

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-360

**ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРОВ PKC И PI3K ПРИ НАГРЕВЕ НА КОЛЕБАНИЯ КАЛЬЦИЯ И СКОРОСТИ НАРАБОТКИ ОКСИДА АЗОТА В ЦИТОПЛАЗМЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КОЖИ МЫШИ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ\***

**INFLUENCE OF PKC AND PI3K INHIBITORS DURING HEATING ON CALCIUM AND NITRIC OXIDE GENERATION RATE OSCILLATION IN THE CYTOPLASM OF CULTURED MOUSE SKIN ENDOTHELIOCYTES IN HYPERGLYCEMIC CONDITIONS**

М. С. Сидорова<sup>1,2</sup>, А. Р. Дюкина<sup>2</sup>, С. Н. Мякишева<sup>2</sup>, А. А. Гриневич<sup>2</sup>, Д. А. Серов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Пуцинский филиал Российского биотехнологического университета

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пуцзино

<sup>3</sup>Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, Москва

M. S. Sidorova<sup>1,2</sup>, A. R. Dukina<sup>2</sup>, S. N. Myakisheva<sup>2</sup>, A. A. Grinevich<sup>2</sup>, D. A. Serov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pushchino branch of the Russian Biotechnology University

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino

<sup>3</sup>Institute of General Physics named after A. M. Prokhorov RAS, Moscow

✉ marya.yase@yandex.ru

**Аннотация**

Эндотелиальная дисфункция приводит к сосудистым осложнениям при сахарном диабете. Функционирование этих клеток характеризуется колебаниями  $[Ca^{2+}]_i$  и  $d[NO]_i$ . Исследованы эндотелиоциты кожи мыши в нормо- и гипергликемии (НГ, ГГ), при тепловой пробе 40 °С, с ингибиторами PKC и PI3K (GF, TG). Обнаружено снижение энергии колебаний  $[Ca^{2+}]_i$  и  $d[NO]_i$  под действием TG при ГГ. Повышение температуры усиливало эффект снижения энергии колебаний  $d[NO]_i$  с GF и TG при НГ и  $[Ca^{2+}]_i$  для TG при ГГ.

**Abstract**

Endothelial dysfunction leads to vascular complications of diabetes mellitus. The functioning of these cells is characterized by oscillation of  $[Ca^{2+}]_i$  and  $d[NO]_i$ . Mouse skin endothelial cells were studied under normoglycemic (NG) and hyperglycemic (HG) conditions, during a heat test 40 °C, and in the presence of PKC and PI3K inhibitors (GF and TG). A decrease in the energy of  $[Ca^{2+}]_i$  and  $d[NO]_i$  oscillations was detected under the influence of TG in HG. Increasing the temperature intensified the reduction in the energy of  $d[NO]_i$  oscillations for both GF and TG in NG, and of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillation for TG in HG.

Гипергликемия — одно из осложнений сахарного диабета (СД), хронического заболевания, характеризующегося высоким содержанием глюкозы в крови, возникающим вследствие недостаточной выработки инсулина поджелудочной железой, или инсулинорезистентностью клеток тканей организма. Увеличение количества заболеваний СД в мире сравнивают с пандемией. Так, метаболические нарушения при СД, приводящие к гипергликемии и хроническому воспалению, считаются одной из основных причин микрососудистых осложнений. В их развитии ключевую роль играет модификация функций эндотелиальных клеток (эндотелиоцитов). Работа эндотелиоцитов характеризуется изменениями концентрации внутриклеточного кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) и скорости наработки оксида азота ( $d[NO]_i$ ), которые носят колебательный характер. При этом спектральные характеристики и энергии этих колебаний служат индикатором функционального состояния эндотелиоцитов, меняющегося при гипергликемии и при повышении температуры, связанной, например, с воспалительными процессами.

Цель работы — оценить эффект ингибиторов PKC и PI3K при нагреве на энергию колебаний  $[Ca^{2+}]_i$  и  $d[NO]_i$  в культивируемых эндотелиоцитах кожи мыши в условиях гипергликемии.

Исследования осуществлялись на культивируемых эндотелиоцитах микрососудов мыши с моделированием гипергликемических условий СД *in vitro*. Контролем были нормогликемические клетки. Для нормо- и гипергликемических условий клетки инкубировали в течение 24 ч в среде для культивирования клеток с содержанием D-глюкозы в концентрациях 5,5 и 22 мМ соответственно. За 10 мин и 1 ч до проведения эксперимента добавлялись ингибиторы GF (109203X ингибирует PKC — протеинкиназу C) и TG (100713 ингибирует PI3K — фосфоинозитид-3-киназу) в концентрациях 1 и 10 мкМ соответственно. В качестве контроля брались клетки без добавлений ингибиторов. После 15 мин покоя (37 °С) после начала эксперимента проводили тепловую пробу (нагрев

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00215П).

© М. С. Сидорова, А. Р. Дюкина, С. Н. Мякишева, А. А. Гриневич, Д. А. Серов, 2025

до 40 °C), которая длилась 20 мин. Изменение  $[Ca^{2+}]_i$  и  $d[NO]_i$  определяли методом флуоресцентной микроскопии. Для анализа изображений использовалось программное обеспечение ImageJ. Спектры и энергии колебаний вычисляли с помощью вейвлет-преобразования и интегрирования квадрата амплитуды соответственно, в частотном диапазоне эндотелиального ритма кожной микроциркуляции 0,007–0,021 Гц.

Показано достоверное снижение энергии колебаний  $[Ca^{2+}]_i$  и  $d[NO]_i$  при добавке TG по сравнению с контролем для гипергликемических условий и обеих температур. Увеличение температуры приводило к достоверному снижению по сравнению с покоем энергии колебаний  $d[NO]_i$  для обоих ингибиторов при нормогликемии и  $[Ca^{2+}]_i$  для TG при гипергликемии. Таким образом, показан вклад двух киназных путей (PKC и PI3K) в регуляцию колебаний  $[Ca^{2+}]_i$  и  $d[NO]_i$  в эндотелиоцитах микрососудов кожи мыши при увеличении температуры в гипергликемических условиях. Это может быть полезным для понимания развития метаболических нарушений в регуляции периферического кровотока у больных сахарным диабетом.