

## БЛОКАТОР P2X<sub>3</sub> РЕЦЕПТОРА AF-353 (Ro-4) СНИЖАЕТ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ИНДЕКС ПЕРВИЧНОЙ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

А.С. Зеленцова, М.Ю. Скоркина\*, А.В. Дейкин

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,  
308015, Белгород, ул. Победы, 85; \*эл. почта: marinaskorkina0077@gmail.com

В клинических исследованиях пуринергический рецептор P2X<sub>3</sub> рассматривается как молекулярная мишень для коррекции боли в спинальных сенсорных нейронах с использованием высокоселективных антагонистов на основе производных диаминопиримидина. В ЦНС P2X<sub>3</sub> рецепторы участвуют в синаптической пластичности, лежащей в основе памяти и обучения. В настоящее время известны мощные и селективные аллостерические модуляторы рецепторов P2X<sub>3</sub> и P2X<sub>2/3</sub> — производные ряда диаминопиримидина. Среди них 5-(5-йод-2-изопропил-4-метоксифеноксипиримидин-2,4-диамин (Ro-4 или AF-353), гефапиксанта, которые имеют хороший фармакокинетический профиль и менее активны в отношении широкого спектра киназ, рецепторов и ионных каналов. Терапевтическое значение блокирования рецепторов P2X<sub>3</sub> в нейронах ЦНС не изучалось, однако, судя по литературным данным, этот рецептор может стать новой мишенью при поиске противосудорожных препаратов, а также препаратов, снижающих тревожность и стресс. Целью работы было изучить влияние антагониста P2X<sub>3</sub> рецептора AF-353 (Ro-4) на биоэнергетический индекс здоровья (БНИ) нейронов первичной смешанной культуры гиппокампа. В условиях блокады P2X<sub>3</sub> рецептора в эмбриональной и постнатальных культурах нейронов гиппокампа мышечное дыхание увеличилось на 27,5% и 15,8% соответственно, потеря протонов — на 31,0% и 61,4%, а базальное дыхание снизилось на 89% и 39% по сравнению с контролем. Снижение БНИ в постнатальной культуре составило 68% по сравнению с контролем. Полученные результаты указывают на влияние AF-353 на митохондриальное дыхание первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа, что раскрывает потенциал P2X<sub>3</sub> рецептора в качестве фармакологической мишени при гипоксических состояниях головного мозга.

**Ключевые слова:** P2X<sub>3</sub> рецептор; антагонист AF-353 (Ro-4); митохондриальное дыхание; гиппокамп; нейроны

**DOI:** 10.18097/PBMCR1531

### ВВЕДЕНИЕ

Межклеточная коммуникация в нервной системе осуществляется с участием семейства пуринергических рецепторов P2, которые подразделяются на два класса — лиганд-управляемые каналы P2X и метаботропные рецепторы P2Y, связанные с G-белком [1]. Каждое из семейств подразделяется на подклассы P2X<sub>1-7</sub>, P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub> [2]. Известно, что P2X<sub>3</sub> рецептор сенсорных нейронов принимает участие не только в возникновении и развитии нейропатической и воспалительной боли [3, 4], но выполняет нейротрофическую роль после нарушения целостности нервного волокна [5, 6], участвуя в процессе регенерации нервных окончаний [7, 8]. В центральной нервной системе (ЦНС) P2X<sub>3</sub> рецепторы принимают участие в регуляции синаптической пластичности благодаря их высокой проницаемости для кальция [9]. Исследователи предполагают его участие в быстрой возбуждающей синаптической передаче по цинк-чувствительным АТР-зависимым каналам на пирамидальных клетках CA3 гиппокампа [10]. P2X<sub>3</sub> и P2X<sub>1</sub> могут модулировать синаптическую передачу моховидных волокон в гиппокампе на пре- и постсинаптическом уровне [11]. P2X<sub>3</sub> рецепторы значительно активируются при височной эпилепсии, их ингибирование приводит

к относительно низкочастотным разрядам [12]. У мышей, у которых отсутствует рецептор P2X<sub>3</sub>, отмечены аномалии в синаптической пластичности гиппокампа, нарушена долговременная депрессия в синапсах CA1, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа. Полагают, что приток кальция через постсинаптические каналы P2X<sub>3</sub> играет ключевую роль для индукции долговременной депрессии [13]. Несмотря на дефицит долговременной депрессии гиппокампа, мыши с нокаутом P2X<sub>3</sub> рецептора (P2X<sub>3</sub>KO) нормально справлялись с тестами пространственного обучения в водном лабиринте, это позволило авторам работы предположить, что выключение гена P2X<sub>3</sub> улучшило способность к обучению. Кроме того, мыши P2X<sub>3</sub>KO продемонстрировали лучшие результаты, чем мыши дикого типа в задаче, которая включала визуальное определение местоположения и плавание к платформе [13]. На сегодняшний день разработан ряд производных диаминопиримидина, проявляющих свойства сильнодействующих и избирательных аллостерических модуляторов P2X<sub>3</sub> и P2X<sub>2/3</sub> рецепторов. Среди них 5-(5-йод-2-изопропил-4-метоксифеноксипиримидин-2,4-диамин (Ro-4 или AF-353, IC<sub>50</sub>=3,16 нМ), гефапиксанта (IC<sub>50</sub>=0,03 мкМ для P2X<sub>3</sub> и 0,250 мкМ для P2X<sub>2/3</sub> рецепторов), которые обладают хорошим фармакокинетическим профилем [14–16].



AF-353 (Ro-4) в 100 раз менее активен в отношении широкого спектра киназ, рецепторов и ионных каналов [15]. Антагонисты P2X<sub>3</sub> рецепторов класса диаминопиримидинового обладают улучшенными физико-химическими свойствами по сравнению с более ранними антагонистами P2X<sub>3</sub> и, вероятно, связываются с аллостерическим сайтом канала [16, 17]. Терапевтическую значимость блокады рецепторов P2X<sub>3</sub> в нейронах ЦНС ранее не исследовали, однако, судя по литературным данным, этот рецептор может быть новой мишенью при поиске противосудорожных препаратов [12]. Несмотря на то, что описаны различные сигнальные пути с участием P2X<sub>3</sub> рецептора при нейропатической и воспалительной боли [3, 5], участие этого рецептора в механизмах митохондриального дыхания не изучено. Вместе с тем, активация каналов P2X<sub>3</sub> опосредует приток внеклеточного кальция [18], который может запускать различные сигнальные каскады.

Целью работы было изучение влияния антагониста P2X<sub>3</sub> рецептора AF-353 (Ro-4) на биоэнергетический индекс здоровья нейронов (BHI) первичной смешанной культуры гиппокампа.

## МЕТОДИКА

### *Животные*

В работе использованы мыши линии CD1 в возрасте 2 месяца массой 23–25 г. Животные были приобретены в филиале “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (сертификат № 18980 от 23.05.2023). Животных содержали в условиях конвенционального вивария Белгородского государственного национального исследовательского университета (НИУ “БелГУ”) при искусственно регулируемом режиме светового дня (12 ч темного и 12 ч светлого времени) и температуре от 22°C до 26°C со свободным доступом к корму и воде.

### *Выделение первичной смешанной нейрональной культуры гиппокампа*

Для получения нейрональной культуры гиппокампа проводили эвтаназию мышей при помощи метода цервикальной дислокации позвонков. Для получения эмбриональной культуры (E18) в эксперимент брали ткань гиппокампа от 24 хорошо сформированных эмбрионов на 18 день гестации. Для получения постнатальной первичной смешанной культуры гиппокампа (P2) использовали десять 2-дневных новорожденных мышат линии CD1. Все манипуляции проводили на льду. Вскрывали брюшную полость, проводили эктомию матки с эмбрионами, которые помещали в чашку Петри с охлажденным раствором Хенкса (“ПанЭко”, Россия). Отделяли эмбрионы от стенки матки и промывали их в охлажденном растворе Хенкса. Эмбрионы последовательно переносили в сухую чашку Петри. У новорожденных мышат препарировали верхнюю часть черепной коробки от кожи и фасций, удаляли кости черепа, обнажая головной мозг, извлекали мозг и помещали его

в чашку Петри с охлажденным фосфатно-солевым буфером (PBS). Выделение головного мозга у эмбрионов и новорожденных мышат проводили под стереомикроскопом Leica Microsystems EZ4 (“Leica”, Германия). Гиппокамп переносили на стекло в “лунку” с охлажденным PBS pH 7,4 (“ПанЭко”), отбирали PBS, гиппокамп делили скальпелем на 4–5 частей и переносили в пробирку с 1 мл 0,25% раствора трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты (трипсин-ЭДТА; “ПанЭко”) [19].

### *Трипсинизация ткани гиппокампа E18 и P2*

Ткань трипсинизировали в 0,25% растворе трипсин-ЭДТА в течение 20 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе Binder CB150 (“Binder”, Германия). После трипсинизации добавляли 1 мл ледяного раствора Дульбекко (“ПанЭко”), затем проводили трёхкратную отмывку клеточной суспензии PBS (pH 7,4). К полученной суспензии добавляли 2 мл нейробазальной среды (“ПанЭко”), 2% добавку нейромакс (“ПанЭко”), 0,5 mM L-глутамакс (“Thermo Fisher Scientific”, США), 1% пенстреп (“ПанЭко”).

### *Посев и культивирование первичной смешанной культуры гиппокампа*

Первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа культивировали в 8-луночных планшетах для анализатора клеточного метаболизма Seahorse XF HS mini (“Agilent”, США). Предварительно готовили планшеты. В канавки вокруг лунок вносили по 400 мкл стерильной дистиллированной воды. Культуральные лунки B–G покрывали 10 мкл поли-D-лизина (“Thermo Fisher Scientific”) в концентрации 0,01 мг/мл, в лунки коррекции фона A и H вносили по 180 мкл дистиллированной воды. Планшеты оставляли на 1 ч в ламинарном шкафу под УФ-лампой. После планшеты трижды промывали дистиллированной водой и высушивали в ламинарном шкафу. В каждую ячейку планшета Cell Culture Miniplates (“Agilent”) вносили по 80 мкл клеточной суспензии, содержащей 2×10<sup>4</sup> клеток гиппокампа. Число клеток для посева и выбор оптимальной концентрации FCCP для выполнения Митостресс теста определяли, предварительно выполнив калибровку прибора по оптимизации числа клеток и поиску концентрации FCCP для заданного типа клеток согласно инструкции производителя. Клетки в планшетах выращивали в течение трёх суток с ежедневной сменой половины порции среды.

### *Фармакологическая блокада P2X<sub>3</sub> рецептора*

С целью фармакологической блокады рецептора P2X<sub>3</sub> использовали высокоселективный блокатор AF-353 (Ro-4) (5-(5-йод-2-изопропил-4-метокси-фенокси)пиримидин-2,4-диамин монохлоридная соль, “Selleckchem”, США) в конечной концентрации 12 нМ. Выбор дозы препарата основан на известной для данного лиганда концентрации полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>), которая по данным литературы составляет 3,16 нМ [14]. Блокатор готовили на культуральной нейробазальной среде и вводили

в культуральные планшеты через 24 ч от начала культивирования в опытные ячейки (B, C, D) при смене среды. В качестве контроля были ячейки (E, F, H) с культуральной средой без препарата.

#### Митостресс тест

Митохондриальное дыхание измеряли на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse XF HS mini (“Agilent”). За 24 ч до анализа гидратировали сенсорный картридж Cartridge Agilent Seahorse XFp (“Agilent”), заполняя его калибрантом по 200 мкл в каждую лунку. Картридж помещали в инкубатор без CO<sub>2</sub> при температуре 37°C на 24 ч. Аналитическую среду готовили, используя среду Seahorse XF DMEM Media (“Agilent”), содержащую 10 mM глюкозу (Glucose XF 1.0 M; “Agilent”), 1 mM пируват (Pyruvate XF 100 mM; “Agilent”) и 2 mM L-глутамин (L-Glutamine XF 200 mM; “Agilent”) согласно рекомендациям производителя. Для оценки митохондриальной функции использовали набор Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (“Agilent”). Стоковые растворы готовили согласно инструкции производителя. Набор включает олигомицин, FCCP, смесь ротенона и антимицина А. В эксперименте готовили рабочие растворы в конечной концентрации на лунку: олигомицин — 1 мкМ, FCCP — 2,5 мкМ, ротенон/антимицин А — 0,5 мкМ. Митострессоры вводили в клеточные культуры инъекционно через порты сенсорного картриджа Cartridge Agilent Seahorse XFp (“Agilent”). Выполняли калибровку картриджа, а затем меняли калибровочную тарелку на тарелку с клетками и проводили измерения параметров: скорость поглощения кислорода (OCR), которая отражает степень аэробного митохондриального дыхания в клетке. В каждой опытной и контрольной ячейках было выполнено по 3 технических

измерения. Полученные экспериментальные данные обрабатывали, используя программное обеспечение Wave 2.6 (“Agilent”), нормализацию данных проводили по числу клеток, используя вкладку “Normalization” в программе. Рассчитывали базальное дыхание, утечку протонов, максимальное дыхание, запасную дыхательную ёмкость, немитохондриальное дыхание, продукцию АТФ, коэффициент сопряжения дыхания (рис. 1), биоэнергетический индекс здоровья клеток [20].

Биоэнергетический индекс здоровья нейронов рассчитывали согласно формуле (1):

$$BHI = \frac{SRC \times ATP}{nonMit \times H^+ leak} \quad (1),$$

где BHI (bioenergy health index) — биоэнергетический индекс клеточного здоровья, усл. ед., SRC (spare respiratory capacity) — резервная дыхательная ёмкость, пмоль/мин, ATP — продукция АТФ, пмоль/мин, nonMit — немитохондриальное дыхание, пмоль/мин, H<sup>+</sup> leak — потеря протонов, пмоль/мин.

Кривые скорости потребления скорости кислорода (OCR) эмбриональной культурой E18 и постнатальной культурой гиппокампа были получены в режиме реального времени. Измеренные данные OCR позволили рассчитать:

- уровень немитохондриального дыхания (минимальное измеренное значение OCR после инъекции смеси ротенон/антимицин А);
- уровень базального дыхания (последнее измеренное значение параметра OCR до первой инъекции за вычетом немитохондриального дыхания);
- уровень максимального дыхания (разница между максимальными значениями OCR после инъекции FCCP и немитохондриальным дыханием);

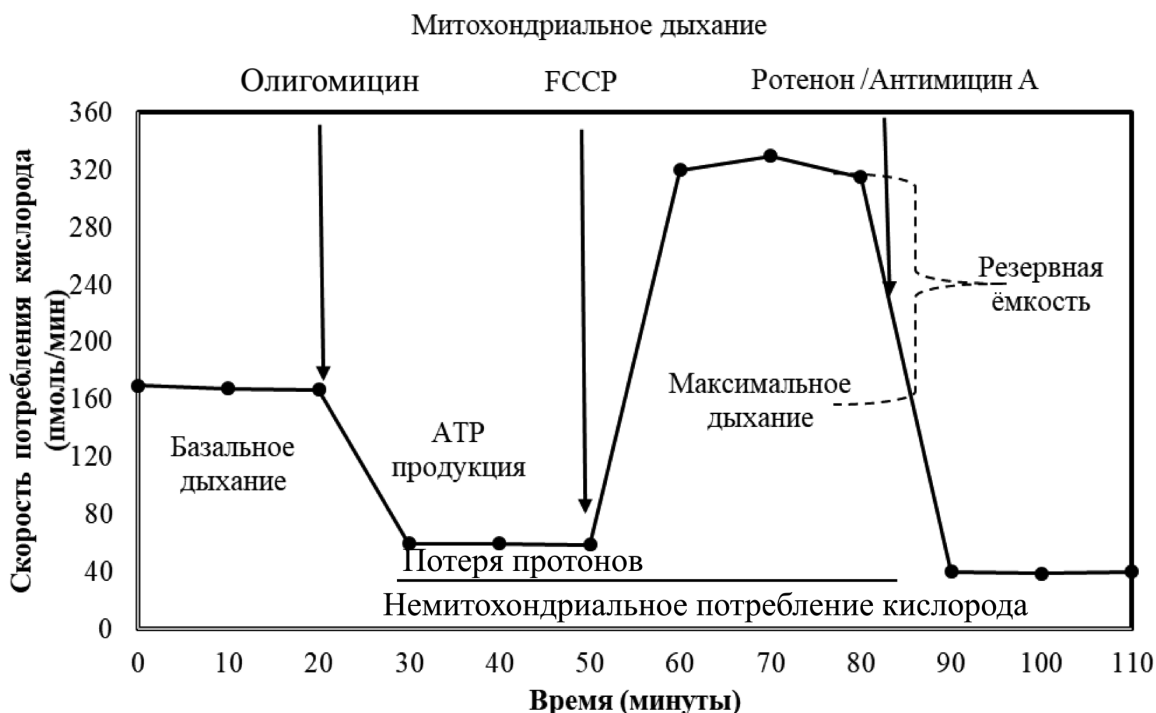


Рисунок 1. Профайл программного обеспечения Wave 2.6.

## AF-353 СНИЖАЕТ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ИНДЕКС НЕЙРОНОВ

- потерю протонов — как минимальное значение OCR после инъекции олигомицина за вычетом немитохондриального дыхания;
- продукцию АТР (после добавления олигомицина по разнице между последним значением OCR);
- резервную дыхательную ёмкость (разница между максимальным дыханием и базальным дыханием);
- коэффициент эффективности сопряжения дыхания (отношение продукции АТР к базальному дыханию).

полученных данных осуществляли по критерию согласия Пирсона. Учитывая, что все полученные числовые данные не подчиняются гипотезе нормального распределения, для оценки достоверности полученных результатов использовали критерий Манна-Уитни для выборок с ненормальным распределением и числом измерений  $n \leq 20$ . Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали при  $p=0,05$ .

### Статистический анализ

Полученные экспериментальные данные обрабатывали, используя программное обеспечение Wave 2.6 (“Agilent”) и пакет описательной статистики Excel 10.0. Экспериментальные данные представлены медианой и минимальным и максимальным значениями. Проверку гипотезы о виде распределения

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные представлены в таблице 1.

В культуре нейронов гиппокампа E18 под действием блокатора AF-353 увеличилось немитохондриальное дыхание и потеря протонов на 27,5% и 31% соответственно ( $p < 0,05$ ),

*Таблица 1.* Параметры митохондриального дыхания первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа в условиях блокады P2X3 рецептора

Параметр, пмоль/мин/клетки $\times 10^3$		Культура E18		Культура P2	
		контроль	блокатор AF-353	контроль	блокатор AF-353
Немитохондриальное дыхание	M	888,0	1224,0*	1731,9	2058,3*
	min	610,0	1141,4	1616,2	2003,6
	max	1030,8	1331,4	1912,6	2199,8
Базальное дыхание	M	3298,0	2948,0	1065,7	1158,6
	min	2602,2	2407,2	659,0	591,2
	max	3786,6	3612,2	1706,4	1661,0
Максимальное дыхание	M	4316,2	3982,7	3710,2	4040,5
	min	3270,8	2804,8	2465,0	3581,8
	max	5134,2	4959,2	4290,6	4764,2
Потеря протонов (H <sup>+</sup> )	M	2146,5	3104,6*	496,5	1286,8*
	min	1665,0	3835,8	232,0	1072,2
	max	2796,2	3467,0	642,4	1696,8
АТР-продукция	M	4433,6	3544,2*	1530,5	1405,2
	min	3454,0	2520,0	1177,4	1124,6
	max	5598,0	4590,0	1738,8	1717,4
Резервная дыхательная ёмкость	M	1024,2	1032,6	2644,2	2892,6
	min	213,6	128,3	1451,4	1990,8
	max	1454,6	1910,6	3405,6	3700,6
Коэффициент эффективности дыхания, %	M	1364,2	1472,6	3188,6	2772,6
	min	1103,6	440,6	1664,8	1716,4
	max	1653,4	2752,0	4547,6	5215,2
Биоэнергетический индекс, %	M	0,9	0,8	5,0	1,6*
	min	0,5	0,1	2,8	1,0
	max	3,1	4,7	9,7	2,7

Примечание: \* - достоверность различий при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, M – медиана, max – максимальное значение, min – минимальное значение.

а продукция АТФ снизилась на 25% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Остальные параметры биоэнергетического статуса митохондрий находились в пределах недостоверных различий с контролем.

При анализе митохондриальной функции культуры нейронов P2 в условиях блокады P2X3 рецептора установлено увеличение немитохондриального дыхания на 15,8% ( $p < 0,05$ ) и потери протонов на 61,4% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. При этом достоверных различий в продукции АТФ, эффективности сопряжённого дыхания и резервной дыхательной ёмкости между опытной и контрольной группами не установлено.

На основании полученных данных для E18 и P2 культур гиппокампа был рассчитан ВНИ в норме и в условиях блокады P2X3 рецептора. Согласно полученным данным, как для культуры E18, так и P2, блокада P2X3 рецептора приводила к снижению ВНИ. Для культуры P2 характерно достоверное снижение ВНИ на 68% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 1).

В выполненном исследовании изучено влияние высокоселективного антагониста P2X3 рецептора AF-353 (Ro-4) на ВНИ нейронов первичной смешанной культуры гиппокампа. Выбор гиппокампа связан с тем, что это ключевая структура мозга, задействованная в формировании пространственной навигации, эмоциональной памяти и обучения, и в то же время — идеальная модель для создания первичных культур нейронов высокой частоты с целью исследования патофизиологических процессов в нервной системе [21]. На клеточном уровне гиппокамп представлен пирамидальными клетками с минимальным числом интернейронов и глиальных клеток по сравнению с другими областями мозга [22]. В гиппокампе грызунов рецепторы семейства P2 представлены следующими подтипами: P2X2 [23], P2X3 [24, 25], P2X4 и P2X7 [26], а также P2Y1 и P2Y11-13 [27-29]. Рецепторам P2Y1 и P2X1-3 отводится определённая функция в процессах обучения и памяти [5, 30]. Пуринергические рецепторы экспрессируются как на глиальных клетках, так и на истинных нейронах гиппокампа описано присутствие P2X2, P2X3, P2X4, P2X7 [31]. Исследование двух культур гиппокампа на эмбриональной и постнатальной стадиях обусловлено различной функцией P2X3 рецептора на разных стадиях формирования нервной ткани. На ранних стадиях эмбрионального развития P2X3 рецептору отводится ключевая роль в нейрогенезе; исследователи указывают, что он может быть единственным подтипом рецептора, участвующим в быстрой АТФ-опосредованной возбуждающей передаче сигналов [32]. Кроме того, эмбриональные культуры характеризуются высокой устойчивостью к химической диссоциации и выживаемостью после механического воздействия на ткани. Для эмбриональной культуры гиппокампа характерна высокая степень чистоты, меньшее число сложных нейритов, более низкая связь между нейронами и меньшая зависимость от субстратов культивирования по сравнению с постнатальной культурой [33, 34].

Постнатальная культура гиппокампа представляет собой удобную модель для изучения физиологических процессов, лежащих в основе обучения и памяти, а также в изучении участия P2X3 рецептора в адаптации нейронных сетей при развитии процессов тревожности и мотивации [13]. В отличие от эмбриональной ткани, постнатальная мозговая ткань относительно чувствительна к процессу культивирования и имеет сниженную жизнеспособность вследствие физической деградации нейронов и удаления внутринейрональной трофической поддержки [33]. Нейроны постнатальной культуры по мере развития становятся более восприимчивыми к эксайтотоксичности, опосредованной глутаматом [35], и проявляют повышенную активацию каспаз и апоптоз [36].

Под влиянием антагониста AF-353 (Ro-4) как в культуре E18, так и P2 установлено увеличение скорости потребления кислорода за счёт усиления немитохондриального дыхания. Также общей реакцией на блокаду P2X3 рецептора была потеря протонов на фоне снижения базального дыхания. Снижение базального дыхания указывает на развитие клеточного стресса при введении блокатора. Доказано, что окислительный стресс изменяет биоэнергетические параметры, увеличивает потребление кислорода, связанное с утечкой протонов [37]. Потеря протонов и усиление немитохондриального дыхания на фоне значительного снижения продукции АТФ указывает на сдвиг внутриклеточного гомеостаза и генерацию свободных радикалов. Доказано, что немитохондриальное потребление кислорода обычно увеличивается в присутствии стрессоров, включая активные формы кислорода и азота [37, 38]. Вместе с тем, усиление потери протонов под действием блокатора AF-353 (Ro-4) можно рассматривать в качестве защитного механизма, снижающего повреждение митохондрий путём отрицательной обратной связи. Это согласуется с полученными данными по резервной дыхательной ёмкости митохондрий и коэффициенту эффективности дыхания, которые в опытной группе поддерживались на уровне контроля. В настоящее время всё большее подтверждение находит предположение о наличии защитной петли обратной связи, где повышенная генерация АФК активирует механизмы, запускающие утечку протонов, а они, в свою очередь, снижают выработку АФК, ограничивая, тем самым, повреждение митохондриальной функции [39, 40]. Тот факт, что под влиянием блокатора P2X3 рецептора не истощается дыхательный резерв как в E18, так и в P2 культурах, указывает, что антагонист AF-353 (Ro-4) не вызывает развитие сильного окислительного стресса в клетке. Ранее на клетках сердца показано, что в условиях сильного окислительного стресса дыхательный резерв истощается на фоне снижения порога базального дыхания, что приводит к гибели клеток [41, 42]. В целом, исследователи отмечают, что резервная дыхательная ёмкость является параметром, который зависит от типа клетки. Митохондрии в возбудимых клетках, таких как кардиомиоциты и нейроны функционируют в условиях высоких потоков кальция

и других ионов, которые будут использовать протонный градиент и таким образом увеличивать скорость потребления кислорода независимо от потребности АТФ [43]. Чем выше значения резервной дыхательной ёмкости, тем эффективнее митохондрии могут удовлетворять потребности в АТФ и справляться с метаболическим стрессом [37].

Под действием антагониста AF-353 (Ro-4) установлена разница в продукции АТФ между культурами E18 и P2. В культуре E18 резко снижена продукция АТФ, в то время как в P2 культуре, достоверных различий не обнаружено. Это указывает на высокую пластичность и наличие компенсаторно-приспособительных механизмов P2 культуры, скорее всего за счёт сложных нейроглиальных связей и механизмов синаптического обмена [44]. Для культуры P2 характерен высокий дыхательный резерв в сравнении с эмбриональной культурой.

Анализируя ВНИ в эмбриональной культуре гиппокампа, видно, что изначально он в 5 раз ниже по сравнению с постнатальной культурой, что указывает на низкую митохондриальную активность в физиологических условиях. Под влиянием антагониста P2X<sub>3</sub> рецепторов AF-353 в эмбриональной культуре установлено усиление немитохондриального дыхания и потери протонов, на фоне снижения продукции АТФ. Известно, что дыхание в отсутствие синтеза АТФ обусловлено утечкой протонов внутренней мембраны митохондрий [45]. Согласно данным, представленным в работе Surin и соавт., в эмбриональных культурах нейрональный митохондриальный потенциал значительно снижен по сравнению с постнатальными культурами, из-за повышенной проницаемости внутренней митохондриальной мембраны для протонов [46]. Показано, что в 84% нейронов, культивируемых от эмбрионов крыс, E17-E18 митохондриальная АТФ-синтаза не производит АТФ, а потребляет его для поддержания мембранного потенциала митохондрий. В эмбриональных культурах синтез АТФ является преимущественно гликолитическим [46]. Таким образом, блокада P2X<sub>3</sub> рецептора на фоне разобщения митохондриального дыхания, приводит к снижению продукции АТФ и усилению немитохондриального дыхания. Не исключено, что такое изменение связано с повышенной протонной проводимостью внутренней митохондриальной мембраны в эмбриональных культурах, по сравнению с постнатальными, а также особенностями в энергетическом фенотипе клетки. Согласно нашим результатам, полученным ранее, блокада P2X<sub>3</sub> рецептора не оказывает влияния на метаболический профиль эмбриональной культуры [47]. Для эмбриональной культуры гиппокампа характерен аэробный тип дыхания как в контроле, так и при блокаде P2X<sub>3</sub> рецептора, скорее всего за счёт глиальных клеток [47]. Существенную роль при этом могут выполнять астроциты, которые являются синтезаторами и экспортёрами биоэнергетических молекул (лактат/кетоновые тела) для окислительного

фосфорилирования [48]. Блокада функции P2X<sub>3</sub> рецептора в эмбриональных культурах на фоне сниженной митохондриальной функции может негативно отразиться на морфологии клеток, формировании отростков и синаптических контактов между нейронами. На мышинной модели болезни Альцгеймера было доказано нарушение нейрогенеза гиппокампа, снижение пролиферации и недоразвитие нейритов в головном мозге в условиях ингибирования гена *p2rx3* [49].

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В постнатальной культуре гиппокампа блокада P2X<sub>3</sub> рецептора высокоселективным антагонистом AF-353 (Ro-4) приводит к снижению ВНИ и продукции АТФ, но увеличивает скорость потребления кислорода и сохраняет резервную дыхательную ёмкость нейрона, что имеет важное значения с точки зрения удовлетворения клетки в энергетических источниках и её способности справляться с метаболическим стрессом. Эмбриональная культура гиппокампа изначально имеет достаточно ВНИ нейронов по сравнению с постнатальной, что указывает на превалирование гликолитических процессов при синтезе АТФ. Блокада P2X<sub>3</sub> рецепторов в эмбриональной культуре приводит к усилению потери протонов и снижению продукции АТФ, что в дальнейшем может негативно влиять на формирование межнейрональных связей в культуре. Полученные данные указывают на потенциал P2X<sub>3</sub> рецептора в качестве фармакологической мишени при гипоксических состояниях головного мозга во время нейрогенеза.

## **ФИНАНСИРОВАНИЕ**

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ соглашение № 23-24-00600.

## **СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ**

Все эксперименты выполнены с соблюдением требований Хельсинской декларации по гуманному обращению с животными (Хельсинская декларация этических принципов, 2008), директивами Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, а также этическим стандартом, принятым экспертными советами РНФ “Позиция по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке Российского научного фонда” от 09.08.2022 г. и одобрены комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИУ “БелГУ” (экспертное заключение № 01и/23 от 23.01.2023).

## **КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Burnstock G, Kennedy C. (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.*, **16**(5), 433–440. DOI: 10.1016/0306-3623(85)90001-1
2. Köles L., Kató E., Hanuska A., Zádori Z.S., Al-Khrasani M., Zelles T., Rubini P., Illes P. (2016) Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glial signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems. *Purinergic Signal.*, **12**(1), 1–24. DOI: 10.1007/s11302-015-9480-5
3. Brederson J.D., Jarvis M.F. (2008) Homomeric and heteromeric P2X3 receptors in peripheral sensory neurons. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **9**(7), 716–725.
4. Burnstock G. (2017) Purinergic signalling: therapeutic developments. *Front. Pharmacol.*, **8**, 661. DOI: 10.3389/fphar.2017.00661
5. Burnstock G. (2015) Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system. *Curr. Med. Chem.*, **22**(7), 819–844. DOI: 10.2174/0929867321666140706130415
6. Pedata F., Dettori I., Coppi E., Melani A., Fusco I., Corradetti R., Pugliese A.M. (2016) Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology*, **104**, 105–130. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.11.007
7. Heine C., Heimrich B., Vogt J., Wegner A., Illes P., Franke H. (2006) P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus *in vitro*. *Neuroscience*, **138**(1), 303–311. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.11.056
8. Heine C., Sygnecka K., Franke H. (2016) Purines in neurite growth and astroglia activation. *Neuropharmacology*, **104**, 255–271. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.022
9. Pankratov Y., Lalo U., Krishtal O.A., Verkhratsky A. (2009) P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience*, **158**(1), 137–148. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.076
10. Séguéla P., Haghighi A., Soghomonian J.J., Cooper E. (1996) A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J. Neurosci.*, **16**(2), 448–455. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-02-00448.1996
11. George J., Cunha R.A., Mulle C., Amédée T. (2016) Microglia-derived purines modulate mossy fiber synaptic transmission and plasticity through P2X4 and A1 receptors. *Eur. J. Neurosci.*, **43**(10), 1366–1378. DOI: 10.1111/ejn.13191
12. Zhou X., Ma L.-M., Xiong Y., Huang H., Yuan J.-X., Li R.-H., Li J.-N., Chen Y.-M. (2016) Upregulated P2X3 receptor expression in patients with intractable temporal lobe epilepsy and in a rat model of epilepsy. *Neurochem. Res.*, **41**(6), 1263–1273. DOI: 10.1007/s11064-015-1820-x
13. Wang Y., Mackes J., Chan S., Haughey N.J., Guo Z., Ouyang X., Furukawa K., Ingram D.K., Mattson M.P. (2006) Impaired long-term depression in P2X3 deficient mice is not associated with a spatial learning deficit. *J. Neurochem.*, **99**(5), 1425–1434. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04198.x
14. Carter D.S., Alam M., Cai H., Dillon M.P., Ford A.P.D.W., Gever J.R., Jahangir A., Lin C., Moore A.G., Wagner P.J., Zhai Y. (2009) Identification and SAR of novel diaminopyrimidines. Part 1: The discovery of RO-4, a dual P2X(3)/P2X(2/3) antagonist for the treatment of pain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**(6), 1628–1631. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.02.003
15. North R.A., Jarvis M.F. (2013) P2X receptors as drug targets. *Mol. Pharmacol.*, **83**(4), 759–769. DOI: 10.1124/mol.112.083758
16. Gever J.R., Soto R., Henningsen R.A., Martin R.S., Hackos D.H., Panicker S., Rubas W., Oglesby I.B., Dillon M.P., Milla M.E., Burnstock G., Ford A.P.D.W. (2010) AF-353, a novel, potent and orally bioavailable P2X3/P2X2/3 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, **160**(6), 1387–1398. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00796.x
17. Ballini E., Virginio C., Medhurst S.J., Summerfield S.G., Aldegheri L., Buson A., Carignani C., Chen Y.H., Giacometti A., Lago I., Powell A.J., Jarolimek W. (2011) Characterization of three diaminopyrimidines as potent and selective antagonists of P2X3 and P2X2/3 receptors with *in vivo* efficacy in a pain model. *Br. J. Pharmacol.*, **163**(6), 1315–1325. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01322.x
18. Xia L.-P., Luo H., Ma Q., Xie Y.-K., Li W., Hu H., Xu Z.-Z. (2021) GPR151 in nociceptors modulates neuropathic pain via regulating P2X3 function and microglial activation. *Brain*, **144**(11), 3405–3420. DOI: 10.1093/brain/awab245
19. Зеленцова А.С., Борисова А.Ю., Шмугерова В.С., Скоркина М.Ю., Дейкин А.В. (2024) Митохондриальное дыхание первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа на различных стадиях дифференцировки. Гены и клетки, **19**(1), 201–210. [Zelentsova A.S., Borisova A.Y., Shmigerova V.S., Skorkina M.Y., Deykin A.V. (2024) Mitochondrial respiration of a primary mixed culture of neurons from hippocampus at various stages of differentiation. *Genes and Cells*, **19**(1), 201–210.] DOI: 10.17816/gc529662
20. Divakaruni A.S., Paradyse A., Ferrick D.A., Murphy A.N., Jastroch M. (2014) Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol.*, **547**, 309–354. DOI: 10.1016/B978-0-12-801415-8.00016-3
21. Zhang J., Yang H., Wu J., Zhang D., Wang Y., Zhai J. (2022) Recent progresses in novel *in vitro* models of primary neurons: a biomaterial perspective. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 953031. DOI: 10.3389/fbioe.2022.953031
22. Kaech S., Banker G. (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.*, **1**(5), 2406–2415. DOI: 10.1038/nprot.2006.356
23. Florenzano F., Viscomi M.T., Mercaldo V., Longone P., Bernardi G., Bagni C., Molinari M., Carrive P. (2006) P2X2R purinergic receptor subunit mRNA and protein are expressed by all hypothalamic hypocretin/orexin neurons. *J. Comp. Neurol.*, **498**(1), 58–67. DOI: 10.1002/cne.21013
24. Chen C.C., Akopian A.N., Sivilotti L., Colquhoun D., Burnstock G., Wood J.N. (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, **377**(6548), 428–431. DOI: 10.1038/377428a0
25. Lewis C., Neidhart S., Holy C., North R.A., Buell G., Surprenant A. (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature*, **377**(6548), 432–435. DOI: 10.1038/377432a0
26. Rubio M.E., Soto F. (2001) Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J. Neurosci.*, **21**(2), 641–653. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-02-00641.2001
27. Morán-Jiménez M.J., Matute C. (2000) Immunohistochemical localization of the P2Y(1) purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **78**(1–2), 50–58. DOI: 10.1016/S0169-328X(00)00067-X
28. Communi D., Gonzalez N.S., Detheux M., Brézillon S., Lannoy V., Parmentier M., Boeynaems J.M. (2001) Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J. Biol. Chem.*, **276**(44), 41479–41485. DOI: 10.1074/jbc.M105912200
29. Laitinen J.T., Uri A., Raidaru G., Miettinen R. (2001) [(35)S]GTPgammaS autoradiography reveals a wide distribution of G(i/o)-linked ADP receptors in the nervous

- system: close similarities with the platelet P2Y(ADP) receptor. *J. Neurochem.*, **77**(2), 505–518. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00265.x
30. *Rodrigues R.J., Almeida T., Díaz-Hernández M., Marques J.M., Franco R., Solsona C., Miras-Portugal M.T., Ciruela F., Cunha R.A.* (2016) Presynaptic P2X1-3 and  $\alpha 3$ -containing nicotinic receptors assemble into functionally interacting ion channels in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, **105**, 241–257. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.01.022
31. *Lommen J., Detken J., Harr K., von Gall C., Ali A.A.H.* (2021) Analysis of spatial and temporal distribution of purinergic P2 receptors in the mouse hippocampus. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(15), 8078. DOI: 10.3390/ijms22158078
32. *Cheung K.-K., Burnstock G.* (2002) Localization of P2X3 receptors and coexpression with P2X2 receptors during rat embryonic neurogenesis. *J. Comp. Neurol.*, **443**(4), 368–382. DOI: 10.1002/cne.10123
33. *Brewer G.J., Torricelli J.R.* (2007) Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat. Protoc.*, **2**(6), 1490–1498. DOI: 10.1038/nprot.2007.207
34. *Tomassoni-Ardori F., Hong Z., Fulgenzi G., Tessarollo L.* (2020) Generation of functional mouse hippocampal neurons. *Bio Protocols*, **10**(15), e3702. DOI: 10.21769/bioprotoc.3702
35. *Brewer K.L., Yezierski R.P.* (1998) Effects of adrenal medullary transplants on pain-related behaviors following excitotoxic spinal cord injury. *Brain Res.*, **798**(1–2), 83–92. DOI: 10.1016/S0006-8993(98)00398-9
36. *Brewer L.D., Thibault O., Staton J., Thibault V., Rogers J.T., Garcia-Ramos G., Kraner S., Landfield P.W., Porter N.M.* (2007) Increased vulnerability of hippocampal neurons with age in culture: temporal association with increases in NMDA receptor current, NR2A subunit expression and recruitment of L-type calcium channels. *Brain Res.*, **1151**, 20–31. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.03.020
37. *Hill B.G., Benavides G.A., Lancaster J.R. Jr., Ballinger S., dell'Italia L., Jianhua Z., Darley-Usmar V.M.* (2012) Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol. Chem.*, **393**(12), 1485–1512. DOI: 10.1515/hsz-2012-0198
38. *Dranka B.P., Hill B.G., Darley-Usmar V.M.* (2010) Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: the impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.*, **48**(7), 905–914. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.015
39. *Echtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Jekabsons M.B., Cadenas S., Stuart J.A., Harper J.A., Roebuck S.J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D.* (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, **415**(6867), 96–99. DOI: 10.1038/415096a
40. *Brookes P.S.* (2005) Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic. Biol. Med.*, **38**(1), 12–23. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.016
41. *Dranka B.P., Benavides G.A., Diers A.R., Giordano S., Zelickson B.R., Reily C., Zou L., Chatham J.C., Hill B.G., Zhang J., Landar A., Darley-Usmar V.M.* (2011) Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**(9), 1621–1635. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.005
42. *Schneider L., Giordano S., Zelickson B.R., Johnson M.S., Benavides G.A., Ouyang X., Fineberg N., Darley-Usmar V.M., Zhang J.* (2011) Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**(11), 2007–2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.030
43. *Chacko B.K., Kramer P.A., Ravi S., Benavides G.A., Mitchell T., Dranka B.P., Ferrick D., Singal A.K., Ballinger S.W., Bailey S.M., Hardy R.W., Zhang J., Zhi D., Darley-Usmar V.M.* (2014) The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clin. Sci. (London)*, **127**(6), 367–373. DOI: 10.1042/CS20140101
44. *Liu Y., Shen X., Zhang Y., Zheng X., Cepeda C., Wang Y., Duan S., Tong X.* (2023) Interactions of glial cells with neuronal synapses, from astrocytes to microglia and oligodendrocyte lineage cells. *Glia*, **71**(6), 1383–1401. DOI: 10.1002/glia.24343
45. *Cadenas S.* (2018) Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**(9), 940–950. DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.05.019
46. *Surin A.M., Khiroug S., Gorbacheva L.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G., Khiroug L.* (2013) Comparative analysis of cytosolic and mitochondrial ATP synthesis in embryonic and postnatal hippocampal neuronal cultures. *Front. Mol. Neurosci.*, **5**, 102. DOI: 10.3389/fnmol.2012.00102
47. *Zelentsova A.S., Shmigerova V.S., Stepenko Y.V., Skorkina M.Yu., Deikin A.V.* (2024) Elastic properties of the cell surface and metabolic profile of an embryonic primary mixed culture of hippocampal neurons under conditions of P2X3 receptor blockade. *J. Evol. Biochem. Phys.*, **60**, 1846–1856. DOI: 10.1134/S002209302405017X
48. *Rose J., Brian C., Pappa A., Panayiotidis M.I., Franco R.* (2020) Mitochondrial metabolism in astrocytes regulates brain bioenergetics, neurotransmission and redox balance. *Front. Neurosci.*, **14**, 536682. DOI: 10.3389/fnins.2020.536682
49. *Gong M., Ye S., Li W.X., Zhang J., Liu Y., Zhu J., Lv W., Zhang H., Wang J., Lu A., He K.* (2020) Regulatory function of praja ring finger ubiquitin ligase 2 mediated by the P2rx3/P2rx7 axis in mouse hippocampal neuronal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **318**(6), C1123–C1135. DOI: 10.1152/ajpcell.00070.2019

Поступила в редакцию: 18. 11. 2024.  
После доработки: 18. 12. 2024.  
Принята к печати: 20. 01. 2025.



**THE P2X3 RECEPTOR BLOCKER AF-353 (Ro-4) REDUCES BIOENERGETIC INDEX  
OF A PRIMARY MIXED CULTURE OF HIPPOCAMPAL NEURONS**

*A.S. Zelentsova, M.Yu. Skorkina\*, A.V. Deykin*

Belgorod State National Research University,  
85 Pobedy str., Belgorod, 308015 Russia; \*e-mail: marinaskorkina0077@gmail.com

In clinical studies, the purinergic receptor P2X3 is considered as a molecular target for pain correction in spinal sensory neurons by highly selective antagonists based on diaminopyrimidine derivatives. In the CNS, P2X3 receptors are involved in synaptic plasticity underlying memory and learning. Currently, potent and selective allosteric modulators of P2X3 and P2X2/3 receptors have been recognized among diaminopyrimidine derivatives. These include 5-(5-iodo-2-isopropyl-4-methoxyphenoxy)pyrimidine-2,4-diamine (Ro-4 or AF-353), gefapixant, which have a good pharmacokinetic profile and are less active with respect to a wide range of kinases, receptors, and ion channels. Although the therapeutic value of P2X3 receptor blockade in CNS neurons has not been studied, however, certain evidence exists in the literature that this receptor could represent a new target in the search for antiepileptic drugs, as well as drugs that reduce anxiety and stress. The aim of the work was to study the effect of the P2X3 receptor antagonist AF-353 (Ro-4) on the neuronal bioenergetic health index (BHI) in a primary mixed hippocampal culture. The P2X3 receptor blockade in embryonic and postnatal mouse hippocampal neuron cultures increased non-mitochondrial respiration by 27.5% and 15.8%, respectively, proton loss by 31.0% and 61.4%, and decreased basal respiration by 89% and 39% compared to the control. The neuronal BHI decrease in the postnatal culture was 68% compared to the control. The obtained results indicate the effect of AF-353 on mitochondrial respiration of a primary mixed culture of hippocampal neurons; this reveals the potential of the P2X3 receptor as a pharmacological target in hypoxic conditions of the brain.

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

**Keywords:** P2X3 receptor; AF-353 antagonist (Ro-4); mitochondrial respiration; hippocampus; neurons

**Funding.** This study was supported by a grant from Russian Science Foundation (project No. 23-24-00600).

Received: 18.11.2024; revised: 18.12.2024; accepted: 20.01.2025.