рецептора mPR α в нерепродуктивных тканях самцов имеет профиль, близкий к профилю самок (рис. 2). Максимальный уровень этой экспрессии наблюдался у самцов в семенниках, минимальные уровни — у обоих полов в сердце, в толстом кишечнике, фоновый уровень — в мышцах.

Уровень мРНК mPR β во многих нерепродуктивных тканях преобладал у самок (рис. 3, табл. 4). В репродуктивных тканях самцов наблюдались очень высокие уровни мРНК этого рецептора в семенниках и в семенных пузырьках. Самые низкие уровни экспрессии гена рецептора mPR β обнаружены у обоих полов в сердце, надпочечниках, а у самцов также в печени и жировой ткани. В мышцах и у самцов, и у самок экспрессия гена этого рецептора не выявлялась.

Экспрессия гена рецептора mPR γ в нерепродуктивных органах, наоборот, преобладала в ряде тканей самцов, хотя достоверные различия обнаружены только в двух органах (рис. 4, табл. 4). Как и в случае мРНК mPR β , максимальные уровни мРНК рецептора γ выявлены в семенниках самцов. Фоновые уровни мРНК mPR γ в мышцах, в сердце, в надпочечниках и в печени обоих полов.

Ген рецептора mPR δ экспрессируется во многих тканях самок крыс более интенсивно, чем у самцов (рис. 5, табл. 4). Исключением являются почки, где уровень мРНК этого рецептора достоверно выше у самцов. Экспрессия в семенниках гена рецептора δ довольно умеренная, на максимальном уровне она обнаружена у самок в жировой ткани, в сосудах, в молочных железах и в трахее. Самые низкие, почти фоновые уровни мРНК данного субтипа mPRs наблюдались в мышцах и в печени обоих полов.

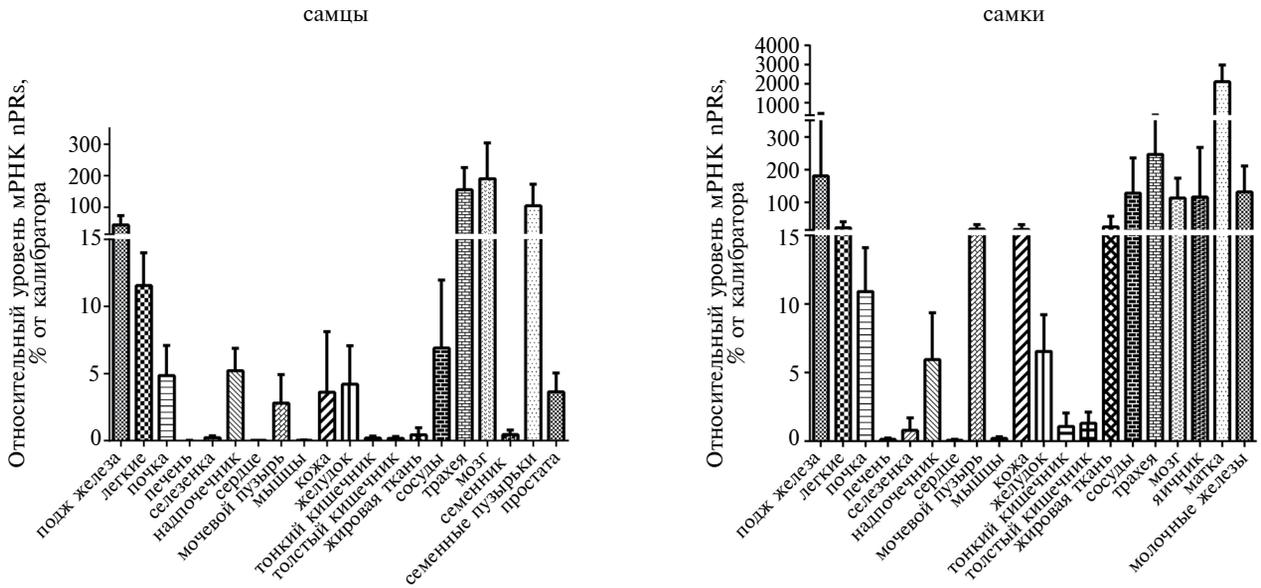


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК pPRs в органах самцов и самок крыс Wistar (нерепродуктивные ткани, $n = 3$, репродуктивные $n = 5$). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

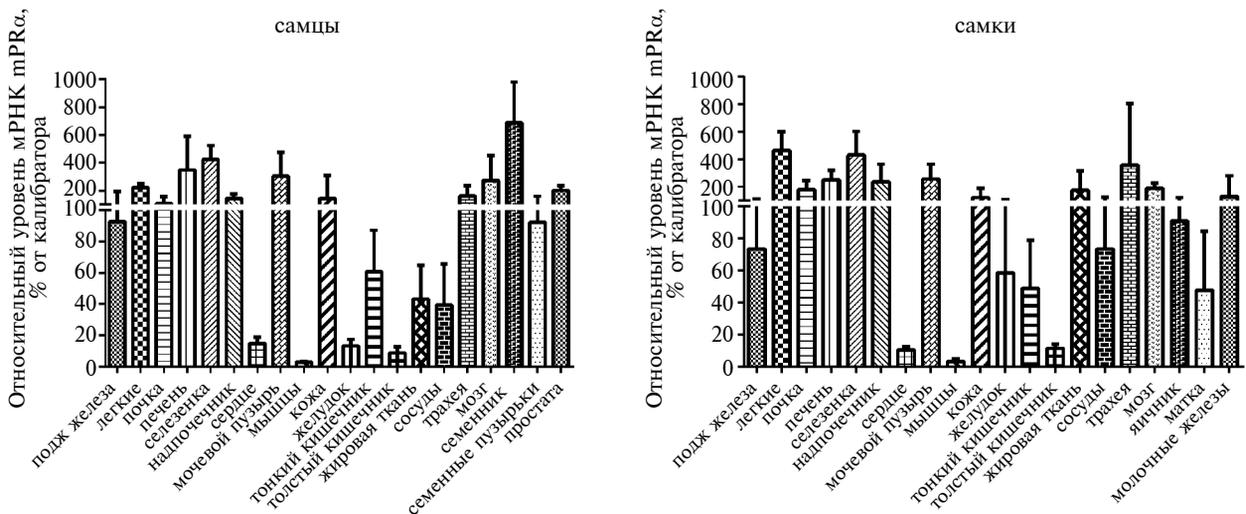


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК mPRα в органах самцов и самок крыс Wistar (нерепродуктивные ткани, $n = 3$, репродуктивные $n = 5$). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

Таблица 2. Достоверные различия относительной экспрессии мРНК мембранных рецепторов прогестерона в тканях самцов крысы

Ткань	mPR α	mPR β	mPR γ	mPR δ	mPR ϵ	PGRMC I
1 – поджелудочная железа	18		18	4, 9, 12, 13		
2 – легкие	7, 9, 11, 13	7, 9	18	4, 6, 7, 9, 11, 12, 13		7, 9, 13, 14, 15, 18
3 – почка	18	18, 19	4, 6, 7, 9, 12, 15	4, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 20	6, 9, 11, 12, 13	7, 9, 13, 15
4 – печень	7, 9, 11, 13	11, 17, 18, 19	3, 8, 10, 18, 20	1, 2, 3, 8, 10, 18, 19	6, 9, 10, 11, 12, 13, 15	5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 18
5 – селезенка	7, 9, 11, 12, 13, 14, 15	9	18	9		4, 6, 20
6 – надпочечники	9	8, 11, 17, 18, 19	3, 8, 10, 18, 20	2, 3, 8, 19	3, 4, 18	5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 18
7 – сердце	2, 4, 5, 8, 17, 18, 20	2, 8, 11, 17, 18, 19, 20	3, 8, 10, 18	2, 3, 8, 10, 18, 19		2, 3, 4, 6, 8, 16, 19, 20
8 – мочевого пузыря	7, 9, 11, 13	6, 7, 9	4, 6, 9, 12	4, 6, 7, 9, 11, 12, 13		7, 9, 13, 14, 15, 18
9 – мышцы	2, 4, 5, 6, 8, 16, 17, 18, 20	2, 5, 8, 11, 17, 18, 19, 20	3, 8, 10, 18	1, 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19	3, 4, 18	2, 3, 4, 6, 8, 16, 19, 20
10 – кожа	18	18, 19	4, 6, 7, 9, 12, 15	4, 7, 9, 12, 13	4, 18	4, 6, 20
11 – желудок	2, 4, 5, 8, 17, 18, 20	4, 6, 7, 9, 14		2, 3, 8, 19	3, 4, 18	
12 – тонкий кишечник	5, 18		3, 8, 10, 18	1, 2, 3, 8, 10, 18, 19	3, 4, 18	4, 6, 20
13 – толстый кишечник	2, 4, 5, 8, 17, 18, 20	17, 18, 19	18	1, 2, 3, 8, 10, 18, 19	3, 4, 18	2, 3, 4, 6, 8, 16, 19, 20
14 – жировая ткань	5, 18	11, 17, 18, 19	18	9		2, 4, 6, 8, 16, 20
15 – сосуды	5, 18	17, 18, 19	3, 10, 18		4, 18	2, 3, 4, 6, 8, 16, 20
16 – трахея	9		18	9		7, 9, 13, 14, 15
17 – мозг	7, 9, 11, 13	4, 6, 7, 9, 13, 14, 15	18	9		
18 – семенники	1, 3, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 19	3, 4, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 15	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17	4, 7, 9, 12, 13	6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 19	2, 4, 6, 8, 20
19 – семенные пузырьки	18	3, 4, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 15		4, 6, 7, 9, 11, 12, 13	18	7, 9, 13
20 – простата	7, 9, 11, 13	7, 9	4, 6	3		5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 18

Примечание. Использован однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с тестом Краскела–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения по Данну. Числа в ячейке указывают номера тканей, в которых уровень мРНК данного рецептора достоверно отличается ($p < 0.05$) от уровня мРНК в ткани, приведенной в первом столбце вместе с ее номером.

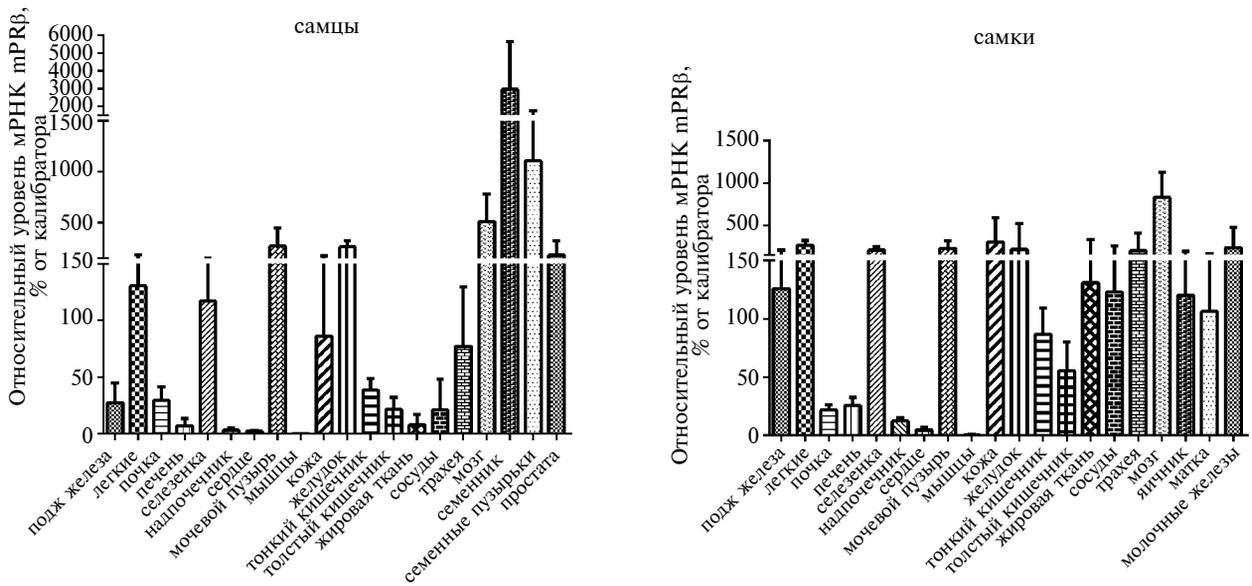


Рис. 3. Уровень экспрессии мРНК mPRβ в органах самцов и самок крыс Wistar (нерепродуктивные ткани, $n = 3$, репродуктивные $n = 5$). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

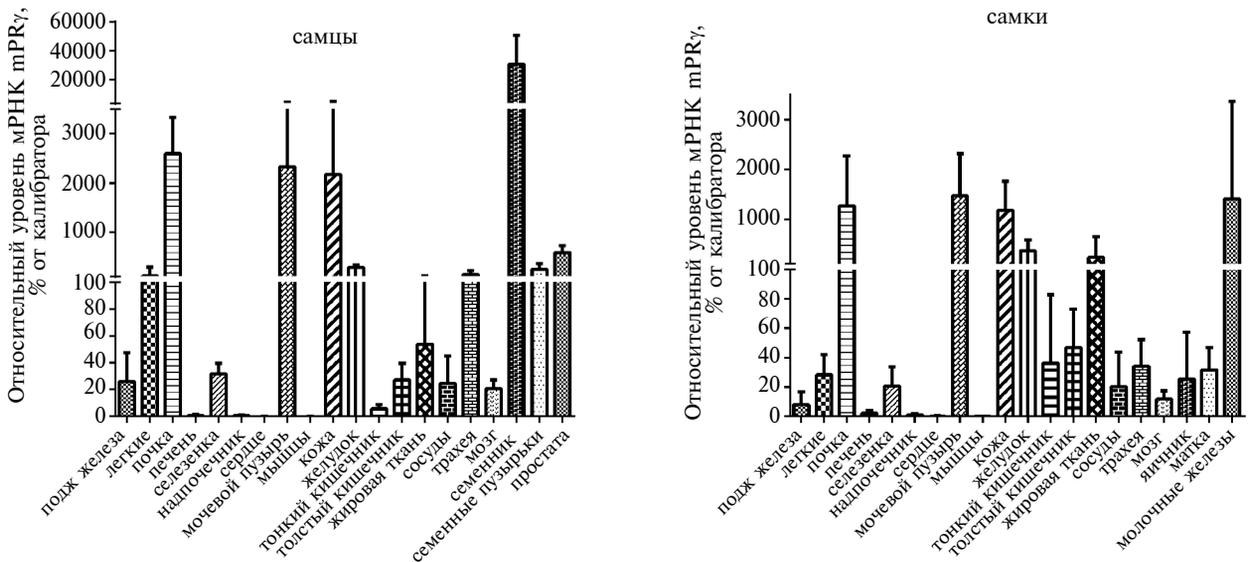


Рис. 4. Уровень экспрессии мРНК mPRγ в органах самцов и самок крыс Wistar (нерепродуктивные ткани, $n = 3$, репродуктивные $n = 5$). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

Таблица 3. Достоверные различия относительной экспрессии мРНК мембранных рецепторов прогестерона в тканях самок крысы

Ткань	mPR α	mPR β	mPR γ	mPR δ	mPR ϵ	PGRMC I
1 – поджелудочная железа	2, 5	7, 9	3, 8, 10, 11, 20	4, 6, 7, 9, 12, 13	3, 4	6
2 – легкие	1, 7, 9, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20	3, 4, 6, 7, 9	8	4, 6, 7, 9, 12, 13, 18		7, 9, 13
3 – почка	7, 9, 13, 19	2, 5, 8, 17	1, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 17, 18, 19	14	1, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 16, 19, 20	7, 9, 12, 13, 15
4 – печень	7, 9, 11, 12, 13, 19	2, 5, 8, 17	3, 8, 10, 11, 20	1, 2, 8, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 20	1, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20	5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 17, 19
5 – селезенка	1, 7, 9, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20	3, 4, 6, 7, 9	3, 8, 10, 20	9		4, 6
6 – надпочечники	7, 9, 13, 19	2, 5, 8, 10, 17, 18, 20	3, 8, 10, 11, 20	1, 2, 8, 10, 14	3, 4	1, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20
7 – сердце	2, 3, 4, 5, 6, 8, 14, 16, 17	1, 2, 5, 8, 10, 16, 17, 18, 19, 20	3, 8, 10, 11, 20	1, 2, 8, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 20		2, 3, 4, 6, 8, 11, 14, 16, 18, 20
8 – мочевого пузыря	7, 9, 11, 12, 13, 15, 19	3, 4, 6, 7, 9	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 16, 17, 18, 19	4, 6, 7, 9, 12, 13	3, 4, 17	7, 9
9 – мышцы	2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 16, 17, 18	1, 2, 5, 8, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20	3, 8, 10, 11, 20	1, 2, 5, 8, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 20		2, 3, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20
10 – кожа	9	6, 7, 9	1, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 17, 18, 19	4, 6, 7, 9, 12, 13	3, 4	4, 6
11 – желудок	2, 4, 5, 8		1, 4, 6, 7, 9	14	3, 4	7, 9
12 – тонкий кишечник	2, 4, 5, 8, 16		3, 8, 10, 20	1, 2, 6, 10, 14, 15, 16, 20	3, 4	3, 4, 6, 16, 18
13 – толстый кишечник	2, 3, 4, 5, 6, 8, 16, 17	17		1, 2, 8, 10, 14	3, 4	2, 3, 4, 6, 16, 18
14 – жировая ткань	7, 9	17		3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 18, 19	4	6, 7, 9
15 – сосуды	2, 5, 8	9, 17	3, 8, 10, 20	4, 7, 9, 12	4	3, 4, 6, 16, 18
16 – трахея	7, 9, 12, 13, 19	7, 9	8	4, 7, 9, 12	3, 4	7, 9, 12, 13, 15
17 – мозг	7, 9, 13, 19	3, 4, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 19	3, 8, 10, 20	4, 7, 9	8, 19	4, 6
18 – яичник	2, 5, 9	6, 7, 9	3, 8, 10, 20	2, 14		7, 9, 12, 13, 15
19 – матка	2, 3, 4, 5, 6, 8, 16, 17	7, 9, 17	3, 8, 10, 20	4, 7, 9, 14	3, 4, 17	4, 6
20 – молочные железы	2, 5	6, 7, 9	1, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 17, 18, 19	4, 7, 9, 2	3, 4	6, 7, 9

Примечание. Использован однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с тестом Краскела–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения по Данну. Числа в ячейке указывают номера тканей, в которых уровень мРНК данного рецептора достоверно отличается ($p < 0.05$) от уровня мРНК в ткани, приведенной в первом столбце вместе с ее номером.

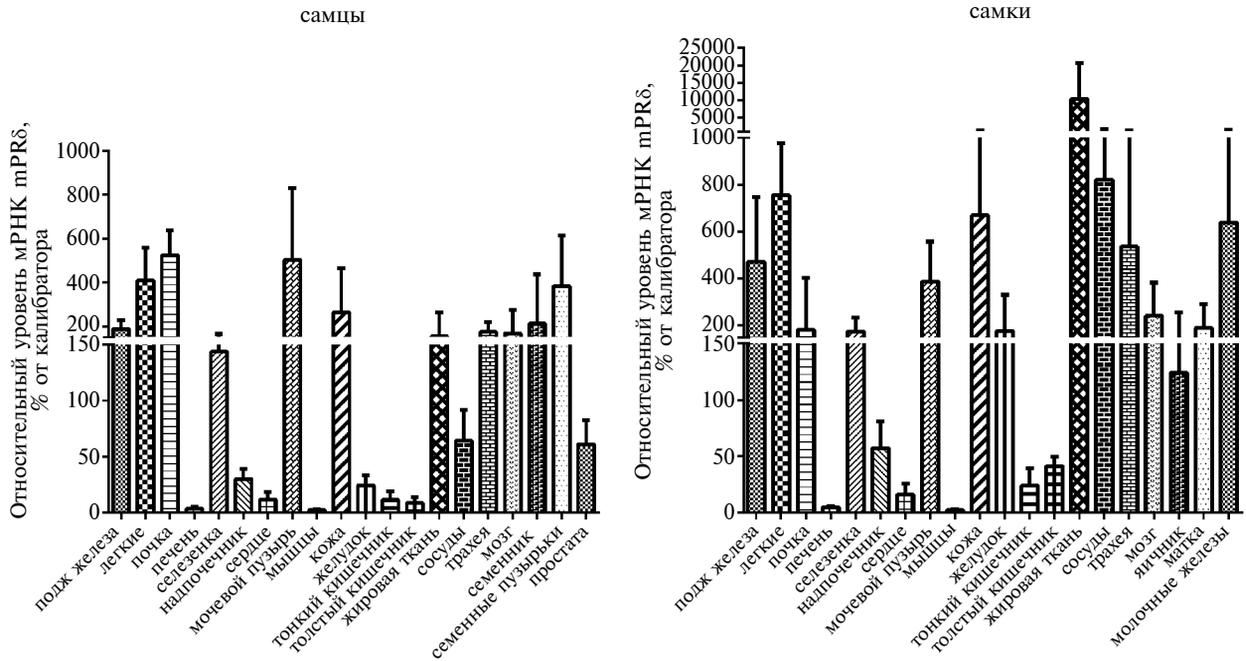


Рис. 5. Уровень экспрессии мРНК mPRδ в органах самцов и самок крыс Wistar (нерепродуктивные ткани, $n = 3$, репродуктивные $n = 5$). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

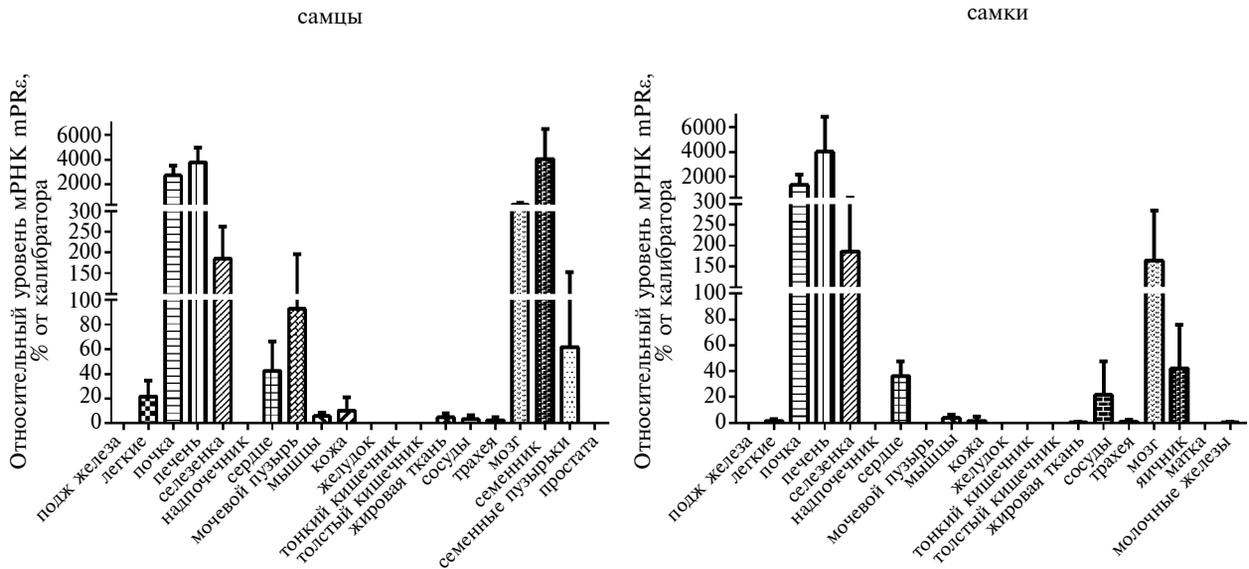


Рис. 6. Уровень экспрессии мРНК mPRε в органах самцов и самок крыс Wistar (нерепродуктивные ткани, $n = 3$, репродуктивные $n = 5$). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

Таблица 4. Различия в экспрессии рецепторов в тканях у самцов и самок крыс

Ткань	nPRs	mPR α	mPR β	mPR γ	mPR δ	mPR ϵ
Поджелудочная железа			Самки***		Самки***	
Легкие		Самки***			Самки**	Самцы**
Почка				Самцы**	Самцы**	Самцы*
Печень	Самки*		Самки***			
Селезенка	Самки**					
Надпочечники			Самки***		Самки**	
Мочевой пузырь	Самки***					Самцы**
Мышцы	Самки***					
Кожа	Самки**		Самки*		Самки*	
Желудок		Самки***			Самки*	
Тонкий кишечник	Самки***				Самки*	
Толстый кишечник	Самки***				Самки***	
Жировая ткань		Самки***	Самки**		Самки***	
Сосуды	Самки***		Самки**			
Трахея				Самцы**		
Мозг						Самцы*

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – достоверность различий в уровнях мРНК рецептора, преобладающего у данного пола.

Распределение транскриптов гена mPR ϵ в тканях значительно отличается от распределения транскриптов других мембранных рецепторов, мРНК рецептора ϵ отсутствует в целом ряде тканей (рис. 6). Среди нерепродуктивных это поджелудочная железа, надпочечник, желудок, тонкий и толстый кишечник, а у самок еще мочевой пузырь и жировая ткань. В репродуктивных тканях фоновые уровни этой мРНК были в простате, в матке и молочных железах. Максимальный уровень экспрессии гена mPR ϵ обнаруживался в семенниках, большие количества – в печени и почках и у самцов, и у самок. В четырех тканях среди изученных экспрессия гена рецептора ϵ достоверно преобладает у самцов (табл. 4).

Экспрессия гена PGRMC I наблюдалась практически во всех тканях у самцов и самок крыс на среднем уровне со сходным профилем распределения транскриптов (рис. 7). Фоновые уровни мРНК PGRMC I были в мышцах и сердце обоих полов. Половая дифференцировка выявлена в жировой ткани, где уровень мРНК у самок выше, и для мышц, где уровень мРНК PGRMC I преобладает у самцов.

На рис. 8 суммированы данные по экспрессии всех рецепторов прогестерона и PGRMC I в тканях, где экспрессия гена, кодирующего nPRs, близка к нулю, а уровень мРНК мембранных рецепторов высок или значителен. Вероятно, действие прогестерона в этих тканях опосредуется mPRs.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение экспрессии генов рецепторов прогестерона, а также PGRMC I показало ряд интересных фактов. Во всех тканях, где достоверно обнаруживается мРНК nPRs (на уровне выше 1.3% относительно калибратора), обнаруживается экспрессия гена *PAQR7* (mPR α), гена *PAQR6* (mPR δ) и *PGRMC I*. Экспрессия гена *PAQR8* (mPR β) выявляется также во всех тканях с мРНК nPRs, кроме надпочечника самцов, а экспрессия гена *PAQR5* (mPR γ) – кроме надпочечников обоих полов. Распределение экспрессии *PAQR9* (mPR ϵ) среди изученных тканей значительно отличается от распределения других прогестероновых рецепторов. Экспрессия *PAQR9* определяется только в 7–9 тканях в зависимости от

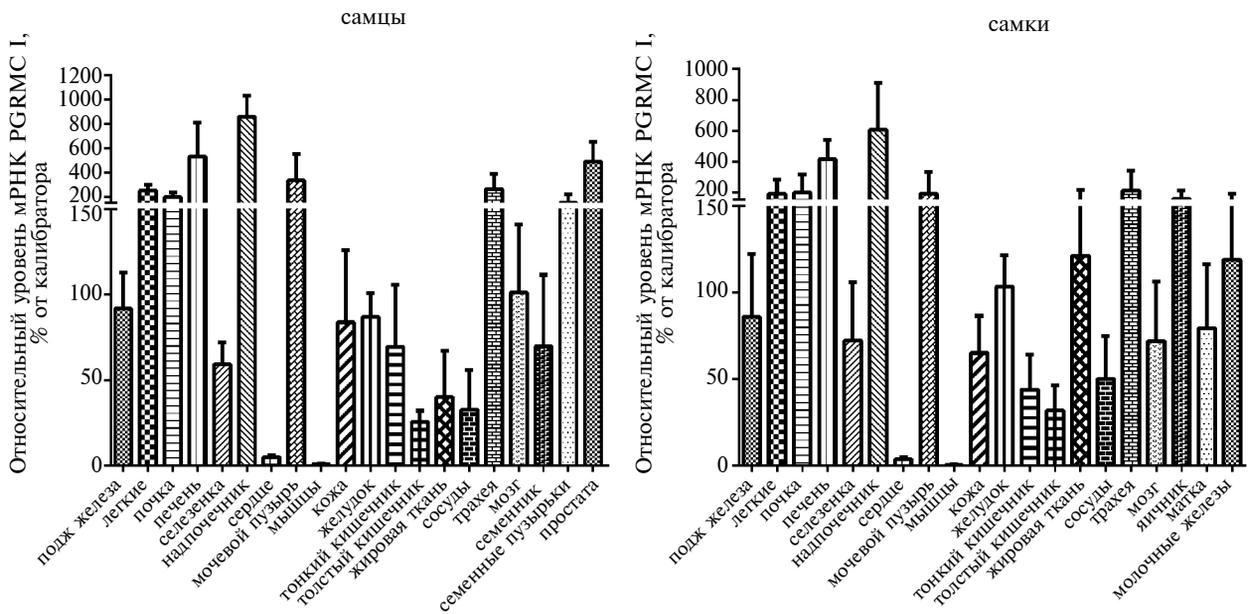


Рис. 7. Уровень экспрессии мРНК PGRMC I в органах самцов и самок крыс Wistar (нерепродуктивные ткани, $n = 3$, репродуктивные $n = 5$). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

пола. Рекордный уровень мРНК nPRs, как и ожидалось, был выявлен в матке. Высокий уровень экспрессии ядерных рецепторов обнаружен в других репродуктивных органах самок (яичники, молочные железы) и в мозге животных обоих полов. Это – классические органы – мишени прогестерона. Такой же высокий уровень мРНК nPRs обнаружился неожиданно в трахее самцов и самок. Экспрессия mPRs всех субтипов, кроме mPR ϵ , здесь также выявляется. Прогестерон ингибирует отложение коллагена и пролиферацию фибробластов при заживлении ран после операций на трахее, предотвращая стеноз. [28]. Однако функции разных типов рецепторов прогестерона в этом процессе не изучались. Другие эффекты прогестерона в трахее на настоящий момент не изучены и являются предметом дальнейших исследований. Высокий уровень мРНК nPRs в сосудах самок наряду с экспрессией всех без исключения mPRs и PGRMC I предполагает важную роль прогестерона в регуляции их функций. Прогестерон оказывает благотворное влияние на сердечно-сосудистую систему. Он снижает артериальное давление, оказывает сосудорасширяющее и натрийуретическое действие [17]. В быстром действии прогестерона на сердечно-сосудистую систему показано участие

mPR α . Прогестерон повышает продукцию оксида азота в эндотелиальных клетках сосудов животных и человека, регулируя синтез эндотелиальной NO-синтазы. Оксид азота вызывает расслабление гладкомышечных клеток. Также посредством активации mPR α прогестерон снижает внутриклеточную концентрацию ионов кальция, ингибируя сокращение гладкомышечных клеток сосудов [29–31]. В поджелудочной железе также обнаружен высокий уровень мРНК nPRs, особенно у самок. При этом там экспрессируются и гены мембранных рецепторов, за исключением mPR ϵ . В островках Лангерганса поджелудочной железы у самцов и самок крыс прогестерон вызывал быстрое ингибирование стимулированного глюкозой высвобождения инсулина. Это действие осуществлялось с внешней поверхности плазматической мембраны, но при этом оно не блокировалось обработкой коклюшным токсином (Pertussis Toxin), что исключает, по мнению авторов, посредничество Gi/Go белков. Внутриклеточная концентрация cAMP при этом не менялась, но снижалась внутриклеточная концентрация ионов Ca²⁺. Блокада входа Ca²⁺, по-видимому, является главным механизмом, с помощью которого прогестерон ингибирует высвобождение инсулина под действием

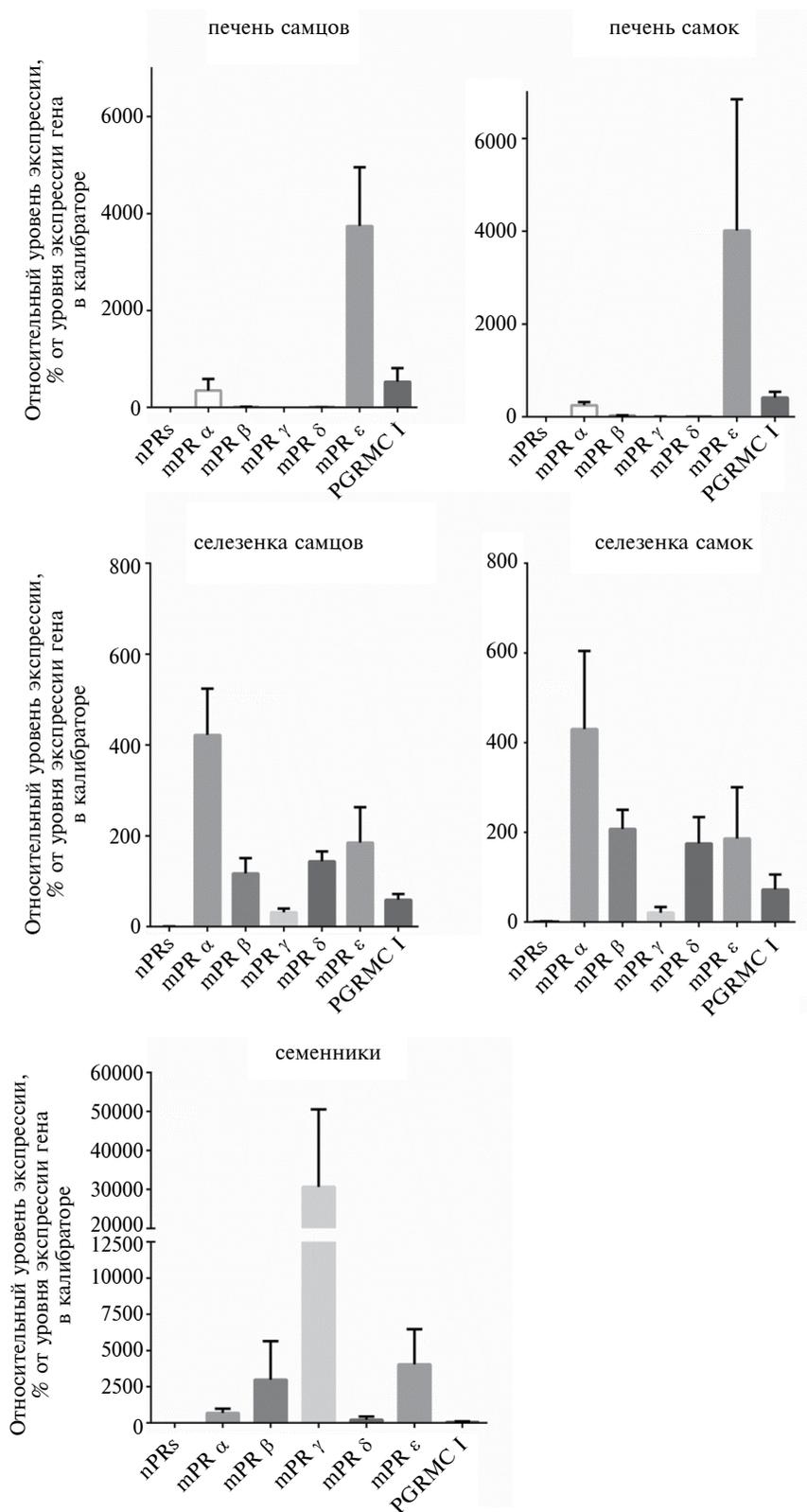


Рис. 8. Уровень экспрессии мРНК mPRs и PGRMC 1 в печени и селезенке самок и самцов ($n = 3$) и в семенниках крыс Wistar ($n = 5$). Данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

глюкозы [32]. Нам представляется возможным участие mPRs в этом действии прогестерона, поскольку известны случаи активации этих рецепторов без изменения концентрации cAMP через $\beta\gamma$ субъединицы G-белков [33]. В другой работе показано, что прогестерон стимулировал пролиферацию альфа- и бета-клеток островков Лангерганса, а также протоковых и непротоковых клеток поджелудочной железы у самцов и самок крыс [34].

Практически не была обнаружена мРНК nPRs в тканях крыс обоих полов в мышцах, сердце, в тонком и толстом кишечнике, в печени и селезенке. Семенники и жировая ткань самцов также отличались крайне низким содержанием мРНК nPRs. Мышцы практически не содержат мРНК ни рецепторов прогестерона, ни PGRMC I. В сердце также довольно низкая экспрессия мРНК рецепторов и у самок, и у самцов (рис. 1–7). В тонком и толстом кишечнике у обоих полов выявляется экспрессия всех субтипов mPRs и PGRMC I, кроме mPR ϵ на среднем уровне. Высокий уровень экспрессии генов mPRs и близкий к нулю уровень экспрессии гена nPRs наблюдался в печени и селезенке самцов и самок крыс, а также – в семенниках самцов (рис. 8). По-видимому, прогестерон оказывает свое действие в этих тканях через mPRs.

Было показано, что прогестерон изменяет экспрессию 472 генов в печени коров. При этом обнаружилось высокое сходство действия физиологических концентраций эстрадиола и прогестерона в регуляции экспрессии генов в печени, на основании чего был сделан вывод о непрямом либо о неклассическом пути действия этих стероидов [35]. Наши исследования показали, что в печени крыс отсутствуют классические nPRs, но обнаруживаются на среднем уровне мРНК mPR α и мРНК его адаптерного белка PGRMC I, на высоком уровне мРНК mPR ϵ . Интересно, что PGRMC I является также адаптерным белком и для ядерного рецептора эстрогенов β , экспрессия которого значительно повышается в мембранах клеток в его присутствии [11]. Исследования, проведенные *in vitro* и *in vivo* у животных и у женщин в постменопаузе, указывают на то, что прогестины ингибируют синтез и секрецию апоВ-100 в печени. В результате увеличивается содержание триглицеридов в секретируемых печенью липопротеинах очень низкой плотности (ЛПОНП). Это в свою очередь может влиять на внутрисосудистый липолиз триглицеридов ЛПОНП и их плазменный клиренс, поскольку более крупные частицы, богатые триглицеридами, более восприимчивы к липолизу

липопротеинлипазой, чем мелкие частицы [36]. Тип рецепторов, опосредующих действие прогестина в описанном эффекте, не исследовался.

Еще одной тканью, где действие прогестерона осуществляется, по-видимому, через mPRs, является селезенка. В ряде исследований показано действие прогестерона на различные типы иммунных клеток селезенки. В дендритных клетках селезенки мышей прогестерон снижал продукцию IL-12 и ингибировал рост экспрессии CD86, MHCII и CCR7 после инфицирования вирусом везикулярного стоматита [37]. В другой работе в CD11c-положительных дендритных клетках селезенки мышей прогестерон увеличивал экспрессию MHC-II и CD40, уровни IL-6 и IL-10, одновременно снижая экспрессию CD54 и IL-12, ядерную локализацию NF- κ B P65. Эти данные позволили предположить, что прогестерон может способствовать созреванию дендритных клеток селезенки и повышать их способность взаимодействовать с Т-клетками [38]. При изучении действия прогестерона на изолированных спленоцитах мышей было показано, что прогестерон повышал экспрессию CD83 как в В-лимфоцитах, так и в Т-лимфоцитах [39]. В макрофагах селезенки длительный дефицит прогестерона, связанный с концом репродуктивного периода жизни, влиял на выработку цитокинов, нарушая секреторный баланс провоспалительных и противовоспалительных факторов. В макрофагах снижалась продукция IL-1 β и повышалась продукция IL-10. После стимуляции ЛПС селезеночные макрофаги крыс с удаленными яичниками продуцировали меньше TNF- α и больше IL-10 [40]. В разных типах иммунных клеток человека ядерные рецепторы прогестерона практически не выявляются, действие прогестина в этих клетках опосредуется мембранными рецепторами [5, 19]. Экспрессия нескольких субтипов mPRs (α , β , δ , ϵ) и PGRMC I в селезенке дает основание предполагать их вклад в регуляцию функций иммунных клеток прогестероном у крыс.

Максимальный уровень экспрессии генов mPRs наблюдался в семенниках (рис. 8). Прогестерон обладает стимулирующим эффектом на активность и подвижность сперматозоидов, индуцируя увеличение концентрации внутриклеточных ионов кальция, вызывающих процесс их капаситации в женских половых путях, состоящий из акросомальной реакции и гиперактивации. У ряда млекопитающих и человека показано, что прогестерон регулирует кальциевые каналы CatSper в этих клетках, вызывая приток ионов кальция в течение 30 с, что в свою очередь

активирует аденилатциклазу, вызывая подъем уровня cAMP и активацию тирозинкиназ [41, 42]. В сперматозоидах бесчелюстных и костистых рыб, амфибий и птиц CatSper не обнаружен [43]. У этих позвоночных обнаружен механизм активации сперматозоидов прогестинами через mPR α , сопряженными с G_{oif} белками, α -субъединицы которых активируют аденилатциклазу, повышающую уровень cAMP и Ca²⁺. Через $\beta\gamma$ субъединицы G_{oif} белков активируются каскады Egfr/p-Erk и Pi3k/Akt/Pde, также необходимые для увеличения концентрации Ca²⁺. Все эти процессы приводят к гиперподвижности сперматозоидов [15]. Показано, что белок mPR α локализуется на плазматической мембране срединной части сперматозоидов человека и, вероятно, участвует в регуляции их подвижности прогестероном. Содержание белка mPR α на мембранах сперматозоидов с низкой подвижностью было значительно меньше, чем на нормальных подвижных сперматозоидах людей-доноров. Обработка оболочек сперматозоидов прогестином вызывала активацию G-белков. Эти результаты позволяют предположить, что у людей, как и у рыб, mPR α является посредником в стимуляции подвижности сперматозоидов прогестинами посредством механизма, включающего активацию G-белка [44]. У крыс мы обнаружили экспрессию всех пяти субтипов mPRs в семенниках на очень высоком уровне, что свидетельствует об их важной роли в регуляции функций клеток этого органа у данного вида животных.

Были проанализированы половые различия в экспрессии рецепторов прогестерона в репродуктивных тканях самцов и самок крыс. В табл. 4 отмечены ткани, где экспрессия того или иного рецептора достоверно выше либо у самок, либо у самцов на уровне значимости $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни). Экспрессия ядерных рецепторов преобладает во многих тканях у самок. В то же время экспрессия генов mPRs у крыс делится на две группы. Гены mPR α (PAQR7), mPR β (PAQR8) и mPR δ (PAQR6) экспрессируются на более высоком уровне у самок в поджелудочной железе (mPR β , mPR δ), легких (mPR α , mPR δ), печени (mPR β), надпочечниках (mPR β , mPR δ), коже (mPR β , mPR δ), желудке (mPR α , mPR δ), тонком (mPR δ) и толстом кишечнике (mPR δ), жировой ткани (mPR α , mPR β , mPR δ) и сосудах (mPR β). Для гена mPR δ есть исключение, в почках его экспрессия выше у самцов. Гены mPR γ (PAQR5) и mPR ϵ (PAQR9) экспрессируются на более высоком уровне у самцов в легких (mPR ϵ), почках (mPR γ , mPR δ), мочевом пузыре (mPR ϵ), трахее (mPR γ), мозге (mPR ϵ).

Половые различия функций многих нерепродуктивных органов, изучаемых в нашей работе, описаны в литературе [45]. Часть их может быть связана с действием прогестерона через разные типы рецепторов в этих тканях. Так, например, в мозге показано действие прогестерона через mPRs [46]. В литературе есть данные о различии эффектов прогестерона в жировой ткани самцов и самок крыс. У самцов введение этого гормона не влияло на липолиз в адипоцитах, а у самок под действием прогестерона снижалась экспрессия гена гормон-чувствительной липазы, что приводило к подавлению липолиза [6]. Показаны половые различия в функционировании мочевого пузыря у животных и человека [47]. Часть из них связана с действием прогестерона [48, 49]. В почках крыс экспрессия гена NCC (NaCl-котранспортера) и его фосфорилирование зависят от пола, а прогестерон способствует фосфорилированию этого белка [50]. Также прогестерон в почках снижает выведение калия с мочой [51]. Однако пока разнообразие эффектов прогестерона в клетках тканей самцов и самок крыс очень мало изучено. Преобладание трех субтипов mPRs (α , β , δ) у самок и двух mPRs (γ , ϵ) у самцов позволяет предположить, что экспрессия генов каждой группы регулируется половыми гормонами сходным образом в ряде тканей. Выявление гендерных различий в распределении рецепторов прогестерона может служить основой для изучения механизмов этой регуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе изучена экспрессия генов различных типов рецепторов прогестерона и PGRMC I в 17 нерепродуктивных и в 3 репродуктивных тканях самцов и самок крыс. Показано, что mPНК ядерных рецепторов на максимальном уровне наблюдается в репродуктивных органах самок, у самцов в семенных пузырьках, в нерепродуктивных тканях — в мозге, трахее, поджелудочной железе и сосудах. Экспрессия мембранных рецепторов представлена во всех изученных тканях на высоком или среднем уровне, за исключением мышц, сердца, надпочечников (кроме mPR α) и печени (кроме mPR α и mPR ϵ). Наконец, выявлены ткани с почти полным отсутствием ядерных рецепторов и высоким уровнем экспрессии mPRs — печень, селезенка и семенники. Эти результаты могут быть использованы для разработки стратегии изучения функций мембранных рецепторов у крыс *in vivo*. Очевидно, mPRs могут функционировать в качестве ключевых модуляторов действия прогестерона

при регуляции физиологических функций во многих органах у нормальных крыс обоего пола.

Обнаруженные различия в экспрессии разных типов рецепторов демонстрируют одну из причин разнообразия тканеспецифического действия прогестерона и механизм поддержания зависимых от пола эффектов этого гормона в нерепродуктивных органах млекопитающих.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23–25–00071, [https://rscf.ru/project/23–25–00071/](https://rscf.ru/project/23-25-00071/)).

Соответствие принципам этики. Все действия с животными в данном исследовании были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ (заявление № 134-а-2, утверждено на заседании Комиссии по биоэтике № 151-д, состоявшемся 20.04.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guennoun R., Labombarda F., Gonzalez Deniselle M.C., Liere P., De Nicola A.F., Schumacher M. 2015. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **146**, 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.09.001>
2. González-Orozco J.C., Camacho-arroyo I. 2019. Progesterone actions during central nervous system development. *Front. Neurosci.* **13**, 503. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00503>.
3. Schuffner A.A., Bastiaan H.S., Duran H.E., Lin Z.Y., Morshedi M., Franken D.R., Oehninger S. 2002. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: Dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol. Hum. Reprod.* **8**, 722–727. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.8.722>.
4. Oettel M., Mukhopadhyay A.K. 2004. Progesterone: The forgotten hormone in men? *Aging Male* **7**, 236–257. <https://doi.org/10.1080/13685530400004199>.
5. Polikarpova A.V., Levina I.S., Sigai N.V., Zavarzin I.V., Morozov I.A., Rubtsov P.M., Guseva A.A., Smirnova O.V., Shchelkunova T.A. 2019. Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors. *Steroids*. **145**, 5–18. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.02.009>.
6. Stelmanska E., Szrok S., Swierczynski J. 2015. Progesterone-induced down-regulation of hormone sensitive lipase (Lipe) and up-regulation of G0/G1 switch 2 (G0s2) genes expression in inguinal adipose tissue of female rats is reflected by diminished rate of lipolysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **147**, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.017>.
7. Seifert-Klauss V., Prior J.C. 2010 Progesterone and bone: Actions promoting bone health in women. *J. Osteoporos.* **2010**, 845180. <https://doi.org/10.4061/2010/845180>.
8. Щелкунова Т.А., Морозов И.А. 2015. Молекулярные основы и тканевая специфичность действия прогестинов. *Мол. биол.* **49**, 728–748. <http://doi.org/10.7868/S0026898415050158>.
9. Zhu Y., Bond J., Thomas P. 2003. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 2237–2242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0436133100>.
10. Pang Y., Dong J., Thomas P. 2013. Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and ϵ (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*. **154**, 283–295. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1772>.
11. Thomas P., Pang Y., Dong J. 2014. Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progesterone receptor α (mPR α) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC 1): Evidence for a role of PGRMC 1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology*. **155**, 1107–1119. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1991>.
12. Sleiter N., Pang Y., Park C., Horton T.H., Dong J., Tomas P., Levine J.E. 2009. Progesterone receptor A (PRA) and PRB independent effects of progesterone on gonadotropin releasing hormone release. *Endocrinology*. **150**, 3833–3844. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0774>.
13. Camilletti M.A., Abeledo-Machado A., Perez P.A., Faraoni E.Y., De Fino F., Rulli S.B., Ferraris J., Pisera D., Gutierrez S., Thomas P., Díaz-Torga G. 2019. mPRs represent a novel target for PRL inhibition in experimental prolactinomas. *Endocr. Relat. Cancer*. **26**, 1–14. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0409>.
14. Flock G.B., Cao X., Maziarz M., Drucker D.J. 2013. Activation of enteroendocrine membrane progesterone receptors promotes incretin secretion and improves glucose tolerance in mice. *Diabetes*. **62**, 283–290. <https://doi.org/10.2337/db12-0601>.
15. Tan W., Pang Y., Tubbs C., Thomas P. 2019. Induction of sperm hypermotility through membrane progesterone receptor alpha (mPR α): A teleost model of rapid, multifaceted, nongenomic progesterone signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* **279**, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.002>.
16. Karteris E., Zervou S., Pang Y., Dong J., Hillhouse E.W., Randevara H.S., Thomas P. 2006. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: Potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1519–1534. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0243>.

17. Pang Y., Dong J., Thomas P. 2015. Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- α . *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E899–E911. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00527.2014>.
18. Щелкунова Т.А., Морозов И.А. 2016. Прогестины и канцерогенез. *Мол. биол.* 2016. **50**, 10–26. <http://doi.org/10.7868/S0026898416010171>.
19. Dosiou C., Hamilton A.E., Pang Y., Overgaard M.T., Tulac S., Dong J., Thomas P., Giudice L.C. 2008. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J. Endocrinol.* **196**, 67–77. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0317>.
20. Frye C.A., Walf A.A., Kohtz A.S., Zhu Y. 2013. Membrane progesterin receptors in the midbrain ventral tegmental area are required for progesterone-facilitated lordosis of rats. *Horm. Behav.* **64**, 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.05.012>.
21. Zuloaga D.G., Yahn S.L., Pang Y., Quihuis A.M., Oyola M.G., Reyna A., Thomas P., Handa R.J., Mani S.K. 2012. Distribution and estrogen regulation of membrane progesterone receptor- β in the female rat brain. *Endocrinology.* **153**, 4432–4443. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1469>.
22. Intlekofer K.A., Petersen S.L. 2011. Distribution of mRNAs encoding classical progesterin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progesterin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. *Neuroscience.* **172**, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.051>.
23. Petersen S.L., Intlekofer K.A., Moura-Conlon P.J., Brewer D.N., Del Pino Sans J., Lopez J.A. 2013. Novel progesterone receptors: Neural localization and possible functions. *Front. Neurosci.* **7**, 164. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00164>.
24. Cai Z., Stocco C. 2005. Expression and regulation of progesterin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology.* **146**, 5522–5532. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0759>.
25. Yoshida A., Yasuda K., Okada H. 2024. Changes in the conflicting nongenomic effects of progesterone in rat myometrium during pregnancy. *Life Sci.* **340**, 122454. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122454>.
26. Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* **25**, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
27. Svingen T., Letting H., Hadrup N., Hass U., Vinggaard A.M. 2015. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ.* **24**, e855. <https://doi.org/10.7717/peerj.855>.
28. Liman S.V., Kara C.O., Bir F., Yildirim B., Topcu S., Sahin B. 2005. The effects of estradiol and progesterone on the synthesis of collagen in tracheal surgery. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **69**, 1327–1331. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2005.03.028>.
29. Pang Y., Thomas P. 2018. Progesterone induces relaxation of human umbilical cord vascular smooth muscle cells through mPR α (PAQR7). *Mol. Cell. Endocrinol.* **474**, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.02.003>.
30. Pang Y., Thomas P. 2019. Role of mPR α (PAQR7) in progesterone-induced Ca²⁺ decrease in human vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Endocrinol.* **63**, 199–213. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0019>.
31. Pang Y., Thomas P. 2021. Involvement of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) in mPR α (PAQR7)-mediated progesterone induction of vascular smooth muscle relaxation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* **320**, E453–E466. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00359.2020>.
32. Straub S.G., Sharp G.W., Meglasson M.D., De Souza C.J. 2002. Progesterone inhibits insulin secretion by a membrane delimited, non-genomic action. *Biosci. Rep.* **21**, 653–666. <https://doi.org/10.1023/A:1014773010350>.
33. Charles N.J., Thomas P., Lange C.A. 2010. Expression of membrane progesterone receptors (mPR/PAQR) in ovarian cancer cells: implications for progesterone induced signaling events. *Horm. Cancer.* **1**, 167–176. <https://doi.org/10.1007/s12672-010-0023-9>.
34. Nieuwenhuizen A.G., Schuiling G.A., Liem S.M.S., Moes H., Koiter T.R., Uilenbroek J.T. 1999. Progesterone stimulates pancreatic cell proliferation in vivo. *Eur. J. Endocrinol.* **140**, 256–263. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1400256>.
35. Piccinato C.A., Rosa G.J.M., N'jai A.U., Jefcoate C.R., Wiltbank M.C. 2013. Estradiol and progesterone exhibit similar patterns of hepatic gene expression regulation in the bovine model. *PLoS One.* **17**, e73552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073552>.
36. Magkos F., Mittendorfer B. 2009. Gender differences in lipid metabolism and the effect of obesity. *Obstet Gynecol. Clin. North Am.* **36**, 245–265. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2009.03.001>.
37. Mackern-Oberti J.P., Jara, E.L., Riedel C.A., Kaleris A.M. 2017. Hormonal modulation of dendritic cells differentiation, maturation and function: Implications for the initiation and progress of systemic autoimmunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **65**, 123–136. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0418-6>.
38. Yang L., Li X., Zhao J., Hou Y. 2006. Progesterone is involved in the maturation of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Steroids.* **71**, 922–929. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.07.001>.
39. Packhäuser K.R.H., Roman-Sosa G., Ehrhardt J., Krüger D., Zygmunt M., Muzzio D.O. 2017. A kinetic study of CD83 reveals an upregulation and higher production of sCD83 in lymphocytes from pregnant mice. *Front. Immunol.* **8**, 486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00486>.

40. Stanojević S., Kovačević-Jovanović V., Dimitrijević M., Vujić V., Ćuruvija I., Blagojević V., Leposavić G. 2015. Unopposed estrogen supplementation/progesterone deficiency in post-reproductive age affects the secretory profile of resident macrophages in a tissue-specific manner in the rat. *Am. J. Reprod. Immunol.* **74**, 445–456. <https://doi.org/10.1111/aji.12424>.
41. Sharif M., Kerns K., Sutovsky P., Bovin N., Miller D.J. 2021. Progesterone induces porcine sperm release from oviduct glycans in a proteasome-dependent manner. *Reproduction.* **161**, 449–457. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0474>.
42. Mirihagalle S., Hughes J.R., Miller D.J. 2022. Progesterone-induced sperm release from the oviduct sperm reservoir. *Cells.* **11**, 1622. <https://doi.org/10.3390/cells11101622>.
43. Cai X., Clapham D.E. 2008. Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSpers and CatSperβ. *PLoS One.* **3**, e3569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003569>.
44. Thomas P., Tubbs C., Garry V. F. 2009. Progesterin functions in vertebrate gametes mediated by membrane progesterin receptors (mPRs): Identification of mPRα on human sperm and its association with sperm motility. *Steroids.* **74**, 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.10.020>.
45. de Vries G.J., Forger N.G. 2015. Sex differences in the brain: a whole body perspective. *Biol. Sex Differ.* **6**, 15. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0032-z>.
46. Thomas P., Pang Y., Camilletti, M.A., Castelnovo L.F. 2022. Functions of membrane progesterone receptors (mPRs, PAQRs) in nonreproductive tissues. *Endocrinology.* **163**, bqac147. <https://doi.org/10.1210/endoctr/bqac147>.
47. Patra P.B., Patra S. 2013. Sex differences in the physiology and pharmacology of the lower urinary tract. *Curr. Urol.* **6**, 179–188. <https://doi.org/10.1159/000343536>.
48. Patra P.B., Thorneloe K.S., Laping N.J. 2009. Effect of estrogen and progesterone on urodynamics in conscious rat. *Urology.* **74**, 463–466. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2008.12.046>.
49. Chen J., Zhou Y.X., Yu Y.L., Shen Z.J. 2008. Effects of sex hormones on bladder function and structure: Experiment with ovariectomized female rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* **88**, 1851–1854, Chinese. <https://doi.org/10.3321/j.issn:0376-2491.2008.26.014>.
50. Rojas-Vega L., Reyes-Castro L.A., Ramírez V., Bautista-Pérez R., Rafael C., Castañeda-Bueno M., Meade P., de Los Heros P., Arroyo-Garza I., Bernard V., Binart N., Bobadilla N.A., Hadchouel J., Zambrano E., Gamba G. 2015. Ovarian hormones and prolactin increase renal NaCl cotransporter phosphorylation. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **308**, F799–F808. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00447.2014>.
51. Elabida B., Edwards A., Salhi A., Azroyan A., Fodstad H., Meneton P., Doucet A., Bloch-Faure M., Crambert G. 2011. Chronic potassium depletion increases adrenal progesterone production that is necessary for efficient renal retention of potassium. *Kidney Int.* **80**, 256–262. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.15>.

Distribution of Progesterone Receptors and the Membrane Component of Progesterone Receptor in Various Organs and Tissues of Male and Female Rats

A. D. Dmitrieva¹, I. A. Morozov², A. M. Karhov¹, P. M. Rubtsov², O. V. Smirnova¹,
T. A. Shchelkunova^{1,*}

¹Biological Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: schelkunova-t@mail.ru

Progesterone regulates reproductive processes and affects many functions of various non-reproductive organs. Its effects in mammals and humans are mediated by nuclear (nPRs) and membrane progesterone receptors (mPRs). The action of progesterone through different types of receptors may differ significantly and has tissue specific features. The expression of known types and subtypes of progesterone receptors in the tissues of male and female rats has been studied fragmentarily. The purpose of our work was to study the expression of five mPRs genes, as well as the nPRs gene and the membrane component of the progesterone receptor PGRMC I in the reproductive organs and in 17 non-reproductive tissues of male and female rats using reverse transcription followed by real-time PCR. In this study, it was shown that a high level of nPRs gene expression in rats is found not only in reproductive organs of females (uterus, ovary, mammary glands), but also in seminal vesicles of males, in the brain and trachea of both sexes, in blood vessels, and in the pancreas of females. The highest level of expression of mPRs genes of all subtypes was found in the testes, while expression of the gene encoding nPRs was practically undetectable in them. Expression of genes encoding mPRs was also detected in the liver

and spleen of male and female rats, while expression of the gene encoding nPRs was at background levels. Virtually no expression of nPRs, mPRs, and membrane component of progesterone receptor (PGRMC I) genes was detected in muscle, and its level was very low in the heart in animals of both sexes. We found sex-specific differentiation of nuclear and membrane receptor mRNA levels in rats in non-reproductive tissues, characterized by a predominance of nPRs transcripts and three subtypes of mPRs (α , β , δ) in females and two subtypes of mPRs (γ , ϵ) in males. Data on the presence of progesterone receptors in tissues not involved in reproduction confirm the effect of progesterone on these organs. High levels of mRNA for various progesterone receptors in the tissues of male rats, such as the pancreas, lungs, kidney, and trachea, indicate an important physiological role of progestins not only in females, but also in males, which is still poorly understood. The work also discusses the known functions of progesterone receptors in the tissues studied.

Keywords: progesterone, membrane progesterone receptors, nuclear progesterone receptors, membrane component of progesterone receptor 1, gene expression