

УДК 57.085.23+ 616.8

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЭРИТРОПОЭТИН СМЯГЧАЕТ АНОМАЛИИ  
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ  
ГИПЕРЭКСПРЕССИИ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ БЕЛКА FUS: ИССЛЕДОВАНИЕ  
IN VITRO**

**Уколова П. А.** (Лаборатория клеточной физиологии и патологии, Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева, Орел, Россия), **Микенькина М.А.** (Лаборатория клеточной физиологии и патологии, Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева, Орел, Россия) **Солдатов В. О.** (НИИ Фармакологии живых систем, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия)

**Научный руководитель – канд. техн. наук. Винокуров А.Ю.**

(Лаборатория клеточной физиологии и патологии, Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева, Орел, Россия)

**Аннотация.** В докладе представлены результаты оценки нарушений митохондриального мембранного потенциала в первичной нейроглиальной культуре, полученной от мышечной с гиперэкспрессией ассоциированной с боковым амиотрофическим склерозом укороченной формы белка FUS, а также приведены результаты изучения коррекции выявленных аномалий рекомбинантным эритропоэтином.

**Введение.** Боковой амиотрофический склероз (БАС) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся нарушением работы мышц вследствие гибели моторных нейронов. По статистике, заболеваемость БАС в мире составляет 0,6-3,8 новых случая на 100 тыс. населения в год. Одним из центральных патогенетических признаков некоторых семейных форм БАС является образование агрегатов белка FUS в цитоплазме мотонейронов. Формирование нерастворимых агрегатов FUS запускает каскады нейрональной гибели, приводящей к утрате двигательной функции и прогрессирующему параличу. При этом значительную роль в развитии FUS-ассоциированной нейродегенерации играет нарушение биоэнергетического потенциала клетки. Показано, что изменение митохондриального мембранного потенциала (ММП), – основной величины, отражающей функциональное состояние митохондрий, – является характерным признаком ряда нейродегенеративных заболеваний, включая БАС.

В настоящее время эритропоэтин нашел широкое применение не только как эффективное средство стимулирования одного из этапов кроветворения, но и в качестве нейропротектора. Не случайно в головном мозге имеются участки, способные продуцировать эритропоэтин при развитии гипоксии. Наличие нейропротекторного и нейротрофического действия эритропоэтина, которое доказано на целом ряде моделей нейродегенеративных заболеваний (БАС, аутоиммунного энцефаломиелита, при церебральной и спинальной ишемии, а также при диабетической нейропатии), позволяет позиционировать его как перспективное средство для смягчения БАС-ассоциированных молекулярных нарушений.

Целью данного исследования является *in vitro* оценка функционального состояния митохондрий при FUS-ассоциированных функциональных нарушениях ММП и их коррекция эритропоэтином.

**Основная часть.** Исследования проводили на первичной нейроглиальной культуре, полученной от трансгенной линии мышечной суперэкспрессирующей аберрантный человеческий ген FUS [1-359]. Данная линия мышечной была разработана для исследования роли белковых неамилоидных агрегатов в возникновении и прогрессировании БАС и некоторых других нейродегенеративных заболеваний. Все манипуляции с животными и клеточными культурами были одобрены Институциональным этическим комитетом Орловского государственного университета (протокол № 18 от 21.02.2020) в соответствии с законодательством Российской Федерации.

В данных экспериментах для определения ММП в качестве флуоресцентного зонда использовали тетраметилродамин (TMRM) с рабочей концентрацией раствора 30 нМ. В первую очередь определяли исходный уровень ММП и оценивали вклад различных комплексов дыхательной цепи митохондрий в поддержание ММП. Предварительную загрузку клеток зондом проводили в течение 30 минут при 37°C, после чего выполняли измерения с помощью конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2 с использованием лазерного излучения с длиной волны 561 нм в режиме Time series. В ходе эксперимента производили добавки растворов ингибиторов I и V комплексов дыхательной цепи ротенона (3 мкМ) и олигомицина (5 мкг/мл) соответственно, а также протонофора FCCP (1 мкМ).

В ходе экспериментов было выявлено, что в клетках, полученных от мышей FUS [1-359] I комплекс электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) вносит незначительный вклад в поддержание ММП, что находит отражение в малой величине снижения интенсивности флуоресценции в ответ на добавление ротенона. Нарушение работы I комплекса по поддержанию ММП может быть связано с его дисфункцией или недостаточным содержанием в системе субстратов цикла Кребса. В связи с этим были дополнительно проведены эксперименты с добавлением пирувата (5 мМ), который не оказал статистически значимого влияния на характер изменения ММП при внесении ротенона. В целях коррекции клеточной биоэнергетики проводили эксперименты по оценке ММП с предварительной обработкой клеток растворами эритропоетина с концентрациями 10 нг/мл, 5 нг/мл и 2,5 нг/мл в течение 30 минут

**Выводы.** Исходя из полученных первичных данных можно сказать, что в случае клеток, экспрессирующих мутантную форму белка FUS, I комплекс ЭТЦ вносит незначительный вклад в поддержание величины ММП, так как после внесения ротенона не происходило значительного снижения потенциала в сравнении с клетками, полученными от контрольной линии мышей. Обработка пируватом не повлияла на работу I комплекса. При этом после воздействия эритропоетина с концентрацией 5 нг/мл снижение потенциала в ответ на ротенон существенно увеличилось, а при использовании концентрации 2,5 нг/мл полученные данные статистически не отличались от данных, полученных в ходе экспериментов с контрольной группой. Предварительная загрузка первичной нейроглиальной культуры эритропоетином с концентрацией 10 нг/мл не повлияла на снижение уровня ММП в ответ на ротенон. Приведенные результаты указывают на то, что в определенных концентрациях эритропоетин способен оказывать влияние на работу I комплекса ЭТЦ, что может объяснить нейропротекторные свойства данного соединения и дать основание для дальнейших исследований в целях обоснования применения данного гормона при нарушениях клеточного метаболизма в ходе развития БАС.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях и государственных научных центрах Российской Федерации №075–15–2019–1877.

**Уколова П.А.**

**Винокуров А.Ю.**