

# ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНОГО БЛОКАТОРА КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ $\omega$ -hexatoxin-Hv1a НА КЛЕТЧНУЮ ГИБЕЛЬ ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ *in vitro*

DOI: 10.17691/stm2023.15.1.03

УДК 616–005.4:615.372

Поступила 24.11.2022 г.

© **Е.В. Юрова**, младший научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;  
**Е.А. Белобородов**, научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;  
**Ю.В. Саенко**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;  
**Д.Е. Сугак**, младший научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;  
**А.Н. Фомин**, к.т.н., старший научный сотрудник, директор Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;  
**С.М. Слесарев**, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии, экологии и природопользования Института медицины, экологии и физической культуры;  
**Е.С. Погодина**, к.б.н., начальник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы

Ульяновский государственный университет, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновск, 432017

Апоптоз и некроз при реперфузии после ишемии являются ключевыми механизмами на клеточном уровне, приводящими к повреждению. Развитию патологических состояний предшествует внутриклеточная перегрузка ионами кальция как на стадии ишемии, так и на стадии реперфузии. В связи с этим одна из стратегий, направленных на уменьшение повреждений при ишемии/реперфузии, связана с использованием блокаторов кальциевых каналов.

**Цель исследования** — изучение влияния пептидного токсина — блокатора кальциевого канала  $\omega$ -hexatoxin-Hv1a — на разные типы клеточной гибели эпителиальных клеток при воспроизведении *in vitro* условий ишемии/реперфузии, характерных при трансплантации органа.

**Материалы и методы.** В работе использовали эпителиальную клеточную культуру СНО-К1. Оценивали изменение апоптоза, некроза, клеточного индекса и концентрации ионов кальция при моделировании процессов ишемии/реперфузии *in vitro* с добавлением токсина — блокатора кальциевого канала. Ишемического и реперфузионного повреждения достигали за счет депривации кислорода и питательных веществ с последующей реперфузией в полной питательной среде. Измерения проводили с использованием мультимодального планшетного ридера-флуориметра.

**Результаты.** При моделировании процессов ишемии/реперфузии зафиксировано повышение апоптоза, некроза и концентрации ионов кальция. При добавлении токсина в концентрации 50 нМ на стадии реперфузии отмечено снижение апоптоза и некроза, а также концентрации ионов кальция до физиологического уровня или уровня, близкого к физиологическому. В присутствии токсина клеточный индекс показал более быстрое восстановление.

**Заключение.** Данные эксперимента подтверждают гипотезу о благотворном влиянии пептидных блокаторов кальциевых каналов на состояние эпителиальных клеток при реперфузии после ишемии и могут рассматриваться для дальнейшего изучения как стратегия адаптации органа перед реперфузией.

**Ключевые слова:** ишемия; реперфузионное повреждение; пептидные токсины; блокаторы кальциевых каналов; апоптоз при реперфузии.

**Как цитировать:** Iurova E.V., Beloborodov E.A., Saenko Yu.V., Sugak D.E., Fomin A.N., Slesarev S.M., Pogodina Ye.S. Effect of the peptide calcium channel blocker  $\omega$ -hexatoxin-Hv1a on cell death during ischemia/reperfusion *in vitro*. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(1): 21, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.1.03>

Для контактов: Юрова Елена Валерьевна, e-mail: [urovaev523@gmail.com](mailto:urovaev523@gmail.com)

## Effect of the Peptide Calcium Channel Blocker $\omega$ -hexatoxin-Hv1a on Cell Death during Ischemia/Reperfusion *in vitro*

**E.V. Iurova**, Junior Researcher, Laboratory of Research and Development of Peptide Drugs and Vaccines, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;

**E.A. Beloborodov**, Researcher, Laboratory of Research and Development of Peptide Drugs and Vaccines, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;

**Yu.V. Saenko**, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Research and Development of Peptide Drugs and Vaccines, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;

**D.E. Sugak**, Junior Researcher, Laboratory of Research and Development of Peptide Drugs and Vaccines, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;

**A.N. Fomin**, PhD, Senior Researcher, Director of the S.P. Kapitsa Technological Research Institute;

**S.M. Slesarev**, DSc, Professor, Head of the Department of Biology, Ecology and Nature Management, Institute of Medicine, Ecology and Physical Education;

**Ye.S. Pogodina**, PhD, Head of the Laboratory of Research and Development of Peptide Drugs and Vaccines, S.P. Kapitsa Technological Research Institute

Ulyanovsk State University, 42 Leo Tolstoy St., Ulyanovsk, 432017, Russia

Apoptosis and necrosis during reperfusion after ischemia are key mechanisms at the cellular level leading to damage. The development of pathological conditions is preceded by intracellular calcium ion overload both at the stage of ischemia and at the stage of reperfusion. In this regard, one of the strategies aimed at reducing damage during ischemia/reperfusion is associated with the use of calcium channel blockers.

**The aim of the study** was to study the effect of a peptide toxin, a calcium channel blocker  $\omega$ -hexatoxin-Hv1a, on different types of epithelial cell death during *in vitro* reconstruction of ischemia/reperfusion conditions characteristic of organ transplantation.

**Materials and Methods.** In this study, we used CHO-K1 epithelial cell culture. Changes in apoptosis, necrosis, cell index, and calcium ion concentration were assessed when modeling ischemia/reperfusion processes *in vitro* with the addition of a calcium channel blocker toxin. Ischemic and reperfusion injury was achieved by oxygen and nutrient deprivation followed by reperfusion in a complete nutrient medium. The measurements were performed using a multimodal plate reader-fluorimeter.

**Results.** An increase in apoptosis, necrosis, and the concentration of calcium ions was recorded when modeling ischemia/reperfusion processes. A decrease in the level of apoptosis and necrosis, as well as the concentration of calcium ions to a physiological level or a level close to physiological, was noted when the toxin was added at a concentration of 50 nM at the reperfusion stage. The cell index showed a faster restoration in the presence of the toxin.

**Conclusion.** The experimental data confirm the hypothesis of a beneficial effect of peptide calcium channel blockers on the state of epithelial cells during reperfusion after ischemia and can be considered for further study as a strategy for organ adaptation before reperfusion.

**Key words:** ischemia; reperfusion injury; peptide toxins; calcium channel blockers; apoptosis during reperfusion.

### Введение

Ишемическое и реперфузионное повреждение (ИРП) является важным фактором, приводящим к высокой заболеваемости и смертности при ряде состояний, к которым помимо инфаркта миокарда [1, 2], ишемического инсульта [3, 4] и острого повреждения почек [5, 6] относятся трансплантация органов [7, 8], а также обширные операции. Во всех данных случаях ИРП существенно влияет на клинический исход [9]. Сходные механизмы повреждений, вызванных ИРП, наблюдаются при трансплантации почек, печени, легких. Ряд исследований показал, что в первую очередь повреждению подвержены эпителиальные и эндотелиальные клетки трансплантированных органов [10–13].

Трансплантаты неизбежно испытывают ишемию с момента отделения от донорской крови. Во время трансплантации отмечается смена последовательных событий: после периода хирургической тепловой ишемии во время извлечения донорского органа следует длительный период холодовой ишемии в гипотермическом консервирующем растворе, который заканчивается тепловой ишемией во время имплантации реципиенту [14]. Как это ни парадоксально, последующая реперфузия не восстанавливает нормальное состояние, а еще более усиливает повреждение, активируя несколько механизмов, среди которых врожденный и адаптивный иммунный ответ, и программы клеточной гибели [9].

На клеточном уровне следует различать две фазы ИРП: повреждение, возникающее во время ишемии, и

повреждение, возникающее после реперфузии, которые характеризуются такими типами клеточной гибели, как апоптоз и некроз [15, 16]. Апоптоз идентифицирован как центральный механизм во многих аспектах трансплантации органов и тканей [17].

Первым изменением, вызванным ишемией, является снижение доставки кислорода. Это служит причиной переключения с аэробного на анаэробный метаболизм. Анаэробный метаболизм не удовлетворяет потребностей аэробных тканей, и, как следствие, уровень внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) быстро падает, обуславливая внутриклеточный ацидоз. Все это приводит к ингибированию активности Na/K-АТФ-азы, что вызывает увеличение концентрации ионов натрия и воды внутри клетки. Наряду с накоплением ионов  $\text{Na}^+$  в клетке повышается также и уровень  $\text{Ca}^{2+}$ , поскольку антипортер Na/Ca прекращает выкачивать кальций из клетки. Так как накапливающийся внутри клетки натрий не может быть удален Na/K-АТФ-азами, обменник Na/Ca начинает работать в обратном направлении [18]. Перегрузка кальцием вызывает активацию зависимых от кальция протеаз, таких как кальпаины. Они остаются неактивными из-за кислой среды, но могут повреждать клетки после нормализации pH при реперфузии [19]. Другим эффектом перегрузки  $\text{Ca}^{2+}$  является образование активных форм кислорода (АФК) на митохондриальном уровне во время ишемии [20].

Несмотря на все вышеперечисленные процессы, при ишемии теряется лишь небольшое количество клеток по сравнению с фазой реперфузии. При реперфузии происходят как повышение уровня кислорода, так и нормализация внеклеточного pH. А после реперфузии происходит дальнейшее увеличение уровня цитоплазматического и митохондриального кальция, который активизирует кальпаины, вызывающие нарушение клеточной структуры и гибель клеток. Возвращение к нормоксии способствует большей выработке АФК и снижению уровня антиоксидантной способности [21, 22]. АФК в свою очередь способствуют повреждению мембран и цитоскелета [23]. Увеличение АФК и повышенное содержание кальция в митохондриях вызывают открытие митохондриальной поры, которое приводит к гибели клеток посредством различных механизмов, таких как апоптоз и некроз [16, 24].

Чтобы обеспечить наилучшее функционирование органа после трансплантации, в настоящее время в клинической практике используются два метода консервации органов: статическое хранение в холодильнике и машинная перфузия [25]. Дополнительно исследовали использование нескольких терапевтических газов, среди которых водород ( $\text{H}_2$ ), NO, сероводород ( $\text{H}_2\text{S}$ ) и монооксид углерода [26], а также лечение фармакологическими дозами ингибиторов пролилгидроксилазы [27] и ферментом супероксиддисмутазой [28]. Однако поскольку одним из наиболее важных патофизиологических механизмов ИРП является перегрузка кальцием, основным стратегическим методом,

направленным на уменьшение повреждений, представляется использование блокаторов кальциевых каналов. В ряде исследований установлено, что использование верапамила, дилтиазема или нифедипина улучшает целостность трансплантированного органа [29], а также облегчает экспериментальное ишемическое и реперфузионное повреждение различных органов [30–32] за счет снижения клеточной проницаемости для кальция.

В настоящее время в качестве альтернативы химическим препаратам — блокаторам кальциевых каналов, при использовании которых отмечается ряд существенных недостатков [33], рассматриваются пептидные токсины членистоногих, относящиеся к группе нейротоксинов с дисульфидными мостиками (кноттины), формирующими ингибиторный цистинный узел. Эти пептиды содержат примерно 30 аминокислотных остатков, включая консервативные цистеины, которые образуют внутримолекулярные дисульфидные связи [34]. Мало того, что большинство этих пептидов обладают избирательностью к одному классу ионных каналов, они могут обладать селективностью к одному каналу: от слабой до исключительной [35]. К тому же цистинный узел превращает токсины в гиперстабильные мини-белки с огромной химической, термической и биологической стабильностью. Кноттины обычно устойчивы к экстремальным значениям pH, органическим растворителям и высоким температурам. Однако с терапевтической точки зрения наиболее важным их свойством является устойчивость к протеазам [36, 37].

В настоящее время уже показан эффект подобных токсинов в регуляции ИРП. К примеру, одним из  $\beta$ -конотоксинов является MVIIIC, который состоит из 26 аминокислот и является членом семейства токсинов, блокирующих кальциевые каналы. Исследования *in vitro*, в которых моделировалась ишемия головного и спинного мозга, показали, что MVIIIC значительно снижает приток  $\text{Ca}^{2+}$  и ослабляет высвобождение глутамата [38]. Эксперименты *in vitro* также показали, что  $\beta$ -конопептид GVIA ингибирует избыточное высвобождение глутамата во время ишемии, блокируя  $\text{Ca}^{2+}$ -канал N-типа, и что это ингибирование вызывает значительный защитный эффект в нейронах [39].

Таким образом, стратегия применения пептидных кальциевых блокаторов будет заключаться в использовании их в качестве перспективной основы для разработки терапевтических препаратов, действие которых направлено на снижение негативных последствий реперфузии при трансплантации органов.

**Цель исследования** — изучение влияния пептидного токсина — блокатора кальциевого канала  $\omega$ -hexatoxin-Hv1a [PDB: P56207] из паука *Hadronyche versuta* — на разные типы клеточной гибели эпителиальных клеток при воспроизведении *in vitro* условий ишемии/реперфузии, характерных при трансплантации органа.

## Материалы и методы

Исследование проведено на культуре CHO-K1 — эпителиальных клетках яичника китайского хомячка, поскольку имеются доказательства, что при ишемии/реперфузии в первую очередь страдают эпителиальные клетки [10–12]. Ни один человек/животное не принимали непосредственного участия в процессе отбора биоматериала во время этого исследования. Российские нормативные акты не требуют согласования использования биоматериалов клеточных линий для научных исследований (Федеральный закон от 23 июня 2016 г. №180-ФЗ).

Клеточная линия содержалась в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки — ФБС (Biosera, Франция) и гентамицина при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония). За 24 ч до эксперимента были сделаны пассажи в 48-луночные планшеты в концентрации 40 000 клеток на лунку.

Модель ишемии/реперфузии была воспроизведена в условиях 3-часового культивирования этих клеток в среде DMEM («ПанЭко») с пониженным содержанием ФБС (1%) и глюкозы (1 г/л) в 1% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> (ишемия) в инкубаторе CB-53 (Binder, Германия) с последующим 3-часовым инкубированием в среде DMEM, содержащей 10% ФБС и 3,151 г/л глюкозы с 18,6% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> (реперфузия) — контроль [40]. Токсин в конечных концентрациях 10 и 50 нМ добавляли в начале реперфузии. Для общего контроля параметры фиксировали в нормальных условиях (DMEM с 10% ФБС и 3,151 г/л глюкозы, 18,6% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Перед началом каждого эксперимента питательные среды были уравновешены в необходимых условиях в течение 30 мин.

Аминокислотная последовательность токсина ω-hexatoxin-Hv1a найдена с использованием базы данных UniProt (P56207). Токсин получен на основе твердофазного пептидного синтеза на пептидном синтезаторе ResPep SL (Intavis, Германия) по стандартному протоколу. Анализ пептидов проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографической системе LC-20AD XR (Shimadzu, Япония), оснащенной спектрофотометрическим детектором SPD-20A. Масс-спектрометрический анализ выполняли на масс-спектрометре AUTOFLEX (модификация MICROFLEX) (Bruker Daltonics GmbH, Германия).

В ходе эксперимента фиксировали изменения уровня апоптоза, некроза и кальция. Краситель Yo-Pro 1 и PI (конечная концентрация — 1 мкМ) [41] использован для измерения уровня апоптоза и некроза, Rhod 2 AM (1 мкМ) [42] — уровня ионов кальция. Красители были добавлены через 3 ч после начала реперфузии и до ее начала — для ионов кальция. После окрашивания все ячейки дважды промывали теплым фосфатно-солевым буфером (PBS).

Измерения проводили с использованием мульти-

модального планшетного ридера CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Германия) в PBS в режиме matrix scan (10×10). После эксперимента клетки смывали с планшета и подсчитывали их концентрацию на камере Горяева. Первичную обработку выполняли в программе MARS (BMG LABTECH, Германия) с последующей обработкой в Excel. Все данные были пересчитаны на 100 000 клеток.

Дополнительно проанализировали выживаемость клеток в условиях ишемии/реперфузии и при действии токсинов. Для этого использовали систему 16-луночного планшета xCELLigence RTCA S16 (Agilent Technologies, США) [43]. В каждую ячейку 16-луночного планшета вносили 10 000 клеток, измерение показателей клеточной культуры фиксировали в режиме реального времени. При достижении экспоненциальной стадии роста (через 24 ч) культуру переносили в условия, описанные выше. Каждый эксперимент проводили три раза по три повтора.

**Статистическая обработка.** Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (M±SD). Для определения характера распределения использовали критерий асимметрии и эксцесса. Для оценки статистической значимости различий (в связи с небольшим объемом выборки) применяли критерий Манна–Уитни, обработку выполняли в программе Origin (OriginLab, США). Поскольку данные о действии токсина сравнивались с контрольными условиями без токсина, а также с нормальными условиями, для устранения эффекта множественных сравнений использовали критерий Бонферрони, различия между группами считали статистически значимыми при p≤0,01.

## Результаты

В результате пептидного синтеза получен токсин с чистотой >95% (рис. 1).

Изменение уровня апоптоза при действии токсина в концентрациях 10 и 50 нМ при моделировании условий ишемии/реперфузии показало, что после 3-часовой реперфузии в культуре CHO-K1 (контроль) происходит повышение уровня апоптоза, однако добавление токсина в концентрации 50 нМ поддерживает состояние культуры на уровне нормальных условий (рис. 2). При этом токсин в концентрации 10 нМ не оказывает влияния на уровень апоптоза.

Аналогичная картина наблюдается при изучении влияния токсина на уровень некроза при моделировании условий ишемии/реперфузии (рис. 3). После реперфузии уровень некроза также возрастает, однако токсин уже в концентрации 10 нМ способствует поддержанию этого уровня, соответствующего уровню некроза при нормальных условиях.

В наших экспериментах повышение уровня апоптоза и некроза сопровождается увеличением концентрации ионов кальция (рис. 4). При этом сразу после ишемии концентрация кальция значительно возрастает, а после 3 ч реперфузии снижа-

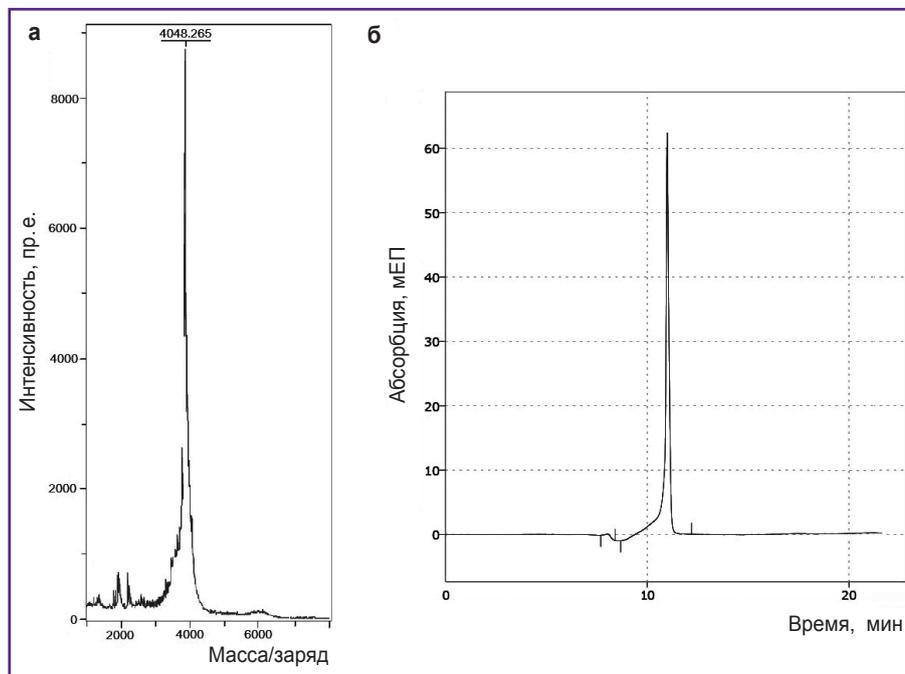


Рис. 1. Масс-спектрограмма (а) и хроматограмма (б) токсина ω-hexatoxin-Hv1a пр.е. — произвольная единица; мЕП — миллиединицы поглощения

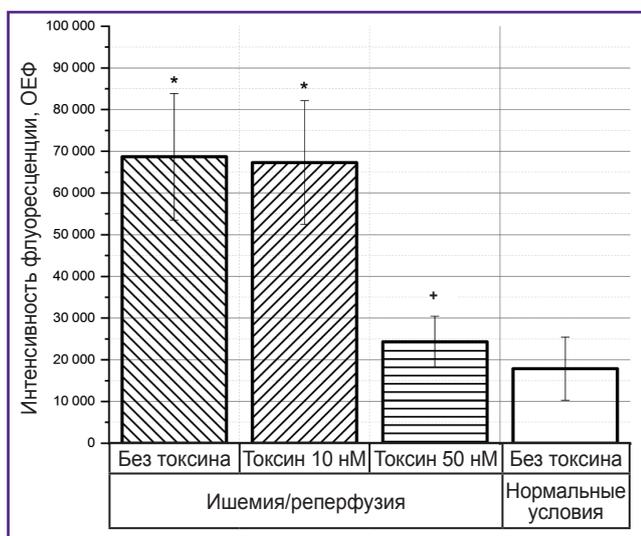


Рис. 2. Влияние токсина ω-hexatoxin-Hv1a в концентрациях 10 и 50 нМ на уровень апоптоза через 3 ч реперфузии после ишемии

+ различия статистически значимы по сравнению с группой без токсина,  $p < 0,01$ ; \* по сравнению с нормальными условиями,  $p < 0,01$ ; ОЕФ — относительная единица флуоресценции

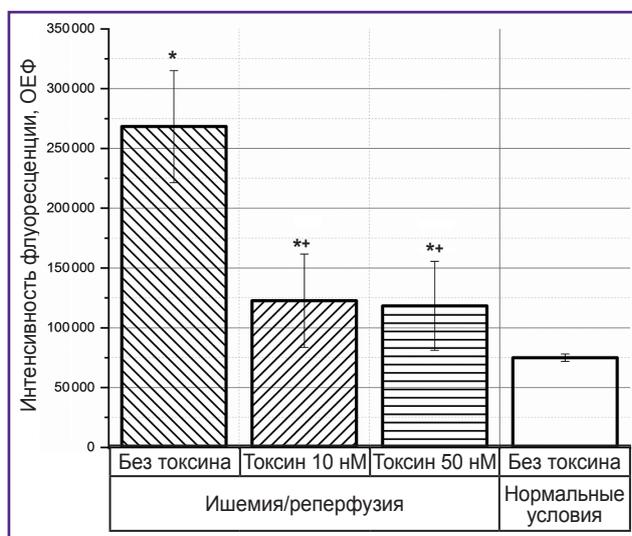
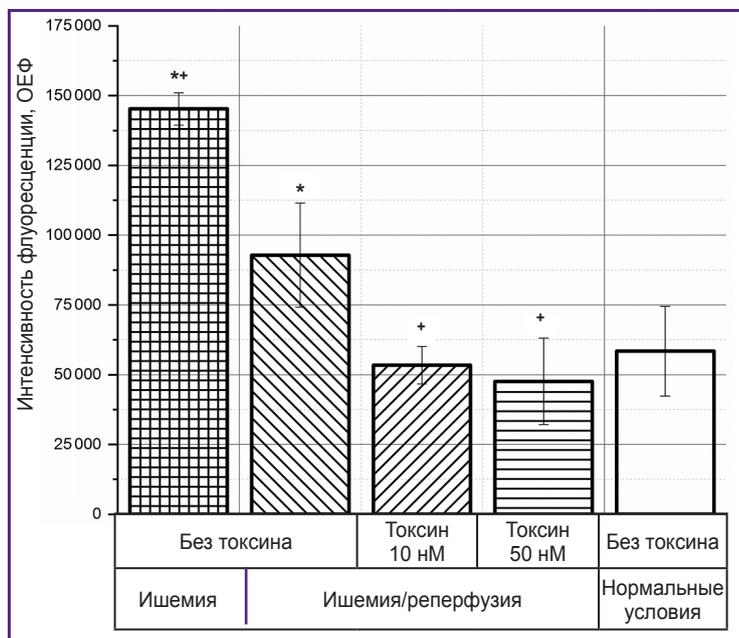


Рис. 3. Влияние токсина ω-hexatoxin-Hv1a в концентрациях 10 и 50 нМ на уровень некроза через 3 ч реперфузии после ишемии

+ различия статистически значимы по сравнению с группой без токсина,  $p < 0,01$ ; \* по сравнению с нормальными условиями,  $p < 0,01$ ; ОЕФ — относительная единица флуоресценции

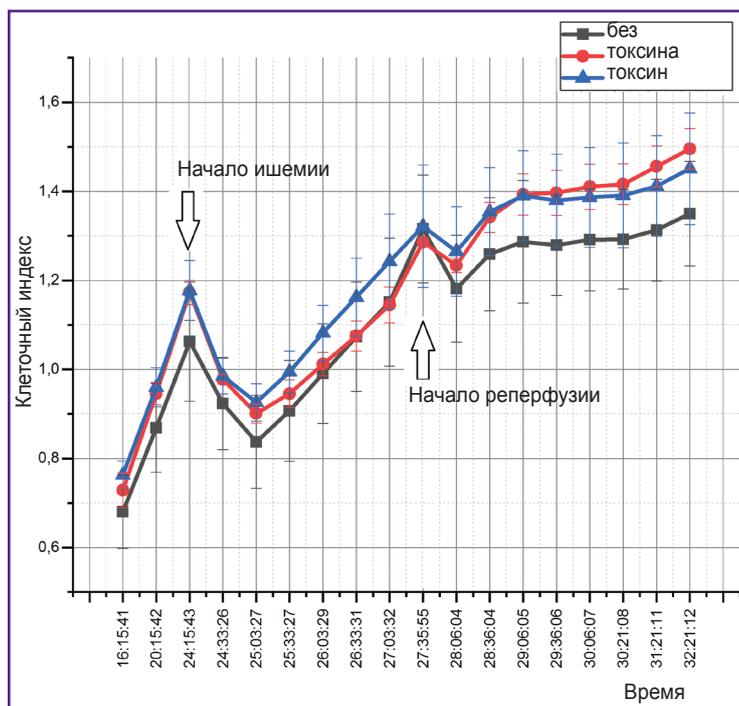
ется, но остается на уровне выше нормальных условий. Добавление токсина в данном случае ведет к снижению концентрации ионов кальция во время реперфузии, что коррелирует с данными о снижении уровня апоптоза и некроза при добавлении токсина. Эффект наблюдается как при концентрации токсина 10 нМ, так и при 50 нМ.

Отдельно стоит рассмотреть динамику клеточного индекса (рис. 5), который указывает на изменение адгезии клеток при различных формах воздействия. Обнаружено, что в начале ишемии происходит падение индекса в первые 30 мин (стадия адаптации к смене среды), затем после нормализации условий индекс начинает расти и продолжает рост в течение



**Рис. 4. Влияние токсина  $\omega$ -hexatoxin-Hv1a в концентрациях 10 и 50 нМ на концентрацию ионов кальция через 3 ч реперфузии после ишемии**

+ различия статистически значимы по сравнению с группой без токсина,  $p < 0,01$ ; \* по сравнению с нормальными условиями,  $p < 0,01$ ; ОЕФ — относительная единица флуоресценции



**Рис. 5. Изменение клеточного индекса в условиях ишемии/реперфузии с добавлением и без добавления токсина**

всего времени инкубации в гипоксических условиях с сывороточной и глюкозной депривацией. В начале реперфузии индекс снова падает, что обусловлено

сменой среды, а затем также начинает расти. Однако в присутствии токсина в обеих концентрациях отмечается возврат индекса к показателям до начала реперфузии уже через 1 ч. В условиях, когда токсин не добавлялся в среду, показатель индекса на протяжении дальнейшего инкубирования остается ниже первоначального значения и достигает нормального уровня только через 5 ч от начала реперфузии.

### Обсуждение

Ишемическое и реперфузионное повреждение представляет собой патологическое состояние, характеризующееся начальным снижением кровоснабжения органа с последующей реперфузией и реоксигенацией [9]. ИРП на основе ишемии с последующей реперфузией протекает во всех пересаженных органах в более или менее тяжелой форме [44]. Значительная часть повреждений ишемизированного органа возникает не в период ишемии, а во время и после реперфузии и приводит в первую очередь к потере функций эпителиальных клеток канальцев почек [10, 17], а также эпителии желчных протоков [45], способствуя развитию острого повреждения, задержке функционирования трансплантата, а также острому и хроническому отторжению органов [13].

В наших экспериментах исследована индукция гибели клеток через моделирование процессов гипоксии–депривации/реоксигенации–реперфузии, которые характеризуют многие патологические состояния, связанные с ишемическим и реперфузионным поражением, в том числе в период трансплантации. Мы использовали модель, основанную не только на гипоксии, но также и на ограничении доступа питательных веществ к клеткам. В качестве блокатора кальциевых каналов применяли токсин  $\omega$ -hexatoxin-Hv1a, эффективность которого в снижении индуцированного проапоптотическим пептидом апоптоза в концентрациях 10 и 50 нМ уже была показана в нашей предыдущей работе [46].

Реперфузионное повреждение как эффекторная фаза ишемии развивается в течение нескольких часов или дней после ишемии. Процессы репарации и регенерации органа протекают вместе с клеточным апоптозом, аутофагией и некрозом; судьба органа зависит от того, преобладает ли гибель клеток или регенерация. Поскольку апоптоз нуждается в

энергии и синтезе белка, он происходит в основном при реперфузии. Когда цитозольный кальций, который увеличивается во время ишемии, возвращается к

нормальным значениям, клетки могут восстановиться после повреждения. Однако прогрессирующее увеличение содержания кальция в цитозоле указывает на необратимую фазу повреждения [19]. Подобное можно было увидеть в наших экспериментах. При стадии реперфузии после ишемии происходит увеличение как апоптоза, так и некроза (см. рис. 2 и 3). При этом реперфузия сопровождается увеличением концентрации ионов кальция, которая начинает повышаться уже на стадии ишемии (см. рис. 4). Митохондриальная дисфункция — критическое событие во время ишемии, поскольку она инициирует каскады как некроза, так и апоптоза во время реперфузии. Органелла является одновременно местом образования вредных частиц и мишенью повреждения. Во время ишемии антипортер Na/Ca прекращает выкачивать кальций из клетки, так как накапливающийся внутри клетки натрий не может быть удален Na/K-АТФ-азами, что приводит к тому, что обменник Na/Ca начинает работать в обратном направлении [18]. Перегрузка кальцием в митохондриях вызывает раннее ингибирование NADH-кофермента Q-оксидоредуктазы (комплекс I) с последующим окислением цитохрома А3. Все это приводит к тому, что цитохром С теряет свое закрепление на внутренней митохондриальной мембране и проникает в цитозоль, активируя каспазу 3 [47].

Добавление токсина — блокатора кальциевых каналов — приводит к снижению концентрации кальция, что способствует ингибированию процессов апоптоза и некроза при реперфузии. Аналогично этот результат подтверждают данные об изменении клеточного индекса, который показывает степень распластанности клеток и их реакцию на изменение условий (см. рис. 5). В группе, где не использовали токсин, возврат к нормальному состоянию клеточной культуры происходит через несколько часов, в то время как при добавлении токсина данный процесс занимает 1 ч.

## Заключение

Данные эксперимента подтверждают гипотезу о благотворном влиянии блокаторов кальциевых каналов на состояние эпителиальных клеток при реперфузии после ишемии и могут рассматриваться для дальнейшего изучения в качестве стратегии использования для их адаптации органа перед реперфузией. Вероятный способ применения подобной стратегии может быть связан с предварительным хранением трансплантируемого органа в растворе, содержащем токсин в наномолярных концентрациях.

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература/References

1. Simonis G., Strasser R.H., Ebner B. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. *Crit Care* 2012; 16(2): A22, <https://doi.org/10.1186/cc11280>.
2. Heusch G. Myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17(22): 773–789, <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0403-y>.
3. Guo Z.H., Li F., Wang W.Z. The mechanisms of brain ischemic insult and potential protective interventions. *Neurosci Bull* 2009; 25(3): 139–152, <https://doi.org/10.1007/s12264-009-0104-3>.
4. Al-Mufti F., Amuluru K., Roth W., Nuoman R., El-Ghanem M., Meyers P.M. Cerebral ischemic reperfusion injury following recanalization of large vessel occlusions. *Neurosurgery* 2018; 82(6): 781–789, <https://doi.org/10.1093/neuros/nyx341>.
5. Bonventre J.V., Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011; 121(11): 4210–4221, <https://doi.org/10.1172/jci45161>.
6. Hesketh E.E., Czopek A., Clay M., Borthwick G., Ferenbach D., Kluth D., Highes J. Renal ischaemia reperfusion injury: a mouse model of injury and regeneration. *J Vis Exp* 2014; 88: 51816, <https://doi.org/10.3791/51816>.
7. Jassem W., Fuggle S.V., Rela M., Koo D.D.H., Heaton N.D. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73(4): 493–499, <https://doi.org/10.1097/00007890-200202270-00001>.
8. Dar W.A., Sullivan E., Bynon J.S., Eltzhig H., Ju C. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: cellular and molecular mechanisms. *Liver Int* 2019; 39(5): 788–801, <https://doi.org/10.1111/liv.14091>.
9. Salvadori M., Rosso G., Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: pathogenesis and treatment. *World J Transplant* 2015; 5(2): 52–67, <https://doi.org/10.5500/wjt.v5.i2.52>.
10. Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29(6): 1134–1140, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu244>.
11. Smith S.F., Hosgood S.A., Nicholson M.L. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation: 3 key signaling pathways in tubular epithelial cells. *Kidney Int* 2019; 95(1): 50–56, <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.10.009>.
12. Saren G., Wong A., Lu Y.B., Baciuc C., Zhou W., Zamel R., Soltanieh S., Sugihara J., Liu M. Ischemia-reperfusion injury in a simulated lung transplant setting differentially regulates transcriptomic profiles between human lung endothelial and epithelial cells. *Cells* 2021; 10(10): 2713, <https://doi.org/10.3390/cells10102713>.
13. Saat T.C., van den Akker E.K., IJzermans J.N.M., Dor F.J.M.F., de Bruin R.W.F. Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? *J Transl Med* 2016; 14: 20, <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0767-2>.
14. Zhao H., Alam A., Soo A.P., George A.J.T., Ma D. Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond. *EBioMedicine* 2018; 28: 31–42, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.025>.
15. Capuzzimati M., Hough O., Liu M. Cell death and ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2022; 41(8): 1003–1013, <https://doi.org/10.1016/j.healun.2022.05.013>.
16. Thomas F., Wu J., Thomas J.M. Apoptosis and organ

- transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2000; 5(1): 35–41, <https://doi.org/10.1097/00075200-200003000-00007>.
17. Bulent G. Ischemia reperfusion injury in kidney transplantation. In: *Kidney transplantation — new perspectives*. Trzcinska M. (editor). IntechOpen; 2011; p. 213–222, <https://doi.org/10.5772/18289>.
18. Kosieradzki M., Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc* 2008; 40(10): 3279–3288, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.004>.
19. Inserte J., Hernando V., Garcia-Dorado D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2012; 96(1): 23–31, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs232>.
20. Peng T.I., Jou M.J. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1201: 183–188, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x>.
21. Li C., Jackson R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282(2): C227–C241, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00112.2001>.
22. Tang S.P., Mao X.L., Chen Y.H., Yan L.L., Ye L.P., Li S.W. Reactive oxygen species induce fatty liver and ischemia-reperfusion injury by promoting inflammation and cell death. *Front Immunol* 2022; 13: 870239, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.870239>.
23. Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M., Korthuis R.J. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 298: 229–317, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394309-5.00006-7>.
24. Philipponnet C., Aniot J., Garrouste C., Kemeny J.L., Heng A.E. Ischemia reperfusion injury in kidney transplantation: a case report. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(52): e13650, <https://doi.org/10.1097/md.00000000000013650>.
25. Radajewska A., Krzywonos-Zawadzka A., Bil-Luli I. Recent methods of kidney storage and therapeutic possibilities of transplant kidney. *Biomedicines* 2022; 10(5): 1013, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051013>.
26. Sahara H., Yamada K. Medical gas (carbon monoxide, hydrogen sulfide) therapy prolongs survival of the fully MHC-disparate lung graft from brain-dead donors in miniature swine. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33(4): S49–S50, <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.01.164>.
27. Bernhardt W.M., Gottmann U., Doyon F., Buchholz B., Campean V., Schödel J., Reisenbuechler A., Klaus S., Arend M., Flippin L., Willam C., Wiesener M.S., Yard B., Warnecke C., Eckardt K.U. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(50): 21276–21281, <https://doi.org/10.1073/pnas.0903978106>.
28. Baldari S., Di Rocco G., Trivisonno A., Samengo D., Pani G., Toietta G. Promotion of survival and engraftment of transplanted adipose tissue-derived stromal and vascular cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Int J Mol Sci* 2016; 17(7): 1082, <https://doi.org/10.3390/ijms17071082>.
29. Saber M., Eimani H., Soleimani Mehranjeni M., Shahverdi A., Momeni H.R., Fathi R., Tavana S. The effect of Verapamil on ischaemia/reperfusion injury in mouse ovarian tissue transplantation. *Biomed Pharmacother* 2018; 108: 1313–1319, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.130>.
30. Fansa I., Altug M.E., Melek I., Ucar E., Kontas T., Akcora B., Atik E., Duman T. The neuroprotective and anti-inflammatory effects of diltiazem in spinal cord ischaemia-reperfusion injury. *Int J Med Res* 2009; 37(2): 520–533, <https://doi.org/10.1177/147323000903700228>.
31. Bao M., Huang W., Zhao Y., Fang X., Zhang Y., Gao F., Huang D., Wang B., Shi G. Verapamil alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress via activation of SIRT1. *Front Pharmacol* 2022; 13: 822640, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.822640>.
32. Søfteland J.M., Oltean M. Intestinal ischemia-reperfusion injury and calcium channel blockers: getting to the core of the problem. *J Invest Surg* 2021; 34(7): 808–809, <https://doi.org/10.1080/08941939.2020.1714823>.
33. Nawrot D.A., Ozer L.Y., Al Haj Zen A. A novel high content angiogenesis assay reveals that Lacidipine, L-type calcium channel blocker, induces in vitro vascular lumen expansion. *Int J Mol Sci* 2022; 23(9): 4891, <https://doi.org/10.3390/ijms23094891>.
34. Gao X., Stanger K., Kaluarachchi H., Maurer T., Ciepla P., Chalouni C., Franke Y., Hannoush R.N. Cellular uptake of a cystine-knot peptide and modulation of its intracellular trafficking. *Sci Rep* 2016; 6: 35179, <https://doi.org/10.1038/srep35179>.
35. Deplazes E. Molecular simulations of disulfide-rich venom peptides with ion channels and membranes. *Molecules* 2017; 22(3): 362, <https://doi.org/10.3390/molecules22030362>.
36. Funk C.D., Ardakani A. A novel strategy to mitigate the hyperinflammatory response to COVID-19 by targeting leukotrienes. *Front Pharmacol* 2020; 11: 1214, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01214>.
37. Bajaj S., Han J. Venom-derived peptide modulators of cation-selective channels: friend, foe or frenemy. *Front Pharmacol* 2019; 10: 58, <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00058>.
38. Oliveira K.M., Lavor M.S., Silva C.M., Fukushima F.B., Rosado I.R., Silva J.F., Martins B.C., Guimarães L.B., Gomez M.V., Melo M.M., Melo E.G. Omega-conotoxin MVIIc attenuates neuronal apoptosis in vitro and improves significant recovery after spinal cord injury in vivo in rats. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(7): 3524–3536.
39. Yamada K., Teraoka T., Morita S., Hasegawa T., Nabeshima T.  $\omega$ -conotoxin GVIA protects against ischemia-induced neuronal death in the Mongolian gerbil but not against quinolinic acid-induced neurotoxicity in the rat. *Neuropharmacology* 1994; 33(2): 251–254, [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(94\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)90016-7).
40. Wenger R.H., Kurtcuoglu V., Scholz C.C., Marti H.H., Hoogewijs D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl)* 2015; 3: 35–43, <https://doi.org/10.2147/hp.s92198>.
41. 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. Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. *PLoS One* 2012; 7(1): e30688, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030688>.
42. Fonteriz R.I., de la Fuente S., Moreno A., Lobatón C.D., Montero M., Alvarez J. Monitoring mitochondrial  $[Ca^{2+}]$  dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium* 2010; 48(1): 61–69, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.07.001>.

43. Ke N., Wang X., Xu X., Abassi Y.A. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 33–43, [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_6).
44. Kahn J., Schemmer P. Control of ischemia-reperfusion injury in liver transplantation: potentials for increasing the donor pool. *Visc Med* 2018; 34(6): 444–448, <https://doi.org/10.1159/000493889>.
45. Wang L., Li J., He S., Liu Y., Chen H., He S., Yin M., Zou D., Chen S., Luo T., Yu X., Wan X., Huang S., Guo Z., He X. Resolving the graft ischemia-reperfusion injury during liver transplantation at the single cell resolution. *Cell Death Dis* 2021; 12(6): 589, <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03878-3>.
46. Iurova E., Beloborodov E., Tazintseva E., Fomin A., Shutov A., Slesarev S., Saenko Y., Saenko Y. Arthropod toxins inhibiting Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels prevent AC 1001 H3 peptide-induced apoptosis. *J Pept Sci* 2021; 27(1): e3288, <https://doi.org/10.1002/psc.3288>.
47. Soares R.O.S., Losada D.M., Jordani M.C., Évora P., Castro-e-Silva O. Ischemia/reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies. *Int J Mol Sci* 2019; 20(20): 5034, <https://doi.org/10.3390/ijms20205034>.