

## ПЕПТИДНЫЕ ТОКСИНЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ИОННЫЕ КАНАЛЫ, КАК ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЕ АГЕНТЫ ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

*Е.В. Юрова\*, Е.В. Расторгуева, Е.А. Белобородов, Д.Е. Сугак, Е.С. Погодина, А.Н. Фомин, Ю.В. Саенко*

Научно-исследовательский технологический институт имени С.П. Капицы Ульяновского государственного университета, 432017, Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42; \*эл. почта: urovaev523@gmail.com

Ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) — совокупность процессов и событий, сопровождаемая нарушением кровоснабжения в ткани или органе с последующим восстановлением кровотока. Особо остро проблема ИРП стоит в хирургии и трансплантологии. Одна из стратегий снижения повреждения органов и тканей при трансплантации — регуляция внутриклеточных концентраций ионов. Поддержание концентрации ионов в клетке во время развития повреждения можно контролировать, воздействуя на потенциал-зависимые ионные каналы определёнными типами соединений. Мы предлагаем снижать ишемически-реперфузионное повреждение при помощи пептидных токсинов, тропных к кальциевым (омега-гексатоксин-Hv1a) и натриевым (мю-агатоксин-Aa1a) потенциал-зависимым ионным каналам. Токсины были получены с использованием твердофазного пептидного синтеза. Моделирование ИРП при действии токсинов проводили на культуре клеток эпителиального происхождения СНО-K1 при инкубации в условиях гипоксии и депривации питательных веществ с последующим восстановлением питательной среды. Уровень клеточной гибели, концентрации ионов кальция, натрия, калия и уровень pH фиксировали с использованием мультимодального планшетного ридера и флуоресцентных красителей. В итоге, оба токсина, несмотря на разный механизм действия, снижают развитие клеточной гибели СНО-K1 за счёт изменения концентраций ионов и поддержания уровня pH.

**Ключевые слова:** ишемически-реперфузионное повреждение; потенциал-зависимые кальциевые каналы; потенциал-зависимые натриевые каналы; пептидный токсин

**DOI:** 10.18097/PBMCR1553

### ВВЕДЕНИЕ

Ишемическое повреждение — совокупность процессов и событий, сопровождаемая нарушением кровотока в ткани или органе. Последующее восстановление потока кислорода и питательных веществ парадоксальным образом усугубляет ишемическое повреждение и приводит к ишемически-реперфузионному повреждению (ИРП). Особо остро проблема ИРП стоит в хирургии и трансплантологии. ИРП — основная причина осложнений и даже смертности при хирургических операциях или трансплантации печени, почек, лёгких, яичников и т.д. [1–3].

Ишемия возникает в результате забора донорского органа (тёплая ишемия), хранения в холодном консервирующем растворе (холодная ишемия) и во время приживления, что вызывает глубокую гипоксию тканей, клеточный метаболический дисбаланс и микрососудистую дисфункцию [3–5]. Реперфузионное повреждение в данном случае происходит через несколько часов или дней после первоначальной ишемии при приживлении органа и проявляется в дисфункции аллотрансплантата [3, 6].

ИРП — результат нескольких взаимосвязанных процессов. Снижение оксигенации тканей изменяет метаболизм клеток из-за снижения поступления кислорода и удаления конечных продуктов. Переход к анаэробному метаболизму клеток приводит

к снижению продукции АТФ, накоплению лактата и внутриклеточному ацидозу. Это вызывает накопление ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , активацию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеаз (кальпаины), дестабилизацию лизосомальных мембран с утечкой лизосомальных ферментов, разрушением цитоскелета и ингибированием активности мембраносвязанных  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз. Восстановление потока крови (реперфузия) также связано с производством активных форм кислорода (АФК). АФК могут изменять мембраны и ДНК посредством перекисного окисления липидов и карбонилирования белков. Избыток  $\text{Ca}^{2+}$  и АФК в сочетании с митохондриальной дисфункцией вызывает открытие митохондриальной поры mPTP (mitochondrial permeability transition pore) и последующее высвобождение цитохрома c, митохондриальной ДНК и сукцината [7, 8]. Умеренная ишемия и реперфузия при трансплантации органов могут привести к дисфункции клеток, которая может нивелироваться из-за активации систем восстановления для контроля продукции АФК. Однако длительная и тяжёлая ишемия и реперфузия вызывают гибель клеток путём апоптоза и некроза [2].

Стратегии снижения ИРП при трансплантации органов в настоящее время во многом связаны с выяснением физиологических и молекулярных путей, активируемых во время ИРП. Одной из таких стратегий является регуляция концентраций ионов.



© 2025 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

Хорошо известна роль потенциал-зависимых ионных каналов в развитии ИРП сердца и мозга [2, 9]. Однако ряд исследований показывает, что потенциал-зависимые ионные каналы экспрессируются и в невозбудимых клетках [10, 11]. При этом их предполагаемые физиологические функции и регуляция их активности в невозбудимых клетках, особенно при развитии ИРП, остаются предметом активной дискуссии, поскольку в первую очередь потенциал-зависимые ионные каналы являются молекулярными детерминантами клеточной возбудимости [12, 13]. В этом случае потенциал-зависимые ионные каналы в невозбудимых клетках опосредуют ключевые клеточные функции посредством внутриклеточных биохимических механизмов, а не быстрой электрической сигнализации [14]. Особый интерес представляют потенциал-зависимые кальциевые и натриевые ионные каналы, которые играют важную роль, модулируя движущую силу притока  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^{+}$  в невозбудимые клетки. Каналы также участвуют в регуляции объёма клеток, инициируя потерю внутриклеточного  $\text{K}^{+}$  и сопутствующую потерю воды, что приводит к уменьшению объёма клеток [15].

Мы предлагаем использовать в качестве регуляторов активности потенциал-зависимых кальциевых и натриевых каналов в невозбудимых клетках токсины членистоногих (омега-гексатоксин-Hv1a из паука *Hadronyche versuta* как блокатор кальциевых каналов (Uniprot: T01A\_HADVE) и мю-агатоксин-Aa1a паука *Agelenopsis aperta* (Uniprot: T5G1A\_AGEAP) как модулятор натриевых каналов). Эти токсины относятся к семейству кноттинов, что обуславливает их высокую аффинность к целевым каналам-мишеням и повышенную биодоступность за счёт стабильности в отношении температуры, протеаз и pH. Более подробно механизм действия мю-агатоксина-Aa1a уже описан ранее [16]. В данной работе приведён сравнительный анализ влияния мю-агатоксина-Aa1a и омега-гексатоксина-Hv1a на выживаемость клеток при моделировании ИРП при акцентировании внимания на ключевые параметры, такие как клеточная гибель и динамика ионов и pH.

## МЕТОДИКА

### Пептидный синтез токсинов, анализ, очистка, фолдинг

Синтез токсинов проводили на пептидном синтезаторе ResPep SL (“Intavis”, Германия) в соответствии со стандартным протоколом твердофазного синтеза [17]. Для синтеза использовали Fmoc-защищённые аминокислоты (“Intavis”), в качестве активатора использовали HBTU (“Кемикал Лайн”, Россия).

Анализ токсинов выполнен на колонке Dr. Maisch Luna C18 с использованием ВЭЖХ системы Shimadzu LC-20AD XR (“Shimadzu”, Япония) с детектором SPD-20A и протокола градиентного элюирования из 95% А (деионизированная вода)

и 5% Б (ацетонитрил, “Криохром”, Россия). Для масс-спектрометрического анализа использовали аппаратно-программный комплекс MALDI-TOF MS FLEX серии (“Bruker Daltonics”, Германия). Для очистки токсинов на сорбенте Bio-Gel P-4 на колонке Econo-Column 1×30 см (“Bio-Rad”, США) использовали ВЭЖХ (хроматографическая система NGC Quest™ 10, “Bio-Rad”).

Фолдинг токсинов проводили в буфере, содержащем 10 mM восстановленного и 1 mM окисленного глутатиона в 0,1 M Tris-HCl (все реактивы от “ПанЭко”, Россия), при pH 8,0 и 4°C при постоянном перемешивании в течение 24 ч [18].

### Клеточная культура и экспериментальные условия

В исследовании использовали культуру эпителиального происхождения CHO-K1 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (“ПанЭко”) с периодичностью пассажа один раз в 3–4 дня с использованием 0,25% трипсина (“ПанЭко”).

Перед экспериментом клетки переносили в 96-луночные планшеты и оставляли до достижения экспоненциальной стадии роста. Для моделирования ИРП клетки помещали сначала в условия пониженного содержания кислорода и питательных веществ (среда DMEM с 1 г/л глюкозы (“ПанЭко”) и 1% фетальной бычьей сыворотки (“Biosera”, Франция)) в инкубаторе с 1%  $\text{O}_2$  и 5%  $\text{CO}_2$  (“Binder”, Германия) на 3 ч для ишемии, затем в условия нормального содержания веществ и кислорода (стандартная среда для культивирования с 10% сывороткой при 18,6%  $\text{O}_2$  и 5%  $\text{CO}_2$ ) на 3 ч для реперфузии [19]. Токсины, растворённые в деионизированной воде, добавляли в начале стадии реперфузии в конечной концентрации 50 нМ.

### Флуоресцентный анализ

Через 3 ч реперфузии для детекции клеточной гибели в среду добавляли флуоресцентные красители Yo-Pro 1 и PI в конечной концентрации 1 мкМ [20], а также индикаторы ионов кальция, Rhod 2 AM 500 нМ [21], натрия, ION NaTRIUM Green 2 AM 500 нМ [22], калия, ION Potassium Green 2 AM 500 нМ [23]. Для анализа динамики pH использовали 1 мкМ краситель BCECF AM [24], который добавляли сразу после ишемии и через 30 мин, 1,5 ч и 3 ч от начала реперфузии. Все красители инкубировали с клетками в течение 20 мин в темноте. Затем среду с красителями убирала, и лунки планшета дважды промывали тёплым фосфатно-солевым буфером (“Sigma-Aldrich”, США). Фиксирование флуоресценции проводили с помощью мультимодального планшетного ридера CLARIOstar Plus (“BMG LABTECH”, Германия) в 100 мкл буфера в режиме матриксного сканирования. Обработку результатов проводили с использованием программы MARS (“BMG LABTECH”). Концентрацию клеток подсчитывали с использованием камеры Горяева и проводили нормализацию данных на 100000 клеток в MS Excel.

## Анализ клеточного индекса

Реакцию клеток на моделирование ИРП и действие токсинов оценивали по изменению их “распластанности” в изменяющих условиях по динамике клеточного индекса в реальном времени. Для этого использовали клеточный анализатор xCELLigence RTCA-S16 (“ACEA Biosciences”, США) [25]. После пассажа культуру клеток засеивали в 16-луночный планшет в стандартной среде, предварительно зафиксировав нулевую точку. При достижении экспоненциальной стадии среду заменяли для моделирования ишемии и переносили в инкубатор с 1% O<sub>2</sub>. Через 3 ч среду заменяли для реперфузии и переносили в нормальные условия. Также в среду для реперфузии добавляли токсины в концентрации 50 нМ. Клеточный индекс фиксировали на протяжении всех манипуляций. Группу с нормальными условиями воздействию не подвергали.

## Статистическая обработка данных

Все эксперименты выполняли в трёх повторах по минимум три группы в каждом. Для определения характера распределения использовали критерии асимметрии и эксцесса. Для оценки статистической значимости различий (ввиду малого размера выборки) использовали тест Манна-Уитни; обработку проводили в программе Origin (“OriginLab”, США). Для устранения

эффекта множественных сравнений использовали тест Бонферрони, различия между группами считали статистически значимыми при  $p \leq 0,01$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Оба токсина были получены в результате твердофазного пептидного синтеза с чистотой более 90% (рис. 1). Токсины прошли стадию рефолдинга, в результате которой приобрели структуру, характерную для кноттинов, в виде трёх бета-слоев за счёт формирования дисульфидных мостиков. Далее влияние токсинов анализировали при моделировании ИРП в культуре СНО-K1.

Анализ уровня клеточной гибели (при окрашивании Yo-Pro 1 как показателя раннего апоптоза [26] и PI как показателя позднего апоптоза и/или некроза [27]) в культуре СНО-K1 при моделировании условий ИРП показывает повышение обоих показателей в среднем в 2,5 раза относительно нормальных условий культивирования (рис. 2).

При анализе клеточной гибели на стадии реперфузии добавление токсина мю-агатоксин-Aa1a — модулятора натриевых потенциал-зависимых каналов — поддерживает состояние клеток, как в группе с нормальными условиями культивирования. Токсин омега-гексатоксин-Hv1a также вызывает снижение клеточной гибели, однако в отношении раннего апоптоза эффект более выражен.

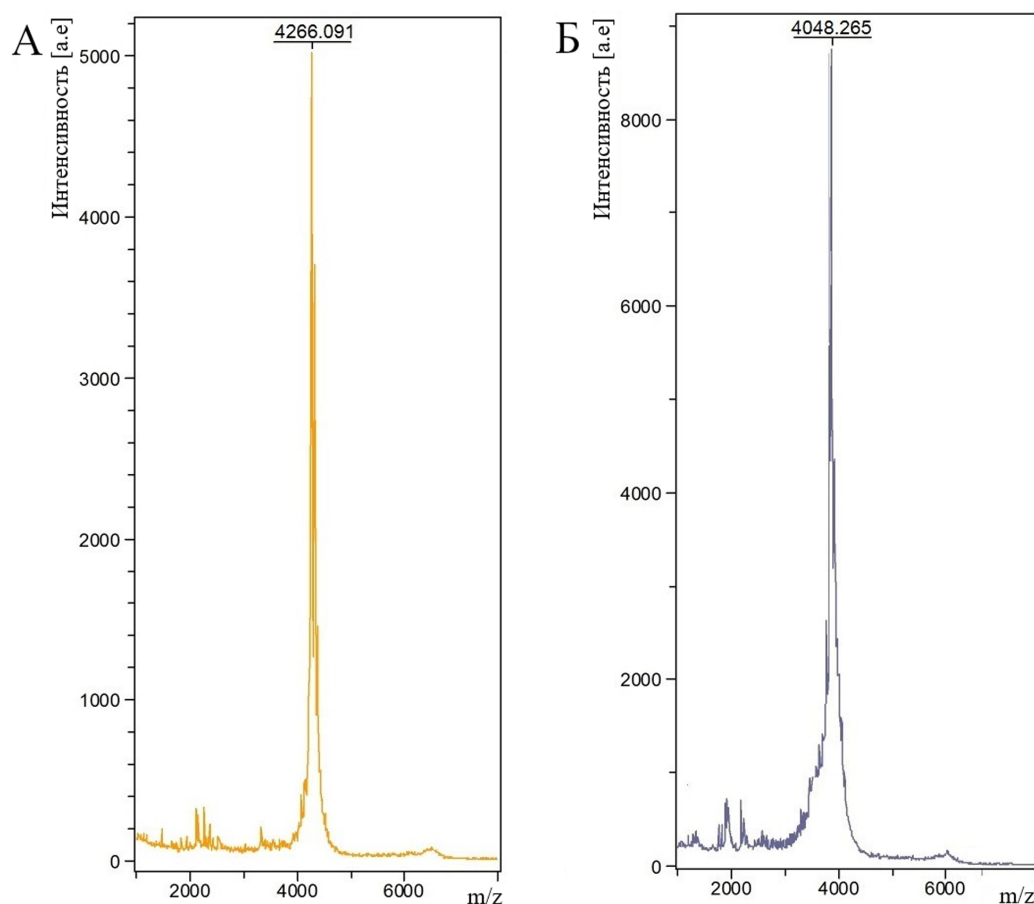
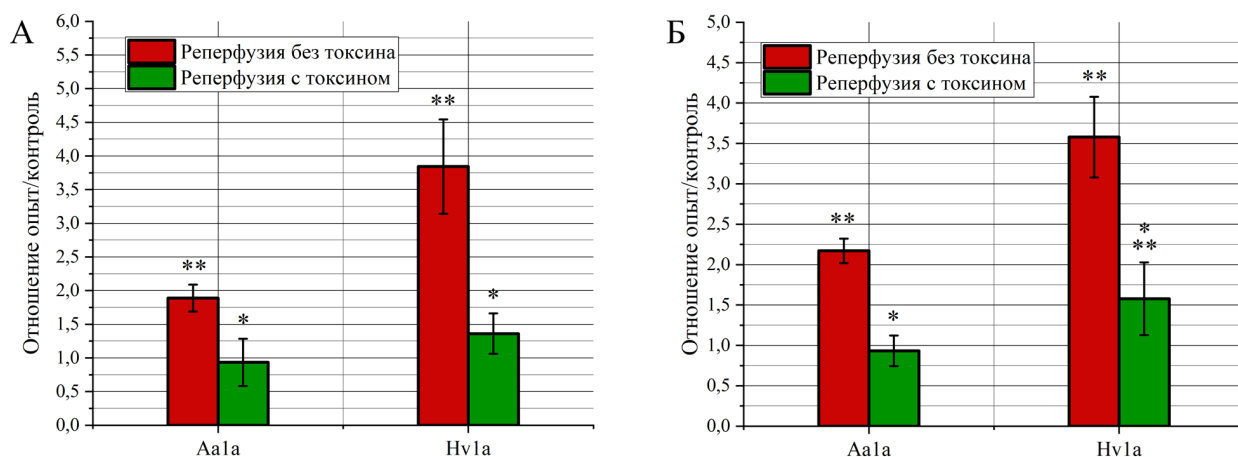
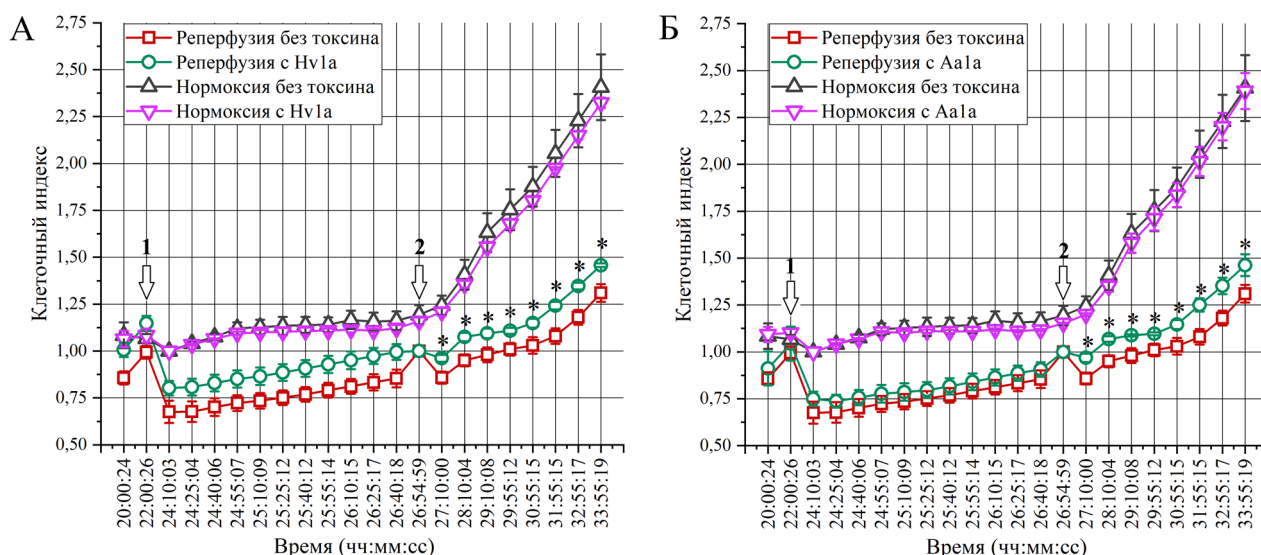


Рисунок 1. Масс-спектрограммы мю-агатоксина-Aa1a (А) и омега-гексатоксина-Hv1a (Б).



**Рисунок 2.** Детекция клеточной гибели при окрашивании Yo-Pro 1 (А) и PI (Б) на стадии реперфузии в присутствии токсинов и без них в культуре СНО-K1. Данные представлены в виде отношения интенсивности флуоресценции в относительных единицах экспериментальной группы (опыт) к группе с нормальными условиями культивирования (контроль) (\* – статистически значимое отличие от группы “реперфузия без токсина”,  $p < 0,01$ , \*\* – статистически значимое отличие от нормальных условий культивирования,  $p < 0,01$ ).



**Рисунок 3.** Динамика клеточного индекса как показателя изменения адгезии клеток под действием различных условий среды, культуры СНО-K1 при моделировании ИРП и в условиях нормоксии в присутствии токсинов омега-гексатоксин-Hv1a (А) и мю-агатоксин-Aala (Б) и без (точка 1 – начало ишемии (для группы “нормоксия” – смена среды), точка 2 – начало реперфузии; группа реперфузии нормализована по точке 2, группа нормоксия по точке 1; \* – статистически значимое отличие от группы “реперфузия без токсина”,  $p < 0,01$ ).

Другой показатель, который также отражает реакцию клеток на внешнее воздействие, проявляющуюся в изменении адгезии клеток — клеточный индекс (рис. 3).

Изменение клеточного индекса фиксировали в четырёх состояниях: нормальные условия культивирования (нормоксия), нормоксия при добавлении токсинов, экспериментальные условия ИРП и ИРП с токсинами на стадии реперфузии. Видно, что сами по себе токсины не оказывают влияния на распластанность клеток, что можно интерпретировать как отсутствие влияния на жизнеспособность клеток в целом (рост клеток продолжается в той же динамике,

что и при нормальных условиях). Однако при возникновении дисбаланса ионов в клетках, как при моделировании ИРП, начинает проявляться эффект действия токсинов.

Если отдельно рассмотреть изменение клеточного индекса при смене состояний, характерных для ИРП, видно, что в начале ишемии (рис. 3, точка 1) индекс резко снижается, однако дальше продолжает медленно расти, что свидетельствует об адаптации клеток к сниженным показателям сыровотки, глюкозы и кислорода. На стадии реперфузии (рис. 3, точка 2) при возобновлении содержания питательных веществ и кислорода индекс также резко снижается, при этом возврат к первоначальному показателю

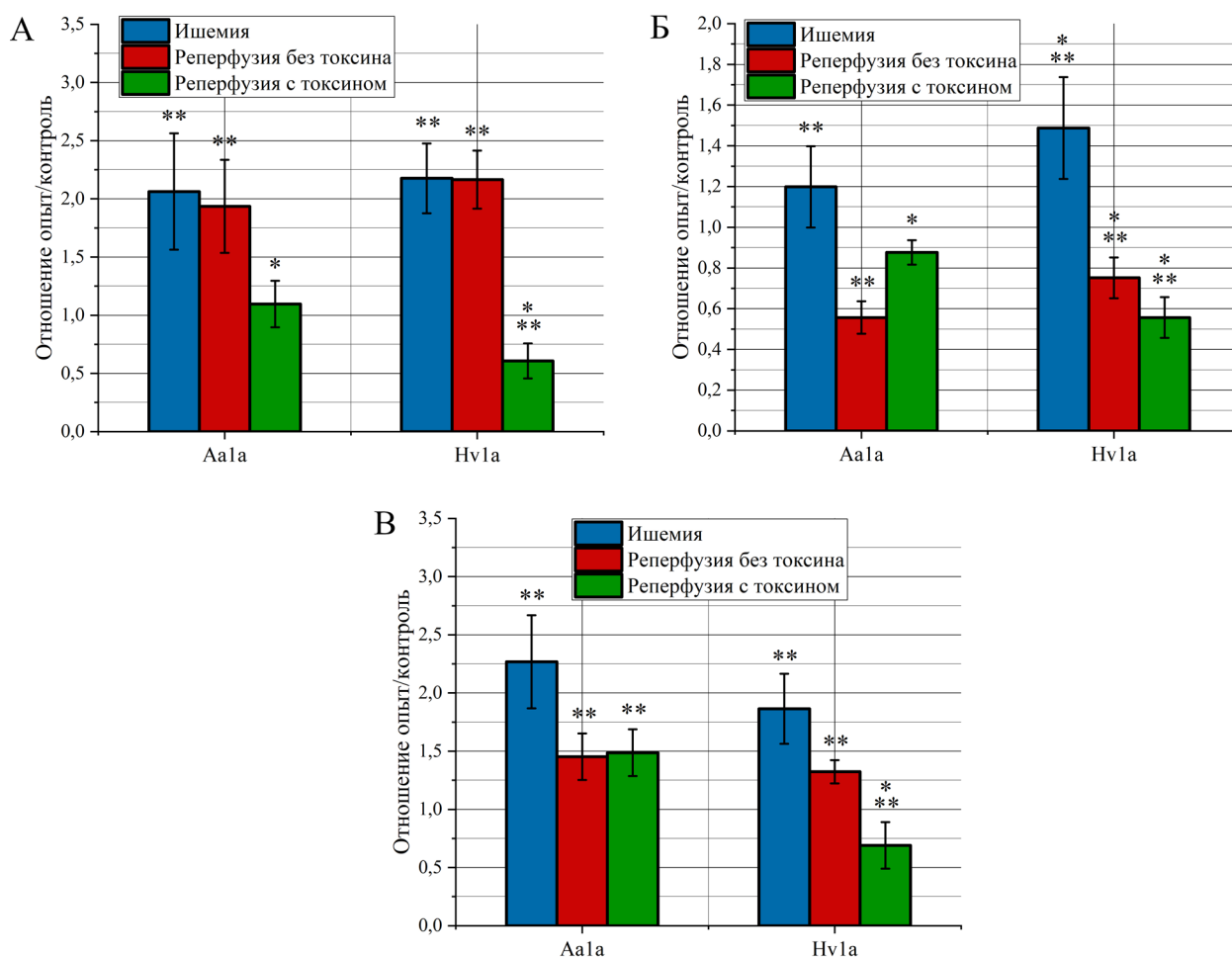
## ПЕПТИДНЫЕ ТОКСИНЫ КАК ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЕ АГЕНТЫ

(до начала реперфузии) происходит в течение 3 ч. В присутствии токсинов картина другая. Добавление в среду для реперфузии мю-агатоксина-Aa1a приводит к незначительному падению индекса в первые 20 мин, затем индекс быстро нормализуется до исходного значения и продолжает расти с прежней динамикой. Похожая картина отмечена при добавлении омега-гексатоксина-Hv1a: индекс также относительно быстро нормализуется и продолжает расти, в то время как в группе с реперфузией без токсинов повышение индекса замедляется.

Анализ динамики ионов кальция, натрия и калия при развитии ИРП указывает на то, что на стадии ишемии концентрация всех ионов значительно возрастает (рис. 4).

На стадии реперфузии концентрация ионов кальция также остаётся повышенной на том же уровне, что и при ишемии (рис. 4А), а концентрация ионов натрия и калия снижается (рис. 4Б,В). При этом концентрация натрия снижается до уровня ниже нормальных условий, а концентрация калия, несмотря на снижение относительно ишемической стадии, остаётся

повышенной относительно нормальных условий культивирования. Эффект токсинов, несмотря на их схожесть в снижении клеточной гибели, различается. Так, омега-гексатоксин-Hv1a, проявляет себя в соответствии со своей биологической функцией. Являясь блокатором кальциевых каналов, он снижает концентрацию ионов кальция почти в 4 раза относительно группы без токсина, что значительно ниже концентрации в нормальных условиях. Концентрации натрия и калия при снижении на стадии реперфузии в присутствии токсина снижаются ещё больше, так что концентрации обоих ионов были ниже концентраций в нормальных условиях. При добавлении в среду для реперфузии токсина мю-агатоксин-Aa1a видно, что концентрация кальция снижается, но до уровня нормальных условий (в отличие от омега-гексатоксина-Hv1a). Концентрация ионов натрия также снижается относительно ишемии, но в отличие от реперфузии без токсина, где концентрация значительно падает, снижение происходит до нормального уровня. При этом изменений в концентрации ионов калия не отмечено.



**Рисунок 4.** Концентрации ионов кальция (А), натрия (Б) и калия (В) на разных стадиях моделирования ИРП в культуре СНО-К1 в присутствии токсинов и без в виде отношения интенсивности флуоресценции в относительных единицах экспериментальной группы (опыт) к группе с нормальными условиями культивирования (контроль) (\* – статистически значимое отличие от группы “реперфузия без токсина”,  $p < 0,01$ , \*\* – статистически значимое отличие от нормальных условий культивирования,  $p < 0,01$ ).



В прямой взаимосвязи с внутриклеточными концентрациями ионов находится уровень pH. На рисунке 5 видно, что на стадии ишемии развивается ацидоз (0 мин реперфузии).

При последующей реперфузии происходит значительное повышение pH с последующим снижением на всей стадии реперфузии до уровня ниже нормальных условий. Токсин омега-гексатоксин-Hv1a предотвращал резкое повышение pH, поддерживая данный показатель на пониженном уровне на всей стадии реперфузии (рис. 5А). Токсин мю-агатоксин-Aa1a ведёт себя иначе (рис. 5Б). При его добавлении в среду в начале стадии реперфузии уровень pH также повышается, однако поддерживается на повышенном уровне на всей стадии реперфузии в отличие от омега-гексатоксина-Hv1a.

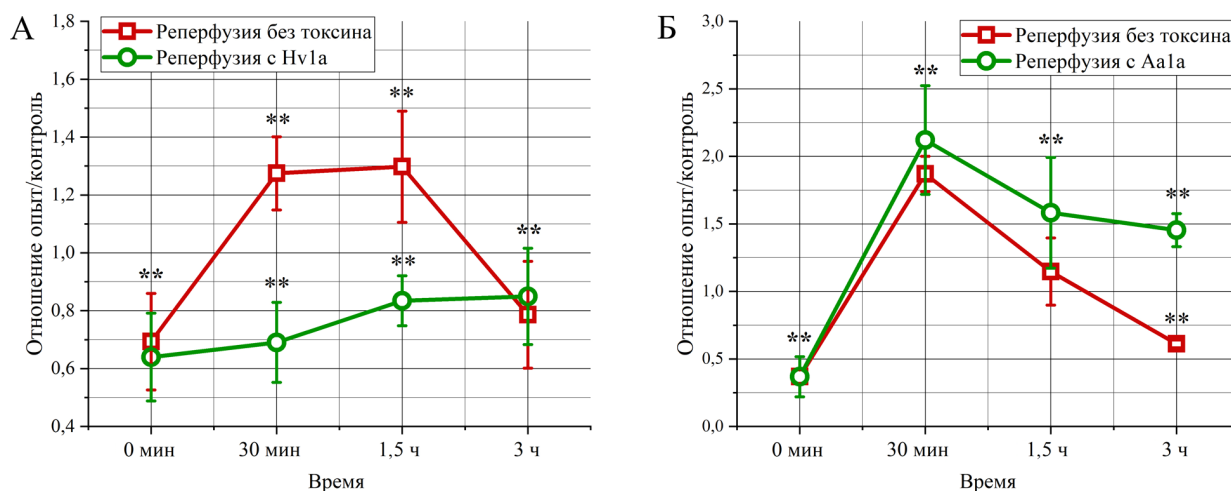
## ОБСУЖДЕНИЕ

Роль ионов в развитии ИРП возбудимых клеток доказана давно [28]. Однако участие потенциал-зависимых ионных каналов в развитии данной патологии изучено мало. Кроме того, каноническая роль потенциал-зависимых кальциевых и натриевых каналов в импульсном электрогенезе и проводимости в возбудимых клетках хорошо известна и относительно хорошо изучена [29–32]. Тем не менее, помимо экспрессии кальциевых и натриевых каналов в нейронах, миоцитах, кардиомиоцитах и других возбудимых клетках, существуют убедительные доказательства того, что несколько подтипов потенциал-зависимых каналов — тех же каналов, которые поддерживают электрогенез в нервных клетках, мышечных клетках и сердечных миоцитах, — экспрессируются в типах клеток, которые считаются невозбудимыми [12, 33]. При этом данные каналы играют немаловажную роль в функционально значимых процессах. Экспрессия натриевых и кальциевых каналов не статична и носит динамичный характер в зависимости от состояния клеток. Например, отмечено значительное повышение экспрессии натриевого канала Nav1.5 в реактивных астроцитах на границе рубцовой травмы в модели *in vitro* [34].

Дифференцировка человеческих фибробластов в миофибробласты при патологических состояниях также сопровождается экспрессией *de novo* Nav1.5 [35]. Помимо этого, в клетках Мюллера, фагоцитах активированных макрофагов также отмечено изменение экспрессии Nav1.5 [36, 37]. Аналогичная картина выявлена и при экспрессии кальциевых потенциал-зависимых каналов. Первоначальные исследования определили роль Cav каналов в проведении возбуждения-сокращения в мышцах и синаптической передаче в нейронах. Помимо относительно хорошо охарактеризованных функций каналов Cav в возбудимых клетках, многочисленные исследования продемонстрировали функциональную экспрессию данных каналов в нормальных невозбудимых клетках, таких как эмбриональные и стволовые клетки [38, 39], лимфоциты [40], ретикулярный пигментный эпителий [41] и в ряде типов эпителиальных раковых клеток [42]. Кроме того, использование блокаторов кальциевых каналов при лечении гипертрофических нарушений заживления ран подчёркивает роль потенциал-зависимых каналов в коже [43], также, как и повышенная экспрессия Cav1.2 в клапанах у пациентов с кальцифицированным аортальным стенозом [44].

Все эти данные подчёркивают важность потенциал-зависимых кальциевых и натриевых каналов в невозбудимых клетках, особенно при развитии патологических состояний. ИРП является одним из таких состояний и, что особенно важно, при трансплантации органов.

Известно, что при реперфузии после непродолжительной ишемии развивается как апоптоз, так и некроз [45, 46]. Из-за снижения поступления кислорода клетки переключаются с аэробного на анаэробный метаболизм, что приводит к снижению продукции АТФ и внутриклеточному ацидозу из-за образования лактата. Это в свою очередь ведёт к ингибированию  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Данный процесс приводит к внутриклеточному накоплению ионов  $\text{Na}^+$  и воды с последующим набуханием клеток. Из-за снижения экскреции  $\text{Ca}^{2+}$  происходит внутриклеточное накопление  $\text{Ca}^{2+}$ ,



**Рисунок 5.** Динамика pH при ИРП в культуре CHO-K1 в присутствии токсинов (А – омега-гексатоксин-Hv1a; Б – мю-агатоксин-Aa1a) и без (\*\* – статистически значимое отличие от нормальных условий,  $p < 0,01$ ).

что вызывает активацию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеаз и поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии. В митохондриях перегрузка  $\text{Ca}^{2+}$  ответственна за генерацию активных форм кислорода. Это приводит к открытию митохондриальной поры mPTP после реперфузии на фоне продолжающегося повышения концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [9]. Массивный приток  $\text{Na}^+$  внутрь клетки, который продолжается во время реперфузии за счёт вытеснения избыточного количества ионов  $\text{H}^+$  через  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник, заставляет  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник работать нестандартно, выкачивая  $\text{Na}^+$  в обмен на  $\text{Ca}^{2+}$  [47, 48], что также усугубляет накопление ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Последующие процессы, запускаемые ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^+$ , ведут к гибели клеток. Решить данную проблему можно с использованием препаратов, нацеленных на ионные каналы, через которые происходит транспорт ионов из/в клетку.

Исследования роли потенциал-зависимых каналов при трансплантации органов и перспективах использования данной стратегии для снижения ишемически-реперфузионного повреждения проводят ещё с начала 90-х годов прошлого века. Так, было показано, что блокаторы кальциевых каналов верапамил, бепридил и нифедипин снижают апоптоз в почечных канальцах почек в крысиной модели ИРП [49]. Использование верапамила при ишемии эпителиальных клеток кишечника также снижает уровень гибели в модели *in vitro* [50]. Антиоксидантный механизм нейропротекторной активности верапамила был показан в модели ИРП головного мозга крысы [51]. В отношении потенциал-зависимых натриевых каналов получены немногочисленные данные. Например, использование лидокаина как блокатора натриевых каналов при моделировании ИРП почек на крысиной модели показало снижение клеточной гибели [52].

Мы использовали пептидные токсины из яда паукообразных для снижения ИРП. Эволюционно токсины членистоногих обладают высокой аффинностью в отношении конкретных типов ионных каналов, в отличие от синтетических препаратов [53]. Мы сконцентрировали внимание на двух токсинах: омега-гексатоксин-Hv1a из паука *Hadronyche versuta* и мю-агатоксин-Aa1a паука *Agelenopsis aperta*. Данные токсины имеют разные механизмы действия. Так, омега-гексатоксин-Hv1a — это ингибитор кальциевых каналов типа Cav1.2, Cav2.1 и Cav2.2, который блокирует проводимость ионов кальция [54]; в то время как мю-агатоксин-Aa1a — модулятор натриевых каналов. Модификация натриевых каналов токсином приводит к повышению чувствительности этих каналов к мембранному потенциалу за счёт смещения кривой активации к более отрицательному потенциалу. Это приводит к повышенной вероятности открытия натриевых каналов при изменении потенциала мембраны. Также стоит учесть, что исследование действия токсинов проводили на культуре СНО-K1, которая относится к невозбудимым клеткам и экспрессирует как натриевые, так и кальциевые потенциал-зависимые каналы.

Добавление обоих токсинов в питательную среду на стадии реперфузии приводило к тому, что скорость развития клеточной гибели снижалась (рис. 2). При этом омега-гексатоксин-Hv1a имел более выраженный эффект. Распластанность клеток как один из показателей реакции клеток на воздействие при действии токсинов в условиях реперфузии также повышалась относительно контрольной группы без токсинов (рис. 3). В отношении данного показателя токсины действуют одинаково, а также не оказывают влияния на клеточную культуру при добавлении в питательную среду без индукции клеточной гибели.

Поскольку ключевые процессы при развитии ИРП связаны с изменением концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , то отдельно фиксировали изменение данных параметров (рис. 4). Видно, что изменение концентраций ионов, как на стадии ишемии, так и на стадии реперфузии происходит в соответствии с каноничными механизмами: растёт концентрация всех ионов на стадии ишемии, при этом на стадии реперфузии концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  остаётся повышенной, а концентрации  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  снижаются до уровня близких к физиологическим условиям (ионы  $\text{K}^+$ ) или до уровня ниже физиологических (ионы  $\text{Na}^+$ ). Токсины в данном случае ведут себя по-разному, что обусловлено механизмом их действия. Так, блокатор кальциевых каналов омега-гексатоксин-Hv1a значительно снижает концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  до уровня значительно ниже нормальных. В то же время модулятор натриевых каналов мю-агатоксин-Aa1a снижает концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^+$  до физиологического уровня, при этом не оказывая влияния на концентрацию  $\text{K}^+$  (уровень соответствует контрольному без токсина).

Особенно важным при развитии ИРП является развитие парадокса рН. Он связан с тем, что при ишемии начинается ацидоз из-за накопления ионов  $\text{H}^+$  в результате перехода клеток на гликолитическое энергосбережение. При последующей реперфузии, когда восстановленный кровоток доставляет питательные вещества, развивается алкалоз, когда уровень рН резко возрастает до уровня выше физиологического и клетки начинают погибать [55]. Это мы видим в наших экспериментах (рис. 5). Сразу после ишемии отмечается пониженный рН. В первые 30 мин ишемии уровень рН возрастает и остаётся выше нормального, медленно снижаясь до первоначального в последующие 2,5 ч. Всё это сопровождается повышенной гибелью клеток. При добавлении токсинов картина меняется. Омега-гексатоксин-Hv1a предотвращает повышение рН на всей стадии реперфузии (рис. 5А). В то время, как мю-агатоксин-Aa1a, несмотря на первичное повышение рН как в контрольной группе, поддерживает повышенный уровень на всём протяжении реперфузии (рис. 5Б).

Таким образом, при моделировании условий ИРП в культуре клеток эпителиального происхождения СНО-K1 запускаются процессы клеточной гибели, что обусловлено повышением

концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и уровня pH при реперфузии после ацидоза, развившегося при ишемии. Токсин омега-гексатоксин-Hv1a выступает в роли блокатора кальциевых каналов — одного из путей поступления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку при реперфузии. Блокировка каналов приводит к снижению концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , что в свою очередь оказывает влияние на ионы  $\text{Na}^+$ . Блокируя кальциевые каналы, токсин вызывает снижение  $\text{Ca}^{2+}$ , в результате чего концентрация  $\text{Na}^+$  и  $\text{H}^+$  не повышается, а уровень pH остаётся пониженным после ишемии. Всё это ведёт к тому, что процессы, ведущие к апоптозу и некрозу, не развиваются.

С модулятором натриевых каналов мю-агатоксин-Aa1a другая картина. Ряд исследований показывает, что добавление блокаторов натриевых каналов повышает выживаемость клеток при развитии ИРП [52, 56]. Однако в нашем случае токсин выступает в роли модулятора, который поддерживает открытое состояние канала за счёт снижения его чувствительности к мембранному потенциалу. Активность натриевых каналов в невозбудимых клетках приводит к притоку  $\text{Na}^+$ , что приводит к обратной работе  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника и импорту  $\text{Ca}^{2+}$  и модуляции кальциевой сигнализации. При этом на стадии ишемии мембранный потенциал снижается за счёт работы натриевых каналов, а на стадии реперфузии начинается реполяризация, в результате чего натриевые каналы закрываются [57]. Поддержание открытого состояния натриевых каналов должно привести к увеличению клеточной гибели. Однако в условиях наших экспериментов было отмечено значительное снижение клеточной гибели. В данном случае можно провести аналогию между нашим экспериментом и работами других исследователей. Суть заключается в том, что при развитии травм или иных патологических состояний увеличивается экспрессия натриевых каналов [34, 35]. В нашем случае компенсация поступления ионов  $\text{Na}^+$  в клетку идет не за счёт увеличения экспрессии каналов, а за счёт поддержания этих каналов в открытом состоянии. В результате чего отток  $\text{Na}^+$  происходит не только за счёт обмена на  $\text{H}^+$  через соответствующий обменник, но и за счёт оттока  $\text{Na}^+$  через открытые потенциал-зависимые каналы, при этом отток идёт со значительно меньшей скоростью. Ещё один немаловажный момент — скорость связывания токсина с каналом. Как мы видим на рисунке 5, токсин начинает работать только через 30 мин от начала реперфузии, что проявляется в медленном снижении pH в течение последующих 2,5 ч.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на различный механизм действия, оба токсина проявляют себя как цитопротекторные агенты в условиях ишемически-реперфузионного повреждения эпителиальных тканей. Полученные данные можно использовать для снижения дисфункций аллотрансплантата при пересадке органов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FEUF-2022-0008).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Ни один человек/животное не принимали непосредственного участия в процессе отбора биоматериала во время этого исследования. Местные российские нормативные акты не требуют согласования использования биоматериалов клеточных линий для научных исследований (Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Teodoro J.S., da Silva R.T., Machado I.F., Panisello-Roselló A., Roselló-Catafau J., Rolo A.P., Palmeira C.M. (2022) Shaping of hepatic ischemia/reperfusion events: the crucial role of mitochondria. *Cells*, **11**(4), 688. DOI: 10.3390/cells11040688
2. Dugbartey G.J. (2024) Cellular and molecular mechanisms of cell damage and cell death in ischemia-reperfusion injury in organ transplantation. *Mol. Biol. Rep.*, **51**(1), 473. DOI: 10.1007/s11033-024-09261-7
3. Liu J., Man K. (2023) Mechanistic insight and clinical implications of ischemia/reperfusion injury post liver transplantation. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **15**(6), 1463–1474. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2023.03.003
4. Zhou M., Yu Y., Luo X., Wang J., Lan X., Liu P., Feng Y., Jian W. (2021) Myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutics from a mitochondria-centric perspective. *Cardiology*, **146**(6), 781–792. DOI: 10.1159/000518879
5. Christie J.D., Kotloff R.M., Ahyia V.N., Tino G., Pochettino A., Gaughan C., de Missie E., Kimmel S.E. (2005) The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **171**(11), 1312–1316. DOI: 10.1164/rccm.200409-1243OC
6. Masior L., Grq M. (2022) Primary nonfunction and early allograft dysfunction after liver transplantation. *Digestive Diseases*, **40**(6), 766–776. DOI: 10.1159/000522052
7. Criner R.N., Clausen E., Cantu E. (2021) Primary graft dysfunction. *Curr. Opin. Organ Transplant.*, **26**(3), 321–327. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000876
8. Lasorsa F., Rutigliano M., Milella M., d'Amati A., Crocetto F., Pandolfo S.D., Barone B., Ferro M., Spilotros M., Battaglia M., Ditunno P., Lucarelli G. (2024) Ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and potential therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**(8), 4332. DOI: 10.3390/ijms25084332
9. Nieuwenhuijs-Moeke G.J., Pischke S.E., Berger S.P., Sanders J.S.F., Pol R.A., Struys M.M.R.F., Ploeg R.J., Leuvenink H.G.D. (2020) Ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation: relevant mechanisms in injury and repair. *J. Clin. Med.*, **9**(1), 253. DOI: 10.3390/jcm9010253



10. Frank A., Bonney M., Bonney S., Weitzel L., Koeppen M., Eckle T. (2012) Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, **16**(3), 123–132. DOI: 10.1177/1089253211436350
11. Lin L., Wang X., Yu Z. (2016) Ischemia-reperfusion injury in the brain: mechanisms and potential therapeutic strategies. *Biochem. Pharmacol. (Los Angeles)*, **5**(4), 213. DOI: 10.4172/2167-0501.1000213
12. Piskowski R., Haeberle H., Panditrao M.V., Lumpkin E.A. (2008) Voltage-activated ion channels and Ca(2+)-induced Ca(2+) release shape Ca(2+) signaling in Merkel cells. *Pflugers Arch.*, **457**(1), 197–209. DOI: 10.1007/s00424-008-0496-3
13. Sontheimer H. (2008) An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **233**(7), 779–791. DOI: 10.3181/0711-MR-308
14. Stokes L., Gordon J., Grafton G. (2004) Non-voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channels in human T cells: pharmacology and molecular characterization of the major alpha pore-forming and auxiliary beta-subunits. *J. Biol. Chem.*, **279**(19), 19566–19573. DOI: 10.1074/jbc.M401481200
15. Badou A., Jha M.K., Matza D., Flavell R.A. (2013) Emerging roles of L-type voltage-gated and other calcium channels in T lymphocytes. *Front. Immunol.*, **4**, 243. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00243
16. Iurova E., Rastorgueva E., Beloborodov E., Pogodina E., Fomin A., Sugak D., Viktorov D., Tumozov I., Saenko Y. (2023) Protective effect of peptide calcium channel blocker omega-hexatoxin-Hv1a on epithelial cell during ischemia-reperfusion injury. *Pharmaceuticals*, **16**(9), 1314. DOI: 10.3390/ph16091314
17. Amblard M., Fehrentz J.A., Martinez J., Subra G. (2006) Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.*, **33**(3), 239–254. DOI: 10.1385/MB:33:3:239
18. Moore S.J., Leung C.L., Norton H.K., Cochran J.R. (2013) Engineering agatoxin, a cysteine-knot peptide from spider venom, as a molecular probe for *in vivo* tumor imaging. *PLOS One*, **8**(4), e60498. DOI: 10.1371/journal.pone.0060498
19. Wenger R.H., Kurtcuoglu V., Scholz C.C., Marti H.H., Hoogewijs D. (2015) Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckland)*, **3**, 35–43. DOI: 10.2147/HP.S92198
20. Gallardo Bolaños J.M., Miró Morán Á., Balao da Silva C.M., Morillo Rodríguez A., Plaza Dávila M., Aparicio I.M., Tapia J.A., Ortega Ferrusola C., Peña F.J. (2012) Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. *PLOS One*, **7**(1), e30688. DOI: 10.1371/journal.pone.0030688
21. Fonteriz R.I., de la Fuente S., Moreno A., Lobatón C.D., Montero M., Alvarez J. (2010) Monitoring mitochondrial [Ca(2+)] dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium*, **48**(1), 61–69. DOI: 10.1016/j.ceca.2010.07.001
22. Tay B., Stewart T.A., Davis F.M., Deuis J.R., Vetter I. (2019) Development of a high-throughput fluorescent no-wash sodium influx assay. *PLOS One*, **14**(3), e0213751. DOI: 10.1371/journal.pone.0213751
23. Camilli G., Bohm M., Piffer A.C., Lavenir R., Williams D.L., Neven B., Grateau G., Georgin-Lavialle S., Quintin J. (2020)  $\beta$ -Glucan-induced reprogramming of human macrophages inhibits NLRP3 inflammasome activation in cryopyrinopathies. *J. Clin. Invest.*, **130**(9), 4561–4573. DOI: 10.1172/JCI134778
24. Alvarez-Leefmans F.J., Herrera-Perez J.J., Marquez M.S., Blanco V.M. (2006) Simultaneous measurement of water volume and pH in single cells using BCECF and fluorescence imaging microscopy. *Biophys. J.*, **90**(2), 608–618. DOI: 10.1529/biophysj.105.069450
25. Ke N., Wang X., Xu X., Abassi Y.A. (2011) The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol. Biol.*, **740**, 33–43. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6\_6
26. Idziorek T., Estaquier J., de Bels F., Ameisen J.C. (1995) YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods*, **185**(2), 249–258. DOI: 10.1016/0022-1759(95)00172-7
27. Rieger A.M., Hall B.E., Luong L.T., Schang L.M., Barreda D.R. (2010) Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. *J. Immunol. Methods*, **358**(1–2), 81–92. DOI: 10.1016/j.jim.2010.03.019
28. White B.C., Sullivan J.M., de Gracia D.J., O'Neil B.J., Neumar R.W., Grossman L.I., Rafols J.A., Krause G.S. (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.*, **179**(S1–2), 1–33. DOI: 10.1016/S0022-510X(00)00386-5
29. Rush A.M., Cummins T.R., Waxman S.G. (2007) Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.*, **579**(Pt 1), 1–14. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.121483
30. Catterall W.A. (2012) Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.*, **590**(11), 2577–2589. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.224204
31. Kushner J., Ferrer X., Marx S.O. (2019) Roles and regulation of voltage-gated calcium channels in arrhythmias. *J. Innov. Card. Rhythm Manag.*, **10**(10), 3874–3880. DOI: 10.19102/icrm.2019.101006
32. Rougier J.S., Abriel H. (2016) Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**(7 PtB), 1806–1812. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.12.014
33. Jagannathan S., Publicover S.J., Barratt C.L. (2002). Voltage-operated calcium channels in male germ cells. *Reproduction*, **123**(2), 203–215. DOI: 10.1530/rep.0.1230203
34. Pappalardo L.W., Samad O.A., Black J.A., Waxman S.G. (2014) Voltage-gated sodium channel Nav1.5 contributes to astrogliosis in an *in vitro* model of glial injury via reverse Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Glia*, **62**(7), 1162–1175. DOI: 10.1002/glia.22671
35. Chatelier A., Mercier A., Tremblier B., Thériault O., Moubarak M., Benamer N., Corbi P., Bois P., Chahine M., Faivre J.F. (2012) A distinct *de novo* expression of Nav1.5 sodium channels in human atrial fibroblasts differentiated into myofibroblasts. *J. Physiol.*, **590**(17), 4307–4319. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.233593
36. Bringmann A., Wiedemann P. (2012) Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*, **227**(1), 1–19. DOI: 10.1159/000328979
37. Carrithers M.D., Dib-Hajj S., Carrithers L.M., Tokmoulina G., Pypaert M., Jonas E.A., Waxman S.G. (2007) Expression of the voltage-gated sodium channel Nav1.5 in the macrophage late endosome regulates endosomal acidification. *J. Immunol.*, **178**(12), 7822–7832. DOI: 10.4049/jimmunol.178.12.7822
38. Leclerc C., Néant I., Webb S.E., Miller A.L., Moreau M. (2006) Calcium transients and calcium signalling during early neurogenesis in the amphibian embryo *Xenopus laevis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**(11), 1184–1191. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.005

39. Moreau M., Néant I., Webb S.E., Miller A.L., Riou J.F., Leclerc C. (2016) Ca(2+) coding and decoding strategies for the specification of neural and renal precursor cells during development. *Cell Calcium*, **59**(2–3), 75–83. DOI: 10.1016/j.ceca.2015.12.003
40. Pelletier L., Savignac M. (2018) Involvement of ion channels in allergy. *Curr. Opin. Immunol.*, **52**, 60–67. DOI: 10.1016/j.coi.2018.04.006
41. Strauss O., Mergler S., Wiederholt M. (1997) Regulation of L-type calcium channels by protein tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells. *FASEB J.*, **11**(11), 859–867. DOI: 10.1096/fasebj.11.11.9285484
42. Prevarskaya N., Ouadid-Ahidouch H., Skryma R., Shuba Y. (2014) Remodelling of Ca<sup>2+</sup> transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **369**(1638), 20130097. DOI: 10.1098/rstb.2013.0097
43. Verhiel S., Piatkowski de Grzymala A., van der Hulst R. (2015) Mechanism of action, efficacy, and adverse events of calcium antagonists in hypertrophic scars and keloids: a systematic review. *Dermatol. Surg.*, **41**(12), 1343–1350. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000506
44. Guauque-Olarte S., Messika-Zeitoun D., Droit A., Lamontagne M., Tremblay-Marchand J., Lavoie-Charland E., Gaudreault N., Arsenault B.J., Dubé M.P., Tardif J.C., Body S.C., Seidman J.G., Boileau C., Mathieu P., Pibarot P., Bossé Y. (2015) Calcium signaling pathway genes RUNX2 and CACNA1C are associated with calcific aortic valve disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **8**(6), 812–822. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.115.001145
45. Eefting F., Rensing B., Wigman J., Pannekoek W.J., Liu W.M., Cramer M.J., Lips D.J., Doevendans P.A. (2004) Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, **61**(3), 414–426. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.12.023
46. McCully J.D., Wakiyama H., Hsieh Y.-J., Jones M., Levitsky S. (2004) Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **286**(5), H1923–H1935. DOI: 10.1152/ajpheart.00935.2003
47. Schäfer C., Ladilov Y., Inserre J., Schäfer M., Haffner S., Garcia-Dorado D., Piper H.M. (2001) Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc. Res.*, **51**(2), 241–250. DOI: 10.1016/s0008-6363(01)00282-6
48. Sanada S., Komuro I., Kitakaze M. (2011) Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**(5), H1723–H1741. DOI: 10.1152/ajpheart.00553.2011
49. Toronyi E., Hamar J., Perner F., Szende B. (1999) Prevention of apoptosis reperfusion renal injury by calcium channel blockers. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **51**(3), 209–212. DOI: 10.1016/S0940-2993(99)80098-0
50. Jia Z., Chen Q., Qin H. (2012) Ischemia-induced apoptosis of intestinal epithelial cells correlates with altered integrin distribution and disassembly of F-actin triggered by calcium overload. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2012**, 617539. DOI: 10.1155/2012/617539
51. Jangholi E., Sharifi Z.N., Hoseinian M., Zarrindast M.-R., Rahimi H.R., Mowla A., Aryan H., Javidi M.A., Parsa Y., Ghaffarpasand F., Yadolla-Damavandi S., Arani H.Z., Shahi F., Movassaghi S. (2020) Verapamil inhibits mitochondria-induced reactive oxygen species and dependent apoptosis pathways in cerebral transient global ischemia/reperfusion. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2020**, 1–12. DOI: 10.1155/2020/5872645
52. Dumesz D., Cengiz B., Yunrutas O., Demir T., Oztuzcu S., Demiryurek S., Tutar E., Bayraktar R., Bulut A., Simsek H., Daglı S.N., Kılıç T., Bağcı C. (2014) Effect of verapamil and lidocaine on TRPM and NaV1.9 gene expressions in renal ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.*, **46**(1), 33–39. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.10.036
53. Kalia J., Milescu M., Salvatierra J., Wagner J., Klint J.K., King G.F., Olivera B.M., Bosmans F. (2015) From foe to friend: using animal toxins to investigate ion channel function. *J. Mol. Biol.*, **427**(1), 158–175. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.07.027
54. Tedford H.W., Gilles N., Ménéz A., Doering C.J., Zamponi G.W., King G.F. (2004) Scanning mutagenesis of omega-atracotoxin-Hv1a reveals a spatially restricted epitope that confers selective activity against insect calcium channels. *J. Biol. Chem.*, **279**(42), 44133–44140. DOI: 10.1074/jbc.M404006200
55. Lemasters J.J., Bond J.M., Chacon E., Harper I.S., Kaplan S.H., Ohata H., Trollinger D.R., Herman B., Cascio W.E. (1996) The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS*, **76**, 99–114. DOI: 10.1007/978-3-0348-8988-9\_7
56. Kamisli S., Basaran C., Batcioglu K., Oztanir M.N., Gul M., Satilmis B., Uyumlu A.B., Kayhan B., Genc M. (2019) Neuroprotective effects of the new Na channel blocker rs100642 in global ischemic brain injury. *Arch. Med. Sci.*, **15**(2), 467–474. DOI: 10.5114/aoms.2017.72550
57. Al-Mehdi A.B., Zhao G., Fisher A.B. (1998) ATP-independent membrane depolarization with ischemia in the oxygen-ventilated isolated rat lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **18**(5), 653–661.

Поступила в редакцию: 28. 01. 2025.

После доработки: 06. 02. 2025.

Принята к печати: 10. 02. 2025.

PEPTIDE TOXINS TARGETING ION CHANNELS AS CYTOPROTECTIVE AGENTS  
IN ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF EPITHELIAL CELLS

*E.V. Iurova\*, E.V. Rastorgueva, E.A. Beloborodov, D.E. Sugak, E.S. Pogodina, A.N. Fomin, Y.V. Saenko*

S.P. Kapitsa Technological Research Institute, Ulyanovsk State University,  
42 Leo Tostoy str., Ulyanovsk, 432017 Russia; \*e-mail: urovaev523@gmail.com

Ischemia-reperfusion injury (IRI) is a complex process accompanying cessation of blood supply to an organ or tissue followed by subsequent restoration of blood circulation. The IRI is especially prominent in surgery and organ transplantation. One of the strategies for reducing organ and tissue damage during transplantation is regulation of intracellular ion concentrations. Maintenance of ion concentrations in the cell during damage development can be controlled by influencing voltage-dependent ion channels with certain types of compounds. We propose the peptide toxins tropic to calcium (omega-hexatoxin-Hv1a) and sodium (mu-agatoxin-Aa1a) voltage-dependent ion channels as potential agents reducing IRI. The toxins were obtained using solid-phase peptide synthesis. The IRI modeling for evaluation of the action of toxins was carried out on a culture of epithelial cells CHO-K1 during their incubation under conditions of hypoxia and nutrient deprivation followed by subsequent replenishment of the nutrient medium. The level of cell death, concentrations of calcium, sodium, potassium ions, and pH were recorded using a multimodal plate reader and fluorescent dyes. Experiments have shown that regardless of different mechanisms of action, both toxins reduced the development of CHO-K1 cell death by changing ion concentrations and maintaining the pH level.

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

**Keywords:** ischemia-reperfusion injury; voltage-dependent calcium channels; voltage-dependent sodium channels; peptide toxin

**Funding.** The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FEUF-2022-0008).

Received: 28.01.2025; revised: 06.02.2025; accepted: 10.02.2025.