

DOI: 10.7868/S2658655X26030050
УДК 616.831

Экспериментальная статья

Митохондриальная дисфункция первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа на модели мышей линии *Hprt1^{del8Val}*

М.Ю. Скоркина^{1,*}, А.С. Зеленцова¹, Д.Н. Сушкова¹,
Г.Р.Ф. Альхафи¹, А.В. Дейкин¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Российская Федерация
*E-mail: marinaskorkina0077@gmail.com

Аннотация. Биохимические процессы в мозге тесно связаны с метаболизмом пуринов. Клетки синтезируют пурины по пути *de novo*, или утилизируют продукты распада с участием фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФТ), который катализирует рециркуляцию пуринов по резервному пути. Дефицит ГГФТ приводит к изменению митохондриального дыхания. Целью работы явилось изучение митохондриальной биоэнергетики первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа линии с мышью с персонализированной мутацией пациента в гене *Hprt1^{del8Val}*. Для оценки митохондриального профиля и способности клетки вырабатывать энергию в работе рассчитан биоэнергетический индекс клеточного здоровья на основе данных, полученных в ходе митохондриального стресс-теста, при выполнении которого осуществляли последовательное добавление известных ингибиторов клеточного дыхания в культуру клеток. Биоэнергетический индекс клеточного здоровья объединяет функциональные параметры митохондрий, такие как АТФ-связанное дыхание, максимальная дыхательная емкость, утечка протонов, немитохондриальное дыхание, в единое значение. В выполненном исследовании установлено нарушение митохондриальной биоэнергетики первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа как на этапе эмбрионального, так и постнатального развития. Снижение митохондриального дыхательного резерва в эмбриональной культуре у мышей с мутацией в гене *Hprt1^{del8Val}* сопровождалось снижением продукции АТФ. В культуре постнатальных нейронов продукция АТФ снизилась, при этом увеличилось немитохондриальное дыхание. В культуре P2 биоэнергетический индекс клеточного здоровья снижен по сравнению с культурой E18. Выявленные дисфункции в биоэнергетике митохондрий раскрывают новые механизмы в понимании молекулярной природы, лежащей в основе развития тяжелых неврологических фенотипов, связанных с нарушением обмена пуринов в головном мозге. Мыши с персонализированной мутацией пациента в гене *Hprt1^{del8Val}* являются уникальной моделью с измененным энергетическим гомеостазом, что делает их надежным инструментом для поиска терапевтических мишеней, направленных на коррекцию метаболических нарушений при синдроме Лёша–Нихена.

Ключевые слова: митохондрии, нарушение синтеза пуринов, митохондриальная биоэнергетика, синдром Лёша–Нихена

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Государственное задание Лаборатории редактирования генома для биомедицины и ветеринарии – FZWG-2024-0003.

Соблюдение этических стандартов. В работе руководствовались этическими принципами обращения с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS № 170). Все болезненные манипуляции с животными проводились в соответствии с регламентирующими стандартами: Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Все эксперименты выполнены с соблюдением требований Хельсинской декларации по гуманному обращению с животными (Хельсинская декларация этических принципов, 2008) и директивами Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Исследование одобрено Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных Белгородского государственного национального исследовательского университета (экспертное заключение № 03и/31 от 22.05.2024 г.).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Вклад авторов в публикацию. СМЮ, ДАВ – идея работы и планирование эксперимента; ЗАС, АГРФ, СДН – сбор данных; ЗАС, СМЮ, СДН, АГРФ – обработка данных; СМЮ, ЗАС, СДН, АГРФ, ДАВ – написание и редактирование манускрипта.

Ссылка для цитирования: Скоркина М.Ю., Зеленцова А.С., Сушкова Д.Н., Альхафи Г.Р.Ф., Дейкин А.В. Митохондриальная дисфункция первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа на модели мышей линии *Hprt1^{del18Val}*. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова / Russian Journal of Physiology*. 2026. Т. 112. № 3. С. 718–738.
<https://doi.org/10.7868/S2658655X26030050>

Mitochondrial Dysfunction in Primary Mixed Culture of Hippocampal Neurons in the *Hprt*^{del8Val} Mouse Model

M.Yu. Skorkina^{1,*}, A.S. Zelentsova¹, D.N. Sushkova¹,
G.R.F. Alhafi¹, A.V. Deykin¹

¹Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation
*E-mail: marinaskorkina0077@gmail.com

Abstract. Biochemical processes in the brain are closely linked to purine metabolism. Cells synthesize purines de novo or by recycling degradation products with the participation of the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), which catalyzes purine reutilization via the salvage pathway. Deficiency of HGPRT leads to changes in mitochondrial respiration. The aim of this study was to investigate mitochondrial bioenergetics in a primary mixed culture of hippocampal neurons derived from a mouse line carrying a patient-specific mutation in the *Hprt*^{del8Val} gene. The study revealed impaired of the mitochondrial bioenergetics of the primary mixed culture of hippocampal neurons at both embryonic and postnatal stages of development. A bioenergetic index of cellular health was calculated based on data obtained during a mitochondrial stress test, during which known inhibitors of cellular respiration were sequentially added to the cell culture to assess the mitochondrial profile and the cell's ability to produce energy. The Bioenergetic Index of Cellular Health combines mitochondrial functional parameters such as ATP-linked respiration, maximum respiratory capacity, proton leak and non-mitochondrial respiration into a single value. This study revealed impaired mitochondrial bioenergetics in a primary mixed culture of hippocampal neurons during both embryonic and postnatal development. A decrease in mitochondrial respiratory reserve in embryonic cultures in mice with a mutation in the *Hprt*^{del8Val} gene was accompanied by a decrease in ATP production. In the culture of postnatal neurons ATP production decreased while non-mitochondrial respiration increased. The bioenergetic index of cellular health in the P2 culture was reduced compared to the E18 culture. The dysfunctions in mitochondrial bioenergetics reveal new mechanisms in understanding the molecular nature underlying the development of severe neurological phenotypes associated with impaired purine metabolism in the brain. Mice with a patient-specific mutation in the *Hprt*^{del8Val} gene are a unique model with altered energy homeostasis, making them a reliable tool for finding therapeutic targets aimed at correcting metabolic disturbances in Lesch–Nyhan syndrome.

Keywords: mitochondria, purine synthesis disorder, mitochondrial bioenergetics, Lesch–Nyhan syndrome

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. State Assignment FZWG-2024-0003 for the Laboratory of Genome Editing for Biomedicine and Veterinary Science.

Ethics declarations. This study was guided by the ethical principles for the treatment of laboratory animals in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 170). All painful manipulations with animals were carried out in accordance with the following regulatory standards: Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. All experiments were performed in compliance with the Helsinki Declaration on the humane treatment of animals (Helsinki Declaration of Ethical Principles, 2008) and the Council Directives of the European Communities on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. The study was approved by the Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of Belgorod State National Research University (expert opinion No. 03i/31 dated 22.05.2024).

Conflict of interests. The authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Authors contribution. SMYu, DAV – idea of the study and planning of the experiment; ZAS, AGRF, SDN – collecting data; ZAS, SMYu, SDN, AGRF – processing data; SMYu, ZAS, SDN, AGRF, DAV – writing and editing the manuscript.

For Citation: Skorkina M.Yu., Zelentsova A.S., Sushkova D.N., Alhafi G.R.F., Deykin A.V. Mitochondrial dysfunction in primary mixed culture of hippocampal neurons in the *Hprt*^{del8Val} mouse model. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova / Russian Journal of Physiology*. 2026;112(3):718–738. (In Russ.)
<https://doi.org/10.7868/S2658655X26030050>

ВВЕДЕНИЕ

Пурины выполняют центральную роль в обеспечении различных биохимических процессов в нейронах, а также формируют остов для хранения клеточной энергии. Клетки синтезируют пурины по пути *de novo* или, утилизируя продукты распада с участием фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФТ), который катализирует резервный путь синтеза пуринов. В период эмбрионального развития синтез пуринов *de novo* является основным источником для мозга [1]. Однако экспрессия фермента ГГФТ увеличивается в течение постнатального периода, постепенно заменяя синтез *de novo* на резервный путь как доминирующий для производства пуринов [2]. Нуклеотидный баланс очень важен для зрелых дифференцированных нейронов, которые зависимы от резервного пути по сравнению с синтезом *de novo* [3] и обуславливает митохондриальную активность [4]. В более молодых нейронах митохондрий меньше, они более подвижны и занимают меньше места внутри отростков по сравнению с митохондриями зрелых клеток [5]. Эта повышенная подвижность митохондрий может обеспечить более быстрое распределение энергии в ответ на клеточные потребности. По мере созревания нейронов подвижность митохондрий снижается, но их число на клетку увеличивается, это указывает на то, что нейрональная дифференциация требует увеличения числа митохондрий, потенциально независимо от синтеза АТФ [5, 6].

Известно, что закладка нейронов с дефицитом ГГФТ может быть аномальной вследствие митохондриальной дисфункции, характеризующейся недостаточностью АТФ в период пролиферации и дифференцировки клеток [7–9]. В экспериментах отмечается, что дефицит окислительного фосфорилирования и, как следствие производства АТФ на ранних этапах закладки нейронов, может привести к потере маркерного потенциала дофаминергических нейронов среднего мозга [10]. В дофаминовых нейронах доказаны развитие митохондриальной дисфункции на фоне окислительного стресса и нарушение утилизации неправильно свернутых белков в условиях патологической рециркуляции пуринов [11]. В нейронах с нокаутом ГГФТ установлены нарушения гликолиза и окислительного фосфорилирования без каких-либо структурных изменений в митохондриях. При этом метаболизм глюкозы смещается в сторону пентозофосфатного пути, в результате чего преобладает выработка нуклеотидов над выработкой энергии [2]. Согласно данным литературы, дефицит ГГФТ может привести к снижению митохондриального дыхания в комплексе I дыхательной цепи, что увеличивает уровень митохондриального НАДН и активных форм кислорода [12], а также к повышенным уровням цитрата, снижению содержания липидов и жирных кислот [13]. Также известно, что дефицит ГГФТ связан со снижением потенциала митохондриальной мембраны [13, 14]. Дофаминергические нейроны вовлекаются в процесс гиппокамп-зависимого обучения избирательно [15], вырабатывая дофамин, который влияет на изменение эффективности синаптической передачи, способствуя индукции длительной потенциации в синапсах гиппокампа [16]. В связи с этим неизученным на данный момент остается вопрос, как влияет дефицит ГГФТ на биоэнергетический статус гиппокампа. Новизной проводимого исследования является попытка комплексно оценить параметры митохондриального дыхания у мышей с дефицитом фермента ГГФТ которая бы отражала биоэнергетический статус клетки с учетом таких показателе клеточного дыхания, как АТФ-связанное дыхание, максимальная дыхательная емкость, утечка протонов, немитохондриальное дыхание. Целью работы явилось изучение митохондриальной биоэнергетики первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа линии с мышей с персонализированной мутацией пациента в гене *Hprt1*^{del8Val}.

Удобной моделью для изучения биоэнергетики нейрональных культур являются генно-модифицированные животные. В своих исследованиях мы использовали новую модель генетически модифицированных мышей, *Hprt1*^{del8Val} с делецией триплета TCG в первом экзоне гена *HPRT1*, воспроизводящую персонализированную мутацию у пациента с синдромом Лёша–Нихена, у которого отмечали выраженные неврологические расстройства [17]. Известно, что мыши с дефицитом фосфорилболтрансферазы (HPRT), полученные с использованием эмбриональных стволовых клеток, не проявляют поведенческих фенотипов, характерных для синдрома Лёша–Нихена [18]. Это связано с более активным, по сравнению с человеком, ферментом аденинфосфорилболтрансферазой (APRT), который превращает аденозин в аденозинмонофосфат [19]. Однако наша популяция мышей, созданная с использованием метода геномного редактирования CRISPR-Cas9, демонстрировала поведенческий фенотип, связанный с самоповреждением в виде покусывания хвоста и пальцев.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Животные содержались в условиях конвенционального вивария Белгородского государственного национального исследовательского университета в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч темного и 12 ч светлого времени) при температурном режиме от 22 до 26 °С и имели свободный доступ к корму и воде. Эксперименты выполнены на мышах линии *Hprt*^{del8Val} с делецией триплета TCG в первом экзоне гена *HPRT1*, приводящей к удалению аминокислоты валин из восьмого положения аминокислотной последовательности фермента ГГФТ. Мыши были получены путем генетического редактирования системой CRISPR/Cas9 гибридов F1 CBAxС57В16/j [17]. В экспериментальную группу вошли самцы гемизиготы и самки гомозиготы; контрольная группа состояла из самцов и самок дикого типа (WT) генетического фона C57В16/j, синхронизированных по возрасту. Для генотипирования животных использовалась система ПЦР в реальном времени с зондами – TaqMan Real Time PCR. На дикий аллель (WT) использовали зонд FAM, на мутантный аллель (Mut)и- ROX.

Выделение и культивирование первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа. В эксперименте использована первичная смешанная культура нейронов, полученных из гиппокампа сорока восьми хорошо сформированных эмбрионов на 18-й день гестации (E18) и от тридцати двухдневных новорожденных мышат (P2).

Выбор модели первичной смешанной культуры нейронов является предпочтительным с точки зрения митохондриальной физиологии. В выполненном исследовании мы не ставили целью провести эксперименты на чистой нейрональной культуре, а стремились к созданию условий, максимально приближенных к физиологическим. При этом учитывали, что эмбриональная первичная смешанная культура нейронов содержит 20–35% нейронов [20]. Количество нейронов в постнатальной первичной смешанной культуре гиппокампа зависит от протокола выделения и добавления ингибитора роста глии цитозин-арабинозы (ага-С) [21]. В экспериментах мы не использовали ага-С для повышения чистоты первичной смешанной культуры постнатальных нейронов с целью сохранения митохондриальной функции нейроглиальных клеток. На сенсорных нейронах доказано сублетальное воздействие ага-С на клетки. Под влиянием ага-С снижается содержание мтДНК, усиливается производство активных форм кислорода, нарушается митохондриальное дыхание, снижаются запасы НАДФН и восстановленной формы глутатиона (GSH) [22].

Выделение первичной смешанной культуры гиппокампа E18 и P2 осуществляли по протоколу, описанному в работе [23]. Полученные культуры высеивали и культивировали в 8-луночных планшетах Cell Culture Miniplates (Agilent, США). Перед посевом проводили определение и подсчет жизнеспособных клеток в камере Горяева. Для подсчета клеток использовали краситель 0,4%-ный трипановый синий, в который добавляли клеточную суспензию в соотношении краситель : суспензия 3 : 1. Количество живых и мертвых клеток подсчитывали в пяти больших квадратах (разделенных на 16 малых) по диагонали. Расчет числа клеток проводили по стандартной формуле. В работу отбирали культуры при числе жизнеспособных клеток не менее 95%.

При высевании культуры E18 гиппокампа в каждую ячейку культурального планшета Cell Culture Miniplates вносили по 80 мкл клеточной суспензии, содержащей 20 000 клеток, а при работе с культурой P2 – 40 000 клеток. В каждом планшете

было засеяно по три экспериментальных и три контрольных лунки. В качестве контроля были использованы первичные смешанные культуры гиппокампа E18 и P2 мышей линии C57Bl6/j. Культивирование клеток осуществляли в нейробазальной среде (Панэко), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% основы для культивирования нейронов B-27 (нейромакс, Панэко), 0,5 мМ L-глутамакс (Gibco, 25030081), 1% PenStrep (ПанЭко), добавку N2 (ПанЭко). Клетки выращивали в инкубаторе для клеточных культур (Binder, Германия) при 37 °С, 5% CO₂ в течение трех суток. Культивирование осуществляли в течение трех суток, смену ½ порции среды на свежеприготовленную проводили ежедневно.

Метаболические тесты. Для оценки митохондриальной функции в проведенном исследовании выполнен тест митостресс на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse HS mini (Agilent, США). За 24 ч до анализа гидратировали сенсорный картридж Cartridge Agilent Seahorse XFp (Agilent, США), заполняя его калибрантом по 200 мкл в каждую лунку. Картридж помещали в инкубатор без CO₂ при температуре 37 °С на 24 ч. Готовили аналитическую среду, используя среду Seahorse XF DMEM Media, содержащую глюкозу в конечной концентрации 10 мМ, пируват 1 мМ и L-глутамин 2 мМ, согласно рекомендациям производителя. Для оценки митохондриальной функции использовали набор MitostressTest (Agilent, США). Стоковые растворы готовили согласно инструкции производителя. Набор включал олигомицин, FCCP, смесь ротенона и антимицина А. В эксперименте готовили рабочие растворы в конечной концентрации на лунку: олигомицин – 1,0 мкМ, FCCP – 2,0 мкМ, ротенон/антимицин А – 0,5 мкМ. Доза митохондриального разобщителя FCCP в присутствии 1 мкМ олигомицина была подобрана в предварительных экспериментах. Были использованы концентрации FCCP низкого диапазона 0,125, 0,25, 0,5 мкМ и высокого диапазона – 0,5, 1,0 и 2,0 мкМ. Максимальная скорость потребления кислорода установлена при концентрации FCCP 2,0 мкМ.

Митострессоры вводили в клеточные культуры инъекционно через порты сенсорного картриджа Cartridge Agilent Seahorse XFp (Agilent, США). Выполняли калибровку картриджа, а затем меняли калибровочный планшет на планшет с клетками и проводили измерения скорости поглощения кислорода, который отражает степень митохондриального дыхания в клетке. В каждой опытной и контрольной ячейках выполнено по 3 технических измерения. Нормализацию данных проводили по числу жизнеспособных клеток, которые подсчитывали после анализа, используя трипановый синий. Используя программный продукт Multi-File Seahorse XF Mitostress test (Agilent, США), рассчитывали базальное дыхание, максимальное дыхание, продукцию АТФ, утечку протонов, запасную дыхательную емкость, дыхательный резерв, немитохондриальное дыхание, коэффициент сопряжения дыхания.

Биоэнергетический индекс здоровья нейронов рассчитывали согласно формуле [24]

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

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

Биоэнергетический индекс клеточного здоровья отражает общую метаболическую функцию клетки и жизнеспособность клеточной культуры. Этот показатель объединяет несколько функциональных параметров митохондрий, такие как АТФ-связанное дыхание, максимальная дыхательная емкость, утечка протонов, немитохондриальное дыхание, в единое значение. Одним из критериев нейродегенеративных расстройств является биоэнергетическая дисфункция нейронов, что позволяет использовать этот показатель как потенциальный биомаркер заболеваний [25]. Высокий биоэнергетический индекс указывает на метаболический профиль клеток с высокой продукцией АТФ, большим энергетическим резервом, эффективными митохондриями и высокой устойчивостью к клеточному стрессу. Низкий индекс предполагает метаболический стресс, неэффективное производство энергии, снижение функции и резервной емкости митохондрий [26]. В нашей предыдущей работе биоэнергетический индекс клеточного здоровья нейронов показал надежность и объективность его использования для характеристики метаболического потенциала первичной смешанной эмбриональной и постнатальной культур нейронов гиппокампа, полученных от нелинейных мышей [27].

Оценку энергетического фенотипа нейронов проводили с использованием набора Cell Energy Phenotype (Agilent, США). Энергетический фенотип позволяет оценить специфику метаболического профиля у нейронов при патологических состояниях. При выполнении теста на энергетический фенотип измеряется скорость потребления кислорода и скорость закисления среды, что дает картину биоэнергетического состояния нейронов, выявляя баланс между митохондриальным дыханием и гликолизом [28]. В наборе использовали олигомицин (ингибитор АТФ-синтазы) и FCCP (митохондриальный разобщитель). Концентрация стрессового раствора олигомицин/FCCP, который вносили в порт картриджа, составляла 1,0/2,0 мкМ. На анализаторе клеточного метаболизма Seahorse HS mini (Agilent, США) выполняли измерения параметров: скорости поглощения кислорода (OCR) и скорости закисления среды (ECAR). По результатам измерений с помощью программного продукта Multi-File Seahorse XF Cell Energy Phenotype (Agilent, США) рассчитывали стрессовый OCR и ECAR как соотношение OCR (ECAR) в состоянии покоя к OCR (ECAR) после внесения в среду митострессора (смесь Oligomycin и FCCP), умноженное на 100%. В каждой опытной и контрольной ячейках выполнено по 3 технических измерения. По результатам измерений строили метаболические карты с помощью программного продукта Multi-File Seahorse XF Cell Energy Phenotype (США). Метаболическая карта представляет собой визуализацию путей производства энергии нейронов в режиме реального времени. Она демонстрирует использование нейронами митохондриального дыхания и гликолиза для удовлетворения своих энергетических потребностей [29].

Статистический анализ. Результаты экспериментального исследования обработаны с использованием пакета описательной статистики Excel 10.0. Экспериментальные данные в таблицах представлены значениями медианы (M) и стандартного отклонения (SD). Проверка гипотезы о виде распределения данных проведена по критерию согласия Пирсона, критический уровень для исследуемой выборки – 32,7. Для культуры E18 установлено нормальное распределение (коэффициент Пирсона 20,3 в контрольной группе, 14,1 – в опытной группе). Для культуры P2 установлено ненормальное распределение (коэффициент Пирсона в контрольной группе – 70,7, в опытной группе – 44,3). Для выборки с нормальным распределением в качестве критерия для оценки достоверности был использован коэффициент

Фишера, при ненормальном распределении – Т-критерий Вилкоксона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался при $p = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В режиме реального времени получены кривые скорости потребления кислорода (рис. 1).

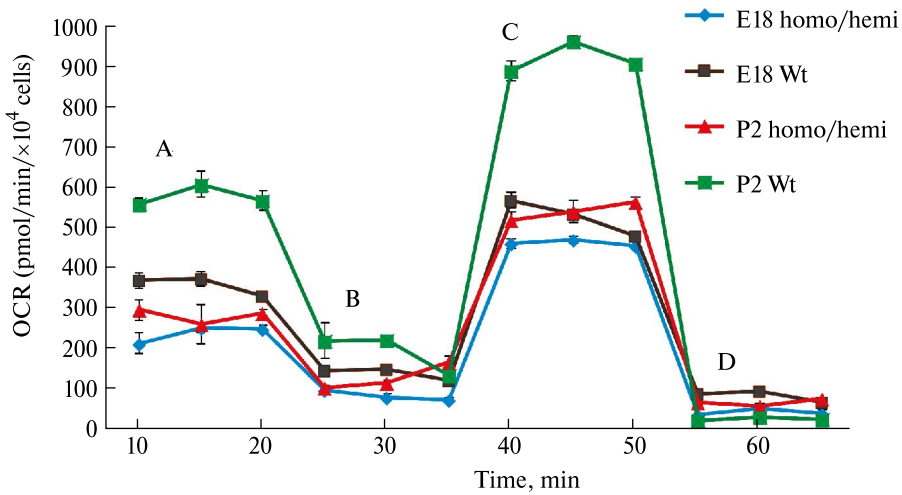


Рис. 1. Скорость потребления кислорода первичной смешанной культурой нейронов гиппокампа (E18, P2) мышей линии $Hprt^{del8Val}$ в режиме реального времени. А – базальное дыхание, В – инъекция олигомицина, С – инъекция FCCP, D – инъекция ротенона/антимидина

Fig. 1. Real-time oxygen consumption rate in primary mixed cultures of hippocampal neurons (E18, P2) derived from $Hprt^{del8Val}$ mice: A – basal respiration; B – oligomycin injection; C – FCCP injection; D – rotenone/antimycin A injection

Параметры митохондриального дыхания эмбриональной культуры (E18) у мышей линии $Hprt^{del8Val}$ снижены по сравнению с контролем (табл. 1).

В E18 первичной смешанной культуре гиппокампа мышей линии $Hprt^{del8Val}$ существенно снижена продукция АТФ – на 50,7% ($p < 0,05$), запасная дыхательная емкость, характеризующая жизнеспособность нейронов, сокращена на 59,3% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Эффективность сопряжения дыхания, которая характеризует процент митохондриального дыхания, связанного с выработкой АТФ, снижена на 48% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Для P2 первичной смешанной культуры гиппокампа мышей линии $Hprt^{del8Val}$ характерно снижение продукции АТФ на 65,3% ($p < 0,05$), запасной дыхательной емкости – на 24,6% ($p < 0,05$), максимального дыхания – на 47% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 2).

Таблица 1. Параметры митохондриального дыхания первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа (E18) мышей линии *Hprt1^{del8Val}* ($M \pm SD$)

Table 1. Parameters of mitochondrial respiration in primary mixed hippocampal neuronal culture (E18) of *Hprt1^{del8Val}* mice ($M \pm SD$)

Параметры	WT	Номо/ Неми	<i>p</i>
Немитохондриальное дыхание, пмоль/мин $O_2 \times 10^4$ клетки	82,4 ± 13,7	36,8 ± 11,9*	0,38
Базальное дыхание, пмоль/мин $O_2 \times 10^4$ клетки	262,6 ± 26,8	200,5 ± 28,2*	0,02
Максимальное дыхание, пмоль/мин $O_2 \times 10^4$ клетки	437,8 ± 36,9	418,3 ± 13,2*	0,01
Потеря протонов, пмоль/мин $\times 10^4$ клетки	53,6 ± 7,2	35,3 ± 1,5*	0,01
Продукция АТФ, пмоль/мин $\times 10^4$ клетки	335,1 ± 36,1	165,2 ± 38,8*	0,04
Запасная дыхательная емкость, пмоль/мин $\times 10^4$ клетки	520,3 ± 46,6	211,9 ± 33,8*	0,02
Эффективность дыхания, %	159,2 ± 10,9	82,4 ± 11,6*	0,23

Данные представлены в виде значение медианы (M) и дисперсии выборки (SD). * – достоверные значения между контролем и опытом при $p < 0,05$ по F-критерию (p).

The data are presented as the median value (M) and standard deviation (SD). * indicates significant differences between the control and experimental groups at $p < 0.05$ using the F-test (p).

Таблица 2. Параметры митохондриального дыхания первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа (P2) мышей линии *Hprt1^{del8Val}* ($M \pm SD$)

Table 2. Parameters of mitochondrial respiration in primary mixed hippocampal neuronal culture (P2) of *Hprt1^{del8Val}* mice ($M \pm SD$)

Параметры	WT	Номо/ Неми	<i>p</i>
Немитохондриальное дыхание, пмоль/мин $O_2 \times 10^4$ клетки	19,7 ± 9,8	62,2 ± 10,1*	0,38
Базальное дыхание, пмоль/мин $O_2 \times 10^4$ клетки	553,1 ± 85,4	213,5 ± 18,9*	0,02
Максимальное дыхание, пмоль/мин $O_2 \times 10^4$ клетки	887,4 ± 31,7	470,7 ± 25,5*	0
Потеря протонов, пмоль/мин $\times 10^4$ клетки	168,6 ± 53,1	57,7 ± 2,75	0
Продукция АТФ, пмоль/мин $\times 10^4$ клетки	419,3 ± 12,1	145,4 ± 35,2*	1
Запасная дыхательная емкость, пмоль/мин $\times 10^4$ клетки	341,2 ± 71,1	257,1 ± 33,7*	1
Эффективность дыхания, %	72,9 ± 13,4	71,6 ± 13,4	6

Данные представлены в виде значение медианы (M) и дисперсии выборки (SD). * – достоверные значения между контролем и опытом при $p < 0,05$ по T-критерию Вилкоксона (p).

The data are presented as the median value (M) and standard deviation (SD). * indicates significant differences between the control and experimental groups at $p < 0.05$ using the Wilcoxon T-test (p).

Установлено увеличение немитохондриального дыхания на 216% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, при этом эффективность АТФ связанного дыхания достоверно не отличалась между исследуемыми группами.

В выполненном исследовании изучен энергетический фенотип и построены метаболические карты, отражающие соотношение в метаболизме культуры окислительного фосфорилирования и гликолиза в физиологических условиях, а также при внесении стрессоров. Согласно полученным картам энергетического фенотипа для E18 культуры гиппокампа мышей линии *Hprt1^{del8Val}*, было характерно дыхание на границе между аэробным и гликолитическим типом (Приложение 1А), в отличие от контроля – для которого зарегистрировано преимущественно аэробное митохондриальное дыхание (Приложение 1В). Введение стрессоров митохондриальной цепи – смеси олигомицина и FCCP – не повлияло на биоэнергетический фенотип, переключения дыхания не установлено. В культуре P2 гиппокампа мышей линии *Hprt1^{del8Val}* так же, как и в контроле, сохранялся достаточно высокий уровень аэробного дыхания (Приложение 2А) даже после внесения стрессоров в среду (Приложение 2В), переключения внутриклеточного метаболизма не установлено.

На основании данных митохондриальной биоэнергетики в работе был рассчитан и проанализирован биоэнергетический индекс клеточного здоровья (ВНИ), который представлен на рис. 2.

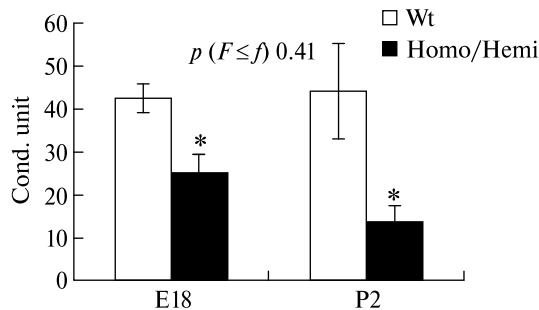


Рис. 2. Биоэнергетический индекс здоровья первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа мышей линии *Hprt1^{del8Val}*. E18 – эмбриональная первичная смешанная культура нейронов гиппокампа, P2 – постнатальная первичная смешанная культура нейронов гиппокампа, Wt – контроль, Homo/Hemi – линия мышей с дефицитом ГГФТ, cond. unit – условные единицы

Fig. 2. Bioenergetic health index of primary mixed culture of hippocampal neurons of *Hprt1^{del8Val}* mice. E18 – embryonic primary mixed hippocampal neuron culture, P2 – postnatal primary mixed hippocampal neuron culture, Wt – control, Homo/Hemi – mice with HGPRT deficiency, cond. units – arbitrary units

Биоэнергетический индекс нейронов культуры E18 мышей линии *Hprt1^{del8Val}* снижен на 41% ($p < 0,05$), культуры P2 – на 69% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При сравнении биоэнергетического индекса клеточного здоровья между E18- и P2-культурами установлено, что в E18-культуре этот индекс достоверно увеличен на 46% ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пурины, особенно АТФ и ГТФ, служат первичными переносчиками энергии в клетках, обеспечивая различные биохимические реакции и процессы. Доказана колокализация пуриносом с митохондриями и микротрубочками [30]. Известно, что ферменты биосинтеза пуринов, такие как фосфорибозилформилглицин амидин синтаза (ФФАС), фосфорибозил-аминоимидазол-сукцинокарбоксамид синтаза (ФАСС) и фермент, катализирующий последние 2 этапа биосинтеза пуринов, 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид формил-трансфераза/ИМФ циклогидролаза (АТИЦ), не только распределены по всей клетке, но и скапливаются вблизи митохондрий [31]. АТИЦ, в частности, был обнаружен внутри самих митохондрий, что предполагает прямую связь между метаболизмом пуринов и функцией митохондрий в нейронах [32]. Мутации в ферментах пути биосинтеза пуринов у людей приводят к спектру глубоких неврологических отклонений. Например, мутация в аденилосукцинатлиазе (АСЛ), ферменте, который катализирует восьмой этап в пути биосинтеза пуринов, вызывает аутизм и психомоторную задержку [33]. Мутация в АТИЦ, ферменте, который катализирует девятый и десятый этапы биосинтеза пуринов, вызывает тяжелую умственную отсталость, эпилепсию и слепоту [31]. Это указывает на важность пути биосинтеза пуринов и его отдельных ферментов для нормального функционирования мозга и нейронов.

В выполненном исследовании на модели мышечной линии *Hprt*^{del8Val} нами установлено снижение продукции АТФ как в эмбриональной, так и в постнатальной нейроглиальной культурах гиппокампа. При этом мы установили более выраженное снижение продукции АТФ в постнатальной культуре, что может быть связано с переходом метаболизма пуринов на резервный путь и увеличения активности ГГФТ [2]. Вместе с тем в эмбриональной культуре снижение уровня АТФ на фоне мутации *HPRT1* может вызвать закладку нейронов аномальных по морфологии, с укороченными отростками [8]. На популяции дофаминергических нейронов установлен ряд биохимических и молекулярных aberrаций при дефиците *HPRT1*, которые указывают на множественные дефекты в экспрессии генов и клеточной сигнализации, включающие экспрессию факторов транскрипции, различные сигнальные пути и экспрессию miRNA, которые могут способствовать функциональной дисрегуляции нейронных путей развития, особенно тех, которые определяют нейрогенез и дофаминергическую сигнализацию [9].

Мутация в гене *HPRT1* снижает запасную дыхательную емкость митохондрий, как в эмбриональной, так и постнатальной нейроглиальной культурах гиппокампа, при этом наиболее выражено в эмбриональной культуре. Дыхательная емкость митохондрий указывает на способность клеток выживать в условиях повышенного энергетического запроса и обеспечивать их жизнеспособность. Сниженная жизнеспособность эмбриональной нейроглиальной культуры в условиях мутации гена *HPRT1* может быть связана с метаболическим профилем, а именно превалированием метаболического сдвига в сторону использования липидов в качестве альтернативного источника энергии, дополняющего анаэробный метаболизм глюкозы [34]. Сообщается, что этот высокоуровневый аэробный гликолиз на стадии развития нейронов поддерживает максимальный биосинтез липидов для роста нейритов [35]. В своих исследованиях мы не установили явно выраженного гликолитического фенотипа E18 нейроглиальной культуры, однако метаболический фенотип все же отличался и был на границе между аэробным дыханием и гликолизом (см. Приложение 1), в то время как P2 был установлен явно выраженный аэробный тип дыхания (см. Приложение 2).

Выявленные различия между нейроглиальными культурами E18 и P2 гиппокампа мышей с мутацией гена *Hprt*^{del8Val} в митохондриальной биоэнергетике мы связываем с каскадом молекулярных и клеточных изменений, запускаемых при рождении. С использованием флюоресцентных зондов доказано, что в 84% нейронов гиппокампа, культивируемых от эмбрионов крыс E17–E18, митохондриальная АТФ-синтаза не производит АТФ, а потребляет его для поддержания мембранного потенциала митохондрий, в то же время для митохондрий, культивируемых от новорожденных крысят, установлена интенсивная продукция АТФ [36]. С учетом этого митохондрии в культурах гиппокампа, полученных от новорожденных мышей с мутацией гена *Hprt*^{del8Val}, при нарушении резервного пути синтеза пуринов, быстрее истощают свои энергетические запасы и сильнее снижают продукцию АТФ по сравнению с эмбриональной культурой. В качестве основных причин, указывающих на неспособность эмбриональных нейронов производить АТФ с помощью митохондриального окислительного фосфорилирования, исследователи отмечают дисфункциональную работу АТФ-синтазы. При низком мембранном потенциале митохондриальной мембраны происходит ингибирование процесса превращения АТФ-синтазы в АТФазу с участием регуляторного пептида IF1 (фактор ингибирования АТФазы 1) [37], тем самым предотвращается преждевременное истощение АТФ [38, 39]. Доказано, что IF-1 регулирует олигомерное состояние АТФазы, облегчая димеризацию фермента через молекулярную связь между доменами [40]. Также исследователи не исключают отсутствие синтеза АТФ в эмбриональных нейронах по причине низкого мембранного потенциала митохондриальной мембраны и повышенной протонной проводимости. В работе Cortassa с соавт. на кардиомиоцитах установлено, что синтез АТФ полностью ингибируется, если мембранный потенциал митохондриальной мембраны становится меньше – 100 мВ [35].

Нами установлено снижение запасной дыхательной емкости митохондрий при мутации гена *HPRT1*, что может быть связано с сокращением митохондриальной массы в нейроглиальной культуре или доступности субстрата [41]. В эмбриональной нейроглиальной культуре гиппокампа, полученной от мышей линии *Hprt*^{del8Val}, установлено более выраженное (примерно в 2 раза) снижение запасной дыхательной емкости по сравнению с постнатальной культурой. Не исключено, что мутация *Hprt*^{del8Val} может повлиять на этапе закладки нейронов и глии гиппокампа на общую митохондриальную массу. Из данных литературы известно, что в эмбриональных нейронах гиппокампа, во время роста нейронов митохондрии остаются в теле клетки, причем большинство митохондрий располагаются у основания только одного из коротких нейритов [42]. Нейрит с митохондриями у его основания затем начинает быстро расти и дифференцируется в аксон, в то время как другие, более медленно растущие нейриты, становятся дендритами. Механизмы инициации и управления ростом аксона с участием митохондрий связаны с регуляцией ими локальной концентрации цитоплазматического Ca^{2+} до уровней, оптимальных для полимеризации микротрубочек [43]. Если нарушается функциональная активность митохондрий, то дальнейшая дифференцировка аксонов прекращается. Полагают, что биогенез митохондрий и движение их в аксон особенно важны, так как аксон требует больше энергии для поддержки своего быстрого роста по сравнению с дендритами. По мере формирования синапсов количество митохондрий увеличивается, и они распределяются по длине дендритов и аксона в пресинаптических окончаниях и у основания дендритных шипиков, обеспечивая синаптическую пластичность [44]. В глиальных клетках митохондрии присутствуют на всех этапах нейрогенеза, начиная от закладки до постнатального функционирования, формирование митохондриальной сети процесс динамический и регулируется балансом между

делением и слиянием митохондрий, их движением вдоль цитоскелета и позиционированием возле эндоплазматического ретикулума [45].

Существенным аспектом, на который мы обратили внимание при анализе биоэнергетической функции, является выраженное усиление немитохондриального дыхания в постнатальной нейроглиальной культуре гиппокампа у мышей с мутацией гена *Hprt1*^{del8Val}. Увеличение немитохондриального дыхания в постнатальной культуре можно связать с накоплением НАДН и снижением мембранного потенциала митохондрий. В нашей предыдущей работе на культуре 2-дневных мышат показано, что дефицит НРРТ ингибирует комплекс I, что приводит к накоплению НАДН и снижению митохондриального дыхания [12]. В качестве причин мы можем предполагать развитие процессов в цитоплазме клетки, связанных с воспалением. Известно, что дисфункциональные митохондрии могут высвобождать в цитоплазму молекулярные паттерны (DAMP – Damage-Associated Molecular Patterns), такие как мтДНК, АТФ, митохондриальный фактор транскрипции, цитохром с и кардиолипин. DAMP активируют рецепторы клеточной поверхности и внутриклеточные рецепторы, инициируя тем самым иммунный ответ [46]. Появление во внутриклеточной среде DAMP может запускать воспалительный ответ с участием интерлейкинов и интерферона I типа [47], рецептора RAGE [48], инфламмосомы [49] и циклической ГМФ-АМФ-синтазы [50]. Важно понимать, что митохондриальная биоэнергетическая неэффективность может лежать в основе симптомов депрессии и расстройств поведения. Исследователи отмечают, что повреждение митохондрий особенно пагубно для дофаминергических нейронов, так как они находятся под постоянным окислительным стрессом и высоким биоэнергетическим запросом [51]. В связи с этим нарушение функции митохондрий и снижение выработки АТФ приводят к снижению активности дофаминергической системы, симптомам мотивационного дефицита, апатии и замедлению движений [52].

В эмбриональной культуре в отличие от постнатальной наблюдали снижение немитохондриального дыхания. Основными причинами снижения немитохондриального дыхания исследователи считают снижение потребления глюкозы, накопление активных форм кислорода, изменение регуляции метаболизма липидов [53]. Дефицит НРРТ может привести к снижению доступности глюкозы вследствие нарушения энергетического обмена, при котором происходит перевод глюкозы из гликолиза в пентозофосфатный путь синтеза пуринов, что приводит к уменьшению потребления клеткой глюкозы для получения энергии [10]. Установлено нарушение регуляции липидного обмена при дефиците НРРТ. Изменения метаболизма НАД в печени НРРТ-дефицитных мышей повышают концентрацию НАД и активность ферментов в печени, это опосредованно может влиять на метаболизм липидов [54]. Липидный обмен в эмбриональной культуре гиппокампа имеет ключевое значение в митохондриальном дыхании. Для получения энергии нейроны наряду с глюкозой используют жирные кислоты – стеариновую, пальмитиновую, миристиновую, которые высвобождаются ферментами из липидных депо [55].

Влияние мутации *Hprt1*^{del8Val} в эмбриональном мозге на биоэнергетику клетки в виде снижения митохондриальной дыхательной способности, продукции АТФ, потери протонов, максимального и базального дыхания отражается в дальнейшем после рождения на всех параметрах митохондриального дыхания. В результате биоэнергетический индекс нейроглиальной культуры, характеризующий клеточное здоровье в условиях мутации *Hprt1*^{del8Val}-гена, существенно снижен по сравнению с контролем. При этом в постнатальной культуре более выраженное негативное воздействие данной

мутации, вероятно, связано с повышенным запросом зрелых нейронов на продукцию АТФ. Использованный нами индекс биоэнергетического здоровья нейроглиальной культуры в качестве маркера, характеризующего митохондриальную дисфункцию, оказался достаточно надежным и показал достоверную разницу между эмбриональной и постнатальной культурами у мышей с мутацией гена *Hprt*^{del8Val}.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение метаболизма пуринов вследствие мутации в гене *Hprt*^{del8Val} изменяет митохондриальную энергетику первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа в эмбриональном и постнатальном периоде. Согласно нашим данным, в эмбриональном периоде мутация в гене *Hprt*^{del8Val} отражается на снижении митохондриального дыхательного резерва клеток, что ведет за собой снижение продукции АТФ. В итоге это изменяет биоэнергетическую функцию нейроглиальной культуры гиппокампа в постнатальном периоде. Вследствие дефектной функции митохондрий продукция АТФ в постнатальной нейроглиальной культуре гиппокампа существенно снижена на фоне усиления немитохондриального дыхания и сниженного митохондриального дыхательного резерва. Выявленные нарушения митохондриальной функции тесно связаны со снижением биоэнергетического индекса клеточного здоровья, являющегося маркером функционального состояния клеток. Все эти дисфункции в биоэнергетике нейроглиальной культуры гиппокампа, начинающиеся в эмбриональном периоде и усугубляющиеся после рождения, могут лежать в основе тяжелых неврологических нарушений, известных для болезни Лёша–Нихена. Таким образом, понимание молекулярной природы нарушения митохондриальной биоэнергетики, связанной с биосинтезом пуринов в мозге, расширяет наши представления о молекулярных основах тяжелых неврологических фенотипов и расширяет пути поиска терапевтических подходов с учетом выявленных особенностей нарушенного метаболизма. Используемые мыши с персонализированной мутацией пациента в гене *Hprt*^{del8Val} являются уникальной моделью с измененным энергетическим гомеостазом. При этом животные демонстрировали изменения в поведении, характерные для данного типа заболевания, что делает их надежной моделью для поиска терапевтических мишеней, направленных на коррекцию метаболических нарушений при синдроме Лёша–Нихена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Mizukoshi T., Yamada S., Sakakibara S.I. Spatiotemporal regulation of de novo and salvage purine synthesis during brain development. *eNeuro*. 2023;**10**. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0159-23.2023>
2. Mileti L.N., Baleja J.D. The role of purine metabolism and uric acid in postnatal neurologic development. *Molecules*. 2025;**30**:839. <https://doi.org/10.3390/molecules30040839>
3. Fu R., Sutcliffe D., Zhao H. et al. Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways. *Mol. Genet. Metab.* 2015;**114**:55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.11.001>
4. Dammer E.B., Göttle M., Duong D.M. et al. Consequences of impaired purine recycling on the proteome in a cellular model of Lesch-Nyhan disease. *Mol. Genet. Metab.* 2015;**114**:570–579. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.02.007>

5. Chang D.T.W., Reynolds I.J. Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience*. 2006;**141**:727–736. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.01.034>
6. Vayssière J.L., Cordeau-Lossouarn L., Larcher J.C. et al. Participation of the mitochondrial genome in the differentiation of neuroblastoma cells. *Vitr. Cell Dev. Biol.* 1992;**28A**:763–772. <https://doi.org/10.1007/BF02631065>
7. Ceballos-Picot I., Mockel L., Potier M.C. et al. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 2009;**18**:2317–2327. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp164>
8. Guibinga G.H., Hsu S., Friedmann T. Deficiency of the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) dysregulates neurogenesis. *Mol. Ther.* 2010;**18**:54–62. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.178>
9. Kang T.H., Park Y., Bader J.S. et al. The housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) regulates multiple developmental and metabolic pathways of murine embryonic stem cell neuronal differentiation. *PLoS ONE*. 2013;**8**:e74967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074967>
10. Bell S., McCarty V., Peng H. et al. Lesch-Nyhan disease causes impaired energy metabolism and reduced developmental potential in midbrain dopaminergic cells. *Stem Cell Rep.* 2021;**16**:1749–1762. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.06.003>
11. Lewers J.C., Ceballos-Picot I., Shirley T.L. et al. Consequences of impaired purine recycling in dopaminergic neurons. *Neuroscience*. 2008;**152**:761–772. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.065>
12. Vinokurov A.Y., Soldatov V.O., Seregina E.S. et al. HPRT1 deficiency induces alteration of mitochondrial energy metabolism in the brain. *Mol. Neurobiol.* 2023;**60**:3147–3157. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03266-2>
13. Meek S., Thomson A.J., Sutherland L. et al. Reduced levels of dopamine and altered metabolism in brains of HPRT knock-out rats: a new rodent model of Lesch-Nyhan disease. *Sci. Rep.* 2016;**6**:25592. <https://doi.org/10.1038/srep25592>
14. Escudero-Ferruz P., Ontiveros N., Cano-Estrada C. et al. A new physiological medium uncovers biochemical and cellular alterations in Lesch-Nyhan disease fibroblasts. *Mol. Med.* 2024;**30**:3. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00774-8>
15. Bethus I., Tse D., Morris R.G. Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *J. Neurosci.* 2010;**30**:1610–1618. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2721-09.2010>
16. McNamara C.G., Dupret D. Two sources of dopamine for the hippocampus. *Trends Neurosci.* 2017;**40**:383–384. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.05.005>
17. Kalmykov V.A., Kusov P.A., Yablonskaia M.I. et al. New personalized genetic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome for pharmacology and gene therapy. *Res. Pharmacol.* 2018;**4**:115–122. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.4.32209>
18. Simmonds H.A., Sahota A.S., Van Acker K.J. Adenine phosphoribosyltransferase and 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 1995:1707–1724.
19. Engle S.J., Womer D.E., Davies P.M. et al. HPRT-APRT-deficient mice are not a model for Lesch-Nyhan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1996;**5**:1607–1610. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.10.1607>

20. Tomassoni-Ardori F., Hong Z., Fulgenzi G. et al. Generation of functional mouse hippocampal neurons. *Bio Protoc.* 2020;**10**:e3702. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3702>
21. Kaar A., Morley S.J., Rae M.G. An efficient and cost-effective method of generating postnatal (P2–5) mouse primary hippocampal neuronal cultures. *J. Neurosci. Methods.* 2017;**286**:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.020>
22. Zhuo M., Gorgun M.F., Englander E.W. Neurotoxicity of cytarabine (Ara-C) in dorsal root ganglion neurons originates from impediment of mtDNA synthesis and compromise of mitochondrial function. *Free Radic. Biol. Med.* 2018;**121**:9–19. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.570>
23. Zelentsova A.S., Borisova A.Y., Shmigerova V.S. et al. Mitochondrial respiration of a primary mixed culture of neurons from hippocampus at various stages of differentiation. *Genes Cells.* 2024;**19**:201–210. <https://doi.org/10.17816/gc529662>
24. Chacko B.K., Kramer P.A., Ravi S. et al. The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clin. Sci. (Lond.).* 2014;**127**:367–373. <https://doi.org/10.1042/CS20140101>
25. Koklesova L., Mazurakova A., Samec M. et al. Mitochondrial health quality control: measurements and interpretation in the framework of predictive, preventive, and personalized medicine. *EPMA J.* 2022;**13**:177–193. <https://doi.org/10.1007/s13167-022-00281-6>
26. Dranka B.P., Benavides G.A., Diers A.R. et al. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic. Biol. Med.* 2011;**51**:1621–1635. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.005>
27. Zelentsova A.S., Skorkina M.Y., Deykin A.V. The P2X3 receptor blocker AF-353 (Ro-4) reduces bioenergetic index of a primary mixed culture of hippocampal neurons. *Biomed. Khim.* 2025;**71**:137–145. <https://doi.org/10.18097/PBMCR1531>
28. Wang L., Chaudhari K., Winters A. et al. Characterizing region-specific glucose metabolic profile of the rodent brain using Seahorse XFe96 analyzer. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2022;**42**(7):1259–1271. <https://doi.org/10.1177/0271678X221077341>
29. Li M., Amend S.R., Pienta K.J. Methods and guidelines for metabolism studies: applications to cancer research. *Int. J. Mol. Sci.* 2025;**26**:8466. <https://doi.org/10.3390/ijms26178466>
30. Chan C.Y., Pedley A.M., Kim D. et al. Microtubule-directed transport of purine metabolons drives their cytosolic transit to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018;**115**:13009–13014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814042115>
31. Williamson J., Petralia R.S., Wang Y.X. et al. Purine biosynthesis enzymes in hippocampal neurons. *Neuromol. Med.* 2017;**19**:518–524. <https://doi.org/10.1007/s12017-017-8466-6>
32. Jaeken J., Van den Berghe G. An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet.* 1984;**2**:1058–1061.
33. Marie S., Heron B., Bitoun P. et al. AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of *ATIC*. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;**74**:1276–1281. <https://doi.org/10.1086/421475>
34. Segarra-Mondejar M., Casellas-Diaz S., Ramiro-Pareta M. et al. Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane lipid provision and neurite outgrowth. *EMBO J.* 2018;**37**:e97368. <https://doi.org/10.15252/embj.201797368>

35. Cortassa S., Aon M.A., Marbán E. et al. An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophys. J.* 2003;**84**:2734–2755. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75079-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75079-6)
36. Surin A.M., Khiroug S., Gorbacheva L.R. et al. Comparative analysis of cytosolic and mitochondrial ATP synthesis in embryonic and postnatal hippocampal neuronal cultures. *Front. Mol. Neurosci.* 2013;**5**:102. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00102>
37. Faccenda D., Campanella M. Molecular regulation of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase: physiological and pathological significance of the inhibitory factor 1 (IF₁). *Int. J. Cell Biol.* 2012:367934. <https://doi.org/10.1155/2012/367934>
38. Campanella M., Parker N., Tan C.H. et al. IF₁: setting the pace of the F₁F₀-ATP synthase. *Trends Biochem. Sci.* 2009;**34**:343–350. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.03.006>
39. Garcia J.J., Morales-Ríos E., Cortes-Hernández P. et al. The inhibitor protein (IF₁) promotes dimerization of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. *Biochemistry.* 2006;**45**:12695–12703. <https://doi.org/10.1021/bi060339j>
40. Son G., Hun J. Roles of mitochondria in neuronal development. *BMB Rep.* 2018;**51**:549–556. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.11.226>
41. Hill B.G., Benavides G.A., Lancaster J.R. Jr. et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol. Chem.* 2012;**393**:1485–1512. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0198>
42. Raefsky S.M., Mattson M.P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: roles in neuroplasticity and disease resistance. *Free Radic. Biol. Med.* 2017;**102**:203–216. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.045>
43. Mattson M.P., Partin J. Evidence for mitochondrial control of neuronal polarity. *J. Neurosci. Res.* 1999;**56**:8–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990401\)56:1<8::AID-JN-R2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990401)56:1<8::AID-JN-R2>3.0.CO;2-G)
44. Cheng A., Wan R., Yang J.L. et al. Involvement of PGC-1 α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nat. Commun.* 2012;**3**:1250. <https://doi.org/10.1038/ncomms2238>
45. Jackson J.G., Robinson M.B. Regulation of mitochondrial dynamics in astrocytes: mechanisms, consequences, and unknowns. *Glia.* 2018;**66**:1213–1234. <https://doi.org/10.1002/glia.23252>
46. Grazioli S., Pugin J. Mitochondrial damage-associated molecular patterns: from inflammatory signalling to human diseases. *Front. Immunol.* 2018;**9**:832. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00832>
47. Lehnardt S., Schott E., Trimbuch T. et al. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J. Neurosci.* 2008;**28**:2320–2331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4760-07.2008>
48. Franklin T.C., Wohleb E.S., Zhang Y. et al. Persistent increase in microglial RAGE contributes to chronic stress-induced priming of depressive-like behavior. *Biol. Psychiatry.* 2018;**83**:50–60. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.06.034>
49. A Fleshner M., Frank M., Maier S. Danger signals and inflammasomes: stress-evoked sterile inflammation in mood disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2017;**42**:36–45. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.125>

50. Sliter D.A., Martinez J., Hao L. et al. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature*. 2018;**561**:258–262.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0448-9>
51. Casaril A.M., Dantzer R., Bas-Orth C. Neuronal mitochondrial dysfunction and bioenergetic failure in inflammation-associated depression. *Front. Neurosci.* 2021;**15**:725547. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.725547>
52. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008;**9**:46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
53. Bhatti J.S., Bhatti G.K., Reddy P.H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders – a step towards mitochondria-based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2017;**1863**:1066–1077.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>
54. Micheli V., Jacomelli G., Di Marcello F. et al. NAD metabolism in HPRT-deficient mice. *Metab. Brain Dis.* 2009;**24**:311–319.
<https://doi.org/10.1007/s11011-009-9134-9>
55. Saber S.H., Yak N., Yong X.L.H. et al. DDHD2 provides a flux of saturated fatty acids for neuronal energy and function. *Nat. Metab.* 2025;**7**:2117–2141.
<https://doi.org/10.1038/s42255-025-01367-x>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Скоркина Марина Юрьевна – д-р биол. наук; доц.; ст. науч. сотр., лаборатория геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии объединенного центра генетических технологий, НИУ «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Российская Федерация
E-mail: marinaskorkina0077@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9441-5295>

Зеленцова Александра Сергеевна – мл. науч. сотр., лаборатория геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии объединенного центра геномных технологий, НИУ «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Российская Федерация
E-mail: static.zel@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-6022-0206>

Сушкова Дарья Николаевна – мл. науч. сотр., лаборатория геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии объединенного центра геномных технологий, НИУ «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Российская Федерация
E-mail: dsuskova263@gmail.com

Альхафи Гадир Раджаб Фриал – магистрант, Институт биологии, химии и фармации, НИУ «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Российская Федерация
E-mail: ghadeeralhafi87@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0006-8283-4595>

Дейкин Алексей Васильевич – канд. биол. наук; доц.; дир. объединенного центра генетических технологий; руководитель лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии, НИУ «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Российская Федерация
E-mail: alexei@deikin.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9960-0863>

Поступила в редакцию 31.07.2025
После доработки 03.11.2025
Принята к публикации 26.11.2025

ABOUT THE AUTHORS

Skorkina, Marina Yu. – Ph.D. (Medicine); Associate Professor; Senior Research Officer; Laboratory of Genomic Editing for Biomedicine and Veterinary Medicine of the Joint Center for Genetic Technologies, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation
E-mail: marinaskorkina0077@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9441-5295>

Zelentsova, Alexandra S. – Research Assistant, Laboratory of Genomic Editing for Biomedicine and Veterinary Medicine of the Joint Center for Genomic Technologies, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation
E-mail: static.zel@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-6022-0206>

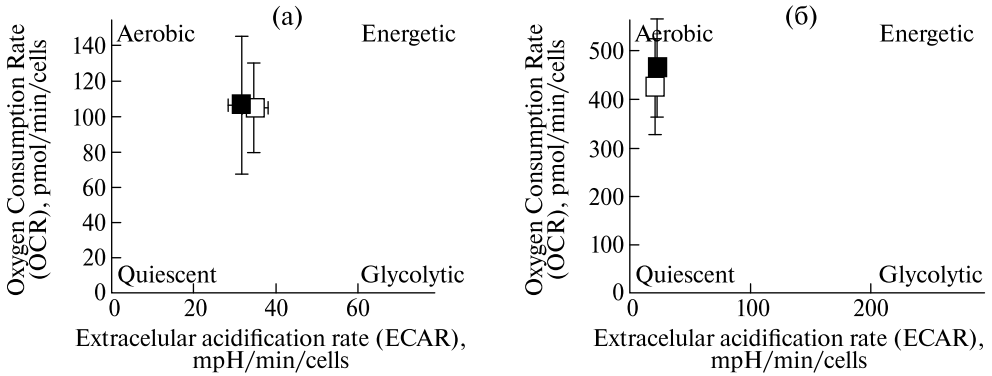
Sushkova, Darya N. – Research Assistant, Laboratory of Genomic Editing for Biomedicine and Veterinary Medicine of the Joint Center for Genomic Technologies, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation
E-mail: dsuskova263@gmail.com

Alhafi, Gadir R.F. – Master's Degree student, Institute of Biology, Chemistry and Pharmacy, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation
E-mail: ghadeeralhafi87@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0006-8283-4595>

Deikin, Aleksey V. – Cand. Sc. (Biology); Associate Professor; Director of the Joint Center of Genetic Technologies; Head of the Laboratory of Genetic Technologies and Gene Editing for Biomedicine and Veterinary Medicine, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation
E-mail: alexei@deikin.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9960-0863>

Received July 31, 2025
Revised November 03, 2025
Accepted November 26, 2025

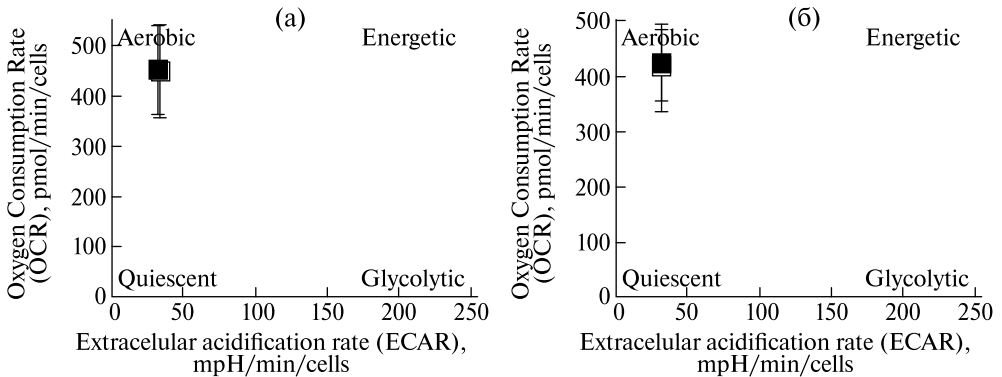
Приложение 1



Карты энергетических фенотипов культуры E18: (а) – мыши линии *Hprt1^{del8Val}*, (б) – мыши линии C57BL/6. Белый маркер – отношение OCR/ECAR в физиологическом состоянии. Черный маркер – отношение OCR/ECAR при добавлении смешанных стрессоров олигомицина и FCCP

Energy phenotype maps of the E18 culture: (a) – *Hprt1^{del8Val}* mice, (б) – C57BL/6 mice. Unshaded marker – OCR/ECAR ratio in the physiological state. Shaded marker – OCR/ECAR ratio upon addition of mixed stressors oligomycin and FCCP

Приложение 2



Карты энергетических фенотипов культуры P2: (а) – мыши линии *Hprt1^{del8Val}*, (б) – мыши линии C57BL/6. Черный маркер – отношение OCR/ECAR в физиологическом состоянии. Белый маркер – отношение OCR/ECAR при добавлении смешанных стрессоров олигомицина и FCCP

Energy phenotype maps of the P2 culture: (a) – *Hprt1^{del8Val}* mice, (б) – C57BL/6 mice. Unshaded marker – OCR/ECAR ratio in the physiological state. Shaded marker – OCR/ECAR ratio upon addition of mixed stressors oligomycin and FCCP