

МРНТИ 34.39.15; 34.39.17

<https://doi.org/10.32523/2616-7034-2026-156-3-86-99>

Научная статья

Электрофизиологический анализ пуринергической сигнализации микроглии как подход к изучению иммунных механизмов болезни Альцгеймера

Г.Т. Тәсібекова¹ , Н. Новосолова² , М.К. Жолдасова³ ,
А.М. Кустубаева⁴ , Р.А. Гиниатуллин^{5*} 

¹ Department of Oncology, NJSC Astana Medical University, Astana, Kazakhstan

¹ Multidisciplinary Medical Center, Astana, Kazakhstan

^{2,3} Center for Life Sciences, National Laboratory Astana, Astana, Kazakhstan

(E-mail: mauletbayev.m@amu.kz, assiya.maikenova@nu.edu.kz, byermekbayeva@nu.edu.kz)

Аннотация. Нейровоспаление, опосредованное хронической активацией микроглии, рассматривается как один из ведущих факторов патогенеза болезни Альцгеймера (БА). Ключевую роль в модуляции функционального состояния микроглии играет пуринергическая сигнализация, в частности рецепторы *P2X4* и *P2X7*, активируемые внеклеточным АТФ. Понимание ионных механизмов, запускаемых этими рецепторами, необходимо для поиска новых терапевтических мишеней, однако исследование их функциональной активности требует применения высокоточных электрофизиологических методов. В работе проведено изучение АТФ-индуцированных ионных механизмов в клетках микроглии линии BV-2 с целью углубления понимания роли пуринергической сигнализации микроглии в нейровоспалении и нейродегенеративных заболеваниях, включая БА. Исследование выполнено на иммортализованной линии микроглии мыши BV-2 и клеточной линии HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 использовалась для оптимизации параметров регистрации). Электрофизиологические измерения проводились в конфигурации «целая клетка» (whole-cell) при удерживающем потенциале –60 мВ. Активация пуринорецепторов осуществлялась путем локальной аппликации АТФ (1 мМ). В ходе исследования отработаны условия формирования стабильного гигаомного контакта и перехода в конфигурацию whole-cell для клеток с амёбоидной морфологией. Установлено, что аппликация АТФ вызывает во всех исследованных клетках линии BV-2 (n=10) выраженные входящие токи со средней амплитудой 188 ± 33 пА. Зарегистрированные ответы характеризовались медленной кинетикой развития и отсутствием

Поступила: 11.03.2026. Одобрена: 10.09.2026. Доступна онлайн: 30.09.2026

*Автор-корреспондент

быстрой десенситизации на протяжении всего периода воздействия агониста. В отличие от первичных культур человека, в клетках BV-2 не выявлено классической двухфазной кинетики, характерной для полномасштабного открытия поры P2X7-рецептора. Это может указывать на превалирование подтипа P2X4 или на особенности регуляции пуринорецепторов в иммортализованных линиях. Полученные результаты подтверждают высокую эффективность метода patch-clamp для оценки функционального состояния микроглии. Выявленные особенности АТФ-индуцированных токов в клетках BV-2 позволяют использовать данную линию как адекватную модель для первичного скрининга модуляторов пуринергической сигнализации.

Ключевые слова: микроглия, пуринергические рецепторы, P2X7, BV-2 клетки, АТФ, patch clamp, ионные токи, нейровоспаление, болезнь Альцгеймера.

Введение

Изучение клеточных и молекулярных механизмов БА во многом опирается на применение электрофизиологических подходов. Электрофизиология представляет собой один из основных инструментов для анализа функционирования и нарушений электрически возбудимых клеток и их сетей. Особое значение среди этих методов имеет техника patch clamp — высокоточная и универсальная методика, позволяющая непосредственно регистрировать мембранный потенциал и ионные токи, проходящие через клеточную мембрану. Hill и соавторы отмечают, что благодаря своей универсальности метод patch clamp может использоваться в различных конфигурациях. Это позволяет применять его для изучения широкого спектра физиологических процессов — от регистрации спонтанной электрической активности клеток в нативных тканях до анализа кинетики активации и инактивации отдельных ионных каналов, экспрессированных в рекомбинантных клеточных линиях [1].

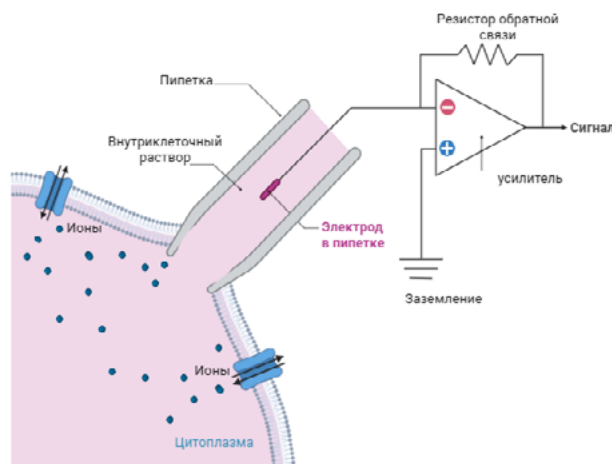
Конфигурация patch clamp «на целой клетке» (whole-cell) считается одной из наиболее точных методик регистрации электрической активности одиночных клеток. Этот подход обеспечивает высокое пространственно-временное разрешение при измерении мембранных токов и потенциалов, превосходя по чувствительности и информативности многие другие электрофизиологические методы. Кроме того, режим whole-cell предоставляет прямой доступ к клеточной мембране и цитозолю, что дает возможность контролировать состав внутриклеточной среды и детально анализировать молекулярные механизмы электрической активности клетки [2].

Непосредственная регистрация мембранного потенциала имеет ключевое значение для исследования нейронов и других электрически возбудимых клеток и, соответственно, занимает центральное место в нейрофизиологии и кардиологии [3].

Метод patch clamp основан на установлении прямого контакта с внутриклеточной средой с помощью стеклянной микропипетки. Формирование высокоомного уплотнения между мембраной клетки и пипеткой существенно снижает влияние внеклеточных потенциалов (рисунок 1), что обеспечивает возможность точной регистрации внутриклеточного мембранного потенциала и ионных токов [4-5].

В настоящее время patch clamp рассматривается как наиболее чувствительный метод внутриклеточной регистрации, обеспечивающий высокое временное разрешение

и оптимальное соотношение сигнал/шум при исследовании электрической активности нейронов и других возбудимых клеток [6].



Created in BioRender.com bio

Рисунок 1. Схематическое изображение метода whole-cell patch-clamp. Принцип регистрации ионных токов через мембранные ионные каналы с использованием стеклянной микропипетки, заполненной внутриклеточным раствором, и усилителя с обратной связью. Изображение создано с помощью BioRender

Нейровоспаление представляет собой широко распространённое патологическое состояние, затрагивающее миллионы людей по всему миру, и рассматривается как один из ведущих факторов риска развития различных неврологических нарушений, включая травматические, ишемические, инфекционные, психиатрические и нейродегенеративные заболевания [7-8].

Ключевую роль в развитии нейровоспаления играет активация микроглии, в том числе запуск инфламасомы NLRP3 (NOD-like receptor protein 3) и последующее высвобождение провоспалительного цитокина IL-1 β . Одним из мощных триггеров этого процесса является внеклеточный АТФ, который индуцирует отток ионов K⁺ — критическое событие, необходимое для активации инфламасомы. В связи с этим K⁺-проницаемые каналы микроглии, включая АТФ-зависимые каналы THIK-1 (Tandem pore-domain Halothane Inhibited K⁺ channel, или ген KCNK13) и рецепторы P2X7, рассматриваются как перспективные терапевтические мишени. Тем не менее их функциональное взаимодействие и значение для патофизиологии человеческого мозга остаются недостаточно изученными [9].

В физиологических условиях микроглия выполняет защитную функцию, распознавая повреждённые клетки и патогены и инициируя воспалительный ответ, направленный на локализацию повреждения и восстановление гомеостаза [10]. Однако при продолжительном или чрезмерном патологическом воздействии микроглия может переходить в состояние хронической активации с преобладанием провоспалительного фенотипа, что способствует прогрессированию заболевания [11-12].

Болезнь Альцгеймера (БА) — это хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, для которого характерно накопление в тканях головного мозга токсичных амилоидных β -бляшек (A β), а также нейрофибриллярных клубков, сформированных гиперфосфорилированным тау-белком.

Микроглия занимает центральное место в патогенезе БА, прежде всего благодаря своей реакции на амилоидные и тау-агрегаты. На ранних этапах заболевания микроглиальные клетки способны эффективно фагоцитировать и удалять амилоидные отложения. Однако при длительной и чрезмерной активации их защитные функции нарушаются, что способствует развитию хронического нейровоспаления, повышению токсичности амилоидных бляшек и формированию самоподдерживающегося патологического каскада, вовлекающего нейроны, астроциты, сосудистые структуры мозга и другие микроглиальные клетки [13].

Одними из ключевых регуляторов активации микроглии являются пуринергические рецепторы *P2X4* и *P2X7* — АТФ-зависимые катионные каналы, вовлечённые в высвобождение провоспалительных цитокинов, активацию инфламмасомы и процессы нейродегенерации. Повышение концентрации внеклеточного АТФ выступает в роли сигнала опасности, инициирующего активацию пуринергических рецепторов [14].

В центральной нервной системе пуринергические рецепторы характеризуются функциональным разнообразием: они участвуют в нейротрансмиссии и нейромодуляции, однако в условиях патологии могут способствовать повреждению нейронов. Их эффект определяется физиологическим или патологическим контекстом, уровнем АТФ, подтипом рецептора и типом клеток, в которых они экспрессируются [15-16].

Позднее исследования, выполненные на двух трансгенных моделях болезни Альцгеймера с экспрессией человеческого APP (мыши APP (amyloid precursor protein)/PS1 и J20), показали, что повышение экспрессии *P2X7R* в активированных микроглиальных клетках коррелирует с прогрессированием заболевания [17-18].

Инфламмасома NLRP3 представляет собой цитозольный мультибелковый комплекс, формирующий платформу для активации каспазы-1, которая обеспечивает созревание и высвобождение провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [19]. Ключевым условием активации NLRP3 является выраженное снижение внутриклеточной концентрации K⁺ — универсальное сигнальное событие, к которому сходятся различные патологические стимулы [20-21]. Среди них внеклеточный АТФ, уровень которого значительно возрастает при поражениях головного мозга, рассматривается как один из наиболее мощных эндогенных сигналов опасности, запускающих активацию микроглии [22-23].

Целью данной работы являлась апробация конфигурации whole-cell метода patch-clamp для регистрации АТФ-индуцированных мембранных токов в микроглиальных клетках, а также проведение пилотного исследования пуринергической сигнализации в микроглии. Дополнительно ставилась задача освоения и оптимизации методики patch-clamp на клеточной линии НЕК293 перед её применением к культурам микроглии.

Материалы и методы

Клеточные линии и условия культивирования

Для апробации и освоения методики patch-clamp использовали клеточную линию НЕК293. После оптимизации параметров регистрации эксперименты проводили на микроглиальных клетках, включая клеточную линию BV-2 и первичные микроглиальные клетки дикого типа. Все клеточные культуры использовались как модельные системы для демонстрации применимости метода whole-cell patch-clamp к регистрации АТФ-индуцированных мембранных ответов. Клетки культивировали в стандартных условиях при температуре 37 °C и 5 % CO₂ в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), дополненной 10 % инактивированной фетальной бычьей сыворотки и антибиотиками (пенициллин/стрептомицин). Среда заменяли каждые 2–3 дня. Для электрофизиологических

экспериментов клетки высевали на покровные стекла за 24–48 ч до регистрации. Перед регистрацией ионных токов клетки пересевали на круглые покровные стекла диаметром 6 мм, размещённые в культуральных чашках.

Подготовка растворов для patch-clamp

Whole-cell patch-clamp записи проводили с использованием усилителя НЕКА и стеклянных электродов сопротивлением 5–8 МОм, заполненных внутриклеточным раствором следующего состава (мМ): 135 К-глюконат, 5 NaCl, 10 HEPES, 2 MgCl₂, 1 EGTA, 2 Mg-АТР, 0,25 Na-GTP и 0,5% биоцитина. pH корректировали до 7,3, осмолярность — до 275–285 мОсм/л.

Внеклеточный раствор готовили на основе воды Milli-Q с общим объёмом 2000 мл. Он содержал следующие компоненты: 152 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 10 мМ глюкозы, 2 мМ CaCl₂ и 1 мМ MgCl₂. pH внеклеточного раствора доводили до 7,4, осмолярность составляла около 300–330 мОсм.

Электрофизиологические исследования (patch-clamp)

Регистрацию ионных токов проводили методом patch-clamp в конфигурации whole-cell при удерживающем потенциале –60 мВ. Эксперименты выполняли с использованием системы Patchmaster (НЕКА Elektronik, Германия), оснащённой усилителем EPC10_USB.

Для регистрации использовали боросиликатные микропипетки с филаментом заводского изготовления предварительной полировкой (World Precision Instruments) со следующими характеристиками: внешний диаметр — 1,5 мм, внутренний диаметр — 0,86 мм, длина — 10 см. Микропипетки вытягивали с использованием пуллера при следующих параметрах: Pressure — 700, Heat — 22, Velocity — 60, Time — 250. Сопротивление заполненных пипеток составляло 5–6 МΩ.

Протокол стимуляции АТФ

Для активации пуриnergических рецепторов использовали аденозинтрифосфат (adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate, TCI Chemicals, Япония; CAS RN: 34369-07-8). Стоковый раствор АТФ концентрацией 1 мМ готовили на основе воды Milli-Q и хранили при –80 °С. Перед экспериментами АТФ разводили во внеклеточном растворе до конечных концентраций 100 мкМ и 1 мМ. Экспериментальный протокол включал:

- 20 с базовой регистрации (baseline);
- 10 с аппликации АТФ;
- 20 с промывки внеклеточным раствором.

Регистрация мембранных токов осуществлялась непрерывно на протяжении всего протокола.

Регистрация и анализ данных

Сбор и анализ электрофизиологических данных осуществляли с использованием программного обеспечения Patchmaster (НЕКА Elektronik). Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего (SEM). Статистическую значимость различий оценивали с использованием стандартных методов; различия считали значимыми при $p < 0,05$. Экспериментальные исследования проводились на базе Института молекулярных наук имени А. И. Виртанена Университета Восточной Финляндии (г. Куопио, Финляндия).

Результаты

Оптимизация методики patch-clamp и визуализация регистрации

На первом этапе исследования метод patch-clamp в конфигурации whole-cell был оптимизирован с использованием клеточной линии НЕК293Т. После этого на микроглиальной клеточной линии BV-2 были отработаны условия формирования гигаомного уплотнения и

перехода в конфигурацию whole-cell, обеспечивавшие стабильность базового мембранного тока и отсутствие выраженных артефактов при механическом контакте микропипетки с клеткой (рисунок 2).

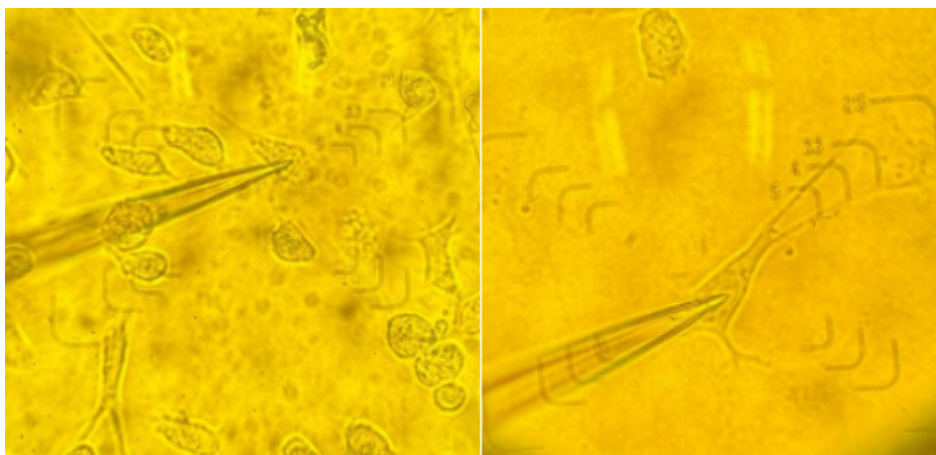


Рисунок 2. Оптимизация patch-clamp регистрации в конфигурации whole-cell на клетках линии BV-2: (а) подведение стеклянной микропипетки к мембране клетки; (б) формирование гигаомного уплотнения (gigaohm seal). Стрелками обозначены микропипетка, мембрана клетки и область контакта.

После оптимизации методики регистрация была перенесена на микроглиальные клетки линии BV-2, являющиеся основным объектом исследования. В связи с меньшими размерами клеток и морфологической вариабельностью требовалась дополнительная настройка условий записи. Тем не менее, при оптимальных параметрах удавалось получать стабильные whole-cell записи, сохранявшиеся на протяжении всего экспериментального протокола, включая базовую регистрацию, аппликацию АТФ и последующую промывку.

Морфология микроглиальных клеток линии BV-2

В культуре микроглиальные клетки линии BV-2 характеризовались выраженной морфологической неоднородностью. Преобладающая часть клеток имела округлую или овально-амёбодную форму с чётко очерченными контурами плазматической мембраны. Клеточные отростки были слабо выражены либо отсутствовали. Диаметр клеточного тела варьировал в пределах, характерных для данной линии *in vitro*.

Клетки формировали адгезивный монослой, при этом в ряде случаев наблюдалось образование небольших скоплений клеток. Цитоплазма отличалась умеренной оптической плотностью, ядра, как правило, располагались эксцентрично (рисунок 3).

Выявленный амёбодный морфологический фенотип соответствует активированному состоянию микроглиальных клеток в условиях культуры и является типичным для линии BV-2. Данная морфология обеспечивала благоприятные условия для проведения patch-clamp экспериментов, включая формирование стабильного гигаомного контакта между мембраной клетки и стеклянной микропипеткой.

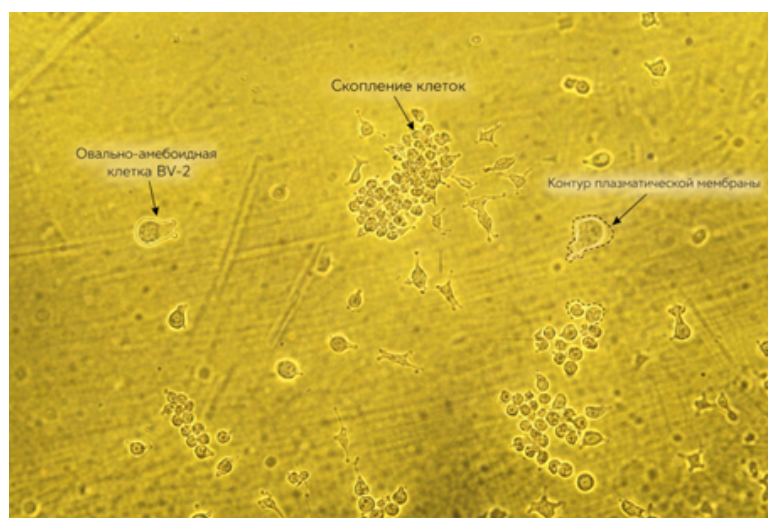


Рисунок 3. Морфология микроглиальных клеток линии BV-2 в культуре. Стрелками обозначены отдельные амёбидные клетки, скопления клеток и контуры плазматической мембраны. Показан характерный для линии BV-2 активированный амёбидный фенотип со слабой выраженностью клеточных отростков.

АТФ-индуцированные ответы в микроглиальных клеток линии BV-2

На следующем этапе электрофизиологические исследования были выполнены методом whole-cell patch-clamp на человеческих микроглиальных клетках линии BV-2 ($n = 10$). Регистрацию мембранных токов проводили при удерживающем потенциале -60 мВ. Сопротивление пипеток составляло $5-6$ МОм. Протокол эксперимента включал:

- регистрацию фоновой активности в течение 20 с (baseline);
- аппликацию АТФ в течение 10 с;
- последующую промывку в течение 20 с.

Аппликация АТФ вызывала развитие выраженного входящего тока во всех исследованных клетках. Ответ начинался с латентным периодом в несколько секунд после начала аппликации и сохранялся на протяжении всего времени воздействия АТФ с последующим постепенным спадом в фазе промывки (рисунок 4).

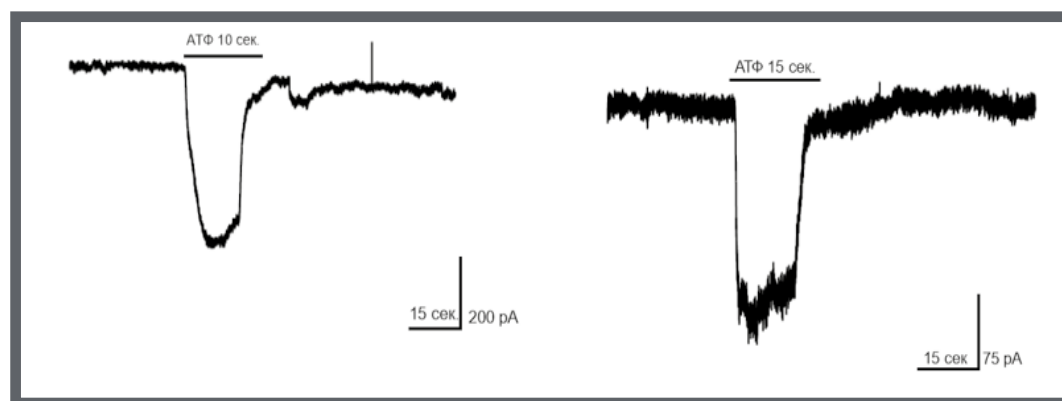


Рисунок 4. Характерная запись АТФ-индуцированного входящего тока в микроглиальной клетке линии BV-2 при фиксации потенциала на уровне -60 мВ. Аппликация АТФ (10 с) вызывала устойчивый входящий ток без выраженной десенситизации.

Характер ответов отличался медленным развитием и отсутствием быстрой десенситизации, что проявлялось в сохранении токов на протяжении всей аппликации агониста. Форма токов напоминала активацию неселективной ионной поры.

Амплитуда АТФ-индуцированных токов варьировала от 100 до 420 пА и в среднем составила 188 ± 33 пА ($M \pm SEM$, $n = 10$).

В клетках линии BV- признаков десенситизации АТФ вызванных ответов не было как не было и двухфазных ответов характерных для *P2X7* рецепторов в других клетках, что может свидетельствовать о различиях в профиле ионотропных рецепторов экспрессированных в этих клетках, либо в различных функциональных свойствах пуринаргических рецепторов или механизмах их регуляции в иммортализованной клеточной линии.

Обсуждение

Главным результатом данной работы является демонстрации выраженных ответов человеческой микроглии на аппликацию АТФ, которая является мощным про-воспалительным агентом, вовлечённым в патогенез БА. Мы показали, что аппликация АТФ вызывала в микроглиальных клетках линии BV-2 развитие устойчивых входящих токов. В последних характер АТФ-индуцированных ответов отличался медленным развитием, отсутствием быстрой десенситизации и сохранением тока на протяжении всего времени аппликации агониста, что указывает на возможную слабую активацию ионных механизмов с порообразными свойствами. Ранее было показано, что в первичных культурах микроглии человека активация *P2X7*-рецепторов АТФ приводит к развитию мембранных токов, характеризующихся двухфазной кинетикой, включающей начальный быстрый компонент и последующую фазу временной фасилитации [24,25]. Полученные в настоящей работе ответы в клетках линии BV-2 демонстрируют не только сходный медленный характер развития и временной динамики АТФ-индуцированных токов, но и отсутствие выраженной второй фазы ответа. Таким образом в исследуемых иммортализованных клетках линии BV-2 признаки быстрой десенситизации отсутствовали. Данное различие может быть связано с особенностями экспрессии или регуляции пуринаргических рецепторов в иммортализованных микроглиальных клетках.

Важно отметить, что практически все исследуемые нами клетки отвечали на АТФ значительным от амплитуды ответом, свидетельствуя о важной роли пуринаргической сигнализации в микроглии.

Таким образом, выявленные АТФ-индуцированные токи в клетках линии BV-2 обладают рядом характеристик, ранее описанных для *P2X7*-опосредованных ответов микроглии, но и различий (отсутствие второго компонента), что указывает на особенности функциональных свойств этих клеток и механизмов пуринаргической сигнализации в них. Одним из возможных объяснений может быть превалирование подтипа *P2X4* АТФ-рецепторов, которые не демонстрируют второй фазы ответа на этот стимул.

Эти данные соответствуют высокой изменчивости микроглиальных клеток, которые трансформируют сигнализацию в зависимости от окружения и других сигнальных и метаболических процессов.

Заключение

В настоящем исследовании метод patch-clamp был успешно апробирован и оптимизирован на клетках НЕК293Т, после чего применён для регистрации мембранных токов в микроглиальных клетках линии BV-2. Показано, что аппликация АТФ вызывает

развитие устойчивых входящих токов в клетках линии BV-2, зарегистрированных методом whole-cell patch-clamp при удерживающем потенциале -60 мВ. Характер АТФ-индуцированных ответов, включающий медленное развитие и отсутствие выраженной десенситизации, указывает на слабую активацию ионных механизмов с порообразными свойствами и демонстрирует сходство с ранее описанными пуринергическими ответами микроглии человека. Это может указывать на маловыраженные про-воспалительные механизмы у микроглии в этих условиях, так как выраженное открытие большой поры свидетельствует о провоспалительном профиле этих клеток. Представляет интерес провести подобные исследования в условиях стимуляции воспалительных реакций с помощью LPS (lipopolysaccharide), который, как мы обсуждаем в нашем обзоре [26], стимулирует провоспалительные процессы в мозге у больных БА [27-30]. Полученные данные подтверждают перспективность использования микроглиальной клеточной линии BV-2 в качестве экспериментальной модели для исследования пуринергической сигнализации микроглии методами электрофизиологии. В то же время для более детального понимания молекулярных механизмов АТФ-индуцированных токов и их функциональной роли в патогенезе нейродегенеративных процессов необходимы дальнейшие исследования с использованием специализированных клеточных моделей, включая модели болезни Альцгеймера.

Вклад авторов

Р.А., Н.Н. – концепция и руководство работой; **Г.Т.** – проведение экспериментов; **Н.Н., Г.Т., Р.А.** – обсуждение результатов исследования; **Г.Т.** – написание текста; **М.К., А.М., Н.Н., Р.А.** – редактирование текста статьи.

Финансирование

Данное исследование финансируется Комитетом по науке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № BR27198099).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов

Список литературы

1. C. L. Hill and G. J. Stephens, "An Introduction to Patch Clamp Recording," 2021, pp.1–19. doi: 10.1007/978-1-0716-0818-0_1
2. I. Kolb et al., "PatcherBot: a single-cell electrophysiology robot for adherent cells and brain slices," J. Neural Eng., vol. 16, no. 4, p. 046003, Aug. 2019, doi: 10.1088/1741-2552/ab1834
3. M. R. Angle and A. T. Schaefer, "Neuronal Recordings with Solid-Conductor Intracellular Nanoelectrodes (SCINeS)," PLoS One, vol. 7, no. 8, p. e43194, Aug. 2012, doi: 10.1371/journal.

pone.0043194

4. P. Chen, W. Zhang, J. Zhou, et.al. "Development of planar patch clamp technology and its application in the analysis of cellular electrophysiology," *Progress in Natural Science*, vol. 19, no. 2, pp. 153–160, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.pnsc.2008.06.012
5. H. N. Rubaiy, "A Short Guide to Electrophysiology and Ion Channels," *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, vol. 20, p. 48, Mar. 2017, doi: 10.18433/J32P6R
6. J. Gao, C. Liao, S. Liu, et.al. "Nanotechnology: new opportunities for the development of patch-clamps," *J. Nanobiotechnology*, vol. 19, no. 1, p. 97, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12951-021-00841-4
7. R. J. Boyd, D. Avramopoulos, L. L. Jantzie, et.al. "Neuroinflammation represents a common theme amongst genetic and environmental risk factors for Alzheimer and Parkinson diseases," *J. Neuroinflammation*, vol. 19, no. 1, p. 223, Sep. 2022, doi: 10.1186/s12974-022-02584-x
8. J. Stephenson, E. Nutma, P. van der Valk, and S. Amor, "Inflammation in CNS neurodegenerative diseases," *Immunology*, vol. 154, no. 2, pp. 204–219, Jun. 2018, doi: 10.1111/imm.12922
9. A. Rifat et al., "Differential contribution of THIK-1 K⁺ channels and P2X7 receptors to ATP-mediated neuroinflammation by human microglia," *J. Neuroinflammation*, vol. 21, no. 1, p. 58, Feb. 2024, doi: 10.1186/s12974-024-03042-6
10. Q. Li and B. A. Barres, "Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 4, pp. 225–242, Apr. 2018, doi: 10.1038/nri.2017.125
11. S. Hickman, S. Izzy, P. Sen, L. Morsett, and J. El Khoury, "Microglia in neurodegeneration," *Nat. Neurosci.*, vol. 21, no. 10, pp. 1359–1369, Oct. 2018, doi: 10.1038/s41593-018-0242-x
12. K. Riester et al., "In vivo characterization of functional states of cortical microglia during peripheral inflammation," *Brain Behav. Immun.*, vol. 87, pp. 243–255, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.bbi.2019.12.007
13. Z. Valiukas, K. Tangalakis, V. Apostolopoulos, and J. Feehan, "Microglial activation states and their implications for Alzheimer's Disease," *J. Prev. Alzheimers Dis.*, vol. 12, no. 1, p. 100013, Jan. 2025, doi: 10.1016/j.tjpad.2024.100013
14. R. J. Rodrigues, A. R. Tomé, and R. A. Cunha, "ATP as a multi-target danger signal in the brain," *Front. Neurosci.*, vol. 9, Apr. 2015, doi: 10.3389/fnins.2015.00148
15. G. Burnstock, "Purinergetic signalling and disorders of the central nervous system," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 7, pp. 575–590, Jul. 2008, doi: 10.1038/nrd2605
16. M. Tewari and P. Seth, "Emerging role of P2X7 receptors in CNS health and disease," *Ageing Res. Rev.*, vol. 24, pp. 328–342, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.arr.2015.10.001
17. H. G. Lee, S. M. Won, et.al. "Microglial P2X₇ receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP^{swe}/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease," *Exp. Mol. Med.*, vol. 43, no. 1, p. 7, 2011, doi: 10.3858/emm.2011.43.1.001
18. C. Martínez-Frailes et al., "Amyloid Peptide Induced Neuroinflammation Increases the P2X7 Receptor Expression in Microglial Cells, Impacting on Its Functionality," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 13, Apr. 2019, doi: 10.3389/fncel.2019.00143
19. Y. Yang, H. Wang, M. Kouadir, et.al. "Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 2, p. 128, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1413-8
20. R. Muñoz-Planillo, P. Kuffa, G. Martínez-Colón, B. L. Smith, T. M. Rajendiran, and G. Núñez, "K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter," *Immunity*, vol. 38, no. 6, pp. 1142–1153, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016
21. J. Rivers-Auty and D. Brough, "Potassium efflux fires the canon: Potassium efflux as a common trigger for canonical and noncanonical NLRP3 pathways," *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, no.

10, pp. 2758–2761, Oct. 2015, doi: 10.1002/eji.201545958

22. F. Di Virgilio, V. Vultaggio-Poma, et.al. “Extracellular ATP: A powerful inflammatory mediator in the central nervous system,” *Neuropharmacology*, vol. 224, p. 109333, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.neuropharm.2022.109333

23. M. Idzko, D. Ferrari, and H. K. Eltzschig, “Nucleotide signalling during inflammation,” *Nature*, vol. 509, no. 7500, pp. 310–317, May 2014, doi: 10.1038/nature13085

24. L. Janks, C. V. R. Sharma, and T. M. Egan, “A central role for P2X7 receptors in human microglia,” *J. Neuroinflammation*, vol. 15, no. 1, p. 325, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12974-018-1353-8

25. Tewari M., Michalski S., Egan T.M. (2024). Modulation of Microglial Function by ATP-Gated P2X7 Receptors: Studies in Rat, Mice and Human. *Cells*, 13(2), 161. DOI: 10.3390/cells13020161

26. G. Tassibekova, M. Zholdassova, N. Novosolova, et.al. “More than Dysbiosis: Imbalance in Humoral and Neuronal Bidirectional Crosstalk Between Gut and Brain in Alzheimer’s Disease,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 27, no. 1, p. 369, Dec. 2025, doi: 10.3390/ijms27010369

27. Andreadou EG, Katsipis G, Tsolaki M, et.al. Involvement and relationship of bacterial lipopolysaccharides and cyclooxygenases levels in Alzheimer’s Disease and Mild Cognitive Impairment patients. *J Neuroimmunol.* 2021 Aug 15;357:577561. doi: 10.1016/j.jneuroim.2021.577561. Epub 2021 Mar 30

28. Zhao Y, Cong L, Jaber V, et.al. Microbiome-Derived Lipopolysaccharide Enriched in the Perinuclear Region of Alzheimer’s Disease Brain. *Front Immunol.* 2017 Sep 4;8:1064. doi: 10.3389/fimmu.2017.01064

29. Zhan X, Hakoupian M, Jin LW, et.al. Lipopolysaccharide, Identified Using an Antibody and by PAS Staining, Is Associated With Corpora amylacea and White Matter Injury in Alzheimer’s Disease and Aging Brain. *Front Aging Neurosci.* 2021 Nov 24;13:705594. doi: 10.3389/fnagi.2021.705594

30. Brown, Guy C, and Michael T Heneka. 2024. “The Endotoxin Hypothesis of Alzheimer’s Disease.” *Springer Nature*. doi:10.17863/CAM.107258.

Альцгеймер ауруының иммундық механизмдерін зерттеу тәсілі ретінде микроглияның пуринарлық сигнализациясын электрофизиологиялық талдау

**Г.Т. Тәсібекова¹, Н. Новосолова², М.К. Жолдасова³,
А.М. Кустубаева⁴, Р.А. Гиниатуллин^{5*}**

^{1,3,4} *Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Биофизика, биомедицина және нейроғылым кафедрасы, Алматы, Қазақстан*

^{2,5} *Шығыс Финляндия университеті, А. И. Виртанен атындағы молекулалық ғылымдар институты, Куопио, Финляндия*

^{3,4} *Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Ми институты, Алматы, Қазақстан*

Аңдатпа. Нейроқабыну әртүрлі неврологиялық аурулардың, соның ішінде Альцгеймер ауруы (АА) сияқты нейродегенеративті патологиялардың дамуында маңызды рөл атқарады. Микроглияның функционалдық күйін модуляциялауда пуринарлық сигнализация, атап айтқанда жасушадан тыс АТФ арқылы белсенетін P2X4 және P2X7 рецепторлары маңызды рөл атқарады. Осы рецепторлар іске қосатын иондық механизмдерді түсіну жаңа терапиялық нысаналарды іздеу үшін қажет, алайда олардың функционалдық белсенділігін зерттеу жоғары дәлдікті электрофизиологиялық әдістерді

қолдануды талап етеді. Жұмыстың мақсаты — BV-2 микроглия жасуша линиясындағы АТФ-пен индукцияланған иондық механизмдерді зерттеу арқылы нейроқабыну мен нейродегенеративті аурулардағы, соның ішінде АА кезіндегі микроглияның пуринергиялық сигнализациясының рөлін тереңірек түсіну. Зерттеу жұмысы иммортализацияланған BV-2 микроглия жасушалық линиясында және HEK293 жасуша линиясында (тіркеу параметрлерін оңтайландыру үшін пайдаланылды) жүргізілді. Электрофизиологиялық өлшемдер «бүтін жасуша» (whole-cell) конфигурациясында –60 мВ ұстап тұру потенциалында орындалды. Пуринорецепторларды белсендіру 1 мМ АТФ ерітіндісін жергілікті аппликациялау арқылы жүзеге асырылды. Зерттеу барысында амебоидты морфологиясы бар жасушаларда тұрақты гигаомдық контакт түзу және whole-cell конфигурациясына көшу шарттары жетілдірілді. BV-2 линиясының барлық зерттелген жасушаларында (n=10) АТФ аппликациясы орташа амплитудасы 188 ± 33 пА болатын айқын кіріс токтарды туғызатыны анықталды. Тіркелген жауаптар баяу даму кинетикасымен және агонист әсері барысында жылдам десенситизацияның болмауымен сипатталды. Адамның бастапқы жасушалық линияларынан айырмашылығы, BV-2 жасушаларында P2X7 рецепторының пораларының толық ашылуына тән классикалық екі фазалы кинетика байқалмады. Бұл P2X4 рецепторлық қосалқы түрінің басым болуын немесе иммортализацияланған желілердегі пуринорецепторлар реттелуінің ерекшеліктерін көрсетуі мүмкін. Алынған нәтижелер микроглияның функционалдық күйін бағалауда patch-clamp әдісінің жоғары тиімділігін растайды. BV-2 жасушаларындағы АТФ-индукцияланған токтардың анықталған ерекшеліктері бұл желіні пуринергиялық сигнализация модуляторларын бастапқы скринингте қолдануға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: микроглия, пуринергиялық рецепторлар, P2X7, BV-2 жасушалары, АТФ, patch-clamp, иондық токтар, нейроқабыну, Альцгеймер ауруы.

Electrophysiological analysis of purinergic signaling of microglia as an approach to studying the immune mechanisms of Alzheimer's disease

G.T. Tasibekova¹, N. Novosolova², M.K. Zholdasova³,
A.M. Kustubayeva⁴, R.A. Giniatullin^{5*}

^{1,3,4} Al-Farabi Kazakh National University, Department of Biophysics, Biomedicine,
and Neuroscience, Almaty, Kazakhstan

^{2,5} University of Eastern Finland, A. I. Virtanen Institute of Molecular Sciences, Kuopio, Finland

^{3,4} Al-Farabi Kazakh National University, Brain Institute, Almaty, Kazakhstan

Abstract. Neuroinflammation mediated by chronic microglial activation is considered a key factor in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Purinergic signaling, particularly P2X4 and P2X7 receptors activated by extracellular ATP, plays an important role in modulating microglial function. Understanding the ionic mechanisms triggered by these receptors is essential for identifying therapeutic targets and requires high-precision electrophysiological methods. The aim of this study was to investigate ATP-induced ionic mechanisms in BV-2 microglial cells to better understand the role of purinergic signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases, including AD. The study was performed on the immortalized BV-2 mouse microglia line and HEK293 cells, used to optimize recording parameters. Electrophysiological measurements were performed in the whole-cell configuration at a holding potential of –60 mV. Purinergic receptors were activated by local application of ATP (1 mM). Conditions for stable

gigaohm seal formation and transition to the whole-cell configuration were optimized for cells with amoeboid morphology. ATP application induced inward currents in all BV-2 cells studied (n=10), with a mean amplitude of 188 ± 33 pA. Responses showed slow development kinetics and no rapid desensitization during agonist exposure. Unlike primary human cultures, BV-2 cells did not exhibit the classic biphasic kinetics associated with full opening of the P2X7 receptor pore. This may indicate predominance of the P2X4 subtype or specific regulation of purinergic receptors in immortalized cell lines. The results confirm the effectiveness of patch-clamp for assessing microglial functional state and support BV-2 cells as a model for primary screening of purinergic signaling modulators.

Keywords: microglia, purinergic receptors, P2X7, BV-2 cells, ATP, patch clamp, ionic currents, neuroinflammation, Alzheimer's disease.

Авторлар туралы мәлімет:

Тәсібекова Гауһар Төлепбекқызы – 3-курс докторанты, Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті. Әл-Фараби даңғылы 71, 050040, Қазақстан.

Наталья Новоселова – PhD, постдок, Шығыс Финляндия университеті, А.И. Виртанен атындағы молекулалық ғылымдар институты. Neulaniementie 2, FI-70211, Куопио, Финляндия.

Гиниатуллин Рашид Асхатович – хат-хабар авторы, PhD, профессор, Шығыс Финляндия университеті, А.И. Виртанен атындағы молекулалық ғылымдар институты. Neulaniementie 2, FI-70211, Куопио, Финляндия.

Жолдасова Манзура Кенесбекқызы – PhD, биофизика, биомедицина және нейроғылым кафедрасының доценті, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Әл-Фараби даңғылы 71, 050040, Алматы, Қазақстан.

Кустубаева Альмира Мелсовна – б.ғ.к., биофизика, биомедицина және нейроғылым кафедрасының профессоры, Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Әл-Фараби даңғылы 71, 050040, Алматы, Қазақстан.

Сведения об авторах:

Тәсібекова Гауһар Төлепбекқызы – PhD студент 3 курса кафедры биофизики, биомедицины и нейронауки, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, проспект Аль-Фараби, 71, 050040, Алматы, Казахстан.

Новоселова Наталья – PhD, постдок Университет Восточной Финляндии, Институт молекулярных наук им. А.И. Виртанена, Neulaniementie, 2, FI-70211, Куопио, Финляндия.

Гиниатуллин Рашид Асхатович – автор-корреспондент, PhD, профессор. Университет Восточной Финляндии, Институт молекулярных наук им. А.И. Виртанена, Neulaniementie, 2, FI-70211, Куопио, Финляндия

Жолдасова Манзура Кенесбекқызы – PhD, доцент кафедры биофизики, биомедицины и нейронауки, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, проспект Аль-Фараби, 71, 050040, Алматы, Казахстан.

Кустубаева Альмира Мэлсовна – к.б.н., профессор кафедры биофизики, биомедицины и нейронауки, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, проспект Аль-Фараби, 71, 050040, Алматы, Казахстан.

Authors' information:

Tassibekova Gauhar – Corresponding Author, 3rd-year PhD student, Department of Biophysics, Biomedicine, and Neuroscience, Al-Farabi Kazakh National University. Al-Farabi Avenue 71, 050040, Almaty, Kazakhstan.

Nataliia Novoselova – PhD, postdoc, University of Eastern Finland, A.I. Virtanen Institute of Molecular Sciences. Neulaniementie 2, FI-70211, Kuopio, Finland.

Rashid Giniatullin – PhD, professor, University of Eastern Finland, A.I. Virtanen Institute of Molecular Sciences. Neulaniementie 2, FI-70211, Kuopio, Finland

Manzura Zholdassova – PhD, Associate Professor, Department of Biophysics, Biomedicine, and Neuroscience, Al-Farabi Kazakh National University, Al-Farabi Avenue 71, 050040, Almaty, Kazakhstan.

Almira Kustubayeva – PhD, Professor, Department of Biophysics, Biomedicine, and Neuroscience, Al-Farabi Kazakh National University, Al-Farabi Avenue 71, 050040, Almaty, Kazakhstan.