_

_

_

Том 38, номер 4, 2021

_

обзоры

Фактор Виллебранда в норме и при патологии

П. П. Авдонин, Н. В. Цветаева, Н. В. Гончаров, Е. Ю. Рыбакова, С. К. Труфанов, А. А. Цитрина, П. В. Авдонин	237

Конфигурации границы упорядоченного домена в липидной мембране на твердой подложке	
Т. Р. Галимзянов, С. А. Акимов	257
Проблема неоднозначности решения обратных задач малоуглового рассеяния: последовательный подход на примере рецептора, подобного рецептору инсулина. Методы интерпретации данных МУРР	
М. В. Петухов, П. В. Конарев, В. В. Волков, А. А. Можаев, Э. В. Штыкова	268
Сравнение эффективности подавления КСІ-индуцированных кальциевых ответов гиппокампальных нейронов различными блокаторами потенциал-зависимых Ca ²⁺ -каналов L-типа	
Д. П. Ларюшкин, С. А. Майоров, С. Г. Гайдин, В. П. Зинченко, А. М. Косенков	284
Влияние окислительного стресса на транспорт субстрата Р-гликопротеина через клеточный монослой	
А. В. Щулькин, Ю. В. Абаленихина, А. А. Сеидкулиева, И. В. Черных, Е. Н. Якушева	292
Анализ упорядоченности липидов рафтовых структур в мембранах митохондрий галофитов с применением флуоресцентной микроскопии	
В. Н. Нурминский, В. Н. Нестеров, О. А. Розенцвет, А. Л. Ракевич, Ю. С. Букин, И. С. Капустина, Н. В. Озолина	306

_

_

Vol. 38, No. 4, 2021

REVIEWS

Von Willebrand Factor in Health and Disease		
P. P. Avdonin, N. V. Tsvetaeva, N. V. Goncharov, E. Yu. Rybakova, S. K. Trufanov, A. A. Tsitrina, P. V. Avdonin	237	

Configurations of Ordered Domain Boundary in Lipid Membrane on Solid Support <i>T. R. Galimzyanov, S. A. Akimov</i>	257	
The Ambiguity Problem in Solving Inverse Problems of Small-angle Scattering: A Consistent Approach by the Example of Insulin Receptor-related Receptor. Methods for SAXS Data Interpretation <i>M. V. Petoukhov, P. V. Konarev, V. V. Volkov, A. A. Mozhaev, E. V. Shtvkova</i>	268	
The Effectiveness of Various Blockers of L-Type Voltage-gated Ca ²⁺ Channels in Suppression of KCl-induced Calcium Responses in Hippocampal Neurons D. P. Laryushkin, S. A. Maiorov, S. G. Gaidin, V. P. Zinchenko, A. M. Kosenkov	284	
Effect of Oxidative Stress on the Transport of P-Glycoprotein Substrate through the Cell Monolayer <i>A.V. Shchulkin, Yu. V. Abalenikhina, A. A. Seidkulieva,</i> <i>I. V. Chernykh, E. N. Yakusheva</i>	292	
 Analysis of Lipid Order of Raft Structures in Mitochondrial Membranes of Halophites with the Aid of Fluorescent Microscopy V. N. Nurminsky, V. N. Nesterov, O. A. Rosentsvet, A. L. Rakevich, Yu. S. Bukin, I. S. Kapustina, N. V. Ozolina 	306	

УДК 576.08,57.085.23

ФАКТОР ВИЛЛЕБРАНДА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

© 2021 г. П. П. Авдонин^{*a*}, Н. В. Цветаева^{*b*}, Н. В. Гончаров^{*c*, *d*}, Е. Ю. Рыбакова^{*a*}, С. К. Труфанов^{*a*}, А. А. Цитрина^{*a*}, П. В. Авдонин^{*a*}, *

> ^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва. 119334 Россия

^bНациональный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России,

Москва, 125167 Россия

^сИнститут эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

^d Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Ленинградская обл., ст. Капитолово, 188663 Россия

> *e-mail: pvavdonin@yandex.ru Поступила в редакцию 15.04.2021 г. После доработки 29.04.2021 г. Принята к публикации 30.04.2021 г.

Фактор Виллебранда (фВ), ключевой компонент гемостаза, синтезируется в эндотелиальных клетках и мегакариоцитах и высвобождается в кровь в виде высокомолекулярных мультимерных гликопротеинов с массой до 20 миллионов дальтон. Металлопротеаза плазмы крови ADAMTS13 расщепляет сверхкрупные мультимеры фВ до более мелких мультимерных и олигомерных молекул. Молекулы фВ присоединяются к местам повреждения поверхности артериол и капилляров и разворачиваются в условиях быстрого кровотока. На развернутой молекуле фВ экспонируются участки, взаимодействующие с рецепторами на мембране тромбоцитов. После связывания с нитями фВ тромбоциты активируются, к ним дополнительно присоединяются циркулирующие в сосудах тромбоциты, и в итоге происходит формирование тромбов, закупорка микрососудов и остановка кровотечения. В обзоре будет описана история открытия фВ, представлены данные о механизмах секреции фВ и его структуре, охарактеризованы процессы обмена фВ в организме в норме и при патологических состояниях.

Ключевые слова: фактор Виллебранда, эндотелий, патология, болезнь Виллебранда, тромботические микроангиопатии

DOI: 10.31857/S0233475521040034

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА И МЕТАЛЛОПРОТЕАЗЫ ADAMTS13

Ключевой компонент системы гемостаза, фактор Виллебранда (фВ), назван по имени врача Эрика Адольфа фон Виллебранда (1.02.1870-12.12.1949), получившего образование в Императорском Александровском университете в Гельсингфорсе (Хельсинки) и работавшего в Финляндии после распада Российской империи. В 1924 году фон Виллебранда попросили осмотреть пятилетнюю девочку из деревни на Аландских островах. страдавшую от кровотечений. Родственники девочки со стороны и отца, и матери имели склонность к сильным кровотечениям при малейшем повреждении кожи и слизистых. Из 11 братьев и сестер девочки четверо умерли по этой причине в раннем возрасте. В 1926 г. по итогам своих исследований Эрик фон Виллебранд опубликовал на

шведском языке статью о ранее неизвестной форме наследственной гемофилии, для которой было характерно нормальное свертывание крови, но увеличенное время кровотечения [1]. Он назвал это заболевание псевдогемофилией. Позднее в его честь оно получило наименование болезнь Виллебранда (см. обзор [2]). Девочка, которую обследовал Эрик фон Виллебранд, умерла в возрасте 13 лет во время четвертого менструального периода. Эрик фон Виллебранд описал одну из наиболее тяжелых форм данной болезни. К настоящему времени показано, что у болезни Виллебранда имеется порядка 20 разновидностей от почти незаметных до крайне тяжелых. Помимо наследственных встречаются приобретенные формы болезни Виллебранда.

Кровотечение из мелких сосудов, которое является главным признаком болезни Виллебранда, в норме останавливается в результате прикрепле-

ния тромбоцитов к поврежденной поверхности и образования микротромбов. Переливание цельной крови или плазмы здорового человека позволяет остановить кровотечение при данной болезни [3]. В конце 50-х годов путем криопреципитации была получена уменьшающая время кровотечения фракция плазмы крови. Выделенная фракция содержала фактор VIII свертывания крови, однако свойством сокращать время кровотечения обладал также криопреципитат, который получали из плазмы больных гемофилией А [4]. Неизвестный активный компонент плазмы получил название фактор фон Виллебранда (фВ). Для того, чтобы исследовать его природу, необходимо было иметь модельную систему, имитирующую кровотечение из мелких сосудов и процесс его остановки. Первоначально для этого использовали пластиковую трубку, заполненную стеклянными шариками диаметром 0.5 мм, через которую пропускали кровь [5, 6]. Адгезивные свойства тромбоцитов оценивали по времени их задержки при протекании крови. Задержка тромбоцитов при протекании крови от пациентов с болезнью Виллебранда была короче, но ее можно было скорректировать, если предварительно через трубку с шариками пропускали плазму здоровых доноров или больных гемофилией А, криопреципитаты или частично очищенные фракции плазмы (см. обзор [7]). С помощью этой тест-системы проводилось определение активности фВ в белковых фракциях при гель-фильтрации, и таким образом удалось получить достаточно хорошо очищенный препарат фВ, к которому были выработаны антитела [8, 9]. С их помощью вскоре была показана мультимерная структура фВ [10]. Методом иммунопреципитации было доказано, что фактор VIII и фВ – это разные субстанции [11]. Для разделения мультимеров фВ используется агарозный гель [12, 13]. Мультимерные белки образованы в результате сшивания дисульфидными связями димерных молекул. В самом димере мономерные белки также соединены дисульфидной связью [14]. В плазме крови фВ представляет собой смесь таких мультимеров с разбросом молекулярной массы от примерно 600 тысяч (одиночный димер) до 20 миллионов дальтон и более. Более детально вопрос о структуре фВ будет рассмотрен ниже.

Изучению фВ в большой степени способствовало открытие индуцированной антибиотиком ристоцетином агрегации тромбоцитов в плазме крови [15]. В присутствии ристоцетина при перемешивании обогащенной тромбоцитами плазмы от здоровых доноров происходит агрегация тромбоцитов, тогда как в плазме пациентов с болезнью Виллебранда агрегации нет. С помощью ристоцетина в тесте агрегации проводится количественное определение активности фВ в плазме крови у пациентов с подозрением на наличие болезни Виллебранда. При этом можно использовать отмытые и фиксированные формальдегидом тромбоциты, которые сохраняют способность к агглютинации в присутствии ристоцетина и нормальной плазмы. Как в дальнейшем выяснилось, ристоцетин вызывает частичное раскручивание высокомолекулярных мультимеров, что придает фактору Виллебранда способность связываться с тромбоцитами. В 1972 были впервые выявлены пациенты с болезнью Виллебранда 2-типа с нормальным уровнем антигена фВ, но с пониженной активностью [16]. Такое же действие, как ристоцетин, оказывает белок из змеиного яда ботроцитин [17].

Немногим ранее открытия Эриком фон Виллебрандом болезни, связанной с дефицитом фВ, в США была опубликована статья Э. Мошковица, посвященная описанию болезни с прямо противоположным механизмом патогенеза [18]. Был впервые описан случай тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП) или синдрома Мошковица – болезни, вызванной гиперактивностью фВ в плазме. У 16-летней девочки наблюдались многочисленные кровоизлияния на поверхности тела (петехии), гемолиз, с последующими параличом, потерей сознания и смертью. При вскрытии были видны многочисленные мелкие гиалиновые (стекловидные) тромбы в артериолах и капиллярах разных органов. Связь этой патологии с фВ стала проясняться после того, как в 1982 г. было показано, что у больных с ТТП во время ремиссии в плазме присутствуют в избытке тромбогенные сверхкрупные мультимеры фВ [19]. При рецидиве болезни, напротив, уменьшается доля сверхкрупных мультимеров фВ и возрастает содержание мультимеров малых размеров. На основе данных о повышенном содержании высокомолекулярных мультимеров при ТТП было предположено, что в плазме больных не происходит или снижено их расщепление. Расщепление гигантских мультимеров фВ до более мелких олигомеров осуществляет металлопротеasa ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs). Этот фермент был обнаружен в двух лабораториях в Швейцарии в 1997 г. [20] и спустя год в США [21]. ADAMTS13 разлагает мультимеры путем разрыва пептидных связей фВ между 1605 и 1606 остатками тирозина и метионина в мономерных субъединицах. Основной причиной развития ТТП является образование в организме антител IgG, блокирующих активность этого фермента [22]. При другой форме тромботической микроангиопатии (ТМА), гемолитико-уремическом синдроме (ГУС), подъем активности фВ вызван увеличением его производства эндотелием, а не подавлением распада. Во время рецидивов ГУС содержание антигена фВ возрастает в несколько раз, причем также преобладают небольшие оли-

275 кДа. Формирующиеся мультимеры фВ поступают в транс-цистерны аппарата Гольджи (trans-

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ № 4 2021 том 38

электронным микроскопом начинающие формироваться тубулы мультимеров фВ [32]. Отшнуровывающиеся от аппарата Гольджи везикулы преобразуются в характерные только для эндотелиальных клеток структуры – тельца Вейбеля-Паладе, сигарообразная форма которых формируется под влиянием спиралевидных трубок, образованных растущими мультимерами фВ [33, 34]. В результате спирализации занимаемый мультимерами объем уменьшается на 2 порядка [35, 36]. Диаметр телец Вейбеля-Паладе составляет 100-200 нм, а длина от 1 до 5 мкм. Молекулярная масса мультимеров фВ в зрелых тельцах может превышать 20 миллионов дальтон [36]. Секретируемые эндотелиальными клетками сверхкрупные мультимеры фВ расщепляются присутствующей в плазме протеазой ADAMTS13 до более мелких фрагментов [37]. В опытах in vivo показано, что в брыжеечных артериях мышей с нокаутом гена ADAMTS13 в ответ на активацию эндотелиальных клеток мультимеры фВ, выстраиваясь в ряд, соединяются друг с другом и формируют прикрепленные к клеткам нити длиной от 20 до 100 мкм [38-40]. При окрашивании тромбоцитов родамином можно видеть, как они прикрепляются к этим нитям подобно бусинам. В культивируемых эндотелиальных клетках из пупочной вены человека длина образованных пучками молекул фВ нитей достигает миллиметра и более [39]. Из этих нитей может формироваться сетчатая структура, которая не образуется in vivo. В прикреплении нитей фВ к мембране культивируемых эндотелиальных клеток участвуют Р-селектин и αVβ3 интегрин [38].

Помимо фВ в тельцах Вейбеля-Паладе присутствуют такие белки, как Р-селектин, интерлейкин-8, остеопротегерин, ангиопоэтин-2, эндотелин-1 [41, 42]. Р-селектин и ангиопоэтин-2 хранятся в разных фракциях телец Вейбеля-Паладе [43]. Кроме того, есть свидетельства, что высвобождение фВ и Р-селектина из телец Вейбеля-Паладе по-разному регулируется [34]. Показано, что только в части культивируемых эндотелиальных клеток из аорты человека одновременно с фВ экспрессируется Р-селектин [44]. Фактор VIII также секретируется не всеми эндотелиальными клетками, производящими фВ [45]. Физиологические эффекты секретируемых из телец Вейбеля-Паладе белков и пептидов рассмотрены в обзоре [42].

В тромбоцитах фВ находится в альфа-гранулах, которые имеют округлую форму. фВ в них также упакован в виде трубочек диаметром 200-250 ангстрем, расположенных эксцентрично [46].

гомеры фВ, но в отличие от ТТП, при ремиссии ГУС не происходит сдвиг мультимерного состава в сторону высокомолекулярных мультимеров [23]. Помимо ТТП и ГУС известны другие формы ТМА, при которых происходит повышение активности фВ. Этиология ТМА не всегда установлена.

СИНТЕЗ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА

Ключевой компонент системы гемостаза, фактор фон Виллебранда (фВ), синтезируется в эндотелиальных клетках и в мегакариоцитах, дающих начало тромбоцитам. фВ секретируется в кровь и обеспечивает присоединение тромбоцитов к поврежденной стенке сосуда, связываясь с коллагеном, а также выполняет функцию носителя фактора VIII свертывания крови [24]. Исходный белок-мономер, из которого образуется мультимерная цепь фВ, кодируется геном, расположенным на хромосоме 12p2.1 [25]. Ген VWF имеет длину примерно 178 тысяч пар оснований (п.о.) и содержит 52 экзона [26], из которых 17 экзонов кодируют сигнальный пептид и пропептид фВ (так называемый антиген II фактора Виллебранда). Размер экзонов варьирует от 40 до 1379 п.о., размер интронов – от 97 до 19.9 тысяч п.о. Зрелая субъединица фактора Виллебранда и З'-нетранслируемая область кодируются частью гена, включающей приблизительно 80 тысяч п.о. В гаплоидном геноме человека имеется один экземпляр гена фВ [27]. Экспрессия контролируется транскрипционным фактором GATA2 [28].

Первичный генный продукт фВ образован

2813 аминокислотами (а.к.), включающий в себя сигнальный пептид из 22 а.к. и пропептид 741 а.к. [29–31]. Доменная структура мономера фВ с многочисленными участками, по которым происходит гликозилирование, показана на рис. 1. Процесс созревания мультимерной молекулы фВ и его секреция в эндотелиальных клетках происходит следующим образом. В шероховатом эндоплазматическом ретикулуме начинается процесс гликозилирования молекулы фВ путем присоединения крупных маннозных остатков. Зрелый гликозилированный мономер массой 260 кДа образует димер в эндоплазматическом ретикулуме через С-концевые дисульфидные связи и перемещается по антероградному пути в аппарат Гольджи. За счет дополнительного роста гликозильных остатков масса мономера возрастает до 275 кДа. Далее происходит мультимеризация фВ. отшепление пропептида у большей части мономеров и начало спирализации. Масса мономера снижается до 220 кДа, однако в некоторых секретируемых мультимерах фВ сохраняются мономеры с массой Golgi network), в которых уже можно видеть под



Рис. 1. Доменная структура мономера зрелого фактора Виллебранда. Показаны участки взаимодействия с фактором VIII, P-селектином, рецепторами фВ на мембране тромбоцитов GP1bα, GPIIbIIIa, коллагена типов I, III, IV, VI, участки присоединения ADAMTS13 и расшепления фВ, участки, по которым происходит димеризация и мультимеризация фВ. TIL' – trypsin inhibitor-like domain. Гликозильные остатки представлены в виде черных (N-гликаны) и белых (О-гликаны) шариков на ножках. Гликозилирование происходит по остаткам аминокислот аргинина (N), треонина (T) и серина (S). Адаптировано из [30] и [90].

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКЗОЦИТОЗА ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА

Секреция фВ в эндотелиальных клетках происходит в результате конститутивного и регулируемого экзоцитоза телец Вейбеля-Паладе [45, 47, 48]. Помимо этих двух описан третий механизм экзоцитоза — с участием аутофагосом [49]. Активация экзоцитоза фВ происходит при различных условиях, включая воспаление, повреждение сосудов, гипоксию, напряжение сдвига, активацию мембранных рецепторов [42, 50, 51]. Регулируемый экзоцитоз происходит преимущественно в апикальном направлении, конститутивный экзоцитоз идет и в апикальном, и в базальном направлениях [40, 52].

Предполагается, что конститутивный экзоцитоз происходит при высвобождении содержимого одиночных телец Вейбеля—Паладе. Высвобождаемый таким путем фВ в комплексе с фактором VIII необходим для поддержания нормального гемостаза. Показано, что при активации экзоцитоза гистамином и тромбином сразу несколько телец Вейбеля—Паладе высвобождают содержащийся в них фВ в особые секреторные везикулы (secretory pods). Молекулы фВ, присутствующие в секреторных везикулах в большом количестве, объединяются в пучки, из которых на поверхности эндотелия формируются нити, цепляющие на себе тромбоциты [38].

В передаче действия агонистов на секрецию фВ участвуют вторичные посредники сАМР и Ca²⁺ [40, 53]. Тромбин и гистамин, активирующие Ca²⁺-сигнальную систему, оказывают более выраженную активацию экзоцитоза фВ [54–56] по сравнению с адреналином и вазопрессином, действующими через сАМР [57, 58]. Кроме этого, адреналин и вазопрессин, в отличие от гистамина и тромбина, не вызывают или слабо активируют экзоцитоз телец Вейбеля–Паладе, содержащих, помимо фВ, Р-селектин [59]. Механизм экзоцитоза телец Вейбеля–Паладе до конца не изучен, но известны некоторые базовые сигнальные механизмы, запускающие данный процесс. При действии как ионов Ca²⁺, так и сAMP, происходит активация обмена GDP на GTP в белке RalA под влиянием RalGDS [60, 61]. RalA, действуя через фосфолипазу D (PLD), стимулирует опосредованное SNARE слияние мембран на плазматической мембране [62]. В этом процессе альфа-синуклеин регулирует активность RalA и может предотвратить слияние телец Вейбеля—Паладе с мембраной [63]. В передаче активирующего сигнала от сАМР помимо протеинкиназы A принимает участие Ерас через сигнальный путь Rap1 –> PREX1 –> Rac1 –> PLD [40].

Регуляция экзоцитоза происходит также на более ранней стадии – во время транспорта телец Вейбеля-Паладе вдоль микротрубочек. После присоединения Rab27A к тельцам Вейбеля-Паладе посредством белков MyRIP и MyoVa происходит их "заякоривание" на актиновых филаментах и тем самым предотвращается экзоцитоз незрелых везикул [64, 65]. Помимо привязки к актиновому цитоскелету, Rab27A регулирует экзоцитоз телец Вейбеля-Паладе посредством присоединения к ним эффекторных белков Slp-4a и Munc14-3 [66-69]. Slp-4а и Munc14-3 необходимы для слияния телец Вейбеля-Паладе с плазматической мембраной. В регуляции экзоцитоза участвуют также Rab15, Rab3B, Rab3D [69] и синтаксин-3 [70, 71]. Разрушение микротрубочек ингибирует Ca²⁺-зависимый экзоцитоз, а дестабилизация актина, наоборот, его усиливает [55, 67, 72]. В случае сАМР-индуцируемого экзоцитоза ланные эффекты не наблюдаются. Ионы кальция активируют транспорт телец Вейбеля-Паладе в сторону мембраны, при повышении концентрации Ca²⁺ в цитоплазме эндотелиальных клеток весь фВ высвобождается из клеток. Напротив, при повышении уровня сАМР секретируется только часть фВ [53, 57, 73]. Интересно, что агонисты, активирующие аденилатциклазу, вызывают концентрирование телец Вейбеля-Паладе в околоядерной области клетки (см. обзор [42]).

В последние годы накапливается все больше свидетельств связи воспаления и тромбозов [74, 75]. В качестве индукторов тромбообразования могут выступать активные формы кислорода, генерируемые при воспалительных процессах. Ранее было показано, что секрецию фВ стимулирует супероксид анион [76]. В отношении влияния на секрецию фВ продукта дисмутации супероксид аниона – пероксида водорода, сведения противоречивы. В исследованиях, представленных в цитируемой статье [76], такой эффект H_2O_2 не был выявлен. С другой стороны, в работе Yang и соавт. [77] приведены данные об увеличении секреции фВ в 1.5–2 раза под действием экзогенного H_2O_2 в достаточно высокой концентрации – 0.5 мМ. В наших исследованиях мы исходили из идеи, что тромбообразование при воспалении определяется не столько циркулирующим фВ, сколько прикрепленными к поверхности активированного эндотелия мультимерами фВ. Поэтому было проведено исследования действия пероксида водорода на экспрессию мультимеров фВ на поверхности эндотелиальных клеток из пупочной вены человека. Мы использовали два метода окрашивания фВ на мембране – с помощью антител [78] и с помощью флуоресцентно-меченного аптамера, связывающего с доменом А1 в молекуле фВ [79]. Было установлено, что пероксид водорода в физиологически релевантной концентрации (100 мкМ) в 2-4 раза увеличивает экспонирование фВ на мембране эндотелиальных клеток. Показано, что при этом формируются нити фВ длиной в десятки микрометров. Таким образом, эти данные свидетельствуют о роли H₂O₂ в тромбообразовании при воспалительных процессах. Помимо поступления в эндотелиальные клетки экзогенного пероксида водорода происходит его образование внутри клеток при воздействии VEGF [80], TNFα [81]. Оба эти агониста активируют экзоцитоз фВ [82, 83]. Исходя из этого можно предполагать, что H_2O_2 участвует в вызываемом этими агонистами экзоцитозе фВ в качестве вторичного посредника.

СТРУКТУРА ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА

Исходный мономер фВ образован доменами D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK. D-домены образованы более мелкими модулями, которые видны на электронных фотографиях [45, 84]. Ключевой элемент мономера фВ образован доменами А: домен А1 обеспечивает связывание фВ с рецептором GPIbα на мембране тромбоцитов, в А2 расположена расщепляемая ADAMTS13 пептидная связь, гидролиз которой регулирует размер мультимера фВ в кровотоке, домен А3 осуществляет присоединение к коллагену в месте повреждения сосудистого эндотелия. Дисульфидный мостик между N- и C-концами A1- и A3-доменов фиксирует каждый из этих доменов в относительно жесткой конфигурации. Напротив, А2-домен не имеет жесткой структуры и растягивается в условиях быстрого кровотока при высоком уровне напряжения сдвига, что делает его доступным для протеолиза [85]. Связывание домена А3 с коллагенами I и III, находящимися в субэндотелиальном пространстве, происходит за счет электростатического взаимодействия отрицательно заряженных аминокислотных остатков в пептидной цепи АЗ и положительно заряженных остатков в коллагенах. Ван-дер-Ваальсово взаимодействие слабо выражено [86]. Этим объясняется невысокое сродство А3 к коллагену и необходимость одновременного присоединения фВ к коллагену несколькими участками для прочной адгезии. По-видимому, отчасти по этой причине сверхкрупные мультимеры обладают большей тромбогенностью. Домены D1, D2, D3 включают модули VWD (von Willebrand D domain), C8, ТІL и Е-модуль. Домен D' не содержит VWD и C8, а в D4 нет Е-модуля и присутствует субдомен D4N. В последовательности фВ необычно высокое содержание остатков цистеина (8.3%). Это в 4 раза больше, чем в среднем для белков. Предполагается, что большая часть цистеиновых остатков формирует дисульфидные связи, причем эти связи перестраиваются во время созревания и спирализации мультимера фВ [87]. Функции доменов подробно описаны в обзорах [88, 89].

Благодаря образованию дисульфидных связей происходит сначала сшивание мономеров фВ в димеры, а затем образование из димеров мультимерных молекул фВ. Протодимеры образуются в результате сшивки двух первичных мономеров тремя дисульфидными связями между цистеиновыми остатками 2771, 2773 и 2811, находящимися в С-концевой части пептидной цепи. Эти дисульфидные мостики структурно защищены от восстановления, что обеспечивает прочность димеров фВ. Находясь в везикулах аппарата Гольджи при кислых значениях рН, протодимеры структурно напоминают букет с двумя переплетенными "стеблями", образованными доменами А2-А3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6, и "цветками" из доменов D1-D2-D'-D3-A1 [84]. Следующим этапом является ковалентная сшивка протодимеров двумя дисульфидными связями между цистеинами 889 и 898 в D3-доменах на N-концах полипептидных цепей. После образования мультимеров протеаза фурин отщепляет N-концевые хвосты мономеров.

Мультимерная структура фВ выявляется при электрофорезе в агарозном геле с концентрацией агарозы от 1 до 2–3% [13]. Сверхкрупные мультимеры можно увидеть при электрофорезе в геле с наименьшей концентрацией агарозы. По результатам электрофореза, максимальная масса мультимеров, образующихся в эндотелиальных клетках, составляет 20 и более миллионов дальтон, что соответствует массе 35-40 димеров [45]. Для улучшения разделения малых компонентов можно дополнительно вводить в состав геля акриламид. Благодаря этому методу у людей, страдающих болезнью Виллебранда типа IIA, выявлены низкомолекулярные белковые молекулы [13]. Сверхкрупные мультимеры фВ способны спонтанно связываться с тромбоцитами в отличие от мультимеров среднего и небольшого размера, которые присоединяются к тромбоцитам только в присутствии ристоцетина или ботроцитина [91]. Согласно модели, предложенной Гуриа и соавт. [92, 93], более высокая тромбогенная активность сверхкрупных мультимеров фВ в сосудах объясняется меньшим пороговым значением напряжения сдвига, при котором происходит их разворачивание.

В нормальной плазме мультимерный состав фВ регулирует металлопротеаза ADAMTS13, расщепляющая связь Туг¹⁶⁰⁵-Меt¹⁶⁰⁶ в домене A2 [94]. Недавние исследования свидетельствуют, что некоторые другие протеазы в плазме, включая плазмин, могут расщеплять мультимеры фВ [95]. Плазмин разрезает связь между аминокислотными остатками K1491-R1492 в участке пептидной цепи, соединяющем домены A1 и A2.

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ И СИАЛИРОВАНИЕ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА

В течение всего времени с момента образования мономера и до секреции гигантских мультимеров происходит посттрансляционная модификация фВ, заключающаяся в гликозилировании [96]. После окончания этого процесса масса N-и О-гликанов достигает 20% от конечной массы фВ [90]. Гликаны присоединяются по остаткам аргинина (N-гликаны) и серина с треонином (О-гликаны). Анализ структуры мономера фВ первоначально выявил 13 потенциальных мест N-гликозилирования, последующие масс-спектрометрические исследования показали наличие 12 N-гликанов [97]. Присоединение первичного олигосахарида (Glc₃Man₉GlcNAc₂) к аргинину происходит в ретикулуме, после чего сначала в ретикулуме, а далее в аппарате Гольджи идет ремоделирование и построение разветвленной структуры гликозильных N-гликанов [96]. После отщепления двух крайних остатков глюкозы гликозидазами мономер связывается с лектинами ретикулума калнексином и калретикулином и происходит его сворачивание (фолдинг). По завершению фолдинга белок далее транспортируется в аппарат Гольджи, где продолжается модификация N-гликанов. В итоге образуются сложные гетерогенные углеводные структуры, в их формировании принимают участие многочисленные гликозилтрансферазы. Образуется три группы N-гликанов – наиболее близкие к исходной структуре богатые маннозой гликаны, гибридные гликаны и комплексные гликаны (complex-type) с двух-, трех- и четырехантенными цепями. Доминирующими формами являются моно- и дисиалированные двухантенные комплексные N-гликаны. У 15% N-гликанов имеются детерминанты групп крови AB0(H). 80% сиаловых кислот в молекуле фВ присоединены к N-гликанам и оставшиеся 20% к O-гликанам.

Связанные с серином или треонином олигосахариды (О-гликаны) синтезируются путем последовательного гликозилирования уже после выхода фВ из комплекса Гольджи [96]. По структуре О-гликаны гораздо проще N-гликанов. Из них только 1% несут AB0-детерминанты групп крови.

Эндотелиальные клетки являются главным источником циркулирующего в крови фВ [98]. Секретируемый тромбоцитами фВ, судя по экспериментам *in vitro*, остается связанным с рецепторами на тромбоцитарной мембране [99, 100]. В плазме крови происходит постепенное отщепление остатков сиаловых кислот от гликозильных остатков на молекуле фВ нейраминидазами. Этот процесс происходит при старении фВ. Десиалированный фВ имеет большую функциональную активность по сравнению с исходным — он вызывает спонтанную агрегацию тромбоцитов и сильнее связывает тромбоциты с коллагеном при напряжении сдвига [90].

Интересно, что фВ в тромбоцитах по характеру гликозилирования существенно отличается от этого гликопротеина в эндотелиальных клетках и от циркулирующего в крови фВ [98]. Тромбоцитарный фВ значительно беднее сиалированными N-гликанами, и у него отсутствуют детерминанты групп крови [96]. фВ тромбоцитов хуже связывается с GPIbα и сильнее с интегрином GPIIb/IIIa и гепарином.

СВЯЗЫВАНИЕ ТРОМБОЦИТОВ С ФАКТОРОМ ВИЛЛЕБРАНДА

Тромбоциты содержат 2 рецептора, которые связывают VWF: комплекс гликопротеина Ib-IX-V (GPIb-IX-V) и интегрин α IIb β 3 (GPIIb-IIIa). В местах повреждения сосудов экспонируется субэндотелиальная поверхность, к которой прикрепляются нити фВ. В микрососудах или в местах сужения артерий в условиях высокого напряжения сдвига прикрепленные к поверхности мультимерные молекулы фВ разворачиваются и на них раскрываются участки, соответствующие пептидной цепи от Leu-480/Val-481 до Gly-718 в первичной молекуле мономера [101]. Комплекс GPIb-IX-V на мембране тромбоцитов взаимодействует с этими последовательностями на молекуле фВ. Узнавание комплекса GPIb-IX-V обеспечивает участок Asp-514-Glu-542 внутри этих сайтов [17]. Вторым рецептором фВ на поверхности тромбоцитов является интегрин αIIbβ3 (GPIIb-IIIa). С GPIIb-IIIa связываются фВ и фибриноген, формируя молекулярные мостики между агрегирующими тромбоцитами. Количество GPIIb-IIIa на поверхности тромбоцитов коррелирует со степенью ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов здоровых доноров и больных с острым коронарным синдромом [102]. При низких значениях напряжения сдвига в отсутствие фибриногена оба рецептора обеспечивают присоединение фВ при агрегации тромбоцитов [103]. При высоком значении напряжения сдвига важным фактором агрегации становиться взаимодействие фВ с GPIb-IX-V [104]. Каневой и соавт. [105] предложена математическая модель, описывающая роль рецепторов фВ в адгезии и последующем тромбообразовании.

Рецептор фВ GPIb-IX-V экспрессируется только в тромбоцитах в количестве примерно 25000 рецепторных комплексов на клетку. В состав GPIb-IX-V входят по 2 субъединицы GPIba, GP1bβ, GPIX и 1 субъединица GPV [35]. фВ связывается с участком 1-282 внеклеточной части GPIba. В молекуле фВ сайт связывания с GPIba находится в домене А1. Помимо фВ лигандами GPIbα являются также тромбоспондин, фактор XII, фактор XI, тромбин, высокомолекулярный кининоген, Р-селектин и Мас-1. Взаимодействие фВ и гликопротеина Ib-IX-V не ограничивается только пассивным присоединением тромбоцитов к этому белковому комплексу. Через свой цитоплазматический хвостовой домен (Phe568-Trp570), GPIbα взаимодействует с PI3-киназой, актинсвязывающим белком фламином, адапторным белком 14-3-3 Связывание фВ с GPIb-IX-V вызывает активацию тромбоцитов и переход интегрина αПbβ3 из низкоаффинного в высокоаффинное состояние, в котором он способен взаимодействовать с доменом С4 в мономере фВ. Это способствует устойчивому прикреплению тромбоцитов к фВ и их распластыванию. Вопрос о том, как взаимодействие VWF/GPIb-IX-V способствует активации тромбоцитов, все еще остается спорным. Разные сигнальные пути активируются в зависимости от величины напряжения сдвига. В активации тромбоцитов, вызванной GPIb-IX-V, показано участие нескольких внутриклеточных молекул — киназ семейства Src, Rac1, PI3-киназы/Akt, cGMP-киназы и MAP-киназы [35].

ОБМЕН ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Как отмечено выше, эндотелиальные клетки постоянно секретируют фВ в апикальном направлении в плазму крови и в базальном направлении в межклеточное пространство. При активации клеток агонистами секреция фВ в кровь

увеличивается. В норме в условиях кровотока нити фВ, выходящие из секреторных пузырьков, в которых аккумулируется фВ из нескольких телец Вейбеля-Паладе, расщепляются протеазой ADAMTS13 [39]. Сверхкрупные мультимеры частично расшепляются и в плазме при разворачивании их в быстром потоке. Благодаря этому поддерживается баланс между крупными мультимерными, средними и мелкими олигомерными формами фВ. В обзоре Садлера [106] приводится среднее значение для уровня антигена фВ в плазме, которое составляет около 100 МЕ/дл. По данным других исследователей [107], концентрация антигена фВ у здоровых доноров составляет 61 ME/дл (95%CI:51-91 ME/дл). Одна международная единица (МЕ) соответствует 10 мкг фВ. Если выражать содержание фВ в других единицах (мкг в мл), среднее значение концентрации составляет около 10 мкг/мл, причем у людей с группой крови 0(I) оно на 20–25% ниже [108, 109]. Десмопрессин, аналог вазопрессина с заменой L-аргинина на D-аргинин, действующий через V2-рецепторы [110], вызывает практически немедленный 2-кратный подъем уровня антигена фВ в плазме крови человека, сохраняющийся в течение не менее 2 ч и возвращающийся к норме через 24 ч. Введение здоровым донорам гистамина или эндотелина-1 повышало уровень фВ в плазме на 11% [111] и 19% [112], соответственно. Сильно выраженные изменения наблюдаются при системном воспалении, вызванном внутривенным введением 2 нг/кг эндотоксина здоровым добровольцам. Через 4 ч уровень антигена фВ возрастал на 259%, через 24 ч на 192% и через 7 дней возвращался к норме [113]. Было исследовано, как агонисты, активирующие эндотелиальные клетки, влияют на секрецию других белков, находящихся в тельцах Вейбеля-Паладе. Поступление в кровь протегерина не изменяется при введении десмопрессина и возрастает в 2 раза в ответ на липополисахарид [114]. Это говорит о том, что десмопрессин и липополисахарид in vivo вызывают экзоцитоз из разных популяций телец Вейбеля-Паладе. Десмопрессин стимулирует секрецию фВ в кровь, но при этом не вызывает поступления в кровь Р-селектина [107], что также подтверждает действие этого агониста на отдельную популяцию телец Вейбеля-Паладе.

Продолжительность жизни фВ варьирует от 4.2 до 26 ч (меньше у группы 0(I), чем у AB(IV)) [35]. Предполагалось, что выведение фВ из плазмы происходит после его расщепления металлопротеазой ADAMTS13. Однако разными способами было показано, что это не так. У пациентов с болезнью Виллебранда 1-типа или с гемофилией А скорость снижения уровня фВ после введения десмопрессина не зависит от активности ADAMTS13 [115]. Опыты на мышах ADAMTS-13+/+ и ADAMTS-13-/- также показали, что скорость выведения фВ не зависит от присутствия этого фермента в крови [116].

Согласно имеющимся данным, клиренс фВ происходит в результате его захвата макрофагами, эндотелиальными клетками синусов печени и гепатоцитами (см. обзор [117]), причем основную роль играют макрофаги. При введении мышам в кровь радиоактивно меченного фВ он накапливается большей частью в печени и в значительно меньшем количестве в селезенке и почках [118, 119]. Выведение крупных и мелких мультимеров проходило с одинаковой скоростью.

При захвате макрофагами, эндотелиоцитами и гепатоцитами фВ он сначала связывается рецепторами на плазматической мембране. Присоединение фВ осуществляют два типа рецепторов – лектины и скэвенджер-рецепторы (scavenger receptors) [117]. Связывание фВ лектинами и последующий клиренс зависят от наличия сиаловой кислоты в гликозильных остатках. Сиаловая кислота защищает фВ от захвата отдельными видами лектиновых рецепторов [120-122]. В макрофагах фВ с десиалированными гликанами связывается с рецептором MGL (macrophage galactose-type lectin) [123], в гепатоцитах – с рецептором AMR (Ashwell-Morell receptor) [124, 125]. Значение MGL для клиренса фВ является преобладающим. Рецепторы MGL и AMR связываются с β-D-галактозой и N-ацетил-D-галактозамином. Эти углеводные остатки демаскируются после отщепления сиаловой кислоты при старении фВ. Рецептор MGL присоединяет также гипосиалированный фВ [123, 126]. Помимо MGL и AMR в макрофагах экспрессируется рецептор лектинового типа. связывающий сиалированный фВ. Это лектин Siglec-5 (sialic-acid binding immunoglobulin-like lectin) [127, 128]. Он присутствует также в нейтрофилах и Т-лимфоцитах [129]. Рецептор фВ CLEC4M (C-type lectin domain family 4 member M), специфически связывающий маннозу [130], экспрессируется в эндотелиальных клетках синусоидов печени и в лимфатических узлах [131].

К скэвенджер-рецепторам, осуществляющим захват фВ, относятся рецепторы LRP1 (lipoprotein receptor-related protein-1) [132] и SR-A1 (scavenger receptor class A member I) [133] в макрофагах и стабилин-2 в эндотелиальных клетках синусоидов печени [134]. фВ связывается с LRP1 участками, расположенными в доменах A1A2A3 [135]. Наличие N-гликанов защищает фВ от фагоцитоза макрофагами печени и селезенки, опосредованного рецепторами LRP1. В регуляции связывания фВ с SR-A1 участвуют участок пептидной цепи доменов D'D3, домен A1 и домен D4 [136].

Вторым хранилищем фВ в крови являются тромбоциты. Содержание фВ в тромбоцитах составляет 15–20% от общего количества фВ в крови или в пересчете на количество клеток 2.8 мкг в

10⁹ тромбоцитов [99]. фВ секретируется из альфагранул при активации тромбоцитов под действием ADP, коллагена, тромбина [137]. В экспериментах со свиньями показано, что секреция фВ из тромбоцитов не оказывает заметного влияния на обший уровень фВ в плазме крови [98]. Секретируемый из альфа-гранул фВ при наличии в среде ионов кальция связывается с тромбоцитами [99, 100]. Количество секретируемого тромбоцитами фВ можно определить, если в среду добавлять хелатор двухвалентных катионов. В бескальциевой среде в условиях *in vitro* концентрация свободного фВ при активации тромбоцитов в суспензии может подниматься до 50 МЕ/дл или 5 мкг/мл [138]. Тромбоцитарный фВ играет важную роль в адгезии тромбоцитов к коллагену в условиях напряжения сдвига [98]. В экспериментах со свиньями показано, что тромбоцитарный фВ, в отличие от фВ. циркулирующего в плазме, не принимает непосредственного участия в образовании артериальных тромбов [139].

НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА КАК ПРИЧИНА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО КРОВОТЕЧЕНИЯ И ТРОМБОЗОВ

Кривая частоты распределения фВ по содержанию в плазме крови людей (рис. 2) имеет несимметричную колоколообразную форму с расположением 95% всех значений в приблизительном интервале от 50 до 200 МЕ/дл [104]. Популяционный анализ показывает, что при крайне высоких и крайне низких значениях содержания фВ повышен риск тромбозов и кровотечений соответственно. Как отмечено выше, средний уровень фВ в плазме для людей с разными группами крови различается. и это не позволяет строго определить те границы, в которые укладываются относительно нормальные значения этого показателя. Выявлены мутации в гене фВ, которые приводят к снижению продукции фВ. Примерная зависимость между наличием мутаций и содержанием антигена фВ в плазме показана тонкой линией (рис. 2). Как будет показано ниже, более объективным критерием для определения патологического состояния является определение мультимерного состава фВ и его активности в тесте агглютинации с ристоцетином [140].

БОЛЕЗНЬ ВИЛЛЕБРАНДА

Причинами болезни Виллебранда являются сниженное содержание фВ в плазме крови или структурно-функциональные нарушения в молекуле фВ [29, 140]. Болезнь Виллебранда — это наиболее распространенное наследственное нарушение свертывания крови. Для него характерны частые гематомы (подкожные кровоизлия-



Рис. 2. Связь между содержанием фВ в плазме и риском развития кровотечений и тромбозов и мутациями в гене фВ. Прерывистые линии отражают связь между содержанием антигена фВ в плазме и относительным риском кровотечений или тромбозов. Тонкой сплошной линией показана зависимость между наличием мутаций в гене фВ и продукцией фВ. Относительный риск кровотечений или тромбозов принят за единицу при содержании фВ 100 МЕ/дл. Адаптировано из [106].

ния), аномально длительные кровотечения после незначительных травм и кровоточивость поверхностей слизистых оболочек, включая слизистую желудочно-кишечного тракта. Известно по меньшей мере 20 разновидностей болезни Виллебранда [29]. Они подразделяются на 3 типа. Признаком первого типа является снижение содержания фВ в плазме крови – менее 30 мкг/мл [141]. Соотношение мультимеров фВ при первом типе болезни Виллебранда соответствует норме (рис. 3*a*). Причиной сниженного содержания фВ может быть уменьшение синтеза/секреции фВ [142] или более быстрый клиренс фВ [141]. Для 1-го типа болезни Виллебранда в основном характерно аутосомно-доминантное наследование. Выявлено более 10 мутаций, вызывающих развитие этой формы заболевания [143]. Большинство этих мутаций вызывают снижение секреции фВ эндотелием.

При третьем типе болезни Виллебранда, который наследуется аутосомно-рецессивно, фВ в плазме практически полностью отсутствует (рис. 3*в*). Концентрация фВ в плазме меньше 3 мкг/мл рассматривается как диагностический признак 3-го типа болезни Виллебранда. При 3-м типе болезни Виллебранда резко снижено содержание фактора VIII свертывание крови. Известно более 80 мутаций разного характера, приводящих к этому типу данной патологии [144].

Болезнь Виллебранда 2-го типа вызвана мутациями, приводящими к структурным и функциональным изменениям фВ. Мультимерный состав фВ при разных видах болезни Виллебранда 2-го

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

типа представлен в ряде публикаций [145–147]. Есть следующие подтипы 2-го типа болезни Виллебранда – 2А (аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный), 2В (аутосомно-доминантный), 2М (аутосомно-доминантный) и 2N (аутосомно-рецессивный) [148]. При 2А, 2В и 2N подтипах в плазме снижено относительное содержание сверхкрупных и крупных мультимеров фВ. Пример мультимерного состава фВ при 2-м типе болезни Виллебранда представлен на рис. 36. Классификация наследственных форм болезни Виллебранда рассмотрена в сводке данных международных исследований [149].

Тип 2А характеризуется сниженным сродством фВ к тромбоцитам вследствие падения уровня высокомолекулярных мультимеров фВ в плазме. Эта патология ассоциирована с более чем 50 различными миссенс-мутациями, которые приводят к двум типам патогенетических механизмов: нарушению биосинтеза димера или мультимера фВ (мутации группы 1), либо к биосинтезу белка с повышенной чувствительностью к протеолизу металлопротеазой ADAMTS13 (мутации группы 2) [144]. Мутации 1 группы приводят к аминокислотным заменам в пропептиде фВ, в доменах D3 и A2 и на С-конце зрелой субъединицы фВ. Мутации, приводящие к ускоренному протеолизу фВ, локализованы в участке экзона 28, кодирующем А2-домен.

Тип 2В болезни Виллебранда включает патологические формы, при которых повышено сродство фВ к гликопротеину 1В тромбоцитов. Мутации вызывают аминокислотные замены в домене



Рис. 3. Изменения мультимерного состава фактора Виллебранда, характерные для болезни Виллебранда I (*a*), II (*b*) и III (*b*) типа. К – мультимеры фВ в плазме здоровых доноров. Электрофорез проводили в 1.5% агарозе, переносили белки на нитроцеллюлозную мембрану, инкубировали с антителами против фВ и вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Проявление проводили с помощью дитионитробензоата.

А1 и также локализованы в домене 28 [144]. При 2В-типе происходит спонтанное связывание фВ с тромбоцитами и выведение крупных мультимеров из кровотока.

Тип 2М включает варианты фВ со сниженным сродством к тромбоцитам при нормальном соотношении мультимеров. Это обусловлено аминокислотной заменой, нарушающей фолдинг петли домена A1 и тем самым приводящей к снижению сродства к гликопротеину 1b тромбоцитов [150].

Тип 2N (Normandy) вызван мутациями в сайте связывания фактора VIII, расположенном в доменах D' и D3 на N-конце молекулы фВ [151]. Наиболее частая причина этого фенотипа – мутация R854Q. При 2N-типе отсутствуют минорные полосы в триплетах мультимеров фВ, снижена секреция и содержание крупных мультимеров.

Количественное соотношение больных разными типами болезни Виллебранда было проанализировано во Франции (общее число установленных случаев 1167 из 670 семей). Показано, что 25% составляют больные с типом 1, 8% типом 3, 66% типом 2 (2A: 18%, 2B: 17%, 2M: 19%, 2N: 12%) и 1% больных с неопределенным типом [152].

Приобретенная форма болезни Виллебранда в ряде случаев вызвана расшеплением сверхкрупных мультимеров фВ в условиях высокого напряжения сдвига [153]. По мультимерному составу фВ данная форма похожа на болезнь Виллебранда 2А-типа. Эта разновидность приобретенной болезни Виллебранда наблюдается при стенозе аорты и сопровождается кровотечением в желудочно-кишечном тракте [154]. Снижение содержания фВ может быть вызвано образованием аутоантител, причем в части случаев они избирательно направлены на фВ в активированном состоянии [155]. Приобретенная форма болезни Виллебранда бывает ассоциирована с лимфопролиферативными и миелопролиферативными заболеваниями.

ОБМЕН ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА ПРИ ТРОМБОТИЧЕСКИХ МИКРОАНГИОПАТИЯХ

Повышенная активность фВ в плазме крови, вызванная увеличением доли тромбогенных высокомолекулярных мультимеров фВ при нор-

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021



Рис. 4. Мультимерный состав фВ в плазме крови больной с ТМА неясной природы (*a*), больной с аутоиммунной ТТП (*b*), онкологического больного в терминальной стадии (*в*). Б – плазмы больных, К – контрольные плазмы здоровых доноров. Б', Б'', Б''' – плазма больной до и через 10 и 20 дней после начала плазмообменов. Условия электрофореза и анализа мультимерного состава фВ приведены в подписи к рис. 3.

мальном уровне его секреции или обусловленная общим ростом поступления фВ в плазму из эндотелия, является причиной тромбозов при тромботических микроангиопатиях [106, 156]. Тромботические микроангиопатии (ТМА) включают наследственную (синдром Апшоу–Шульмана) или аутоиммунную формы тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), ТМА, вызванные раком, инфекциями, трансплантацией, химиотерапией и некоторыми лекарствами, а также гемолитико-уремический синдром (ГУС), ассоциированный с инфекцией кишечной палочкой, производящей Shiga-токсин, и атипичный ГУС, вызванный наследственными или приобретенными нарушениями в системе комплемента [157]. При беременности и в послеродовой период встречаются случаи ТМА, ассоциированной с HELLP-синдромом и преэклампсией [158]. При аутоиммуной ТТП активность ADAMTS13 падает ниже 10% от нормального уровня. Снижение вызвано выработкой ингибиторных аутоантител против ADAMTS13. При других формах TMA уровень активности ADAMTS13 не падает ниже 20% [159]. Мы исследовали мультимерный состав фВ у больной с ТМА неясной этиологии и у больной с аутоиммунной ТТП, развившейся на поздних сроках беременности и после родоразрешения, а также у онкологического больного в терминальной стадии (рис. 4). Активности ADAMTS13 у больных с ТМА и аутоиммунной ТТП составляли соответственно 53% и менее 5% от нормы (рис. 5а). Эти показатели были определены в остром периоде болезни. У больной с ТМА в плазме крови наблюдалось заметное увеличение содержания фВ, что видно по яркости полос мультимеров фВ (рис. 4*a*). Нарастание уровня фВ в плазме данной больной, по всей вероятности, есть результат его повышенного производства, вызванного воспалительной реакцией в эндотелии. Но при этом отчетливо вилно. что относительное солержание сверхкрупных мультимеров резко снижено. Причиной уменьшения доли сверхкрупных мультимеров на фоне общего повышенного уровня антигена фВ является потребление их во время тромбообразования в микрососудах. Аналогичная картина может наблюдаться при терминальной стадии онкологического заболевания (рис. 4в). В плазме больного было существенно повышено содержание антигена фВ, но при этом доля тромбогенных сверхкрупных мультимеров фВ резко снижена (рис. 4в).

На рис. 4 δ приведены электрофореграммы мультимеров фВ в плазме больной с аутоимунной ТТП на высоте клинических проявлений и через 10 и 20 дней после проведения интенсивных плазмообменов. Клинические картина ТТП проявилась в конце беременности и нарастала после родоразрешения: гемолитический криз с активностью лактатдегидрогеназы (ЛДГ), превышающей 20 норм, тромбоцитопения, шистоцитоз в мазке крови, неврологические нарушения завершились комой. В этот момент анализ мультимерного состава фВ показал снижение относительного содержания сверхкрупных и крупных мультимеров (рис. 4 δ). Однако при этом не было повышения уровня антигена фВ по сравнению с контролем.



Рис. 5. *а* – Активность ADAMTS13 в плазме крови больной с ТМА неясной этиологии и больной с ТТП. *б* – Содержание антигена фВ и активность фВ в плазме больной с ТТП до начала (0) и через 10, 20 и 75 дней после начала плазмообменов. Активности ADAMTS13 и фВ выражены в % от среднего значения этих показателей у здоровых доноров. Активность фВ определяли в тесте агрегации лиофилизированных тромбоцитов с ристоцетином с использованием агрегометра НПФ "Биола" и диагностического набора НПО "Ренам".

как у больной с ТМА (рис. 4а). Наоборот, содержание антигена фВ в острой фазе не превышало средний уровень в норме, который составляет, по разным данным, от 6.1 [107] до 10 мкг/мл [106]. Через 10 дней после эффективных плазмообменов стали заметны изменения мультимерного состава фВ. Появились полосы сверхкрупных мультимеров, выросло их относительное содержание, что было расценено как торможение тромбообразования. Об этом же говорило прекращение гемолиза, увеличение числа тромбоцитов в крови больной от 20-30 × 10⁹ до 120 × 10⁹/л, нормализация активности ЛДГ. Через 20 дней после начала плазмообменов мультимерный состав фВ еще более приблизился к норме. Яркость полос уменьшилась, что свидетельствовало о понижении содержания антигена фВ, но сохранялся повышенный уровень сверхкрупных мультимеров. Изменения мультимерного состава фВ коррелировали с данными количественного определения антигена и активности фВ (рис. 56). Как уже отмечено выше, в момент пика болезни содержание в плазме антигена ϕB и активность ϕB , которую определяли в тесте агглютинации с ристоцетином, практически не превышали норму. Небольшой рост концентрации антигена фВ происходил через 10 дней после начала плазмообменов. Но в это же время происходило резкое увеличение активности фВ, что отражает появление в плазме тромбогенных сверхкрупных мультимеров. Через 20 дней отмечалось постепенное снижение активности фВ, спустя 2.5 месяца активность фВ вернулась к исходной практически нормальной величине, а содержание антигена опустилось ниже первоначального уровня.

Общим признаком всех трех описанных патологических состояний является снижение в момент обострения болезни доли сверхкрупных мультимеров фВ, которые потребляются в процессах тромбообразования. Причины исходного повышения уровня сверхкрупных тромбогенных мультимеров фВ различны. При аутоиммунной ТТП количество секретируемого фВ, судя по приведенным данным, не превышает норму, но на фоне нулевой активности ADAMTS13 система менее устойчива, так как исходно соотношение мультимеров сдвинуто в сторону сверхкрупных форм, и тромбозы инициируются легче. При ТМА неясной этиологии и при онкологическом заболевании в финальной стадии, по-видимому, происходит гиперпродукция фВ. Остается не ясным, что является триггером, запускающим тромбообразование, поскольку для этого недостаточно только наличия сверхкрупных мультимеров. Есть данные о связи тромбозов и воспалительных процессов в сосудах [74]. В частности, известно, что фактор комплемента С5а вызывает экзоцитоз Р-селектина и фВ [160]. Однако обсуждение данной проблемы выходит за рамки настоящего обзора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прошло без малого 100 лет с открытия заболеваний, связанных с нарушением обмена фактора Виллебранда. С тех пор показано, что этот уникальный гликопротеин, имеющий много мультимерных форм, различающийся у разных людей по характеру гликозилирования и полиморфизму, играет очень важную роль в реализации нормальных функций организма и в патогенезе многих болезней [161]. Исследования фактора Виллебранда интенсивно проводятся в течение последних десятков лет. Охарактеризованы генетические формы и пути превращения фВ в плазме крови, выявлено, как эти процессы связаны с патогенезом отдельных разновидностей болезни Виллебранда и аутоиммунной тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Наименее исследованным представляется вопрос о том, чем определяется избыточная секреция фВ, которая является, по-видимому, одной из причин крайне тяжелых и не всегда поддающихся эффективному лечению форм тромботической микроангиопатии. И кроме того, требует изучения вопрос о том, какие дополнительные факторы инициируют тромбозы при повышенной активности фВ в плазме.

Источники финансирования. Авторы благодарны проф. А.В. Мазурову за ценные замечания при обсуждении данной статьи и Е.Е. Ефремову за помощь при определении содержания антигена фВ в плазме крови. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00441).

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

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. von Willebrand A. 1926. Hereditar pseudohemofili. *Finska Lakarsallskapetes Handl.* **67**, 7–112.
- Favaloro E. J. 2014. Diagnosing von Willebrand disease: A short history of laboratory milestones and innovations, plus current status, challenges, and solutions. *Semin Thromb Hemost.* 40, 551–570. https://doi.org/10.1055/s-0034-1383546
- 3. Nilsson I.M., Blomback M., Jorpes E., Blomback B., Johansson S.A. 1957. Von Willebrand's disease and its correction with human plasma fraction 1-0. *Acta Med. Scand.* **159**, 179–188. https://doi.org/10.1111/j.0054.6820.1057.tb00123.x
 - https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1957.tb00123.x
- Cornu P., Larrieu M.J., Caen J., Bernard J. 1963. Transfusion studies in von Willebrand's disease: Effect on bleeding time and factor VIII. *Br. J. Haematol.* 9,

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

189-202.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1963.tb05457.x

- 5. Hellem A.J. 1960. The adhesiveness of human blood platelets in vitro. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **12 Suppl**, 1–117.
- Bowie E.J., Owen C.A., Jr., Thompson J.H., Didisheim P. 1969. Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 52, 69–77. https://doi.org/10.1093/ajcp/52.1.69
- Bouma B.N., Van Mourik J.A. 2006. Unraveling the mystery of von Willebrand factor. *J. Thromb. Haemost.* 4, 489–495.
- https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01813.x
- Bouma B.N., Wiegerinck Y., Sixma J.J., Van Mourik J.A., Mochtar I.A. 1972. Immunological characterization of purified anti-haemophilic factor A (factor VIII) which corrects abnormal platelet retention in Von Willebrand's disease. *Nat. New Biol.* 236, 104–106. https://doi.org/10.1038/newbio236104a0
- Zimmerman T.S., Ratnoff O.D., Powell A.E. 1971. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's dissase, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. J. Clin. Invest. 50, 244–254. https://doi.org/10.1172/JCI106480
- van Mourik J.A., Bouma B.N., LaBruyere W.T., de Graaf S., Mochtar I.A. 1974. Factor VIII, a series of homologous oligomers and a complex of two proteins. *Thromb. Res.* 4, 155–164. https://doi.org/10.1016/0049-3848(74)90211-4
- Zimmerman T.S., Edgington T.S. 1973. Factor VIII coagulant activity and factor VIII-like antigen: Independent molecular entities. *J. Exp. Med.* 138, 1015– 1020.

https://doi.org/10.1084/jem.138.4.1015

- Meyer D., Obert B., Pietu G., Lavergne J.M., Zimmerman T.S. 1980. Multimeric structure of factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease. J. Lab. Clin. Med. 95, 590–602.
- 13. Ruggeri Z.M., Zimmerman T.S. 1981. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. *Blood.* 57, 1140–1143.
- Counts R.B., Paskell S.L., Elgee S.K. 1978. Disulfide bonds and the quaternary structure of factor VIII/von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 62, 702–709. https://doi.org/10.1172/JCI109178
- 15. Howard M.A., Firkin B.G. 1971. Ristocetin a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **26**, 362–369.
- Holmberg L., Nilsson I.M. 1972. Genetic variants of von Willebrand's disease. *Br. Med. J.* 3, 317–320. https://doi.org/10.1136/bmj.3.5822.317
- Berndt M.C., Ward C.M., Booth W.J., Castaldi P.A., Mazurov A.V., Andrews R.K. 1992. Identification of aspartic acid 514 through glutamic acid 542 as a glycoprotein Ib-IX complex receptor recognition sequence in von Willebrand factor. Mechanism of modulation of von Willebrand factor by ristocetin and botrocetin. *Biochemistry.* 31, 11144–11151. https://doi.org/10.1021/bi00160a027

- Moschcowitz E. 1925. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: an undescribed disease. *Arch. Intern. Med.* 36, 89–93.
- Moake J.L., Rudy C.K., Troll J.H., Weinstein M.J., Colannino N.M., Azocar J., Seder R.H., Hong S.L., Deykin D. 1982. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 307, 1432–1435. https://doi.org/10.1056/NEJM198212023072306
- Furlan M., Robles R., Solenthaler M., Wassmer M., Sandoz P., Lammle B. 1997. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 89, 3097–3103.
- Tsai H.M., Lian E.C. 1998. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 339, 1585–1594.

https://doi.org/10.1056/NEJM199811263392203

- Kwaan H.C., Bennett C.L. 2005. Thrombotic thrombocytopenic purpura-2005. Semin. Thromb. Hemost. 31, 611–614. https://doi.org/10.1055/s-2005-925466
- Moake J.L., Byrnes J.J., Troll J.H., Rudy C.K., Weinstein M.J., Colannino N.M., Hong S.L. 1984. Abnormal VIII: von Willebrand factor patterns in the plasma of patients with the hemolytic-uremic syndrome. *Blood.* 64, 592–598.
- Terraube V., O'Donnell J.S., Jenkins P.V. 2010. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: Biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia*. 16, 3–13.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2009.02005.x

- 25. Verweij C.L., de Vries C.J., Distel B., van Zonneveld A.J., van Kessel A.G., van Mourik J.A., Pannekoek H. 1985. Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colonyscreening and mapping of the chromosomal gene. *Nucleic Acids Res.* 13, 4699–4717. https://doi.org/10.1093/nar/13.13.4699
- Mancuso D.J., Tuley E.A., Westfield L.A., Worrall N.K., Shelton-Inloes B.B., Sorace J.M., Alevy Y.G., Sadler J.E. 1989. Structure of the gene for human von Willebrand factor. J. Biol. Chem. 264, 19514–19527.
- Collins C.J., Underdahl J.P., Levene R.B., Ravera C.P., Morin M.J., Dombalagian M.J., Ricca G., Livingston D.M., Lynch D.C. 1987. Molecular cloning of the human gene for von Willebrand factor and identification of the transcription initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84, 4393–4397. https://doi.org/10.1073/pnas.84.13.4393
- Jahroudi N., Lynch D.C. 1994. Endothelial-cell-specific regulation of von Willebrand factor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 14, 999–1008.
- 29. Tuddenham E.G. 1989. von Willebrand factor and its disorders: An overview of recent molecular studies. *Blood Rev.* **3**, 251–262.
- 30. Gogia S., Neelamegham S. 2015. Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and

related blood disorders. *Biorheology*. **52**, 319–335. https://doi.org/10.3233/BIR-15061

- Lenting P.J., Casari C., Christophe O.D., Denis C.V. 2012. von Willebrand factor: The old, the new and the unknown. J. Thromb. Haemost. 10, 2428–2437. https://doi.org/10.1111/jth.12008
- Zenner H.L., Collinson L. M., Michaux G., Cutler D.F. 2007. High-pressure freezing provides insights into Weibel-Palade body biogenesis. J. Cell. Sci. 120, 2117– 2125. https://doi.org/10.1242/jcs.007781

 Wagner D.D., Marder V.J. 1984. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *J. Cell. Biol.* 99, 2123–2130.

https://doi.org/10.1083/jcb.99.6.2123

 Nightingale T.D., McCormack J.J., Grimes W., Robinson C., Lopes da Silva M., White I.J., Vaughan A., Cramer L.P., Cutler D.F. 2018. Tuning the endothelial response: Differential release of exocytic cargos from Weibel-Palade bodies. *J. Thromb. Haemost.* 16, 1873– 1886. https://doi.org/10.1111/jth.14218

 Bryckaert M., Rosa J.P., Denis C.V., Lenting P.J. 2015. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 307–326. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1743-8

- 36. Huang R.H., Wang Y., Roth R., Yu X., Purvis A.R., Heuser J.E., Egelman E.H., Sadler J.E. 2008. Assembly of Weibel-Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 482–487. https://doi.org/10.1073/pnas.0710079105
- 37. Dong J.F., Whitelock J., Bernardo A., Ball C., Cruz M.A. 2004. Variations among normal individuals in the cleavage of endothelial-derived ultra-large von Willebrand factor under flow. J. Thromb. Haemost. 2, 1460–1466. doi JTH830 https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00830.x
- De Ceunynck K., De Meyer S.F., Vanhoorelbeke K. 2013. Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle. *Blood.* 121, 270–277. https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442285
- 39. Dong J.F., Moake J.L., Nolasco L., Bernardo A., Arceneaux W., Shrimpton C.N., Schade A.J., McIntire L.V., Fujikawa K., Lopez J.A. 2002. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood.* 100, 4033–4039. https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1401
- Mourik M., Eikenboom J. 2017. Lifecycle of Weibel-Palade bodies. *Hamostaseologie*. 37, 13–24. https://doi.org/10.5482/HAMO-16-07-0021
- van Breevoort D., van Agtmaal E.L., Dragt B.S., Gebbinck J.K., Dienava-Verdoold I., Kragt A., Bierings R., Horrevoets A.J., Valentijn K.M., Eikenboom J.C., Fernandez-Borja M., Meijer A.B., Voorberg J. 2012. Proteomic screen identifies IGFBP7 as a novel component of endothelial cell-specific Weibel-Palade bodies. J. Proteome Res. 11, 2925–2936. https://doi.org/10.1021/pr300010r

 Rondaij M.G., Bierings R., Kragt A., van Mourik J.A., Voorberg J. 2006. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1002–1007.

https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000209501.56852.6c

 Fiedler U., Scharpfenecker M., Koidl S., Hegen A., Grunow V., Schmidt J.M., Kriz W., Thurston G., Augustin H.G. 2004. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 103, 4150–4156.

https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3685

- 44. Byzova T.V., Romanov Iu.A., Blasik T.N., Mazurov A.V. 1995. Interaction of a monoclonal antibody to P-selectin with activated platelets and endothelial cells. Heterogeneity of expressing P-selectin in human aorta endothelial cells. *Biokhimiia (Rus.)*. 60, 1292–1301.
- 45. Lenting P.J., Christophe O.D., Denis C.V. 2015. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood.* **125**, 2019–2028. https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-528406
- 46. Cramer E.M., Meyer D., le Menn R., Breton-Gorius J. 1985. Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies. *Blood.* 66, 710–713.
- Valentijn K.M., van Driel L.F., Mourik M.J., Hendriks G.J., Arends T.J., Koster A.J., Valentijn J.A. 2010. Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood.* 116, 1807–1816.

https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-274209

- Valentijn K.M., Eikenboom J. 2013. Weibel-Palade bodies: A window to von Willebrand disease. J. Thromb. Haemost. 11, 581–592. https://doi.org/10.1111/jth.12160
- 49. Torisu T., Torisu K., Lee I.H., Liu J., Malide D., Combs C.A., Wu X.S., Rovira, II, Fergusson M.M., Weigert R., Connelly P.S., Daniels M.P., Komatsu M., Cao L., Finkel T. 2013. Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor. *Nat. Med.* **19**, 1281–1287. https://doi.org/10.1038/nm.3288
- Antonova O.A., Loktionova S.A., Golubeva N.V., Romanov Y.A., Mazurov A.V. 2007. Damage and activation of endothelial cells during in vitro hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 144, 504–506. https://doi.org/10.1007/s10517-007-0362-x
- Okhota S., Melnikov I., Avtaeva Y., Kozlov S., Gabbasov Z. 2020. Shear stress-induced activation of von Willebrand factor and cardiovascular pathology. *Int. J. Mol. Sci.* 21. https://doi.org/10.3390/ijms21207804
- 52. Lopes da Silva M., Cutler D.F. 2016. von Willebrand factor multimerization and the polarity of secretory pathways in endothelial cells. *Blood.* **128**, 277–285. https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-677054
- Rondaij M.G., Bierings R., Kragt A., van Mourik J.A., Voorberg J. 2006. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1002–1007. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000209501.56852.6c

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

- 54. Sporn L.A., Marder V.J., Wagner D.D. 1986. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell.* 46, 185–190. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90735-x
- 55. Vischer U.M., Barth H., Wollheim C.B. 2000. Regulated von Willebrand factor secretion is associated with agonist-specific patterns of cytoskeletal remodeling in cultured endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 883–891.
- 56. Birch K.A., Pober J.S., Zavoico G.B., Means A.R., Ewenstein B.M. 1992. Calcium/calmodulin transduces thrombin-stimulated secretion: studies in intact and minimally permeabilized human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **118**, 1501–1510. https://doi.org/10.1083/jcb.118.6.1501
- Vischer U.M., Wollheim C.B. 1997. Epinephrine induces von Willebrand factor release from cultured endothelial cells: Involvement of cyclic AMP-dependent signalling in exocytosis. *Thromb. Haemost.* 77, 1182–1188.
- Kaufmann J.E., Oksche A., Wollheim C.B., Gunther G., Rosenthal W., Vischer U.M. 2000. Vasopressininduced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *J. Clin. Invest.* **106**, 107–116. https://doi.org/10.1172/JCI9516
- Cleator J.H., Zhu W.Q., Vaughan D.E., Hamm H.E. 2006. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood.* **107**, 2736–2744. https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2698
- 60. Rondaij M.G., Bierings R., van Agtmaal E.L., Gijzen K.A., Sellink E., Kragt A., Ferguson S.S., Mertens K., Hannah M.J., van Mourik J.A., Fernandez-Borja M., Voorberg J. 2008. Guanine exchange factor RalGDS mediates exocytosis of Weibel-Palade bodies from endothelial cells. *Blood.* **112**, 56–63. https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099309
- 61. de Leeuw H.P., Wijers-Koster P.M., van Mourik J.A., Voorberg J. 1999. Small GTP-binding protein RalA associates with Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Thromb. Haemost.* **82**, 1177–1181.
- Valentijn K.M., Sadler J.E., Valentijn J.A., Voorberg J., Eikenboom J. 2011. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood.* 117, 5033–5043. https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-267492
- 63. Kim K.S., Park J.Y., Jou I., Park S.M. 2010. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis by alpha-synuclein in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 21416– 21425.

https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103499

- 64. Rojo Pulido I., Nightingale T.D., Darchen F., Seabra M.C., Cutler D.F., Gerke V. 2011. Myosin Va acts in concert with Rab27a and MyRIP to regulate acute von-Willebrand factor release from endothelial cells. *Traffic.* **12**, 1371–1382. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01248.x
- 65. Conte I.L., Hellen N., Bierings R., Mashanov G.I., Manneville J.B., Kiskin N.I., Hannah M.J., Molloy J.E., Carter T. 2016. Interaction between MyRIP and the actin cytoskeleton regulates Weibel-Palade body trafficking and exocytosis. J. Cell. Sci. 129, 592–603. https://doi.org/10.1242/jcs.178285

- 66. Holthenrich A., Drexler H. C.A., Chehab T., Nass J., Gerke V. 2019. Proximity proteomics of endothelial Weibel-Palade bodies identifies novel regulator of von Willebrand factor secretion. *Blood.* **134**, 979–982. https://doi.org/10.1182/blood.2019000786
- Nightingale T.D., Pattni K., Hume A.N., Seabra M.C., Cutler D.F. 2009. Rab27a and MyRIP regulate the amount and multimeric state of VWF released from endothelial cells. *Blood.* 113, 5010–5018. https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-181206
- Bierings R., Hellen N., Kiskin N., Knipe L., Fonseca A.V., Patel B., Meli A., Rose M., Hannah M.J., Carter T. 2012. The interplay between the Rab27A effectors Slp4-a and MyRIP controls hormone-evoked Weibel-Palade body exocytosis. *Blood.* 120, 2757–2767.

https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-429936

- 69. Zografou S., Basagiannis D., Papafotika A., Shirakawa R., Horiuchi H., Auerbach D., Fukuda M., Christoforidis S. 2012. A complete Rab screening reveals novel insights in Weibel-Palade body exocytosis. J. Cell. Sci. 125, 4780–4790. https://doi.org/10.1242/jcs.104174
- 70. Schillemans M., Karampini E., van den Eshof B.L., Gangaev A., Hofman M., van Breevoort D., Meems H., Janssen H., Mulder A.A., Jost C.R., Escher J.C., Adam R., Carter T., Koster A.J., van den Biggelaar M., Voorberg J., Bierings R. 2018. Weibel-Palade body localized syntaxin-3 modulates von Willebrand factor secretion from endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 1549–1561.

https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310701

 Schillemans M., Karampini E., Hoogendijk A.J., Wahedi M., van Alphen F.P.J., van den Biggelaar M., Voorberg J., Bierings R. 2019. Interaction networks of Weibel-Palade body regulators syntaxin-3 and syntaxin binding protein 5 in endothelial cells. *J. Proteomics.* 205, 103417.

https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103417

72. Manneville J.B., Etienne-Manneville S., Skehel P., Carter T., Ogden D., Ferenczi M. 2003. Interaction of the actin cytoskeleton with microtubules regulates secretory organelle movement near the plasma membrane in human endothelial cells. J. Cell. Sci. 116, 3927–3938.

https://doi.org/10.1242/jcs.00672

73. Romani de Wit T., Rondaij M.G., Hordijk P.L., Voorberg J., van Mourik J.A. 2003. Real-time imaging of the dynamics and secretory behavior of Weibel-Palade bodies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 755– 761.

https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000069847.72001.E8

- Kawecki C., Lenting P.J., Denis C.V. 2017. von Willebrand factor and inflammation. J. Thromb. Haemost. 15, 1285–1294. https://doi.org/10.1111/jth.13696
- Chen J., Chung D.W. 2018. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13. *Blood*. **132**, 141–147. https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-769000
- Vischer U.M., Jornot L., Wollheim C.B., Theler J.M. 1995. Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured

human vascular endothelial cells. *Blood.* **85**, 3164–3172.

77. Yang S., Zheng Y., Hou X. 2019. Lipoxin A4 restores oxidative stress-induced vascular endothelial cell injury and thrombosis-related factor expression by its receptor-mediated activation of Nrf2-HO-1 axis. *Cell. Signal.* **60**, 146–153. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.05.002

https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.05.002

- Avdonin P.V., Tsitrina A.A., Mironova G.Y., Avdonin P.P., Zharkikh I.L., Nadeev A.D., Goncharov N.V. 2017. Hydrogen peroxide stimulates exocytosis of von Willebrand factor in human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Bull.* 44, 531–537. https://doi.org/10.1134/s106235901705003x
- 79. Avdonin P.P., Trufanov S.K., Rybakova E.Y., Tsitrina A.A., Goncharov N.V., Avdonin P.V. 2021. The use of fluorescently labeled ARC1779 aptamer for assessing the effect of H_2O_2 on von Willebrand factor exocytosis. *Biochemistry (Moscow).* **86**, 123–131. https://doi.org/10.1134/S0006297921020012
- Evangelista A.M., Thompson M.D., Bolotina V.M., Tong X., Cohen R.A. 2012. Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGFinduced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and endothelial cell migration. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 2327–2334.

https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.546

- Mo S.J., Son E.W., Rhee D.K., Pyo S. 2003. Modulation of TNF-alpha-induced ICAM-1 expression, NO and H2O2 production by alginate, allicin and ascorbic acid in human endothelial cells. *Arch. Pharm. Res.* 26, 244–251.
- Bernardo A., Ball C., Nolasco L., Moake J.F., Dong J.F. 2004. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 104, 100–106.

https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0107

- Matsushita K., Yamakuchi M., Morrell C.N., Ozaki M., O'Rourke B., Irani K., Lowenstein C.J. 2005. Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel-Paladebody exocytosis. *Blood.* 105, 207–214. https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1519
- Zhou Y.F., Eng E.T., Zhu J., Lu C., Walz T., Springer T.A. 2012. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood.* 120, 449– 458.

https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405134

- Zhang X., Halvorsen K., Zhang C.Z., Wong W.P., Springer T.A. 2009. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*. 324, 1330–1334. https://doi.org/10.1126/science.1170905
- 86. Huizinga E.G., Martijn van der Plas R., Kroon J., Sixma J.J., Gros P. 1997. Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: Implications for collagen binding. *Structure*. 5, 1147–1156. https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00266-9
- Shapiro S.E., Nowak A.A., Wooding C., Birdsey G., Laffan M.A., McKinnon T.A. 2014. The von Willebrand factor predicted unpaired cysteines are essential for secretion. *J. Thromb. Haemost.* 12, 246–254. https://doi.org/10.1111/jth.12466

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

- Dong X., Leksa N.C., Chhabra E.S., Arndt J.W., Lu Q., Knockenhauer K.E., Peters R.T., Springer T.A. 2019. The von Willebrand factor D'D3 assembly and structural principles for factor VIII binding and concatemer biogenesis. *Blood.* 133, 1523–1533. https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-876300
- Yee A., Kretz C.A. 2014. Von Willebrand factor: Form for function. *Semin. Thromb. Hemost.* 40, 17–27. https://doi.org/10.1055/s-0033-1363155
- Ward S., O'Sullivan J.M., O'Donnell J.S. 2019. von Willebrand factor sialylation-A critical regulator of biological function. *J. Thromb. Haemost.* 17, 1018– 1029.

https://doi.org/10.1111/jth.14471

- 91. Arya M., Anvari B., Romo G.M., Cruz M.A., Dong J.F., McIntire L.V., Moake J.L., Lopez J.A. 2002. Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: Studies using optical tweezers. *Blood.* **99**, 3971–3977. https://doi.org/10.1182/blood-2001-11-0060
- Pushin D.M., Salikhova T.Y., Zlobina K.E., Guria G.T. 2020. Platelet activation via dynamic conformational changes of von Willebrand factor under shear. *PLoS One.* 15, e0234501. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234501
- Zlobina K.E., Guria G.T. 2016. Platelet activation risk index as a prognostic thrombosis indicator. *Sci. Rep.* 6, 30508.

https://doi.org/10.1038/srep30508

94. Sadler J.E. 2008. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. **112**, 11–18.

https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078170

- 95. Brophy T.M., Ward S.E., McGimsey T.R., Schneppenheim S., Drakeford C., O'Sullivan J.M., Chion A., Budde U., O'Donnell J.S. 2017. Plasmin cleaves von Willebrand factor at K1491-R1492 in the A1-A2 linker region in a shear- and glycan-dependent manner in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 845–855. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308524
- 96. Preston R.J., Rawley O., Gleeson E.M., O'Donnell J.S. 2013. Elucidating the role of carbohydrate determinants in regulating hemostasis: insights and opportunities. *Blood.* **121**, 3801–3810. https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-415000
- 97. Canis K., McKinnon T.A., Nowak A., Haslam S.M., Panico M., Morris H.R., Laffan M. A., Dell A. 2012. Mapping the N-glycome of human von Willebrand factor. *Biochem. J.* 447, 217–228. https://doi.org/10.1042/BJ20120810
- McGrath R.T., McRae E., Smith O.P., O'Donnell J.S. 2010. Platelet von Willebrand factor – structure, function and biological importance. *Br. J. Haematol.* 148, 834–843.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08052.x

99. Schmugge M., Rand M.L., Freedman J. 2003. Platelets and von Willebrand factor. *Transfus. Apher. Sci.* 28, 269–277.

https://doi.org/10.1016/S1473-0502(03)00046-6

100. Furby F. H., Berndt M. C., Castaldi P. A., Koutts J. 1984. Characterization of calcium-dependent binding

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

of endogenous factor VIII/von Willebrand factor to surface activated platelets. *Thromb. Res.* **35**, 501–511. https://doi.org/10.1016/0049-3848(84)90282-2

- 101. Andrews R.K., Gorman J.J., Booth W.J., Corino G.L., Castaldi P.A., Berndt M.C. 1989. Cross-linking of a monomeric 39/34-kDa dispase fragment of von Willebrand factor (Leu-480/Val-481-Gly-718) to the N-terminal region of the alpha-chain of membrane glycoprotein Ib on intact platelets with bis(sulfosuccinimidyl) suberate. *Biochemistry*. 28, 8326–8336. https://doi.org/10.1021/bi00447a010
- 102. Yakushkin V.V., Zyuryaev I.T., Khaspekova S.G., Sirotkina O.V., Ruda M.Y., Mazurov A.V. 2011. Glycoprotein IIb-IIIa content and platelet aggregation in healthy volunteers and patients with acute coronary syndrome. *Platelets*. 22, 243–251. https://doi.org/10.3109/09537104.2010.547959
- 103. Naimushin Y.A., Mazurov A.V. 2004. Von Willebrand factor can support platelet aggregation via interaction with activated GPIIb-IIIa and GPIb. *Platelets.* 15, 419–425.

https://doi.org/10.1080/09537100410001721333

- 104. Wu Y.P., Vink T., Schiphorst M., van Zanten G.H., IJsseldijk M.J., de Groot P.G., Sixma J.J. 2000. Platelet thrombus formation on collagen at high shear rates is mediated by von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction and inhibited by von Willebrand factorglycoprotein IIb/IIIa interaction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1661–1667. https://doi.org/10.1161/01.etu/20.6.1661
- https://doi.org/10.1161/01.atv.20.6.1661 105. Kaneva V.N., Dunster J.L., Volpert V., Ataullahanov F.,
- Panteleev M.A., Nechipurenko D.Y. 2021. Modeling thrombus shell: Linking adhesion receptor properties and macroscopic dynamics. *Biophys. J.* **120**, 334–351. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.10.049
- 106. Sadler J.E. 2005. New concepts in von Willebrand disease. *Annu. Rev. Med.* 56, 173–191. https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.082103.104713
- 107. Jilma B., Eichler H.G., Vondrovec B., Breiteneder H., Kyrle P. A., Kitzweger E., Kapiotis S., Speiser W. 1996. Effects of desmopressin on circulating P-selectin. *Br. J. Haematol.* 93, 432–436. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.5031040.x
- 108. Murphy S.J.X., Lim S.T., Hickey F., Kinsella J.A., Smith D.R., Tierney S., Egan B., Feeley T.M., Murphy S.M., Collins D.R., Coughlan T., O'Neill D., Harbison J.A., Madhavan P., O'Neill S.M., Colgan M.P., O'Donnell J.S., O'Sullivan J.M., Hamilton G., McCabe D.J.H. 2021. von Willebrand factor antigen, von Willebrand factor propeptide, and ADAMTS13 in carotid stenosis and their relationship with cerebral microemboli. *Thromb. Haemost.* **121**, 86–97. https://doi.org/10.1055/s-0040-1715440
- 109. Vischer U.M., Ingerslev J., Wollheim C.B., Mestries J.C., Tsakiris D.A., Haefeli W.E., Kruithof E.K. 1997. Acute von Willebrand factor secretion from the endothelium in vivo: Assessment through plasma propeptide (vWf:AgII) levels. *Thromb. Haemost.* 77, 387–393.
- Kaufmann J.E., Vischer U.M. 2003. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). J. Thromb. Haemost. 1, 682–689.
- 111. Jilma B., Pernerstorfer T., Dirnberger E., Stohlawetz P., Schmetterer L., Singer E.A., Grasseli U., Eichler H.G.,

Kapiotis S. 1998. Effects of histamine and nitric oxide synthase inhibition on plasma levels of von Willebrand factor antigen. *J. Lab. Clin. Med.* **131**, 151–156. https://doi.org/10.1016/s0022-2143(98)90157-3

- 112. Leitner G.C., Schmetterer L., Kapiotis S., Jilma B. 2010. Effects of endothelin-1 and phenylephrine on plasma levels of von Willebrand factor and protein S. *Thromb. Res.* **125**, e5–8. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.08.004
- 113. Reiter R.A., Varadi K., Turecek P.L., Jilma B., Knobl P. 2005. Changes in ADAMTS13 (von-Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation. *Thromb. Haemost.* **93**, 554–558. https://doi.org/10.1160/TH04-08-0467
- 114. Buchtele N., Kovacevic K.D., Brostjan C., Schwameis M., Hayden H., Derhaschnig U., Firbas C., Jilma B., Schoergenhofer C. 2020. Differential osteoprotegerin kinetics after stimulation with desmopressin and lipopolysaccharides in vivo. *Thromb. Haemost.* **120**, 1108–1115.

https://doi.org/10.1055/s-0040-1712448

- 115. Millar C.M., Riddell A.F., Brown S.A., Starke R., Mackie I., Bowen D.J., Jenkins P.V., van Mourik J.A. 2008. Survival of von Willebrand factor released following DDAVP in a type 1 von Willebrand disease cohort: Influence of glycosylation, proteolysis and gene mutations. *Thromb. Haemost.* **99**, 916–924. https://doi.org/10.1160/TH07-09-0565
- 116. Badirou I., Kurdi M., Rayes J., Legendre P., Christophe O.D., Lenting P.J., Denis C.V. 2010. von Willebrand factor clearance does not involve proteolysis by ADAMTS-13. J. Thromb. Haemost. 8, 2338–2340. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04012.x
- 117. O'Sullivan J.M., Ward S., Lavin M., O'Donnell J.S. 2018. von Willebrand factor clearance – biological mechanisms and clinical significance. *Br. J. Haematol.* 183, 185–195. https://doi.org/10.1111/bjh.15565
 - nttps://doi.org/10.1111/bjn.15565
- Lenting P.J., Westein E., Terraube V., Ribba A.S., Huizinga E.G., Meyer D., de Groot P.G., Denis C.V. 2004. An experimental model to study the in vivo survival of von Willebrand factor. Basic aspects and application to the R1205H mutation. J. Biol. Chem. 279, 12102–12109.

https://doi.org/10.1074/jbc.M310436200

119. van Schooten C.J., Shahbazi S., Groot E., Oortwijn B.D., van den Berg H.M., Denis C.V., Lenting P.J. 2008. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood.* 112, 1704–1712.

https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-133181

120. Chion A., O'Sullivan J.M., Drakeford C., Bergsson G., Dalton N., Aguila S., Ward S., Fallon P.G., Brophy T.M., Preston R.J., Brady L., Sheils O., Laffan M., McKinnon T.A., O'Donnell J.S. 2016. N-linked glycans within the A2 domain of von Willebrand factor modulate macrophage-mediated clearance. *Blood.* 128, 1959–1968.

https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-709436

121. van Schooten C.J., Denis C.V., Lisman T., Eikenboom J.C., Leebeek F.W., Goudemand J., Fressinaud E., van den Berg H.M., de Groot P.G., Lenting P.J. 2007. Variations in glycosylation of von Willebrand factor with O-linked sialylated T antigen are associated with its plasma levels. *Blood*. **109**, 2430–2437. https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-032706

- 122. Sodetz J.M., Pizzo S.V., McKee P.A. 1977. Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of human factor VIII/von Willebrand factor protein. *J. Biol. Chem.* 252, 5538–5546.
- 123. Ward S.E., O'Sullivan J.M., Drakeford C., Aguila S., Jondle C.N., Sharma J., Fallon P.G., Brophy T.M., Preston R.J.S., Smyth P., Sheils O., Chion A., O'Donnell J.S. 2018. A novel role for the macrophage galactose-type lectin receptor in mediating von Willebrand factor clearance. *Blood.* 131, 911–916. https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-787853
- 124. Grewal P.K. 2010. The Ashwell-Morell receptor. *Methods Enzymol.* 479, 223–241. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)79013-3
- 125. Grewal P.K., Uchiyama S., Ditto D., Varki N., Le D.T., Nizet V., Marth J.D. 2008. The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat. Med.* 14, 648–655. https://doi.org/10.1038/nm1760
- 126. Denis C.V., Lenting P.J. 2018. VWF clearance: It's glycomplicated. *Blood*. 131, 842–843. https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-824904
- 127. Pegon J.N., Kurdi M., Casari C., Odouard S., Denis C.V., Christophe O.D., Lenting P.J. 2012. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica*. 97, 1855–1863. https://doi.org/10.3324/haematol.2012.063297
- 128. Lock K., Zhang J., Lu J., Lee S.H., Crocker P.R. 2004. Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology*. **209**, 199–207. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.04.007
- 129. Jandus C., Simon H.U., von Gunten S. 2011. Targeting siglecs – a novel pharmacological strategy for immuno- and glycotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 82, 323–332. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.018
- Rydz N., Swystun L.L., Notley C., Paterson A.D., Riches J.J., Sponagle K., Boonyawat B., Montgomery R.R., James P.D., Lillicrap D. 2013. The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. *Blood.* 121, 5228–5237. https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-457507
- 131. Khoo U.S., Chan K.Y., Chan V.S., Lin C.L. 2008. DC-SIGN and L-SIGN: The SIGNs for infection. *J. Mol. Med. (Berl.).* 86, 861–874. https://doi.org/10.1007/s00109-008-0350-2
- Rastegarlari G., Pegon J.N., Casari C., Odouard S., Navarrete A.M., Saint-Lu N., van Vlijmen B.J., Legendre P., Christophe O.D., Denis C.V., Lenting P.J. 2012. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood.* **119**, 2126–2134. https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-373605

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

- 133. Zani I.A., Stephen S.L., Mughal N.A., Russell D., Homer-Vanniasinkam S., Wheatcroft S.B., Ponnambalam S. 2015. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells.* 4, 178–201. https://doi.org/10.3390/cells4020178
- 134. Swystun L.L., Lai J.D., Notley C., Georgescu I., Paine A.S., Mewburn J., Nesbitt K., Schledzewski K., Geraud C., Kzhyshkowska J., Goerdt S., Hopman W., Montgomery R.R., James P.D., Lillicrap D. 2018. The endothelial cell receptor stabilin-2 regulates VWF-FVIII complex half-life and immunogenicity. *J. Clin. Invest.* **128**, 4057–4073. https://doi.org/10.1172/JCI96400
- Fazavana J., Brophy T.M., Chion A., Cooke N., Terraube V., Cohen J., Parng C., Pittman D., Cunningham O., Lambert M., O'Donnell J.S., O'Sullivan J.M. 2020. Investigating the clearance of VWF A-domains using site-directed PEGylation and novel N-linked glycosylation. *J. Thromb. Haemost.* 18, 1278–1290. https://doi.org/10.1111/jth.14785
- 136. Wohner N., Muczynski V., Mohamadi A., Legendre P., Proulle V., Ayme G., Christophe O.D., Lenting P.J., Denis C.V., Casari C. 2018. Macrophage scavenger receptor SR-AI contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Haematologica*. **103**, 728–737. https://doi.org/10.3324/haematol.2017.175216
- Koutts J., Walsh P.N., Plow E.F., Fenton J.W., 2nd, Bouma B.N., Zimmerman T.S. 1978. Active release of human platelet factor VIII-related antigen by adenosine diphosphate, collagen, and thrombin. *J. Clin. Invest.* 62, 1255–1263.

https://doi.org/10.1172/JCI109246

- 138. Fernandez M.F., Ginsberg M.H., Ruggeri Z.M., Batlle F.J., Zimmerman T.S. 1982. Multimeric structure of platelet factor VIII/von Willebrand factor: The presence of larger multimers and their reassociation with thrombin-stimulated platelets. *Blood.* **60**, 1132–1138.
- 139. Nichols T.C., Bellinger D.A., Reddick R.L., Read M.S., Koch G.G., Brinkhous K.M., Griggs T.R. 1991. Role of von Willebrand factor in arterial thrombosis. Studies in normal and von Willebrand disease pigs. *Circulation.* 83, IV56–64.
- 140. Keesler D.A., Flood V.H. 2018. Current issues in diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2, 34–41. https://doi.org/10.1002/rth2.12064
- 141. O'Donnell J.S. 2020. Low VWF: Insights into pathogenesis, diagnosis, and clinical management. *Blood Adv.* 4, 3191–3199.

https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002038

- 142. Eikenboom J.C., Matsushita T., Reitsma P.H., Tuley E.A., Castaman G., Briet E., Sadler J.E. 1996. Dominant type 1 von Willebrand disease caused by mutated cysteine residues in the D3 domain of von Willebrand factor. *Blood.* 88, 2433–2441.
- 143. Eikenboom J., Hilbert L., Ribba A.S., Hommais A., Habart D., Messenger S., Al-Buhairan A., Guilliatt A., Lester W., Mazurier C., Meyer D., Fressinaud E., Budde U., Will K., Schneppenheim R., Obser T., Marggraf O., Eckert E., Castaman G., Rodeghiero F., Federici A.B., Batlle J., Goudemand J., Ingerslev J., Lethagen S., Hill F., Peake I., Goodeve A. 2009. Expression of 14 von Willebrand factor mutations

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

identified in patients with type 1 von Willebrand disease from the MCMDM-1VWD study. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1304–1312. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03486.x

- 144. James P., Lillicrap D. 2008. The role of molecular genetics in diagnosing von Willebrand disease. *Semin. Thromb. Hemost.* 34, 502–508. https://doi.org/10.1055/s-0028-1103361
- 145. Zimmerman T.S., Dent J.A., Ruggeri Z.M., Nannini L.H. 1986. Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE). J. Clin. Invest. 77, 947–951. https://doi.org/10.1172/JCI112394
- 146. Schneppenheim R., Budde U., Ruggeri Z.M. 2001. A molecular approach to the classification of von Willebrand disease. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 14, 281–298.
 - https://doi.org/10.1053/beha.2001.0134
- 147. Schneppenheim R., Budde U. 2005. Phenotypic and genotypic diagnosis of von Willebrand disease: A 2004 update. *Semin. Hematol.* **42**, 15–28. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2004.10.002
- 148. Fogarty H., Doherty D., O'Donnell J. S. 2020. New developments in von Willebrand disease. Br. J. Haematol. 191, 329–339. https://doi.org/10.1111/bjh.16681
- 149. Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C., Favaloro E.J., Hill F.G., Holmberg L., Ingerslev J., Lee C.A., Lillicrap D., Mannucci P.M., Mazurier C., Meyer D., Nichols W.L., Nishino M., Peake I.R., Rodeghiero F., Schneppenheim R., Ruggeri Z.M., Srivastava A., Montgomery R.R., Federici A.B. 2006. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: A report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. J. Thromb. Haemost. 4, 2103–2114. https://doi.org/10.1111/j.1538–7836.2006.02146.x
- 150. Stepanian A., Ribba A.S., Lavergne J.M., Fressinaud E., Juhan-Vague I., Mazurier C., Girma J.P., Meyer D. 2003. A new mutation, S1285F, within the A1 loop of von Willebrand factor induces a conformational change in A1 loop with abnormal binding to platelet GPIb and botrocetin causing type 2M von Willebrand disease. *Br. J. Haematol.* **120**, 643–651. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04168.x
- 151. Castaman G., Giacomelli S.H., Jacobi P., Obser T., Budde U., Rodeghiero F., Haberichter S.L., Schneppenheim R. 2010. Homozygous type 2N R854W von Willebrand factor is poorly secreted and causes a severe von Willebrand disease phenotype. *J. Thromb. Haemost.* 8, 2011–2016. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03971.x

152. Veyradier A., Boisseau P., Fressinaud E., Caron C., Ternisien C., Giraud M., Zawadzki C., Trossaert M., Itzhar-Baikian N., Dreyfus M., d'Oiron R., Borel-Derlon A., Susen S., Bezieau S., Denis C. V., Goudemand J., French Reference Center for von Willebrand d. 2016. A laboratory phenotype/genotype correlation of 1167 french patients from 670 families with von Willebrand disease: A new epidemiologic picture. *Medi*- *cine (Baltimore).* **95**, e3038. https://doi.org/10.1097/MD.00000000003038

- 153. Mehta R., Athar M., Girgis S., Hassan A., Becker R.C. 2019. Acquired von Willebrand syndrome (AVWS) in cardiovascular disease: A state of the art review for clinicians. J. Thromb. Thrombolysis. 48, 14–26. https://doi.org/10.1007/s11239-019-01849-2
- 154. Vincentelli A., Susen S., Le Tourneau T., Six I., Fabre O., Juthier F., Bauters A., Decoene C., Goudemand J., Prat A., Jude B. 2003. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N. Engl. J. Med.* 349, 343– 349.

https://doi.org/10.1056/NEJMoa022831

- 155. Hayakawa M., Matsumoto M. 2020. Acquired von Willebrand syndrom. *Rinsho Ketsueki*. **61**, 809–817. https://doi.org/10.11406/rinketsu.61.809
- 156. Moake J.L., McPherson P.D. 1989. Abnormalities of von Willebrand factor multimers in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *Am. J. Med.* **87**, 9N–15N.
- 157. Sadler J.E. 2006. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a moving target. *Hematology Am. Soc. Hematol.*

Educ. Program. 415-420.

https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.415

- 158. Gupta M., Feinberg B.B., Burwick R.M. 2018. Thrombotic microangiopathies of pregnancy: Differential diagnosis. *Pregnancy Hypertens.* 12, 29–34. https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.02.007
- 159. Zheng X.L. 2015. ADAMTS13 and von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Annu. Rev. Med.* **66**, 211–225. https://doi.org/10.1146/annurev-med-061813-013241
- 160. Foreman K.E., Vaporciyan A.A., Bonish B.K., Jones M.L., Johnson K.J., Glovsky M.M., Eddy S.M., Ward P.A. 1994. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. J. Clin. Invest. 94, 1147–1155. https://doi.org/10.1172/JCI117430
- 161. Gragnano F., Golia E., Natale F., Bianchi R., Pariggiano I., Crisci M., Diana V., Fimiani F., Limongelli G., Russo M., Cirillo P., Calabro P. 2017. Von Willebrand factor and cardiovascular disease: From a biochemical marker to an attractive therapeutic target. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 15, 404–415. https://doi.org/10.2174/1570161115666170201114835

Von Willebrand Factor in Health and Disease

P. P. Avdonin¹, N. V. Tsvetaeva², N. V. Goncharov^{3, 4}, E. Yu. Rybakova¹,
S. K. Trufanov¹, A. A. Tsitrina¹, P. V. Avdonin¹, *

¹Koltsov Institute of Development Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia ²National Medical Research Center of Hematology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125167 Russia

³Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

⁴Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, FMBA, Kapitolovo, Leningrad oblast, 188663 Russia

*e-mail: pvavdonin@yandex.ru

Von Willebrand factor (vWF), a key component of hemostasis, is synthesized in endothelial cells and megakaryocytes and released into the blood as high molecular weight multimeric glycoproteins weighing up to 20 million daltons. Blood plasma metalloprotease ADAMTS13 cleaves ultra-large vWF multimers to smaller multimeric and oligomeric molecules. Molecules vWF attach to sites of damage to the surface of arterioles and capillaries and unfold under conditions of shear stress. On the unfolded vWF molecule, regions interacting with receptors on the platelet membrane are exposed. After binding to the vWF filaments, platelets are activated; platelets circulating in the vessels are additionally attached to them, and as a result, thrombi are formed, microvessels are blocked, and bleeding stops. This review describes the history of the discovery of vWF, presents data on the mechanisms of vWF secretion and its structure, and characterizes the processes of vWF exchange in the body in normal and pathological conditions.

Keywords: von Willebrand factor, endothelium, pathology, von Willebrand disease, thrombotic microangiopathies УДК 577.352

КОНФИГУРАЦИИ ГРАНИЦЫ УПОРЯДОЧЕННОГО ДОМЕНА В ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ НА ТВЕРДОЙ ПОДЛОЖКЕ

© 2021 г. Т. Р. Галимзянов^{*a*}, С. А. Акимов^{*a*}, *

^аИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, РАН, Москва, 119071 Россия *e-mail: akimov_sergey@mail.ru

Поступила в редакцию 03.03.2021 г. После доработки 18.03.2021 г. Принята к публикации 19.03.2021 г.

Латеральное распределение белков и липидов в плазматических мембранах клеток млекопитающих неоднородно. Липид-белковые домены, обогащенные сфингомиелином и холестерином, называют рафтами. Размер рафтов клеточных мембран чрезвычайно мал, что существенно затрудняет их экспериментальное исследование. В модельных мембранах, липидный состав которых близок к составу плазматической мембраны, возможно образование упорядоченных доменов в результате фазового разделения, индуцируемого понижением температуры. Эффективным методом исследования модельных рафтов является атомно-силовая микроскопия, позволяющая регистрировать домены, размер которых меньше дифракционного предела видимого света. Однако этот метод предполагает нанесение мембраны на твердую подложку. За счет электростатических, ван-дер-ваальсовых и гидратационных взаимодействий с подложкой ближайший к ней монослой мембраны оказывается в физических условиях, отличных от условий, в которых находится удаленный от подложки монослой. Вследствие асимметрии физических условий изменяется структура и энергия границы рафта. В результате, из двух возможных состояний границы равной энергии в свободной мембране на подложке практически реализуется только одно. Это может приводить к изменению эффективности специфических линейно-активных липилов, накапливающихся на границе доменов и регулирующих их размер за счет понижения энергии границы, аналогично действию поверхностно-активных веществ в трехмерных системах.

Ключевые слова: липидная мембрана, упорядоченный домен, атомно-силовая микроскопия, твердая подложка, гидратационное отталкивание, теория упругости DOI: 10.31857/S0233475521040046

ВВЕДЕНИЕ

Внешние оболочки животных клеток представляют собой липидные мембраны с погруженными в них белковыми молекулами. Как липидный, так и белковый состав мембран очень разнообразен – клеточные цитоплазматические мембраны содержат порядка ста видов различных липидов и сотни видов различных белков [1, 2]. Было показано, что латеральное распределение липидов и мембранных белков крайне неоднородно. Липиды и белки могут формировать специфические домены, состав которых существенно отличается от среднего состава мембраны. Одним из видов таких доменов являются так называемые рафты домены, обогащенные сфингомиелином и холестерином [3], относительно устойчивые к действию неионных детергентов [4, 5]. Большой интерес к исследованию рафтов связан с тем, что содержащиеся в них белки принимают активное участие в таких жизненно важных процессах, как внутриклеточная передача сигналов [6], инфицирование клеток оболочечными вирусами [7], кавеолин-зависимый эндоцитоз [4], дефосфорилирование [8] и т.д. Для нормального функционирования белков требуется специфическое микроокружение, которое обеспечивается в рафтах благодаря специфическому липидному составу и их физико-химическим свойствам. При экстракции из плазматической мембраны холестерина, приводящей к разрушению рафтов [5], протекание некоторых клеточных процессов изменяется [9]. Экспериментальное исследование рафтов in vivo затруднительно из-за сложного состава клеточных мембран и относительно малого размера доменов, который составляет 10-200 нм [10-12]. Однако в модельных чисто липидных мембранах в результате фазового разделения в жидко-неупорядоченной (L_d) мембране могут формироваться жидко-упорядоченные (L_o) домены микронных размеров, которые используются в качестве модели клеточных рафтов и которые могут быть исследованы различными экспериментальными методами [13–16].

Одним из эффективных инструментов исследования мембранных доменов является атомносиловая микроскопия (АСМ). В отличие от флуоресцентной микроскопии разрешение АСМ не ограничено дифракционным пределом видимого света. В АСМ экспериментах было установлено, что домены в плоскости мембраны, как правило, имеют форму круга, т.е., по-видимому, липид в них находится в жидком состоянии. Толщина L_{0} -бислоя на 1—2 нм больше толщины окружающей мембраны. Методами флуоресцентной микроскопии было обнаружено, что в модельных мембранах домены практически всегда имеют бислойную структуру, т.е. располагаются в монослоях мембраны один под другим [14, 16–18]. Ранее было показано [19], что одной из возможных причин стабилизации бислойной структуры L_o-доменов могут являться упругие деформации мембраны, возникающие на границе домена для компенсации разности толщин бислоев. Если бы при скачке толщины бислоя на границе домена в 1-2 нм мембрана оставалась бы недеформированной, это привело бы к контакту гидрофобной зоны мембраны с водой или с липидными полярными группами и, как следствие, к большой величине линейного натяжения границы – 20–40 пН. В такой ситуации энергетически выгодно деформировать мембрану на границе таким образом, чтобы полностью сгладить скачок толщины и обеспечить непрерывность поверхности мембраны. При этом с точки зрения минимизации энергии деформаций оказывается выгоден небольшой относительный сдвиг границ монослойных доменов, составляющих бислойный рафт, на величину 2-4 нм. Эти результаты, полученные в теоретических работах [19–21], подтверждаются данными молекулярного моделирования методами молекулярной динамики [22, 23]. Энергетически выгодно формирование бислойных доменов таких. что радиусы составляющих их монослойных соосных доменов в разных монослоях отличаются на 2-4 нм. Для определенности, бислойный L_o-домен будем называть рафтом; таким образом, рафт состоит из двух монослойных L_o-доменов. В экспериментах с гигантскими липосомами, мембранами Мюллера-Рудина и т.д. монослои мембраны одинаковы и находятся в практически идентичных условиях. Поэтому при фазовом разделении площади образующейся L₀-фазы в обоих монослоях должны совпадать. Однако в АСМ мембрана наносится на твердую слюдяную подложку. Липидный монослой, прилегающий к подложке, находится в физических условиях, отличающихся от физических условий, в которых находится противоположный монослой, обращенный в объемную водную фазу. Исследованию некоторых эффектов, возникающих вследствие такой асимметрии граничных условий, посвящена настоящая работа.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

В работе [24] было рассмотрено взаимодействие плоской мембраны с локально сферическим зондом в АСМ экспериментах. Сферичность зонда учитывалась в рамках теории Дерягина [25]. Считалось, что сила взаимодействия включает электростатическое взаимодействие мембраны с отрицательно заряженным зондом и ван-дер-ваальсово притяжение. Известно, что как у слюды, так и у полярных головок липидных молекул имеются гидратные оболочки, состоящие из частично ориентированных молекул воды; эти гидратные оболочки взаимно отталкиваются [26]. По аналогии с расчетом взаимодействия мембраны и зонда можно рассчитать взаимодействие мембраны и плоской подложки. С учетом электростатических взаимодействий, ван-дер-ваальсова притяжения и гидратационного отталкивания. полная сила взаимодействия мембраны с плоской заряженной подложкой, отнесенная к единице площади, может быть записана в виде [24, 26]:

$$f = \frac{2\sigma_m \sigma_p}{\varepsilon_0 \varepsilon_w} e^{-\frac{z}{l_D}} - \frac{H_a}{12\pi l_D z^2} + P_0 e^{-\frac{z}{l_h}},$$
 (1)

где z — координата вдоль оси, перпендикулярной подложке; σ_m — поверхностная плотность заряда мембраны; σ_p — поверхностная плотность заряда подложки; ε_0 — диэлектрическая проницаемость вакуума; ε_w — диэлектрическая проницаемость воды; l_D — длина Дебая электролита; H_a — константа Гамакера, $H_a \approx (3-10) \times 10^{-21}$ Дж; P_0 — расклинивающее давление, $P_0 \approx 4 \times 10^7 - 10^{10}$ Па; l_h — характерная длина гидратационного отталкивания, $l_h \approx 0.1-0.3$ нм [27]. Первое слагаемое в выражении (1) соответствует электростатическим взаимодействиям, второе слагаемое — ван-дер-ваальсовым, третье слагаемое — гидратационным. Свободная энергия взаимодействия мембраны и подложки, отнесенная к единице площади, может быть найдена согласно соотношению:

$$w(H) = \int_{H}^{\infty} f dz = \frac{2l_{\rm D}\sigma_m\sigma_p}{\varepsilon_0\varepsilon_w} e^{-\frac{H}{l_{\rm D}}} - \frac{H_a}{12\pi l_{\rm D}H} + P_0 l_h e^{-\frac{H}{l_h}}, (2)$$

где H — расстояние от подложки до мембраны. При физически разумных значениях параметров эта энергия имеет минимум, однако положение минимума H_0 не может быть найдено аналитически. Разлагая энергию в окрестности точки H_0 до второго порядка, найдем эффективный квадратичный потенциал, в котором находится мембрана:

$$w \approx \frac{k_h}{2} \left(H - H_0 \right)^2 = w_h. \tag{3}$$

Для численной оценки коэффициента k_h будем считать, что мембрана находится в бинарном электролите с концентрацией 100 мМ. Дебаевская длина l_D находится согласно выражению:

$$l_{\rm D} = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_w k_{\rm B} T}{e^2 J}},\tag{4}$$

где e – заряд электрона; J – ионная сила раствора; k_в – константа Больцмана; T – абсолютная температура. В рассматриваемом случае 100 мМ бинарного электролита $J = 1.2 \times 10^{26} \text{ м}^{-3}$ и $l_{\text{D}} \approx 1$ нм. Считая, что мембрана не содержит заряженных компонентов, т.е. $\sigma_m = 0$, поверхностная плоткомпонентов, т.е. $\sigma_m = 0$, поверхностная плот-ность заряда подложки $\sigma_p = -0.032 \text{ Кл/м}^2$ [24], $\varepsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12} \text{ Ф/м}$, $\varepsilon_w = 81$, заряд электрона e = $= 1.6 \times 10^{-19} \text{ Кл}$, $l_h = 0.2 \text{ нм}$, $P_0 = 4 \times 10^7 \text{ H/m}^2$ [27], $H_a = 5 \times 10^{-21} \text{ Дж}$ [24], для крутизны потенциала получается значение $k_h = 0.3 \times 10^{15} \text{ Дж/м}^4 =$ $= 0.08 k_{\text{B}}T/\text{нм}^4 (k_{\text{B}}T \approx 4 \times 10^{-21} \text{ Дж})$. Минимуму энергии w_h соответствует расстояние между подложкой и мембраной $H_0 pprox 1$ нм. При вариации характерной длины гидратационного отталкивания в диапазоне $l_h = 0.1 - 0.3$ нм [27] крутизна потенциала варьирует в диапазоне $k_h = 1.13 - 0.02 k_B T/HM^4$, а положение равновесия $-H_0 = 0.4 - 2$ нм. При этом значения характерной длины гидратационного отталкивания l_{h} и, соответственно, параметров k_{h} и H_0 , сильно зависят от химической структуры и поверхностной плотности липидных головок и могут быть разными при взаимодействии с подложкой монослойного домена и окружающей его мембраны. Заряд мембраны также существенно влияет на потенциал адгезии липидной мембраны к подложке. Если считать, что мембрана содержит 20 мол.% отрицательно заряженного липида (например, диолеоилфосфатидилсерина), то крутизна потенциала при $l_h = 0.2$ нм станет равна $k_h \approx 0.0003 \ k_B T/\text{нм}^4$, а равновесное расстояние $H_0 \approx 10$ нм. В этом случае энергия взаимодействия мембраны с подложкой, по-видимому, недостаточна, чтобы удержать мембрану на слюде без добавления, например, кальция, образующего "мостики" между электрическим зарядами слюды и мембраны.

Таким образом, вблизи твердой подложки незаряженная или слабо заряженная мембрана оказывается в потенциале, минимум которого расположен на некотором расстоянии H_0 от подложки. Это налагает на систему дополнительные граничные условия. В частности, если в мембране сосуществуют макроскопические фазы с разной толщиной бислоя, то эффективный измеряемый методом ACM перепад толщины на границе фаз должен быть бислойный, а не монослойный, как в случае свободной мембраны, поскольку вдали от границы домена $H = H_0$ для обеих фаз (рис. 1), при условии, что фазы одинаково взаимодействуют с подложкой. Кроме того, новое граничное условие приводит к изменению энергии границы рафта, т.е. ее линейного натяжения, что, в свою очередь, должно влиять на распределение рафтов по размерам [28]. Ниже вычисляется линейное натяжение границы рафта в случае мембраны, находящейся вблизи твердой подложки.

РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Будем считать, что рафт представляет собой совокупность двух монослойных доменов, расположенных в разных монослоях мембраны; положения границ доменов могут не совпадать. Для простоты рассмотрим случай рафта большого радиуса, такого, что кривизной границ составляющих его доменов локально можно пренебречь и приближенно считать границы прямыми линиями. В этом случае система обладает трансляционной симметрией вдоль границы рафта. Деформации мембраны вблизи границ монослойных доменов будем описывать в рамках теории упругости жидких кристаллов, адаптированной к липидным мембранам [29]. Средняя ориентация липидных молекул характеризуется векторным полем единичных векторов n, называемых директорами. Будем учитывать две основные моды упругих деформаций - поперечный изгиб и наклон. Деформация изгиба характеризуется дивергенцией директора вдоль поверхности монослоя, деформация наклона характеризуется разностью директора и единичной нормали N к поверхности монослоя. Деформации предполагаются малыми, и поверхностная плотность энергии монослоя вычисляется в квадратичном приближении по ним согласно выражению [29]:

$$w = \frac{B}{2} (\operatorname{div} \mathbf{n})^2 + \frac{K_t}{2} (\mathbf{n} - \mathbf{N})^2, \qquad (5)$$

где B — модуль изгиба; K_t — модуль наклона. Для нижнего монослоя помимо упругой энергии необходимо учесть также взаимодействие с подложкой согласно выражению (3). Полная энергия верхнего (W_u) и нижнего (W_d) монослоев, таким образом, может быть записана в виде:

$$W_u = \int w_u dS_u, \quad W_d = \int (w_d + w_h) dS_d. \tag{6}$$

Здесь и ниже индексы "*u*" и "*d*" относятся к верхнему и нижнему монослоям соответственно; интегрирование ведется по поверхности соответствующего монослоя. Полная энергия бислойной мембраны дается выражением:

$$W = W_u + W_d. \tag{7}$$

Минимизация функционала (7) по распределению директора в верхнем и нижнем монослоях и форме межмонослойной поверхности приводит к системе линейных дифференциальных уравне-



Рис. 1. Структура границы рафта в мембране, нанесенной на твердую подложку. Упорядоченные домены (толщина монослоя h_r) закрашены темно-серым цветом, неупорядоченная мембрана (толщина монослоя h_s) — светло-серым цветом; H_0 — равновесная толщина слоя воды между нижним монослоем мембраны и подложкой. Между бислойными L_0 - и L_d -фазами расположена "гибридная" зона, в которой один монослой упорядоченный, а другой — неупорядоченный. Возможны две конфигурации гибридной зоны в зависимости от состояния ближайшего к подложке монослоя: упорядоченный (*a*) и неупорядоченный (*б*). Этим двум конфигурациям гибридной зоны соответствует "конический" рафт (*a*) и "обратный конический" рафт (*б*).

ний Эйлера–Лагранжа. Обозначим толщину монослоя L_0 -домена h_r , а толщину L_d -монослоя окружающей мембраны – h_s . При условии возможного латерального сдвига границ монослойных доменов, расположенных в противоположных монослоях, вариационные уравнения необходимо решить в трех зонах, характеризующихся различным соотношением толщин монослоев (рис. 1): 1) бислойная L_d -мембрана, $h_u = h_s$, $h_d = h_s$; 2) переходная зона "гибридного" бислоя, $h_u = h_s$, $h_d = h_r$ (рис. 1*a*) либо $h_u = h_r$, $h_d = h_s$ (рис. 1*б*); 3) бислойный L_o-домен, $h_u = h_r$, $h_d = h_r$

Решения дифференциальных уравнений Эйлера—Лагранжа содержат неопределенные коэффициенты, которые находятся из следующих граничных условий: 1) деформации ограничены и затухают при удалении от границы рафта, 2) директор непрерывен в каждом из монослоев, 3) поверхность каждого монослоя непрерывна. Оставшиеся после подстановки этих граничных условий неопределенные коэффициенты находятся путем минимизации по ним полной энергии системы (7). В силу трансляционной симметрии системы вдоль границы рафта энергию будем относить к единице длины вдоль границы, т.е. вычислять линейное натяжение границы рафта. Более подробно алгоритм вычисления изложен в Приложении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения количественных результатов будем использовать следующие численные значения параметров: модуль изгиба $B = 10 k_{\rm B}T$ (на один монослой) [30], модуль наклона $K_t = 40$ мH/м (на один монослой) [29], толщина монослоя рафта $h_r = 1.8$ нм, толщина монослоя окружающей мембраны $h_s = 1.3$ нм [22, 23].

На рис. 2а представлена зависимость линейного натяжения от величины относительного сдвига границ монослойных доменов, составляющих бислойный рафт (от ширины гибридной зоны, L), в случае "свободной" мембраны, т.е. мембраны, находящейся вдали от подложки, для которой $k_h = 0$. Из графика видно, что в этом случае минимальной граничной энергии соответствует конфигурация, в которой расстояние между границами монослойных доменов составляет некоторую конечную величину ($L \approx 3$ нм на рис. 2*a*). Подобный равновесный сдвиг границ монослойных доменов, составляющих бислойный рафт, наблюдался в ряде работ методами молекулярной динамики [22, 23]. Этот же результат был получен нами в предшествующих теоретических работах [19-21]. Из зависимости рис. 2а следует, что упругие деформации, возникающие на границе рафта при компенсации гидрофобного несоответствия, стабилизируют его бислойную структуру с точностью до небольшого сдвига границ ~3 нм. Кроме того, при отражении свободной мембраны относительно плоскости межмонослойной поверхности структура границы рафта и, следовательно, энергия деформаций мембраны остаются неизменными, т.е. конфигурации конического рафта и обратного конического рафта имеют одинаковую энергию. Иными словами, в симметричной по липидному составу монослоев свободной мембране, расположенной далеко от подложки, при условии равенства площадей L₀-фазы в обоих монослоях с точки зрения минимизации граничной энергии выгодно формирование ансамбля рафтов, такого, что у половины рафтов нижний домен имеет радиус на 3 нм больший, чем верхний (конический рафт), а у другой половины — верхний домен имеет радиус на 3 нм больший, чем нижний (обратный конический рафт) (рис. 1). Более точный расчет энергии круглых доменов, подтверждающий этот вывод, проделан в работе [20].

Наличие подложки нарушает симметрию границы рафта. На рис. 26-2г приведена зависимость граничной энергии бислойного рафта от разности координат границ верхнего и нижнего монослойных доменов при различных значениях длины гидратационного отталкивания *l_h* упорядоченной фазы. Значение *l_h* определяется средней степенью гидратации полярных головок липидов, которая, в свою очередь, определяется их химической структурой и поверхностной плотностью. Различия параметров в L₀- и L_d-фазах обусловлены различной концентрацией сфингомиелина, предположительно ослабляющего гидратационное отталкивание L₀-фазы и слюдяной подложки. Мы рассмотрели три значения длины гидратационного отталкивания L_0 -фазы: $l_h = 0.1$ нм (рис. 2*б*), $l_h = 0.2$ нм (рис. 2*в*) и $l_h = 0.3$ нм (рис. 2*г*), зафиксировав при этом $l_h = 0.1$ нм для L_d -фазы окружающей мембраны. При данных значениях длины гидратационного отталкивания получаются следующие величины жесткости потенциала k_h и равновесного расстояния $H_0: l_h = 0.1$ нм соответствует $k_h = 1.1 k_B T/HM^4$ и $H_0 = 0.37$ нм; $l_h = 0.2$ нм соответствует $k_h = 0.07 k_B T/HM^4$ и $H_0 = 1.2$ нм; $l_h =$ = 0.3 нм соответствует $k_h = 0.02 k_B T/\text{нм}^4$ и $H_0 = 2.2$ нм. На каждом графике изображены зависимости энергии от ширины гибридной зоны L для конического и обратного конического рафтов (рис. 2). Из приведенных графиков видно, что оптимальная ширина переходной области ~3 нм слабо зависит от величины l_h и конфигурации границы. Также видно, что при взаимодействии с подложкой появляется асимметрия, т.е. при одинаковой ширине переходной области линейное натяжение границы конического рафта будет отличаться от линейного натяжения границы обратного конического рафта. При оптимальной ширине переходной области ($L \approx 3$ нм) линейное натяжение границы конического рафта оказывается выше линейного натяжения границы обратного конического рафта (рис. 26-2e).

Несмотря на небольшое различие в энергии различных типов границ, оно может приводить к существенному дисбалансу количества конических и обратных конических рафтов. Рассмотрим систему при $l_h = 0.3$ нм (рис. 2г). При оптимальной ширине гибридной зоны линейное натяжение границы обратного конического рафта равно 0.52 $k_{\rm B}T$ /нм, конического рафта – 0.59 $k_{\rm B}T$ /нм. Таким образом, разница погонной энергии границы в этих двух конфигурациях составляет $0.07 k_{\rm B} T$ /нм. Для рафта диаметром 10 нм это соответствует разности энергий $E = \pi \times 10$ нм \times × 0.07 $k_{\rm B}T$ /нм ≈ 2.2 $k_{\rm B}T$, при диаметре 50 нм – E = $= \pi \times 50$ нм $\times 0.07 k_{\rm B}T$ /нм $\approx 11 k_{\rm B}T$. В равновесных условиях долю рафтов определенного типа можно считать пропорциональной больцмановскому



Рис. 2. Зависимость линейного натяжения границы рафта от ширины гибридной зоны: a - в случае свободной мембраны ($k_h = 0$); $\delta - e - для$ случая мембраны, нанесенной на твердую подложку. Характерная длина гидратационного отталкивания L_0 -монослоя и подложки считалась равной: $\delta - l_h = 0.1$ нм; $e - l_h = 0.2$ нм; $e - l_h = 0.3$ нм; для L_d -монослоя во всех случаях $l_h = 0.1$ нм. Сплошные кривые – конический рафт, штриховые кривые – обратный конический рафт, в соответствии с рис. 1.

фактору ~exp($-E/k_BT$). С учетом этого фактора, в случае рафтов диаметром 10 нм доля конических рафтов будет составлять ~11% от полного числа рафтов. При среднем диаметре рафтов 50 нм доля конических рафтов будет составлять ~1.7 × 10⁻³%, т.е. практически все домены будут иметь обратную коническую структуру.

Разница радиусов монослойных доменов в противоположных монослоях должна приводить к разности площадей L_0 -фазы в верхнем и нижнем монослоях. Этот дисбаланс, в принципе, может компенсироваться образованием монослой-

ных L_o -доменов в нижнем монослое мембраны, прилегающем к подложке, таким образом, чтобы все рафты имели энергетически выгодную обратную коническую структуру, а избыток L_o -фазы образовывал монослойные L_o -домены в нижнем монослое. Формирование монослойных доменов должно приводить к повышению общей энергии системы за счет увеличения длины совокупной границы L_o - и L_d -фаз. Предположим, что избыток площади L_o -фазы от каждого L_o -домена собирается в *n* монослойных доменов, где *n* может быть меньше единицы, что означает конденса-



Рис. 3. Зависимость эффективного линейного натяжения рафтов от их радиуса при n = 1. Длина гидратационного отталкивания для L_0 -фазы составляет: $a - l_h = 0.1$ нм; $\delta - l_h = 0.2$ нм; $e - l_h = 0.3$ нм. Сплошные кривые – конические рафты; штриховые кривые – обратные конические рафты. Горизонтальные прямые соответствуют величине эффективного линейного натяжения равного минимальному линейному натяжению на кривых рис. $2\delta - 2e$.

цию избытка от 1/n рафтов в один монослойный домен. При таких предположениях эффективное линейное натяжение конического/обратного конического рафта дается выражением:

$$\gamma_{\rm eff}^{d,u} = \gamma_0^{d,u} + \gamma_{\rm mono}^{u,d} \sqrt{\frac{2\pi RL}{n\pi R^2}} = \gamma_0^{d,u} + \gamma_{\rm mono}^{u,d} \sqrt{\frac{2L}{nR}}, \quad (8)$$

где R – радиус домена, $\gamma_0^{d,u}$ – линейное натяжение границы конического/обратного конического рафта при оптимальной ширине гибридной зоны, $\gamma^{\mu,d}_{
m mono}$ — линейное натяжение монослойного домена, расположенного в верхнем/нижнем монослое соответственно. у_{топо} вычисляется аналогично линейному натяжению границы бислойного домена при учете энергии деформаций только в области бислойной L_d-фазы и в гибридной зоне и условии $L \to \infty$. При $l_h = 0.1$ нм $\gamma_{\text{mono}}^d = 0.30 \, k_{\text{B}} T / \text{нм}$, $\gamma^{\mu}_{
m mono}~=~0.30~k_{
m B}T/{
m HM};$ при $l_{h}~=~0.2$ нм $\gamma^{\mu}_{
m mono}~=$ $= 0.31 k_{\rm B} T/{\rm HM}, \gamma_{\rm mono}^d = 0.40 k_{\rm B} T/{\rm HM};$ при $l_h = 0.3$ нм $\gamma^{\mu}_{mono} = 0.32 \ k_{\rm B} T/{\rm HM}, \ \gamma^{d}_{mono} = 0.49 \ k_{\rm B} T/{\rm HM}.$ Зависимость эффективного линейного натяжения рафтов от их радиуса при n = 1 приведена на рис. 3. Видно, что при малых радиусах доменов энергетически выгодна конфигурация конических рафтов, а при больших радиусах – обратных конических рафтов (рис. 36, 3в). При увеличении n и радиусов доменов кривые будут приближаться к своим асимптотикам, т.е. значениям, даваемым минимумом соответствующих кривых, приведенных на рис. 2.

На рис. 4 показаны характерные профили верхней поверхности мембраны вблизи границы рафта для обоих типов границ. Из рисунка видно, что в случае свободной мембраны различие уровней верхних поверхностей L_o- и L_d-фаз мембраны вдали от границы составляет 0.5 нм, что соответ-



Рис. 4. Форма верхней поверхности мембраны $H_u(x)$ для случаев: свободной мембраны (красные кривые); мембраны на твердой подложке с одинаковой длиной гидратационных взаимодействий $l_h = 0.1$ нм для L_o и L_d фазы (синие кривые); мембраны на твердой подложке с длиной гидратационных взаимодействий $l_h = 0.1$ нм для L_d фазы и $l_h = 0.3$ нм для L_o фазы (зеленые кривые). Сплошные кривые – конический рафт; Ширина гибридной зоны во всех случаях равна 3 нм.

ствует разности толщин упорядоченного и неупорядоченного монослоев (рис. 4, красные кривые). При одинаковой длине гидратационных взаимодействий L_0 - и L_d -фаз $l_h = 0.1$ нм различие уровней составляет 1 нм, что соответствует разности толщин упорядоченного и неупорядоченного бислоев (рис. 4, синие кривые). При различной длине гидратационных взаимодействий L₀- и L_d-фаз разность уровней верхних поверхностей мембраны определяется комбинацией перепада толщины бислоя на границе фаз (1 нм) и разностью равновесных расстояний H_0 между подложкой и нижними L_o- и L_d-монослоями (рис. 4, зеленые кривые). Во всех случаях взаимодействия мембраны с подложкой профили верхней поверхности мембраны слабо зависят от типа границы (конический/обратный конический рафты), т.е. практически неразличимы методом атомно-силовой микроскопии. При одинаковой длине гидратационных взаимодействий $l_h = 0.1$ нм для L_0 - и L_d-фазы деформации затухают на расстоянии порядка 10 нм от границы (рис. 4, синие кривые). В случае различного взаимодействия с подложкой липидов упорядоченной и неупорядоченной фаз деформации затухают на расстоянии от переходной области порядка 5 нм в сторону неупорядоченной фазы и на расстоянии порядка 15 нм в сторону упорядоченной фазы (рис. 4, зеленые кривые).

Кроме непосредственного влияния подложки на конфигурацию доменов в мембране, она также должна изменять латеральное распределение линейно-активных липидов, действие которых аналогично действию поверхностно-активных веществ в трехмерных системах. В работе [31] было показано, что ганглиозид GM1 накапливается на границе упорядоченных доменов, существенно изменяя их распределение по размерам. Там же было показано, что преимущественной областью распределения GM1 является упорядоченный монослой в гибридной зоне границы. В случае "обратной конической" конфигурации рафта эта область расположена в верхнем монослое, а в случае "конической" конфигурации – в нижнем монослое, обращенном к подложке. Таким образом, наличие подложки в данном случае ведет к тому, что экзогенно добавляемый ганглиозид GM1 будет распределяться на границу практически всех доменов, поскольку энергетически выгодна конфигурация обратных конических рафтов, и именно в этой конфигурации в промежуточной приграничной области мембраны верхний монослой находится в упорядоченном состоянии (рис. 16). При отсутствии взаимодействия с подложкой лишь в половине доменов выгодная для распределения ганглиозида зона будет доступна из объемной водной фазы, и экзогенно добавленный компонент будет преимущественно распределяться на границу только половины общего числа рафтов.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Для простоты рассмотрим случай рафта большого радиуса, такого, что кривизной границ составляющих его доменов локально можно пренебречь и приближенно считать границы прямыми линиями. В этом случае система обладает трансляционной симметрией вдоль границ, т.е. все переменные зависят только от координаты, перпендикулярной границе. Введем декартову систему координат, начало которой расположено на границе одного из доменов (для определенности, нижнего), ось Ox направлена перпендикулярно границам, ось Оу направлена вдоль границ, ось Ог направлена перпендикулярно плоскости мембраны. В рассматриваемом случае трансляционной симметрии вдоль оси Оу все переменные зависят только от координаты х. В этом случае векторные величины могут быть заменены их проекциями на ось Ox, т.е. $\mathbf{n} \rightarrow n_x = n$, $\mathbf{N} \rightarrow N_x = N$. Для малых деформаций div $\mathbf{n} \approx dn/dx$, $N \approx dH(x)/dx =$ = H'(x), где H(x) - функция, характеризующаяформу поверхности монослоя, штрих здесь и ниже обозначает производную по координате х.

Будем считать, что гидрофобная часть липидного монослоя локально объемно несжимаема, т.е. объем любого элемента не изменяется при деформациях. Условие локальной объемной несжимаемости может быть записано в виде [29]:

$$h(x) = h_0 - \frac{h_0^2}{2}n'(x), \qquad (A1)$$

где h(x) — текущая толщина гидрофобной части монослоя; h_0 — толщина гидрофобной части монослоя в недеформированном состоянии. Для простоты будем называть толщину гидрофобной части монослоя просто толщиной монослоя.

Формы поверхностей верхнего и нижнего монослоя, а также межмонослойной поверхности мембраны будем характеризовать тремя функциями $H_u(x)$, $H_d(x)$ и M(x) соответственно. В таких обозначениях условия объемной несжимаемости для верхнего и нижнего монослоев могут быть записаны в виде:

$$H_u - M = h_u - \frac{h_u^2}{2} \dot{n_u}, \quad M - H_d = h_d - \frac{h_d^2}{2} \dot{n_d}, \quad (A2)$$

где n_u и n_d — проекции директора верхнего и нижнего монослоев на ось Ox, h_u и h_d — толщины верхнего и нижнего монослоев в недеформированном состоянии, соответственно; аргумент x опущен. С учетом (5) и (А1) плотность энергии деформации участка монослоя имеет вид:

$$w_{u} = \frac{B}{2}(n'_{u})^{2} + \frac{K_{t}}{2} \left(n_{u} - M' + \frac{h_{u}^{2}}{2}n''_{u}\right)^{2},$$

$$w_{d} = \frac{B}{2}(n'_{d})^{2} + \frac{K_{t}}{2} \left(n_{d} + M' + \frac{h_{d}^{2}}{2}n''_{d}\right)^{2}$$
(A3)

для верхнего и нижнего монослоев, соответственно. Функционал полной энергии бислойной мембраны с учетом (3) и (А2) дается выражением:

$$W = \int \left\{ \frac{B}{2} (\dot{n_u})^2 + \frac{K_t}{2} \left(n_u - M' + \frac{h_u^2}{2} n_u'' \right)^2 + \frac{B}{2} (\dot{n_d})^2 + \frac{K_t}{2} \left(n_d + M' + \frac{h_d^2}{2} n_d'' \right)^2 + \frac{K_h}{2} \left(M - h_d + \frac{h_d^2}{2} \dot{n_d'} - H_0 \right)^2 \right\} dx.$$
(A4)

Вариация функционала по функциям $n_{\mu}(x)$, $n_{d}(x)$ и М(х) приводит к следующей системе дифференциальных уравнений Эйлера–Лагранжа:

$$\begin{cases} h_{u}^{4}n_{u}^{(4)} + 4(h_{u2}^{2} - l^{2})n_{u}^{"} + 4n_{u} - 2h_{u}^{2}M^{"} - 4M^{'} = 0\\ h_{d}^{4}n_{d}^{(4)} + 4(h_{d}^{2} - l^{2})n_{d}^{"} + 4n_{d} + 2h_{d}^{2}M^{"} - \\ -\left(4 - 2\frac{k_{h}h_{d}^{2}}{k}\right)M^{'} = 0\\ h_{u}^{2}n_{u}^{"'} - h_{d}^{2}n_{d}^{"} + 2n_{u}^{'} - \left(2 - \frac{k_{h}h_{d}^{2}}{k}\right)n_{d}^{'} - 4M^{"} + \\ + 2\frac{k_{h}}{k^{2}}(M - h_{d} - H_{0}) = 0. \end{cases}$$
(A5)

Обозначим уравнения системы (А5) через E_1, E_2 и

 E_3 . Комбинация $\frac{E_1}{h_u^2} - \frac{E_2}{h_d^2} - \frac{dE_3}{dx}$ позволяет выразить M'(x) через проекции директора n_u и n_d и их вторые производные. Дифференцируя это выражение по x и подставляя M'' в E_3 , получим уравнение, из которого выражается M(x) через проекции директора n_u и n_d, их первые и третьи производные. Это позволяет исключить функцию M(x) из системы (А5). Аналогично, исключая из получающейся системы двух уравнений проекцию директора n_d, получим изолированное уравнение на проекцию директора *п*_и:

$$\frac{l^{2}K_{t}^{2}}{k_{h}}\left(h_{u}^{4}+h_{d}^{4}\right)n_{u}^{(8)}+$$

$$+l^{2}\left(\frac{4K_{t}^{2}}{k_{h}}\left(h_{u}^{2}+h_{d}^{2}-2l^{2}\right)-h_{u}^{4}-h_{d}^{4}\right)n_{u}^{(6)}+$$

$$+\left(4l^{4}+\frac{8K_{t}^{2}l^{2}}{k_{h}}-4h_{u}^{2}l^{2}+h_{u}^{4}\right)n_{u}^{(4)}+$$

$$+4\left(h_{u}^{2}-2l^{2}\right)n_{u}^{''}+4n_{u}=0.$$
(A6)

Корни λ_i (*j* = 1, 2, ..., 8) характеристического уравнения находятся аналитически, но очень громоздки. Все корни комплексные и представимы в виле:

$$\begin{split} \lambda_{1} &= \alpha + i\beta, \quad \lambda_{2} = \alpha - i\beta, \\ \lambda_{3} &= -\alpha + i\beta, \quad \lambda_{4} = -\alpha - i\beta, \\ \lambda_{5} &= \varphi + i\varphi, \quad \lambda_{6} = \varphi - i\varphi, \\ \lambda_{7} &= -\varphi + i\varphi, \quad \lambda_{8} = -\varphi - i\varphi, \end{split}$$
(A7)

где α , β , ϕ , ϕ – некоторые действительные числа, зависящие от параметров системы; і – мнимая единица. Пространственное распределение проекции директора верхнего монослоя может быть записано как:

$$n_u(x) = \sum_{j=1}^8 c_j e^{\lambda_j x}, \qquad (A8)$$

где c_i (j = 1, 2, ..., 8) – комплексные коэффициенты, определяемые из граничных условий. Восемь комплексных коэффициентов эквивалентны шестнадцати действительным коэффициентам, однако на функцию $n_{\mu}(x)$ налагается условие вещественности при любых значениях x, которое уменьшает число независимых действительных коэффициентов до восьми. Из распределения проекции директора верхнего монослоя $n_u(x)$ находятся распределения проекции директора нижнего монослоя $n_d(x)$ и форма межмонослойной поверхности *М*(*x*). Затем из условия локальной объемной несжимаемости (А2) находится форма поверхности верхнего, $H_u(x)$, и нижнего, $H_d(x)$, монослоев. Подставляя функции $n_u(x)$, $n_d(x)$, M(x)в уравнение (A4) и интегрируя по x, найдем энергию деформированного участка мембраны, нанесенной на твердую подложку.

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

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ingólfsson H.I., Melo M.N., Van Eerden F.J., Arnarez C., Lopez C.A., Wassenaar T.A., Periole X., de Vries A.H., Tieleman D.P., Marrink S.J. 2014. Lipid organization of the plasma membrane. *J. Am. Chem Soc.* 136, 14554–14559.
- Ingólfsson H.I., Carpenter T.S., Bhatia H., Bremer P.T., Marrink S.J., Lightstone F.C. 2017. Computational lipidomics of the neuronal plasma membrane. *Biophys. J.* 113, 2271–2280.
- Pike L.J. 2006. Rafts defined: A report on the Keystone Symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lip. Res.* 47, 1597–1598.
- Simons K., Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387, 569–572.
- 5. Edidin M. 2001. Shrinking patches and slippery rafts: Scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.* **11**, 492–496.
- Bocharov E.V., Mineev K.S., Pavlov K.V., Akimov S.A., Kuznetsov A.S., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2017. Helix-helix interactions in membrane domains of bitopic proteins: Specificity and role of lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 561–576.
- Ripa I., Andreu S., López-Guerrero J.A., Bello-Morales R. 2021. Membrane rafts: Portals for viral entry. *Frontiers Microbiol.* 12, 120.
- Ayuyan A.G., Cohen F.S. 2008. Raft composition at physiological temperature and pH in the absence of detergents. *Biophys. J.* 94, 2654–2666.
- Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Баратова Л.А., Радюхин В.А. 2019. Модуляция холестерин-зависимой активности макрофагов IC-21 пептидом, содержащим два CRAC-мотива из белка М1 вируса гриппа. Биол. мембраны. 36, 271–280.
- Lillemeier B.F., Pfeiffer J.R., Surviladze Z., Wilson B.S., Davis M.M. 2006. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 18992–18997.
- Pralle A., Keller P., Florin E.L., Simons K., Hörber J.H. 2000. Sphingolipid–cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148, 997–1008.
- Frisz J.F., Klitzing H.A., Lou K., Hutcheon I.D., Weber P.K., Zimmerberg J., Kraft M.L. 2013. Sphingolipid domains in the plasma membranes of fibroblasts are not enriched with cholesterol. *J. Biol. Chem.* 288, 16855–16861.
- Samsonov A.V., Mihalyov I., Cohen F.S. 2001. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys. J.* 81, 1486–1500.
- Veatch S.L., Polozov I.V., Gawrisch K., Keller S.L. 2004. Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 86, 2910– 2922.
- 15. Staneva G., Osipenko D.S., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Akimov S.A. 2016. Metabolic precursor of

cholesterol causes formation of chained aggregates of liquid-ordered domains. *Langmuir.* **32**, 1591–1600.

- Baumgart T., Hess S.T., Webb W.W. 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*. 425, 821–824.
- Saitov A., Akimov S.A., Galimzyanov T.R., Glasnov T., Pohl P. 2020. Ordered lipid domains assemble via concerted recruitment of constituents from both membrane leaflets. *Phys. Rev. Lett.* **124**, 108102.
- Vinklárek I.S., Vel'as L., Riegerová P., Skála K., Mikhalyov I., Gretskaya N., Hof M., Šachl R. 2019. Experimental evidence of the existence of interleaflet coupled nanodomains: An MC-FRET study. J. Phys. Chem. Lett. 10, 2024–2030.
- Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И., Акимов С.А. 2011. Стабилизация бислойной структуры рафтов за счет упругих деформаций мембраны. Биол. мембраны. 28, 307–314.
- Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Bozdaganyan M.E., Cohen F.S., Pohl P., Akimov S.A. 2015. Elastic membrane deformations govern interleaflet coupling of lipidordered domains. *Phys. Rev. Lett.* 115, 088101.
- Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Cohen F.S., Pohl P., Akimov S.A. 2016. Comment on "Elastic membrane deformations govern interleaflet coupling of lipid-ordered domains" Reply. *Phys. Rev. Lett.* 116, 079802.
- 22. Risselada H.J., Marrink S.J. 2008. The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 17367–17372.
- Perlmutter J.D., Sachs J.N. 2011. Interleaflet interaction and asymmetry in phase separated lipid bilayers: Molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 6563–6577.
- Müller D.J., Fotiadis D., Scheuring S., Müller S.A., Engel A. 1999. Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope. *Biophys. J.* 76, 1101–1111.
- 25. Israelachvili J. 2011. *Intermolecular and Surface Forces*. London: Acad. Press.
- LeNeveu D.M., Rand R.P., Parsegian V.A. 1976. Measurement of forces between lecithin bilayers. *Nature*. 259, 601–603.
- Lipowsky R., Sackmann E. 1995. Handbook of biological physics. Chapter 11. Generic interactions of flexible membranes. Amsterdam: Elsevier Science, p. 521–602.
- 28. Акимов С.А., Фролов В.А., Кузьмин П.И. 2005. Линейное натяжение и функция распределения нанорафтов по размерам в бислойных липидных мембранах. *Биол. мембраны.* **22**, 413–426.
- 29. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
- Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* 79, 328–339.
- Galimzyanov T.R., Lyushnyak A.S., Aleksandrova V.V., Shilova L.A., Mikhalyov I.I., Molotkovskaya I.M., Akimov S.A., Batishchev O.V. 2017. Line activity of ganglioside GM1 regulates raft size distribution in a cholesterol-dependent manner. *Langmuir.* 33, 3517– 3524.

Configurations of Ordered Domain Boundary in Lipid Membrane on Solid Support

T. R. Galimzyanov¹, S. A. Akimov^{1, *}

¹Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia *e-mail: akimov sergey@mail.ru

The lateral distribution of proteins and lipids in plasma membranes of mammalian cells is not uniform. Lipidprotein domains enriched with sphingomyelin and cholesterol are called rafts. The size of cell membrane rafts is extremely small, and this significantly complicates their experimental study. In model membranes, the lipid composition of which is close to the composition of the plasma membrane, the formation of ordered domains is possible as a result of phase separation induced by a decrease in temperature. An effective method for studying model rafts is atomic force microscopy, which makes it possible to register domains whose size is less than the diffraction limit of visible light. However, this method involves the deposition of the membrane on a solid support. Due to electrostatic, van der Waals, and hydration interactions with the support, the closest membrane monolayer appears in physical conditions that differ from the conditions of the monolayer distant from the support. The asymmetry of physical conditions leads to alteration of the structure and energy of the raft boundary. As a result, of the two possible states of the boundary of equal energy in a free membrane, only one is practically realized on the support. This can lead to a change in the efficiency of specific line-active lipids that accumulate at the boundary of domains and regulate their size by decreasing the boundary energy, similar to the action of surfactants in three-dimensional systems.

Keywords: lipid membrane, ordered domain, atomic force microscopy, solid support, hydration repulsion, theory of elasticity

УДК 539.26

ПРОБЛЕМА НЕОДНОЗНАЧНОСТИ РЕШЕНИЯ ОБРАТНЫХ ЗАДАЧ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ: ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЙ ПОДХОД НА ПРИМЕРЕ РЕЦЕПТОРА, ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРУ ИНСУЛИНА. МЕТОДЫ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ДАННЫХ МУРР

© 2021 г. М. В. Петухов^{*a*, *}, П. В. Конарев^{*a*}, В. В. Волков^{*a*}, А. А. Можаев^{*a*, *b*}, Э. В. Штыкова^{*a*}

^аИнститут кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва, 119333 Россия ^bИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия *e-mail: maxim@embl-hamburg.de Поступила в редакцию 16.03.2021 г. После доработки 25.03.2021 г. Принята к публикации 25.03.2021 г.

Построение трехмерных моделей белковых макромолекул представляет собой серьезную проблему из-за возможной неоднозначности решения обратной задачи восстановления трехмерной структуры по одномерному профилю малоуглового рассеяния. Целевая функция этой задачи может иметь несколько локальных минимумов, что приводит к зависимости решения от стартовых значений параметров моделей и от метода поиска глобального минимума. Проблема создания структурных моделей усложняется также усреднением картины рассеяния по всем ориентациям частиц в пространстве, а при наличии полидисперсности и/или полиморфизма — распределением по размерам и по форме рассеивающих объектов. В данной работе проблема неоднозначности решения обратных задач и восстановления трехмерной структуры белка рассматривается на примере исследования строения эктодомена рецептора, подобного рецептору инсулина (ectoIRR) в растворе. В работе представлен последовательный подход к решению данной проблемы, начиная от определения общих структурных параметров и *ab initio* восстановления формы до моделирования жесткими телами (методом молекулярной тектоники), гибридными методами и анализ кривых рассеяния с помощью разложения на сингулярные векторы.

Ключевые слова: малоугловое рентгеновское рассеяние, структурное моделирование, рецепторные тирозинкиназы, рецептор подобный рецептору инсулина **DOI:** 10.31857/S0233475521040095

введение

Благодаря широкому использованию источников синхротронного излучения, новых типов регистрирующих устройств и развитию новых подходов к обработке и интерпретации данных эксперимента метод малоуглового рассеяния (МУР) превратился в один из самых мощных и универсальных инструментов для исследования надатомной структуры вещества, который применяется при анализе структуры дисперсных систем, в молекулярной биологии, биофизике и других областях науки и техники [1–5].

Уровень структурной информации, заключенной в данных МУР, определяется природой рассеивающих объектов. Наиболее плодотворно теория малоуглового рассеяния и подходы к решению структурных задач разработаны для исследования монодисперсных систем идентичных частиц. Такие системы исследуются, например, при анализе высокоочищенных растворов биологических макромолекул. В этом случае интенсивность рассеяния непосредственно связана со структурой частиц, что дает уникальную возможность определения их формы и размера, а в ряде случаев и внутреннего строения с разрешением порядка 1 нм.

Общие параметры исследуемых образцов, так называемые инварианты МУР, однозначно определяются непосредственно по кривым рассеяния, не требуя структурного моделирования [1]. К ин-

вариантам МУР относятся максимальный размер частиц (D_{max}), радиус инерции (R_g), объем Порода (V_p) и молекулярная масса (MM) [1, 6]. Построение же трехмерных моделей представляет собой значительно более сложную проблему из-за плохой обусловленности обратной задачи восстановления трехмерной структуры по одномерному профилю рассеяния. Целевая функция этой задачи может иметь несколько локальных минимумов. что приводит к зависимости решения от стартовых значений параметров моделей и от метода поиска глобального минимума. Проблема создания структурных моделей усложняется также усреднением картины рассеяния по всем ориентациям частиц в пространстве, а при наличии полидисперсности и/или полиморфизма распределением по размерам и по форме рассеивающих объектов. Таким образом, однозначное решение обратной задачи рассеяния, т.е. восстановление трехмерной структуры объекта высокого разрешения по экспериментальным данным МУР, в общем случае невозможно. Тем не менее, учитывая значения инвариантов, рассчитанных по экспериментальным кривым, налагая определенные ограничения на искомую структуру, например, вводя условие симметричности частицы или ее однородности, и используя структурную информацию, полученную комплементарными методами, коридор возможных решений удается значительно сузить. Кроме того, современные методы обработки и интерпретации данных малоуглового рассеяния [5, 7] позволяют за сравнительно короткое время, используя разные подходы и многократный запуск соответствующих программ, восстановить структуру исследуемого образца, что дает возможность сравнения, усреднения, кластеризации и последующего анализа набора полученных решений [8, 9]. В результате удается получить достаточно подробную структуру рассеиваюшего объекта.

В данной работе проблема неоднозначности решения обратных задач и восстановления структуры по данным малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) рассматривается на примере исследования строения эктодомена рецептора, подобного рецептору инсулина (ectoIRR) в растворе. Рецептор, подобный инсулиновому рецептору (IRR), принадлежит к суперсемейству трансмембранных рецепторных тирозинкиназ, которые регулируют различные жизненно важные процессы в организме путем передачи сигнала об изменении условий окружающей среды во внутриклеточное пространство, активируя тем самым ответ клетки на возникшие изменения. IRR был открыт в 1989 году [10], но его структура и функции долгое время не были известны. Только недавно впервые было показано, что этот белок активизируется исключительно при изменении кислотно-щелочного баланса, т.е. для передачи

сигнала во внутриклеточную среду этому белку не требуется присоединение к нему лигандов [11, 12]. Необычные функциональные свойства этого рецептора привлекли внимание исследователей всего мира, однако структура полноразмерного белка неизвестна до сих пор, и только в 2019 году методами МУРР и атомно-силовой микроскопии впервые была определена конформация его эктодомена при разных рН [13]. Тем не менее дальнейшее изучение свойств ectoIRR показывает. что из-за сложности его структурной организации вопрос об однозначности полученной в 2019 году структуры остается открытым. Именно поэтому этот белок был выбран в качестве объекта для выработки оптимальной стратегии минимизации неоднозначности решения обратных задач МУРР при исследовании структур сложных биологических макромолекул в растворе.

В работе представлен последовательный подход к решению данной проблемы, начиная от определения общих структурных параметров и *ab initio* восстановления формы до моделирования жесткими телами (методом молекулярной тектоники) и гибридными методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантного ectoIRR. Рекомбинантный эктодомен рецептора, подобного рецептору инсулина (ectoIRR), был экспрессирован, очищен и охарактеризован, как описано в [13].

Анализ данных малоуглового рентгеновского рассеяния: первичная обработка данных. Малоугловой эксперимент с IRR был проведен на станции BioSAXS P12 в EMBL (DESY, Гамбург, Германия) [14] совместно с эксклюзионной гель-хроматографией (ЭГХ) с целью разделить возможные олигомеры и для обеспечения его монодисперсности [15].

Обработка полученных экспериментальных данных и их дальнейшая интерпретация проводилась с помощью программного комплекса ATSAS [16], который представляет собой один из самых надежных и популярных инструментов анализа, визуализации и моделирования данных МУР. Все представленные ниже программы и программные блоки, использованные в данном исследовании, являются частью последней модификации ATSAS.

Первичная обработка экспериментальных данных состоит в ряде манипуляций с набором экспериментальных кривых рассеяния, тщательность выполнения которых определяет количество и качество полученной структурной информации. Программный многофункциональный блок PRIMUS [17], разработанный для выполнения предварительных действий с исходными экспериментальными данными МУРР, обеспечивает необходимый и достаточный базис для дальнейшего структурного анализа.

Процесс первичной обработки включает в себя статистический анализ набора кривых малоуглового рассеяния для данного образца за период измерения, их усреднение и шкалирование. С помощью программного блока PRIMUS проводится вычитание рассеяния фоном (растворителем), сшивка данных, измеренных на разных угловых интервалах, экстраполяция к нулевой концентрации образца, вычисление инвариантов с использованием графиков Гинье и Порода и многое другое.

Следует отметить, что в случае использования онлайн ЭГХ для обеспечения монодисперсности образца усреднение кривых рассеяния, а также вычитание рассеяния буфером проводится с помощью программы CHROMIXS [18].

Радиус инерции R_g определяется из аппроксимации Гинье [19] при очень малых углах, где интенсивность рассеяния для идентичных невзаимодействующих частиц определяется как $I(s) = I_0 \exp[-(sR_g)^2/3]$. При этом интенсивность рассеяния в нулевой угол I_0 пропорциональна молекулярной массе. Объем Порода V_p рассеивающего объекта вычисляют с использованием нормированного инварианта Порода Q [20].

Для оценки свернутости макромолекулы используется график в координатах Кратки: $s^2I(s)$ от *s*. Интенсивность рассеяния структурированных, плотно свернутых частиц демонстрирует хорошо выраженный колоколообразный максимум на графике Кратки [20]. Разупорядоченные, развернутые рассеивающие объекты подчиняются закономерности s^{-2} , образуя статистически свернутую Гауссову цепь (клубок) [21].

Модифицированный вариант программного блока PRIMUS, PRIMUS/QT [7], содержит инструмент "Molecular weight", который дает Байесиановскую оценку молекулярной массы, основываясь на нескольких параметрах [22].

Встроенная в PRIMUS утилита SASPLOT [7] позволяет оценить качество разностных кривых рассеяния благодаря возможности детальной визуализации их отдельных участков. Определение геометрических и весовых характеристик и ряда других структурных параметров также требует тщательного визуального контроля, и хотя в настоящее время первичную обработку данных малоуглового рассеяния можно проводить в полностью автоматическом режиме [23], в случае исследования сложных объектов и систем, обладающих полиморфизмом и/или полидисперсностью, эту процедуру следует выполнять вручную, а графический интерфейс комплекса PRIMUS позволяет оценить качество выполняемых манипуляций.

Программа SHANUM [24] используется для оценки полезного участка кривой рассеяния, где высокоугловые точки с сильным шумом исключаются из рассмотрения как неинформативные. Программа DATCLASS [25] используется для предсказания типа частицы по кривой рассеяния (компактная, вытянутая, плоская, кольцевая, полая, случайная цепь). Оценка неоднозначности определения формы для конкретных образцов проводится с помощью программы AMBIMETER [26], которая сравнивает экспериментальную кривую рассеяния с "картой неоднозначности", рассчитанной по 14000 топологий, и дает количественный прогноз для ab initio восстановления формы. Индекс неоднозначности *a-score* является логарифмом числа соседних кривых на карте неоднозначности для данной экспериментальной кривой. Величина *a-score* < 1.5 практически гарантирует однозначное восстановление. При значениях *a-score* > 2.5 восстановление имеет множество, во всех остальных случаях восстановление потенциально неоднозначно.

Анализ данных малоуглового рентгеновского рассеяния: определение общей формы частиц по данным МУРР. Для разбавленных растворов со случайной ориентацией монодисперсных, невза-имодействующих частиц рассеяние является изо-тропным, и его интенсивность I(s) выражается как функция модуля вектора рассеяния s ($s = |s| = 4\pi sin(\theta)/\lambda$), где λ – длина волны падающего излучения и 2 θ – угол рассеяния:

$$I(s) = 4\pi \int_{0}^{D_{\text{max}}} p(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr,$$
 (1)

здесь функция распределения по расстояниям p(r) связана преобразованием Фурье с интенсивностью рассеяния:

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin(sr)}{sr} ds.$$
 (2)

Таким образом, функции распределения по расстояниям p(r) может быть найдена с помощью уравнений (1) и (2). Эта функция содержит информацию о форме и структуре частицы и позволяет оценивать ее максимальный размер D_{max} из условия p(r) = 0 при $r > D_{\text{max}}$. В практических исследованиях p(r) рассчитывают не прямым интегрированием интенсивности (что приводит к сильным эффектам обрыва), а с помощью так называемого косвенного Фурье-преобразования и программы GNOM пакета ATSAS [27].

Реконструкция трехмерной модели объекта по его одномерной кривой рассеяния является не вполне корректной задачей, поскольку множественные структуры гипотетически могут обеспечить один и тот же профиль рассеяния. Упрощение, уменьшающее неоднозначность такой ре-
конструкции, состоит в представлении частицы с низким разрешением как однородного тела. Форма частицы может быть описана как набор конечных объемных элементов (шариков), расположенных на плотной гексагональной упаковке. Наиболее распространенный подход для определения формы с низким разрешением использует минимизацию целевой функции с помощью имитации отжига для создания компактного взаимосвязанного ансамбля шариков в объеме поиска (обычно, сфера с диаметром D_{max}), которая соответствует экспериментальным данным. Этот подход реализован в программе DAMMIN [28]. Данный подход не требует наличия априорной структурной информации и, таким образом, моделирование ведется ab initio.

В процессе моделирования выполняется поиск оптимальной модели, где минимизируется отклонение между экспериментальными данными $I_{exp}(s)$ и профилем рассеяния, вычисленным из модели $I_{calc}(s)$:

$$\chi^{2} = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^{N} \left[\frac{I_{\exp}(s_{j}) - cI_{calc}(s_{j})}{\sigma(s_{j})} \right]^{2}, \quad (3)$$

где c — шкалирующий коэффициент, N — количество экспериментальных точек, а σ обозначает ошибки эксперимента.

Для получения структурных моделей, отвечающих надатомному разрешению, на искомую модель накладываются условия связности и компактности. Поэтому целевая функция, минимизируемая в процессе восстановления структуры, имеет вид: $f(X) = \chi^2 + \alpha P(X)$, где P(X) - штраф за некомпактность модели ($\alpha > 0$ – его вес, задаваемый пользователем).

Программу DAMMIN для *ab initio* моделирования можно применять для любых монодисперсных образцов, а для восстановления доменной структуры белков была разработана программа GASBOR [29]. Виртуальные остатки в этой программе формируют белковоподобную цепь, свернутую так, чтобы рассеяние от полученной структуры соответствовало рассеянию от исследуемой белковой макромолекулы в растворе с разрешением порядка 0.5 нм.

Расчет кривой МУРР от моделей атомного разрешения. Более детальная интерпретация данных МУРР возможна, если атомные модели высокого разрешения всей макромолекулы или ее отдельных фрагментов доступны из кристаллографических данных или ЯМР. В этом случае МУРР позволяет обнаружить структурное различие кристалл—раствор, определить биологически активную конформацию или олигомерное состояние. Следует отметить, что точное построение кривых рассеяния в растворе по атомным координатам рассеивающих объектов не является тривиальной задачей. На профили рассеяния влияют эффекты растворителя, в частности наличие гидратной оболочки со средней плотностью, примерно на 10% превышающей плотность основного растворителя. Тем не менее расчет рассеяния макромолекулой в растворе и приближение экспериментальной кривой может быть произведено программой CRYSOL [30].

Восстановление структуры по данным МУРР методом молекулярной тектоники. В тех случаях, когда рассеивающие частицы представляют собой макромолекулярные комплексы, чрезвычайно важным подходом к интерпретации данных МУРР является моделирование жесткими телами, или метод молекулярной тектоники [31]. Часто сложный биологический комплекс не может быть закристаллизован, и расположение субъединиц в нем остается неизвестным, но удается закристаллизовать и определить структуру отдельных составляющих комплекса с атомным разрешением. Тогда взаимное расположение субъединиц в комплексе можно получить методом молекулярной тектоники из данных МУРР. То есть метод используется в том случае, когда известны структуры отдельных частей, составляющих комплекс. Кроме того, этим методом можно анализировать внутреннюю структурную гибкость и подвижность, присущую субъединицам в комплексе или доменам в границах одной макромолекулы. Моделирование жесткими телами пространственной структуры комплексов заключается в перемещении и вращении отдельных элементов структуры и получении минимального отклонения χ^2 между модельной и экспериментальными кривыми, что осуществляется с помощью программы SASREF [31]. Процедура моделирования методом молекулярной тектоники легко обобщается на случай произвольного числа жестких тел К и в общем случае может быть описана с помощью 6(K-1)параметров. При этом амплитуды рассеяния отдельных субъединиц рассчитываются с помощью программы CRYSOL.

Поскольку в белковых макромолекулах часто жесткие домены соединены между собой гибкими, разупорядоченными, подвижными линкерами, анализ структуры таких белков проводится с помощью дальнейшего развития метода молекулярной тектоники, что реализовано, например, в программе CORAL [8]. Программа совершает гибридное моделирование, используя молекулярную тектонику для позиционирования доменов и *ab initio* подход для представления линкеров в виде цепей, составленных из виртуальных остатков. Принцип гибридного моделирования биологических объектов описан ниже.

Гибридные методы восстановление структуры по данным **МУРР.** Сочетание разных подходов, например молекулярной тектоники и других струк-



Рис. 1. Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния (*a*) и графики Кратки (*б*) для эктодомена рецептора, подобного рецептору инсулина (ectoIRR), в растворе при pH 7.0 и 9.0: кривые 1 (pH 7.0) и 2 (pH 9.0) – измерения, проведенные до применения онлайн хроматографии; кривые 3 (pH 7.0) и 4 (pH 9.0) – измерения с использованием эксклюзионной гель-хроматографии.

турных методов, позволяет создать кластер методов, которые называются гибридными. Одним из наиболее важных подходов к изучению макромолекулярных комплексов гибридными методами является сочетание методов ab initio и молекулярной тектоники. Среди программ, реализующих этот подход, следует особо отметить программу ЕОМ, которая представляет собой метод оптимизации ансамбля частиц (доменов, субъединиц) и, помимо функции ab initio восстановления цельной формы, позволяет анализировать гибкость биологических макромолекул, их развернутость и подвижность отдельных частей относительно друг друга, т.е. эта программа представляет собой инструмент для описания распределения по форме и по размеру частично или полностью развернутой макромолекулы в растворе [32].

Модели, полученные различными способами, совмещаются с помощью программы SUPCOMB [33], чтобы определить разницу в их пространственной организации и указать нормализованное пространственное отклонение (NSD). Как правило, значение NSD, близкое к 1.0, показывает, что модели, полученные разными методами, схожи.

Анализ полидисперсных и полиморфных растворов. В случае полидисперсных и полиморфных систем (разбавленные растворы) результирующая интенсивность рассеяния представляет собой линейную комбинацию отдельных компонент и описывается уравнением

$$I(s) = \sum_{k=1}^{K} (v_k I_k(s)),$$
(4)

где K – число компонент системы, v_k – объемные фракции и $I_k(s)$ – интенсивности рассеяния от каждой компоненты.

Для количественного анализа объемной доли различных компонентов в растворе (в случае, когда число компонент и их интенсивности рассеяния известны) применяется программа OLIGO-MER [17]. Программа использует алгоритм неотрицательных линейных наименьших квадратов для минимизации расхождения χ^2 между предсказанной кривой рассеяния от смеси и экспериментальными данными МУРР.

Одним из эффективных модельно-независимых методов оценки числа компонент является разложение на сингулярные векторы. Когда имеется набор данных МУРР, записанный при изменяющихся условиях, программа SVDPLOT [17] применяется для вычисления сингулярных векторов и связанных с ними сингулярных значений. Число неслучайно осциллируемых сингулярных векторов со значительными сингулярными значениями позволяет оценить минимальное количество независимых кривых, необходимых для представления всего набора данных, т.е. количество значимых компонентов в смеси.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Практическое применение методов интерпретации данных МУРР на примере кривых рассеяния от ectoIRR. Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния ectoIRR при pH 7.0 и 9.0 показаны на рис. 1*a*.

Как видно из рис. 1*a*, до применения эксклюзионной гель-хроматографии кривые рассеяния ectoIRR характерны скорее для полидисперсных



Рис. 2. *а* – Хроматограмма ectoIRR при pH 9. Сплошной линией показаны усредненные интенсивности рассеяния в зависимости от номера кривой при элюировании образца. Треугольниками показаны кривые с левой стороны, кружочками – с правой. Черным цветом отмечены точки, соответствующие буферу. *б* – Усредненные кривые малоуглового рассеяния белка, взятые слева (1) и справа (2) от пика хроматограммы.

соединений со слабо выраженным форм-фактором. Особенностью этих кривых является также то, что интенсивность рассеяния в самых малых углах несколько ниже, чем для кривых после хроматографии. Более ярко указанные отличия выявляются на графиках в координатах Кратки (рис. 16). Можно предположить, что образцы ectoIRR до прохождения через хроматографическую колонку, будучи полидисперсными, могут содержать некоторое количество низкомолекулярных примесей, что выражается в уменьшении рассеяния в нулевой угол и уменьшении амплитуды максимума на графике Кратки в интервале vгловых векторов 0.25−0.75 нм⁻¹. Поэтому для структурного анализа далее использовались кривые рассеяния, дополнительно очищенные с помошью ЭГХ.

Поскольку IRR активизируется исключительно при изменении кислотно-щелочного баланса, следовало ожидать заметного изменения профиля МУРР при изменении pH, однако кривые рассеяния при защелачивании раствора практически не отличаются друг от друга, как это уже наблюдалось нами ранее [13], и тогда был сделан вывод, что структура ectoIRR на макроуровне не изменяется при изменении pH, а конформационные перестройки ограничиваются локальным вращением доменов белка за счет гибких линкеров между ними. Аналогичные выводы были сделаны также для одного из гомологов IRR – для эктодомена рецептора инсулиноподобного фактора роста в работе [34].

Для выяснения того, какие именно структурные характеристики и на каком структурном уровне изменяются при активации ectoIRR, в данной работе был проведен тщательный анализ кривых малоуглового рассеяния и рассчитаны соответствующие структурные параметры.

Первичная обработка данных МУРР и общие структурные параметры. Поскольку хроматограммы ectoIRR при pH 7.0 и pH 9.0 практически совпадают, на рис. 2а для примера представлена хроматограмма эктодомена при рН 9.0, представляющая собой узкий и на первый взгляд симметричный пик, характерный для монодисперсного вещества. Несколько кривых рассеяния элюатом были взяты по раздельности с правой и левой сторон пика для усреднения и последующего сравнения, т.е. для того, чтобы убедиться в симметричности пика хроматограммы и исключить присутствие дополнительных фракций ectoIRR. Из отдельно усредненных кривых МУРР с левой и правой сторон пика было вычтено рассеяние буфером (соответствующие кривые помечены черными точками на хроматограмме) в программе CHROMIXS. Полученные таким образом профили рассеяния представлены на рис. 26.

Как видно из рис. 2δ , усредненные кривые рассеяния элюата ectoIRR, взятые слева и справа от пика хроматограммы, полностью совпадают. Отсюда следует, что после хроматографической колонки раствор белка становится монодисперсным и, следовательно, рассеяние от него может быть использовано для детального количественного анализа структуры ectoIRR.

Согласно программе SHANUM, полезный диапазон данных заканчивается при значении $s \approx 2.5-3.0 \text{ нм}^{-1}$ (примерно 15 шенноновских каналов). Однако при расчете максимальных размеров и функций распределения по расстояниям



Рис. 3. Графики Порода для pH 7.0 (вверху) и pH 9.0 (внизу) кривых рассеяния ectoIRR. Вертикальная пунктирная линия ограничивает участок векторов рассеяния, соответствующего рассеянию однородной частицей.

p(r) программой GNOM используемый диапазон данных был ограничен сверху 8–10 шенноновскими каналами, где ширина одного шенноновского канала равна π/D_{max} . Это соответствует выходу на плато графика Порода $I(s)s^4$ от *s* для *s* в области примерно 1.5–1.8 нм⁻¹ (рис. 3). Этот участок соответствует рассеянию однородной частицей и может быть использован в дальнейшем для *ab initio* восстановления формы ectoIRR в растворе.

Классификация типа структуры с помощью программы DATCLASS указала на компактную форму доменов молекулы ectoIRR, что хорошо согласуется с формой кривых рассеяния на графике Кратки (рис. 16). Характерный колоколообразный вид графиков Кратки как для рН 7.0, так и для pH 9.0 свидетельствует о том, что ectoIRR в основном состоит из упорядоченных, свернутых, т.е. компактных, доменов. Тем не менее, для обеих кривых в результате сравнения с "картой неоднозначности" программой AMBIMETER было получено среднее значение параметра неоднозначности 2.1, что предполагает потенциально неоднозначное восстановление формы рассеивающего объекта [26]. Поскольку выше мы показали, что раствор ectoIRR при разных pH является монодисперсным, то такая неоднозначность восстановления структуры может быть вызвана потенциальным полиморфизмом белка, состоящего из множество отдельным доменов, соединенных гибкими линкерами.

Большое значение при решении обратных задач МУРР имеет тщательное определение интегральных макромолекулярных характеристик рассеивающих объектов. Радиусы инерции, посчитанные с помощью формулы Гинье, и другие инварианты МУРР, рассчитанные по кривым МУРР, приведены в табл. 1.

Прежде всего, в табл. 1 обращают на себя внимание более низкие значения инвариантов для есtoIRR, рассчитанных по кривым рассеяния без применения эксклюзионной гель-хроматографии. Совокупность полученных данных свидетельствует о полидисперсности: низкие значения MM и R_g говорят о присутствии в растворе низкомолекулярных примесей, в то время как увеличенное значение D_{max} подразумевает наличие некоторого количества агрегатов белка. В целом, это еще раз подчеркивает необходимость использования онлайн ЭГХ для детального структурного анализа биологических объектов.

Также важен выбор правильного интервала угловых векторов. Породовский объем для ectoIRR при pH 7.0 и 9.0 (табл. 1), посчитанный в диапазоне данных до восьми шенноновских каналов, имеет явно завышенное значение, и если использовать эмпирическое соотношение $MM_{Porod} = V_{Porod}/1.65$, то значения молекулярных масс будут в 2 раза превышать соответствующие теоретические значения. Это значение для глобулярных белков было получено ранее [8]. Эмпирический

Параметр	Без ЭГХ		После ЭГХ		
	pH 7.0	рН 9.0	рН 7.0	pH 9.0	
				левая часть ЭГХ	правая часть ЭГХ
R_g , нм	5.4 ± 0.1	5.3 ± 0.1	5.7 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1
<i>D</i> _{max} , нм	19.0 ± 1.0	18.0 ± 1.0	17.0 ± 1.0	17.5 ± 1.0	17.5 ± 1.0
$V_{\text{Porod}}, \text{Hm}^3$	455 ± 30	440 ± 30	650 ± 30	700 ± 30	700 ± 30
(8 шенноновских каналов)					
$V_{\text{Porod}}, \text{Hm}^3$	455 ± 30	440 ± 30	540 ± 30	580 ± 30	570 ± 30
(15 шенноновских каналов)					
<i>MM</i> _{Porod} , кДа	190 ± 10	180 ± 10	225 ± 20	240 ± 20	240 ± 20
(15 шенноновских каналов)					
MM _{IRdimer} , кДа	230	230	230	230	230
теоретическое значение					
Исключенный объем	500 ± 20	500 ± 20	510 ± 20	520 ± 20	520 ± 20
из <i>ab initio</i> восстановления					
<i>V</i> _{DAM} , нм ³					
<i>MM</i> _{DAM} , кДа	210 ± 20	210 ± 20	210 ± 20	220 ± 20	220 ± 20
<i>ММ</i> _{Байес} , кДа	240	240	320	320	320

Таблица 1. Общие структурные параметры ectoIRR при pH 7.0 и 9.0

коэффициент 1.65 определялся для PDB структур, не содержащих гетероатомы. В данном случае молекула IRR содержит гликаны, что может сушественно изменить соотношение. Для того чтобы оценить коэффициент для данного конкретного случая, использовалась гомологичная модель рецептора инсулина с гликанами, взятая из малоугловой базы данных SASBDB с кодом SASDHF2. Для этой модели, имеющей MM = = 251 кДа, рассчитанный Породовский объем составил 600 нм³. Таким образом, было получено значение коэффициента для вычисления молекулярных масс, равное 2.4. Это значение и было использовано для оценки ММ в настояшей работе в диапазоне угловых векторов до 15 шенноновских каналов. В этом случае молекулярные массы ectoIRR однозначно соответствуют димеру, что отвечает известным литературным данным, свидетельствующим, что рецептор, подобный рецептору инсулина, изначально существуют в мембране в виде димера, где соответствующие субъединицы связаны дисульфидными мостиками [35]. Показанные в табл. 1 значения ММ хорошо согласуются с молекулярной массой, вычисленной по рассеянию в нулевой угол: 220 ± 20 кДа для ectoIRR после ЭГХ.

Завышенное значение Породовского объема в диапазоне данных до 8 шенноновских каналов можно объяснить неоднородностью макромолекул ectoIRR из-за наличия гликанов в его составе. Молекулярная масса эктодомена, посчитанная по аминокислотной последовательности белка, равна примерно 190 кДа, т.е. на долю гликанов приходится почти 20%, и такой рассеивающий объект нельзя рассматривать как однородный. Однако начальный участок кривой рассеяния до 8 шенноновских каналов следует использовать для грубого *ab initio* восстановления формы ectoIRR в растворе. В этом случае мы используем упрощение, уменьшающее неоднозначность восстановления структуры, представляя форму частицы низкого разрешения в качестве однородного тела.

Значения молекулярных масс растворенных частиц были также рассчитаны с помощью инструмента "Molecular Weight" в программе PRIMUS/QT. Молекулярный вес, посчитанный с помощью этой программы, независимо от того, какой диапазон данных использовался (полноразмерный или же до восьми шенноновских каналов) был одинаков в пределах ошибки. Полученное значение в 320 кДа с доверительным интервалом [221-372] кДа соответствует массе димера ectoIRR в присутствии гликанов. Кроме того, следует еще раз подчеркнуть, что узкий пик на гель-хроматограмме свидетельствует о наличии только одного олигомерного состояния, и, соответственно, возможен только полиморфизм, но не полидисперсность.

Ab initio моделирование формы IRR. В результате трехмерного моделирования методом конечных объемных элементов в программе DAMMIN



Рис. 4. *Аb initio* восстановление (программами DAMMIN и GASBOR) структуры ectoIRR с приближениями на разных интервалах кривых рассеяния (вертикальная пунктирная линия ограничивает область порядка 8 шенноновских каналов): 1 и 4 – экспериментальные данные MУPP от ectoIRR для pH 7.0 и 9.0 соответственно; 2 и 5 – расчетные кривые от моделей, полученные программой DAMMIN; 3 и 6 – расчетные кривые от моделей, полученные программой GASBOR. Справа – характерные *ab initio* формы ectoIRR: красные получены с помощью программы DAMMIN, зеленые – с помощью программы GASBOR. Вставка: функции распределения по расстояниям p(r): 1 – pH 7.0; 2 – pH 9.0.

экспериментальные данные ectoIRR были приближены в диапазоне *s* до 8 шенноновских каналов, на котором частица может быть представлена как однородное тело (графики Порода, рис. 3). Это упрощение для такого белка, как ectoIRR, содержащего гетероатомы, необходимо для уменьшения степени неоднозначности решения обратных задач. Типичное восстановление формы молекулы IRR приведено на рис. 4. Объем полученных *ab initio* моделей соответствовал димерному состоянию белка (табл. 1).

Ab initio моделирование программами DAMMIN и GASBOR дали во всех случаях хорошее приближение к экспериментальным кривым рассеяния с $\chi^2 = 1.1 - 1.3$. Полученные формы (рис. 4, справа), хотя и имеют одни и те же значения инвариантов рассеяния. представляли собой сильно различающиеся по своей конформации структуры, что подтверждает предположение о полиморфизме ectoIRR в растворе, возникающее из-за большого количества гибких линкеров, соединяющих отдельные домены белка. Эти формы присутствовали как при восстановлении в растворе ectoIRR при рН 7.0, так и при рН 9.0 в диапазоне до 8 шенноновских каналов. На более длинном участке восстановленные с помощью программы DAMMIN формы были рыхлые и не имели определенной структуры. Поэтому одним из выводов данного

раздела является рекомендация использовать для ab initio моделирования структуры белков с большим количеством разупорядоченных фрагментов более короткие участки экспериментального профиля в соответствии с шенноновской оценкой. Для программы GASBOR такого ограничения нет, поскольку для этого метода возможно восстановление доменной структуры белка. Поэтому структурные модели рассчитывались в диапазоне до 15 шенноновских каналов. Таким образом, двумя различными методами восстановления структуры низкого разрешения были получены сходные формы с разнообразными конформациями. В целом, на этапе ab initio восстановления структуры по данным МУРР было показано, что решение обратной задачи в данном случае усложняется наличием полиморфизма ectoIRR.

Приближение данных МУРР атомной моделью эктодомена рецептора инсулина (ectoIR) – гомолога ectoIRR. Нами была произведена попытка приблизить экспериментальные данные МУРР от есtoIRR доступной атомной моделью гомологичного белка IR. Модель ectoIR и соответствующее приближение программой CRYSOL приведены на рис. 5. В данном случае приближался весь диапазон экспериментальных данных, поскольку использовалась неоднородная модель (в отличие от аb initio моделирования программой DAMMIN).



Рис. 5. Приближение кривой рассеяния ectoIRR атомной моделью гомологичного белка ectoIR. Экспериментальные данные MУPP от ectoIRR (черные точки) и приближение моделью ectoIR (серая линия). Вставка – атомная модель димера ectoIR.

Как видно из рисунка, модель плохо соответствует экспериментальной кривой от ectoIRR, по-видимому, вследствие другого конформационного состояния эктодомена инсулинового рецептора IR.

Молекулярная тектоника для анализа четвертичной структуры ectoIRR

В настоящей работе четвертичная структура тетрамера IRR была восстановлена на основании структуры доменов гомологичного инсулинового рецептора. Программой CORAL моделировалось взаимное расположение индивидуальных доменов в асимметрической части молекулы ectoIRR и конформация гибких линкеров в виде цепей из виртуальных остатков, соединяющих соответствующие домены. Симметрично связанная структура второго мономера генерировалась автоматически. В качестве структурного шаблона, также содержащего гликаны для гибридного моделирования ectoIRR, эктодомен рецептора инсулина (ectoIR) был взят из банка биологических данных малоуглового рассеяния, SASBDB (www.sasbdb.org), код доступа SASDHF2 [34]. В отдельных многократных запусках программы CORAL димер ectoIRR был представлен в виде двух полипептидных цепей, связанных между собой осью второго порядка (симметрия Р2). Каждый мономер был разделен на следующие четыре фрагмента: аминокислоты от 1 до 308, 312-592, 596-655 и 755-909. Последовательные фрагменты были соединены линкерами из виртуальных остатков соответствующей длины. Третий и четвертый фрагменты в ходе моделирования смещались согласованным образом (одинаковые вращения, одинаковые сдвиги), чтобы сохранить структурную целостность двух последних фибронектиновых доменов на С-конце молекулы.

Типичные реконструкции даны на рис. 6 вместе с соответствующими приближениями данных МУРР. Как видно из рисунка, модели не являются идентичными вследствие полиморфизма. При многократном восстановлении получается множество различных конформаций, которые тем не менее имеют общие черты, и их можно разделить на группы по схожести. В целом, полученные модели в основном отражают структуры низкого разрешения *ab initio* восстановления формы, т.е. структуры со сближенными фибронектиновыми доменами (закрытые формы) и структуры, где эти домены пространственно разделены (открытые формы).

Несмотря на различие конформационных форм все модели, как и в случае *ab initio* восстановления, показали хорошее приближение к экспериментальным кривым рассеяния с $\chi^2 = 1.0-1.2$.

Анализ подвижности доменов белка IRR. Степень подвижности доменов белка ectoIRR была оценена с помощью программы EOM (Ensemble Optimization Method). Как и при моделировании с помощью метода молекулярной тектоники, использовалась структура гомологичного белка IR, при этом мономер ectoIR был разбит на два домена (содержащих остатки 1–465 и 472–910 соответственно), разделенных гибким звеном из 7 остатков. Программа EOM создавала ансамбль из 10000 моделей со случайно выбранными взаимными ориентациями доменов, а затем, используя генетический минимизационный алгоритм, выбирала из этого ансамбля оптимизированный набор моделей, комбинация которых наилучшим



Рис. 6. Приближение данных МУРР методом молекулярной тектоники для рассеяния от ectoIRR при pH 7.0 (*1*) и pH 9.0 (*2*). Экспериментальные данные показаны черными точками. Приближение с помощью моделей даны серыми линиями. Справа – типичные модели тетрамера ectoIRR.

образом приближала малоугловые данные. Исходный ансамбль состоял из димерных молекул ectoIR, половина из которых являлась гомодимерами (т.е. обладала Р2-симметрией), вторая половина – гетеродимерами (симметрия Р1). Однако при таком выборе доменов адекватно приблизить экспериментальную кривую не удалось: по-видимому, число степеней свободы при создании случайного ансамбля оказалось недостаточным. После этого каждый мономер ectoIR был разбит на пять частей (содержащих остатки 1-290, 299-450, 459-571, 580-756, 790-908, соответственно, и соединенных между собой гибкими звеньями) и проведено моделирование с помощью программы ЕОМ. В этом случае число степеней свободы при создании ансамбля оказалось достаточным, и экспериментальные данные IRR удалось хорошо приблизить $\chi^2 = 2.3 - 2.8$ (рис. 7). При этом из сравнения распределения радиусов инерции молелей исходного и оптимизированного ансамблей видно, что были выбраны достаточно компактные структуры с радиусами инерций в диапазоне от 4.5 до 6.0 нм, степень подвижности доменов можно отнести к умеренной, что подтверждается оценками параметрами подвижности Rflex, если для исходного случайного ансамбля этот параметр составлял 87.3%, то для оптимизированного набора моделей он составил 61.6%. Таким образом, одним из возможных состояний системы IRR может являться ансамбль умеренно подвижных димеров, имеющих не менее 3-5 гибких звеньев, разделяющих домены белка.

Модельно-независимый анализ минимального числа компонент (конформаций) белка IRR в растворе. Минимальное число независимых и значимых компонент, необходимых для описания экспериментального набора данных МУРР в сочетании с эксклюзионной гель-хроматографией (ЭГХ-МУРР), можно оценить с помощью сингулярного разложения. Для этого набор кривых ЭГХ-МУРР можно представить в виде матрицы, взяв экспериментальные кривые, соответствующие хроматографическому пику (номера кривых между 1600 и 1800, рис. 2). Далее этот набор используется в качестве входных данных для программы SVDPLOT [17], которая проводит его разложение на сингулярные векторы и определяет соответствующие сингулярные значения. На рис. 8 представлены результаты такого разложения, где сингулярные значения расположены в порядке убывания (рис. 8а и 8б), а соответствующие сингулярные векторы для лучшей визуализации смещены вдоль вертикальной оси друг относительно друга. Из рис. 8в видно, что сингулярные значения выходят на слабо меняющееся плато в районе 10-15 компонент, а первые 12 сингулярных векторов (расположенных сверху вниз) имеют неслучайные осцилляции вокруг горизонтальной линии. Это позволяет сделать вывод о наличии в системе минимум 10-15 независимых конформаций белка, что хорошо согласуется с выводом о подвижности доменов ectoIRR белка при моделировании методом оптимизированного ансамбля (ЕОМ), а также многообразием форм, полученных при *ab initio* моделировании.

Таким образом, проведенный модельно-независимый анализ и демонстрация наличия в растворе ectoIRR 10–15 конформаций белка подтверждают результаты моделирования структуры этого домена *ab initio* и гибридными методами. Поэтому для белка, который участвует в регуляции кислотно-щелочного баланса в организме и



Рис. 7 Анализ разупорядоченности ectoIRR при pH 7 (*a*) и при pH 9 (δ). Экспериментальные данные МУРР показаны черными точками, приближение с помощью разупорядоченных димеров, построенных программой ЕОМ – сплошной линией. На вставке – распределение R_g в исходном наборе (сплошная линия) и в оптимизированном ансамбле (штриховая линия).



Рис. 8. Разложение набора данных ЭГХ-МУРР для ectoIRR на сингулярные векторы и определение соответствующих сингулярных значений.

структура которого должна определяться pH раствора, необходимо также провести количественный анализ содержания тех или иных конформаций в зависимости от кислотности среды. Для этого использовалась программа OLIGOMER [17]. Для определения объемных фракций v_k каждой компоненты смеси программа нашла линейную комбинацию интенсивностей рассеяния от каждой компоненты $I_k(s)$ в смеси конформаций. Для расчетов были использованы наиболее часто встречающихся формы белка, полученные при моделировании гибридным методом программой CORAL. Эти формы можно объединить в две основные группы: закрытая и открытая конформация. В результате было показано, что для pH 7.0 характерна открытая (релаксированная) конформация со значением $v_1 = 0.84$ и присутствует фракция закрытой конформации с $v_2 = 0.16$. Для pH 9.0 фракция с открытой конформацией $v_1 = 0.15$ и в основном в растворе присутствует активная, закрытая конформация со сближенными фибронектиновыми доменами с $v_2 = 0.85$. Полученные приближения соответствовали экспериментальным данным с $\chi^2 = 2.8$ для pH 7.0 и $\chi^2 = 1.5$ для pH 9.0 (рис. 9).



Рис. 9. Результат моделирования программой OLIGOMER смесей различных конформаций: 1 и 3 – экспериментальные кривые MУPP ectoIRR при pH 7.0 и 9.0, соответственно; 2 и 4 – теоретическое рассеяние от смеси конформаций при pH 7.0 и 9.0, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проблема неоднозначности решения обратных задач и восстановления трехмерной структуры белка по данным МУРР рассматривалась на примере исследования строения эктодомена рецептора, подобного рецептору инсулина (ectoIRR), в растворе. Мы показали, что этот белок, имея множество разупорядоченных гибких фрагментов, существует в растворе в виде набора конформаций. Был сделан вывод, что конформационные перестройки происходят не только на локальном уровне, как предполагалось раньше [13], но значительно меняется общая форма эктодомена. Полученные данные соответствуют выводам недавно опубликованной работы, где методом атомно-силовой микроскопии было показано разнообразие форм полноразмерного рецептора, подобного рецептору инсулина [36].

Мы продемонстрировали, что последовательный подход к исследованию белков, обладающих полиморфизмом, на примере эктодомена IRR, начиная от определения их общих структурных параметров и *ab initio* восстановления формы с последующим моделированием жесткими телами (методом молекулярной тектоники) и гибридными методами, приводит к достаточно полному описанию структуры белка. Для эктодомена IRR это было особенно важно, так как предыдущие исследования не позволили нам показать изменение конформации белка при изменении pH, т.е. при выполнении рецептором своих биологических функций.

Второй задачей нашего исследования была демонстрация на достаточно сложном примере современных возможностей малоуглового рассеяния. Мы показали, что при решении обратных задач МУРР с принципиальной невозможностью получения однозначного структурного ответа, тем не менее, можно достаточно полно и количественно описать конформационное состояние рассеивающего объекта. При этом, анализируя данные малоуглового рассеяния, стоит критично оценивать полученные результаты и при возможности использовать комплементарные методы. В нашей работе, где мы поставили цель показать современные подходы и возможности МУРР, мы принципиально не прибегали к данным других структурных методов, хотя именно их использование позволяет значительно сузить коридор возможных решений обратной задачи малоуглового рассеяния.

Большое значение также имеет выбор правильного диапазона данных при первичной оценке общих геометрических параметров, таких как исключенный объем, радиус инерции, максимальный размер, а также при моделировании структуры разными методами. При *ab initio* моделировании формы следует использовать только первые восемь-десять шенноновских каналов, а дальнейшее увеличение интервала угловых векторов приводит к неадекватному восстановлению структуры с мнимо подробными деталями. С другой стороны, для гибридных методов диапазон углов должен быть максимально широким.

Очень важно использование онлайн эксклюзионной гель-хроматографии: восстановление структуры с разрешением порядка 1 нм в малоугловом рассеянии возможно только для монодисперсных растворов белка. Однако даже для такого сложного объекта исследования. как эктодомен рецептора, подобного рецептору инсулина, с его гибкостью и полиморфизмом удалось построить структурные модели, отражающие его биологические свойства. Мы надеемся, что наша работа полезна не только в плане изучения конкретно структуры ectoIRR, но также описывает ряд значимых методик МУРР и сценарий, которого следует придерживаться в процессе исследований структурно сложных биологических объектов и комплексов.

Авторы приносят благодарность С.М. Jeffries и Д.И. Свергуну за помощь в проведении малоуглового эксперимента на станции P12 BioSAXS (EMBL, Гамбург) и ценную дискуссию.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках Государственного задания ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 17-00-00487 КОМФИ, № 17-00-00488 КОМФИ и № 20-04-00959а).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Feigin L.A., Svergun D.I. 1987. *Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering*. New York: Plenum Press. 335 p.
- Svergun D.I., Shtykova E.V., Volkov V.V., Feigin L.A. 2011. Small-angle X-ray scattering, synchrotron radiation, and the structure of bio- and nanosystems. *Crystallography Reports*. 56 (5), 725–750.
- Graewert M.A., Svergun D.I. 2013. Impact and progress in small and wide angle X-ray scattering (SAXS and WAXS). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23 (5), 748–754.
- Blanchet C.E., Svergun D.I. 2013. Small-angle X-ray scattering on biological macromolecules and nanocomposites in solution. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 64, 37–54.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

- Schroer M.A., Blanchet C.E., Gruzinov A.Y., Grawert M.A., Brennich M.E., Hajizadeh N.R., Jeffries C.M., Svergun D.I. 2018. Smaller capillaries improve the small-angle X-ray scattering signal and sample consumption for biomacromolecular solutions. *J. Synchrotron Radiation.* 25, 1113–1122.
- Svergun D.I., Koch M.H., Timmins P.A., May R.P. 2013. Small angle X-ray and neutron scattering from solutions of biological macromolecules. London: Oxford University Press. 358 p.
- Franke D., Petoukhov M.V., Konarev P.V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H.D.T., Kikhney A.G., Hajizadeh N.R., Franklin J.M., Jeffries C.M., Svergun D.I. 2017. ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. J. Appl. Crystallogr. 50 (Pt 4), 1212–1225.
- Petoukhov M.V., Franke D., Shkumatov A.V., Tria G., Kikhney A.G., Gajda M., Gorba C., Mertens H.D.T., Konarev P.V., Svergun D.I. 2012. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. J. Appl. Crystal. 45 (2), 342–350.
- 9. Volkov V.V., Svergun D.I. 2003. Uniqueness of ab initio shape determination in small angle scattering. *J. Appl. Crystal.* **36**, 860–864.
- Shier P., Watt V.M. 1989. Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J. Biol. Chem.* 264 (25), 14605–14608.
- Deev I.E., Vasilenko K.P., Kurmangaliev, E.S., O.V., Popova N.V., Galagan Y.S., Burova E.B., Zozulya S.A., Nikol'skii N.N., Petrenko A.G. 2006. Effect of changes in ambient pH on phosphorylation of cellular proteins. *Dokl. Biochem.Biophys.* 408, 184–187.
- Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhevsky D.I., Berchatova A.A., Murashev A.N., Chugunov A.O., Efremov R.G., Nikol'sky N.N., Bertelli E., Eladari D., Petrenko A.G. 2011. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor. *Cell Metab.* 13, 679–689.
- Shtykova E.V., Petoukhov M.V., Mozhaev A.A., Deyev I.E., Dadinova L.A., Loshkarev N.A., Goryashchenko A.S., Bocharov E.V., Jeffries C.M., Svergun D.I., Batishchev O.V., Petrenko A.G. 2019. The dimeric ectodomain of the alkali-sensing insulin receptor-related receptor (ectoIRR) has a droplike shape. *J. Biol. Chem.* 294 (47), 17790–17798.
- Blanchet C.E., Spilotros A., Schwemmer F., Graewert M.A., Kikhney A., Jeffries C.M., Franke D., Mark D., Zengerle R., Cipriani F., Fiedler S., Roessle M., Svergun D.I. 2015. Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). J. Appl. Crystal. 48 (Pt 2), 431–443.
- Jeffries C.M., Graewert M.A., Blanchet C.E., Langley D.B., Whitten A.E., Svergun D.I. 2016. Preparing monodisperse macromolecular samples for successful biological small-angle X-ray and neutron-scattering experiments. *Nature Protocols.* 11 (11), 2122–2153.

- Manalastas-Cantos K., Konarev P.V., Hajizadeh N.R., Kikhney A.G., Petoukhov M.V., Molodenskiy D.S., Panjkovich A., Mertens H.D.T., Gruzinov A., Borges C., Jeffries C.M., Svergun D.I., Franke D. 2021. ATSAS 3.0: Expanded functionality and new tools for smallangle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* 54, 343– 355.
- Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J., Svergun D.I. 2003. PRIMUS – a Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystal.* 36, 1277–1282.
- Panjkovich A., Svergun D.I. 2018. CHROMIXS: Automatic and interactive analysis of chromatography-coupled small-angle X-ray scattering data. *Bioinformatics*. 34 (11), 1944–1946.
- 19. Guinier A. 1939. La diffraction des rayons X aux tres petits angles; application a l'etude de phenomenes ul-tramicroscopiques. *Ann. Phys. (Paris).* **12**, 161–237.
- Glatter O., Kratky O. 1982. Small angle X-ray scattering. London: Academic Press. 515 p.
- 21. Debye P. 1947. Molecular-weight determination by light scattering. J. Phys. Colloid Chem. 51 (1), 18–32.
- Hajizadeh N.R., Franke D., Jeffries C.M., Svergun D.I. 2018. Consensus Bayesian assessment of protein molecular mass from solution X-ray scattering data. *Sci. Rep.* 8 (1), 7204.
- Graewert M.A., Franke D., Jeffries C.M., Blanchet C.E., Ruskule D., Kuhle K., Flieger A., Schafer B., Tartsch B., Meijers R., Svergun D.I. 2015. Automated pipeline for purification, biophysical and X-Ray analysis of biomacromolecular solutions. *Sci. Rep.* 5, 10734.
- 24. Konarev P.V., Svergun D.I. 2015. A posteriori determination of the useful data range for small-angle scattering experiments on dilute monodisperse systems. *IUCR J.* **2**, 352–360.
- Franke D., Jeffries C.M., Svergun D.I. 2018. Machine learning methods for X-Ray scattering data analysis from biomacromolecular solutions. *Biophys. J.* 114 (11), 2485–2492.
- Petoukhov M.V., Svergun D.I. 2015. Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems. *Acta Crystallogr. Section D. Biol. Crystallogr.* 71, 1051–1058.

- 27. Svergun D.I. 1992. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503.
- 28. Svergun D.I. 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J.* **76** (6), 2879–2886.
- 29. Svergun D.I., Petoukhov M.V., Koch M.H.J. 2001. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.* **80** (6), 2946–2953.
- Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. 1995. CRYSOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. J. Appl. Crystallogr. 28, 768–773.
- 31. Petoukhov M.V., Svergun D.I. 2005. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys. J.* **89** (2), 1237–1250.
- Bernado P., Mylonas E., Petoukhov M.V., Blackledge M., Svergun D.I. 2007. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **129** (17), 5656–5664.
- Kozin M.B., Svergun D.I. 2001. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Appl. Crystallogr.* 34, 33–41.
- 34. Whitten A.E., Smith B.J., Menting J.G., Margetts M.B., McKern N.M., Lovrecz G.O., Adams T.E., Richards K., Bentley J.D., Trewhella J., Ward C.W., Lawrence M.C. 2009. Solution structure of ectodomains of the insulin receptor family: The ectodomain of the type 1 insulinlike growth factor receptor displays asymmetry of ligand binding accompanied by limited conformational change. J. Mol. Biol. 394 (5), 878–892.
- 35. De Meyts P. 2008. The insulin receptor: A prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem. Sci.* **33** (8), 376–384.
- Batishchev O.V., Kuzmina N.V., Mozhaev A.A., Goryashchenko A.S., Mileshina E.D., Orsa A.N., Bocharov E.V., Deyev I.E., Petrenko A.G. 2021. Activity-dependent conformational transitions of the insulin receptor-related receptor. *J. Biol. Chem.* https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100534

The Ambiguity Problem in Solving Inverse Problems of Small-angle Scattering: A Consistent Approach by the Example of Insulin Receptor-related Receptor. Methods for SAXS Data Interpretation

M. V. Petoukhov^{1, *}, P. V. Konarev¹, V. V. Volkov¹, A. A. Mozhaev^{1, 2}, E. V. Shtykova¹

¹Shubnikov Institute of Crystallography of FSRC "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia
²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia
*e-mail: maxim@embl-hamburg.de

The construction of three-dimensional models of protein macromolecules is a challenging problem due to the poor convergence of the inverse problem of reconstructing a three-dimensional structure from a one-dimensional small-angle scattering profile. The target function can have several local minima, which leads to the

ПРОБЛЕМА НЕОДНОЗНАЧНОСТИ РЕШЕНИЯ ОБРАТНЫХ ЗАДАЧ

dependence of the solution on the starting values of the model parameters and on the method for finding the global minimum. The problem of creating structural models is also complicated by averaging the scattering pattern over all orientations of particles in space, and in the presence of polydispersity and/or polymorphism, by the size and shape distribution of scattering objects. In this work, the problem of ambiguity in solving inverse problem and restoring the three-dimensional structure of a protein is considered by the example of studying the structure of the ecto-domain of the insulin receptor-related receptor (ectoIRR) in solution. The work presents a consistent approach to solving this problem, starting from the determination of general structural parameters and *ab initio* shape reconstruction to modeling by rigid bodies (by the method of molecular tectonics), hybrid methods and analysis of scattering profiles by singular vector decomposition.

Keywords: small-angle X-ray scattering (SAXS), structural modeling, receptor tyrosine kinases, insulin receptor-related receptor УДК 577.352.465

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОДАВЛЕНИЯ КСІ-ИНДУЦИРОВАННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ ОТВЕТОВ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ РАЗЛИЧНЫМИ БЛОКАТОРАМИ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ Са²⁺-КАНАЛОВ L-ТИПА

© 2021 г. Д. П. Ларюшкин^{*a, b,* *, С. А. Майоров^{*a*}, С. Г. Гайдин^{*a*}, В. П. Зинченко^{*a*}, А. М. Косенков^{*a*}}

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия ^bИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия *e-mail: mr.ldp@yandex.ru Поступила в редакцию 05.02.2021 г. После доработки 17.03.2021 г. Принята к публикации 19.03.2021 г.

Потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа экспрессируются различными клетками млекопитающих. В нейронах они, как правило, расположены постсинаптически и отвечают за передачу возбужлающего сигнала, а также вносят вклал в активацию Са²⁺-зависимых сигнальных каскалов. В настоящий момент одним из основных инструментов для изучения функций этих каналов является применение различных синтетических блокаторов. Целью настоящей работы было сравнение четырех блокаторов из трех фармакологических групп и определение концентрации, необходимой для полного подавления в нейронах гиппокампа притока Ca²⁺ через каналы L-типа в ответ на деполяризацию, индуцируемую добавлением КСІ. Как показали эксперименты, повышение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ в ответ на деполяризацию хоть и определяется в первую очередь притоком Са²⁺ через каналы L-типа, тем не менее также обусловлено активацией других потенциал-зависимых кальциевых каналов. В связи этим нифедипин и исрадипин, обладающие, по всей видимости, большей селективностью по отношению к L-каналам, снижают амплитуду кальциевого ответа примерно в 2 раза. В свою очередь, дилтиазем и верапамил за счет неспецифического блокирования других, не относящихся к L-типу кальциевых каналов, полностью блокировали приток Ca^{2+} , индуцированный аппликацией КСІ. Следует отметить, что концентрация блокаторов, необходимая для полного подавления притока Ca²⁺ через потенциал-зависимые каналы, в обоих случаях составила 300 мкМ, при этом IC₅₀ в случае дилтиазема и верапамила составили 54.2 и 56.4 мкМ, соответственно. Таким образом, вещества из группы дигидропиридинов предпочтительнее использовать в случае, если требуется наибольшая селективность по отношению к L-каналам. В свою очередь, высокие концентрации верапамила и дилтиазема могут применяться, если необходимо заблокировать большую часть потенциал-зависимых кальциевых каналов.

Ключевые слова: кальциевые каналы L-типа, дилтиазем, верапамил, исрадипин, нифедипин, нейрон, Ca²⁺

DOI: 10.31857/S0233475521040071

введение

Потенциал-зависимые кальциевые каналы (ПЗКК/Са_v) представляют собой семейство трансмембранных белков, избирательно проницаемых для ионов кальция. ПЗКК разделены на несколько типов, отличающихся фармакологическим профилем и биофизическими свойствами. На сегодняшний день в клетках млекопитающих охарактеризованы десять представителей семейства Са_v-каналов, относящихся к четырем типам. Так, L-тип представлен каналами $Ca_V 1.1 - Ca_V 1.4$, P-/Q-тип представлен $Ca_V 2.1$ каналами, N-тип представлен каналами $Ca_V 2.2$, R-тип – каналами $Ca_V 2.3$, а T-тип включает каналы $Ca_V 3.1 - Ca_V 3.3$. Типичная структура кальциевого канала L-типа представляет собой гетеротетрамер, состоящий из порообразующей трансмембранной $\alpha 1$ -субъединицы, внутриклеточной β -субъединицы и внеклеточной $\alpha 2\delta$ -субъединицы. Основные биофизические и фармакологические свойства канала определяет α1-субъединица, структурная топология которой высококонсервативна [1].

Каналы L-типа широко распространены в различных клетках млекопитающих. Транскриптомный анализ показал наличие всех известных представителей каналов L-типа в лимфоцитах [2]. Ca_v1.1 в основном присутствует в клетках скелетных мышц, где играет ключевую роль в процессе сокрашения, но также этот канал коэкспрессируется с рианодиновыми рецепторами в ГАМКергических нейронах [3]. Са_v1.2 и Са_v1.3 экспрессируются в клетках надпочечников, сердечных и нейрональных клетках [4], тогда как Ca_v1.4 в основном представлен в нейронах сетчатки [5]. В ряде исследований показано, что фармакологическая модуляция каналов L-типа является перспективным подходом к терапии различных паталогических состояний [6-10]. Изменения в функционировании Ca_v1.1 каналов коррелируют с гипокалиемическим периодическим параличом, а дисфункция Ca_v1.2 и Ca_v1.3 каналов приводит к таким патологиям, как синдром Тимоти, сердечная аритмия [6], биполярное расстройство и аутизм [7, 8].

На сегодняшний день для модуляции активности ПЗКК L-типа идентифицировано несколько низкомолекулярных соединений, которые разделены на четыре группы: фенилалкиламины, бензодиазепины, дигидропиридины и дифенилпиперазины [9]. Предполагается, что сайты связывания блокаторов находятся глубоко внутри молекулы канала и становятся доступными для связывания только в результате конформационных изменений, происходящих при активации и/или инактивации ионных каналов. Эти процессы зависят от потенциала, и при значительной продолжительной деполяризации каналы переходят в инактивированное состояние. Механизм действия этих веществ основан на стабилизации канала в инактивированном состоянии. Показано, что сайты связывания блокаторов в основном расположены близко к поре, в спиралях S5 и S6 [10]. Однако предполагается, что верапамил-подобные фенилалкиламины могут связываться непосредственно в порах канала [6].

Дигидропиридины

1,4-Дигидропиридин (ДГП) и его производные являются эффективными блокаторами кальциевых каналов L-типа. Эта группа препаратов используется при терапии сердечно-сосудистых заболеваний, таких как стенокардия и гипотензия [10, 11]. Производные дигидропиридина, нифедипин и исрадипин, также используются для лечения заболеваний сердца. Нимодипин, другое производное соединение ДГП, модулирует ПЗКК в нейронах мозга, улучшая результаты лечения аутизма и нейродегенерации [8]. ДГП связываются с инактивированными каналами L-типа и стабилизируют их, нарушая тем самым приток кальция через этот тип каналов [10, 12]. Поскольку большинство дигидропиридинов являются липофильными молекулами, они также могут связываться с внешней поверхностью канала, обращенной к липидным молекулам, и взаимодействовать с S6 спиралью из DIII и DIV участков канала [13, 14]. Показано, что нифедипин, препарат группы дигидропиридинов, является неселективным блокатором ПЗКК, поскольку также блокирует следующие калиевые каналы: K_v1.1, K_v1.2, K_v1.5, K_v2.1, K_v1.7, K_v3.1 [15, 16]. При этом нами не было обнаружено публикаций, посвященных селективности исрадипина.

Фенилалкиламины

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, фенилалкиламин и его производные связываются с центральной полостью поры канала на внутриклеточной стороне "фильтра селективности" [6], что приводит к его блокаде и препятствует прохождению ионов кальция. Типичным представителем фенилалкиламинов, широко применяемым при лечении гипертонии, является верапамил. Аналогично другим ДГП, верапамил связывается с инактивированными каналами L-типа [10, 12], но, связавшись с каналом, верапамил приводит к его необратимому блокированию после реполяризации [13]. Помимо L-каналов этот препарат также блокирует K_v1.7, K_v1.8, K_v3.2, Na_v2.1 каналы [17].

Бензодиазепины

Клинически одобренным и наиболее часто используемым для лечения различного рода аритмий блокатором ПЗКК из класса бензодиазепинов является дилтиазем. Дилтиазем проявляет умеренную селективность в отношении ПЗКК клеток гладких мышц сосудов, но не в отношении ПЗКК клеток сердца. Подобно блокаторам из других фармакологических групп препараты группы бензодиазепинов имеют тенденцию связываться с ПЗКК в инактивированном состоянии с тем же сайтом, что и ДГП. Данные экспериментов по фотоаффинному мечению указывают на то, что сайты связывания дилтиазема расположены в S6 спирали DIII и DIV участков канала [10]. Также сообщалось, что этот препарат блокирует каналы K_v1.1, K_v1.2, K_v1.5, K_v1.7, K_v3.1 и канал 5-НТ₃ рецептора [16, 18].

Несмотря на то, что в настоящий момент синтезировано большое количество блокаторов ПЗКК L-типа, их эффективность, как правило, проверена с использованием систем, в которых были экспрессированы отдельные субъединицы. При этом практически отсутствуют работы, в которых бы доказывалась и сравнивалась эффективность соединений в условиях, приближенных к физиологическим. В настоящей работе мы изучали эффекты блокаторов ПЗКК L-типа, нифидипина и исрадипина, относящихся к классу дигидропиридинов, а также верапамила и дилтиазема, относящихся к классам фенилалкиламинов и бензодиазепинов, соответственно. Целью работы было сравнение действия этих соединений и определение концентраций блокаторов, необходимых для полного подавления притока Ca²⁺ через ПЗКК L-типа в нейроглиальной культуре клеток гиппокампа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление культуры нейроглиальных клеток гиппокампа. В экспериментах использовали нейроглиальную культуру клеток гиппокампа, выделенного из головного мозга новорожденных крыс линии Sprague–Dawley. Извлеченный гиппокамп помещали в холодный раствор Версена и измельчали при помощи ножниц. Затем фрагменты ткани обрабатывали в течение 10 мин при 37°С 1% раствором трипсина. После этого ткань отмывали холодной средой Neurobasal-А для инактивации трипсина и аккуратно пипетировали. Полученную суспензию клеток переносили на круглые покровные стекла диаметром 25 мм, предварительно покрытые полиэтиленимином и помещенные в чашки Петри (диаметром 35 мм). Затем стекла помещали на 30 мин в СО₂-инкубатор для прикрепления клеток, после чего заливали 2 мл среды для культивирования. В качестве среды для культивирования использовали Neurobasal-A, содержащую бессывороточную добавку В-27. 0.5 мМ глутамина и пенициллин-стрептомицин (1:100). Эксперименты проводили на 14-17 день культивирования.

Регистрация изменений концентрации внутриклеточного ионизированного кальция ([Ca²⁺]_i). Перед экспериментом клетки загружали в течение 40 мин при 28°C флуоресцентным двухволновым Ca²⁺-чувствительным зондом Fura-2 AM (3 мкМ) в растворе HBSS (Hank's balanced salt solution), содержащем (мМ): 156 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO₄, 1.25 КН₂РО₄, 2 СаСl₂, 10 глюкозы и 10 НЕРЕS; pH 7.35. Все эксперименты с использованием данного флуоресцентного зонда проводили в растворе того же состава. Для регистрации изменений [Ca²⁺], использовали инвертированный моторизованный флуоресцентный микроскоп Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Германия), оснащенный высокоскоростной монохромной CCDкамерой HAMAMATSU C9100, системой высокоскоростной смены возбуждающих светофильтров

Leica Ultra-Fast Filter Wheels (время переключения 10-30 мс). Для съемки использовали объектив Leica HC PL APO $20 \times /0.7$ IMM. В качестве источника возбуждения флуоресценции использовали осветитель Leica EL 6000 с ртутной лампой высокого давления НВО 103 W/2. Для возбуждения и регистрации флуоресценции Fura-2 использовали набор светофильтров FU2 с фильтрами возбуждения BP 340/30 и BP 387/15, светоделителем FT 410 и фильтром эмиссии BP 510/84. Полученные в двух различных каналах временные серии изображений обрабатывали в программе ImageJ. Изменения [Ca²⁺]_і (кальциевых ответов) в одиночных клетках определяли из отношения интенсивности флуоресценции Fura-2 при возбуждении светом с длиной волны 340 нм к интенсивности при возбуждении 380 нм. Аппликация KCl (35 мМ) производилась в присутствии антагонистов NMDA-рецепторов (D-AP5, 10 мкМ), АМРА/каинатных-рецепторов (NBOX, 10 мкМ) и блокаторов ПЗКК L-типа (нифедипина, исрадипина, верапамила и дилтиазема). Реагенты добавляли путем полной замены среды с помощью специальной перфузионной системы. Скорость записи всех серий изображений составляла 1 кадр в секунду. Все эксперименты выполнены при температуре 28-30°С.

Статистический анализ и обработка данных. Для графической обработки данных и статистического анализа использовался пакет программ OriginLab Pro 2016 (OriginLab, Northampton, США) и Prism GraphPad 8 (GraphPad Software, США). Статистическая обработка данных производилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением по методу Тьюки.

Реагенты. В работе использовали: НЕРЕЅ (Диаэм, Россия), Fura-2 AM (Molecular Probes, США), бессывороточная добавка B-27, Neurobasal-A, трипсин 2.5%, глутамин (Life Technologies, США), D-AP5, NBQX динатриевая соль (Hello Bio, Великобритания), дилтиазем, нифедипин, исрадипин, верапамил, пенициллин-стрептомицин полиэтиленимин (Sigma-Aldrich, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках этой работы проведено сравнение эффективной дозы полумаксимального ингибирования (IC₅₀) различных блокаторов потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа в нейроглиальной культуре клеток гиппокампа крысы. Для активации потенциал-зависимых каналов была использована деполяризация, индуцируемая аппликацией 35 мМ КСІ. Поскольку в таких условиях в ответ на деполяризацию может происходить секреция глутамата, все эксперименты проводились в присутствии антагонистов NMDA-, АМРА- и каинатных рецепторов, чтобы исключить приток Ca²⁺ через эти каналы.

Из рис. 1*а* и 1*б* видно, что верапамил и дилтиазем дозозависимо снижают амплитуду изменения $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на аппликацию KCl во всех нейронах. При этом в обоих случаях максимальное подавление наблюдается при концентрации 300 мкМ. Значительное уменьшение амплитуды кальциевого ответа в случае верапамила отмечается уже при концентрации 1 мкМ, в то время как дилтиазем заметно снижает амплитуду ответа только в концентрации 10 мкМ. Несмотря на это, IC₅₀ этих блокаторов имеют близкие значения, равные 56.4 мкМ для верапамила и 54.2 мкМ для дилтиазема.

В свою очередь, нифедипин и исрадипин не способны полностью подавлять приток Ca²⁺, вызванный деполяризацией (рис. 1в и 1г). Нифедипин в концентрации 10 мкМ в среднем в 2 раза снижает амплитуду кальциевого ответа, однако дальнейшее повышение концентрации не приводит к значимым изменениям. Поскольку у исрадипина IC₅₀ для субъединиц Са_v1.2 и Са_v1.3 находится в наномолярном диапазоне, мы использовали более низкие концентрации. Как и в случае с нифедипином, исрадипин в концентрации 50 нМ снижает амплитуду кальциевого ответа, однако более высокие концентрации уже не влияют на амплитуду ответа. Кроме того, стоит отметить, что высокие концентрации нифедипина приводят к подъему базового уровня [Ca²⁺]_і в течение первых секунд воздействия.

На рис. 2*а* показано, что серия из нескольких аппликаций KCl не приводит к значительным изменениям в амплитуде кальциевого ответа. Таким образом, подавление кальциевого ответа в экспериментах на рис. 1 обусловлено именно воздействием блокаторов, а не связано с какими-либо клеточными процессами, инициируемыми деполяризацией.

Поскольку в наших экспериментах нифедипин и исрадипин даже в высоких концентрациях оказались не способны полностью подавить кальциевый ответ, мы провели дополнительные эксперименты, в которых проверили вклад других ПЗКК и кальциевого депо – эндоплазматического ретикулума (ЭР). Эксперименты показали, что добавление нифедипина в комбинации с блокаторами ПЗКК Т-, N- и P/Q-типа приводит к практически полному подавлению кальциевого ответа при аппликации КСІ (рис. 26). Таким образом, несмотря на то, что ПЗКК L-типа являются основным источником притока Ca^{2+} при деполяризации, другие ПЗКК также вносят значительный вклад в данный процесс. На основании данного эксперимента можно предположить, что нифедипин и исрадипин селективно блокируют каналы L-типа. Однако поскольку T-, N- и P/Q-каналы в сумме вносят значительный вклад в кальциевый приток при деполяризации, использование дигидропиридинов не приводит к полному подавлению кальциевого ответа при добавке КСІ. В свою очередь, верапамил и дилтиазем полностью подавляют кальциевый приток, по всей видимости, за счет неселективного действия на другие ПЗКК.

Вклад депонированного кальция при деполяризации должен быть минимален, поскольку, как показано на рис. 2^{8} , опустошение ЭР путем добавления ингибитора Ca²⁺-ATP-азы ЭР тапсигаргина не приводит к детектируемому подъему [Ca²⁺]_i в теле нейронов. В астроцитах в ответ на добавку ингибитора отмечается постепенное увеличение [Ca²⁺]_i с последующим выходом на плато. Такая форма кальциевого ответа говорит о первоначальной мобилизации кальция из ЭР в ответ на ингибирование ATP-азы и последующей активации депо-управляемых кальциевых каналов.

Таким образом, из приведенных выше экспериментов можно сделать ряд выводов: 1) деполяризация, индуцируемая KCl, приводит к повышению [Ca²⁺]_i, которое, в первую очередь, обусловлено притоком Ca²⁺ через ПЗКК L-типа, а также притоком через T-, N- и P/Q-каналы; 2) верапамил и дилтиазем полностью подавляют кальциевый ответ, индуцируемый деполяризацией, по всей видимости, за счет неселективного действия на другие ПЗКК при высоких концентрациях; 3) нифедипин и исрадипин более селективно по сравнению с верапамилом и дилтиаземом блокируют ПЗКК L-типа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа экспрессируются множеством типов клеток млекопитающих, включая нейроны различных отделов мозга и мышечные клетки. Как правило, в клетках мозга такие каналы состоят из Ca_v1.2 и Ca_v1.3 порообразующих субъединиц [4], которые определяют фармакологические свойства и проводимость канала. Кроме того, свой-

Рис. 1. Влияние ингибиторов ПЗКК L-типа на кальциевый ответ нейронов, индуцируемый деполяризацией. *a*, *б*, *в*, *е* – аппликация KCl (35 мM) в присутствии антагонистов NMDA-рецепторов (D-AP5, 10 мкM), AMPA/каинатных рецепторов (NBQX, 10 мкM) и различных блокаторов ПЗКК L-типа. *a'*, *б'*, *в'*, *е'* – диаграммы, отражающие изменение амплитуды кальциевого ответа на аппликацию KCl в зависимости от концентрации блокаторов L-каналов. Каждая точка является усредненным ответом по 100 нейронам в отдельном эксперименте. ns – отсутствие статистически достоверного различия. *a''*, *б''* – кривые доза–эффект для верапамила и дилтиазема.





Рис. 2. Вклад кальциевых депо и других ПЗКК в кальциевый ответ нейронов. а – Кальциевый ответ нейронов на пять последовательных аппликаций КСІ (35 мМ) в присутствии D-AP5 (10 мкМ) и NBQX (10 мкМ). б -Кальциевый ответ нейронов на аппликацию КСІ (35 мМ) в присутствии D-AP5 (10 мкМ) и NBQX (10 мкМ), а также нифедипина (50 мкМ), блокатора ПЗКК Т-типа ML218 (10 мкМ) и блокатора ПЗКК N-, Р/Q-типа ω-конотоксина MVIIC (1 мкМ). в – Кальциевый ответ клеток гиппокампа на аппликацию KCl (35 мМ) и ингибитора Ca²⁺-ATP-азы ЭР тапсигаргина (2 мкМ). Цветом выделены сигналы клеток, отвечающих на добавку КСІ (нейроны), невозбудимые клетки (предположительно астроциты) выделены черным цветом. Во всех экспериментах пауза между добавками веществ составляла 15 мин.

ства и функции Ca_v1 каналов во многом зависят от взаимодействия с различными белками, такими как АКАР [19], денсин [20], STIM1 [21]. В нейронах эти каналы располагаются преимущественно в постсинаптических терминалях и влияют на передачу возбуждающего сигнала, участвуя в активации кальций-зависимых сигнальных каскадов, передающих сигнал в ядро и влияющих тем самым на транскрипцию генов, вовлеченных в регуляцию развития нейронов, процессов обучения и памяти [20, 22–24]. Несмотря на то, что для изучения ПЗКК активно используются молекулярно-генетические метолы, использование различных блокаторов остается в настояший момент одним из основных инструментов для исследования их функций. Многие из этих соединений уже с успехом используются в медицине в качестве одобренных лекарственных препаратов для терапии серлечно-сосулистых и нейролегенеративных заболеваний. Тем не менее функции ПЗКК на уровне отдельных нейронов, в частности ПЗКК L-типа, остаются до конца не изученными.

В этой работе мы сравнили действие блокаторов ПЗКК из трех групп – фенилалкиламины, бензодиазепины и дигидропиридины. Как показали эксперименты, соединения из этих групп значительно различаются по действию на кальциевый ответ нейронов, индуцируемый деполяризацией. Во всех экспериментах для деполяризации мы использовали добавку 35 мМ КСІ. При добавлении избыточного количества K⁺ во внеклеточную среду меняется градиент концентрации этого иона. в результате чего происходит деполяризация возбудимых клеток. В ответ на деполяризацию происходит активация потенциал-зависимых каналов, в том числе и ПЗКК, что вызывает мошный приток Ca²⁺ в нейроны. Несмотря на то, что, согласно литературным данным, вещества как из групп фенилалкиламинов и бензодиазепинов, так и из группы дигидропиридинов способны блокировать не только ПЗКК, но и другие каналы, в данных условиях такие побочные действия не будут значительно влиять на кальциевый ответ при добавке KCl. В каждом эксперименте добавки производились на фоне антагонистов NMDA-, АМРА-/каинатных рецепторов, что исключает дополнительный приток Са²⁺ через ионотропные рецепторы глутамата. Таким образом, подобная схема экспериментов позволяет оценить влияние блокаторов преимущественно на ПЗКК нейронов в условиях, приближенных к физиологическим.

Верапамил и дилтиазем способны полностью подавлять кальциевый ответ, индуцируемый деполяризацией. Однако максимальный эффект достигается при довольно высокой концентрации блокаторов. В свою очередь, соединения из группы дигидропиридинов не способны полностью подавлять кальциевый ответ. Нифедипин и исрадипин уже в минимальной концентрации снижают амплитуду кальциевого сигнала примерно в 2 раза, при этом дальнейшее повышение концентрации не приводит к значительным изменениям. Такая разница в действии блокаторов может объясняться различной селективностью в отношении к ПЗКК. Как было показано на рис. 26, кальциевый приток в тело нейронов при деполяризации определяется не только ПЗКК L-типа. Таким образом, полное подавление кальциевого ответа при добавлении верапамила и дилтиазема достигается за счет неспецифического блокирования других, не относящихся к L-типу ПЗКК. Указанный эффект имеет место при высоких концентрациях блокаторов. В свою очередь, нифедипин и исрадипин, по всей видимости, более селективны по отношению к L-каналам по сравнению с другими ПЗКК. Однако поскольку широко представленные во взрослом гиппокампе Сау1.3 каналы [25] имеют слабую чувствительность к дигидропиридинам [26], нельзя утверждать, что нифедипин и исрадипин полностью блокируют все ПЗКК L-типа.

Таким образом, нельзя с уверенностью ответить на вопрос, какие именно блокаторы ПЗКК эффективнее. Скорее всего, выбор того или иного соединения будет зависеть от цели исследования. В случае, если важна селективность в отношении каналов L-типа, лучше использовать дигидропиридины или другие соединения, но в минимальных концентрациях. Однако, если необходимо заблокировать большинство ПЗКК, можно использовать верапамил или дилтиазем в высоких дозировках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00138.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Tuluc P., Yarov-Yarovoy V., Benedetti B., Flucher B.E. 2016. Molecular interactions in the voltage sensor controlling gating properties of CaV calcium channels. *Structure*. **24** (2), 261–271.
- Gomes B., Savignac M., Moreau M., Leclerc C., Lory P., Guery J.-C., Pelletier L. 2004. Lymphocyte calcium signaling involves dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels: Facts and controversies. *Crit. Rev. Immunol.* 24 (6), 425–447.
- Hofmann F., Flockerzi V., Kahl S., Wegener J.W. 2014. L-type CaV1.2 calcium channels: From in vitro findings to in vivo function. *Physiol. Rev.* 94 (1), 303–326.
- Striessnig J., Pinggera A., Kaur G., Bock G., Tuluc P. 2014. L-type Ca²⁺ channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 3 (2), 15–38.
- Baumann L., Gerstner A., Zong X., Biel M., Wahl-Schott C. 2004. Functional characterization of the L-type Ca²⁺ channel Cav1.4alpha1 from mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 (2), 708–713.

- Tang L., Gamal El-Din T.M., Swanson T.M., Pryde D.C., Scheuer T., Zheng N., Catterall W.A. 2016. Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca²⁺ channel by Ca²⁺ antagonist drugs. *Nature*. 537 (7618), 117–121.
- Berger S.M., Bartsch D. 2014. The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res.* 357 (2), 463–476.
- Ortner N.J., Striessnig J. 2016. L-type calcium channels as drug targets in CNS disorders. *Channels (Austin)*. 10 (1), 7–13.
- 9. Prakash P., Hancock J.F., Gorfe A.A. 2015. Binding hotspots on K-ras: consensus ligand binding sites and other reactive regions from probe-based molecular dynamics analysis. *Proteins.* **83** (5), 898–909.
- Hockerman G.H., Peterson B.Z., Johnson B.D., Catterall W.A. 1997. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 361–396.
- 11. Shaldam M.A., Elhamamsy M.H., Esmat E.A., El-Moselhy T.F. 2014. 1,4-Dihydropyridine calcium channel blockers: Homology modeling of the receptor and assessment of structure activity relationship. *ISRN Med. Chem.* **2014**, 1–14.
- Striessnig J., Ortner N.J., Pinggera A. 2015. Pharmacology of L-type calcium channels: Novel drugs for old targets? *Curr. Mol. Pharmacol.* 8 (2), 110–122.
- Lipscombe D., Helton T.D., Xu W. 2004. L-type calcium channels: The low down. J. Neurophysiol. 92 (5), 2633–2641.
- Striessnig J., Grabner M., Mitterdorfer J., Hering S., Sinnegger M.J., Glossmann H. 1998. Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 19 (3), 108–115.
- Li X.-T., Li X.-Q., Hu X.-M., Qiu X.-Y. 2015. The inhibitory effects of Ca²⁺ channel blocker nifedipine on rat Kv2.1 potassium channels. *PLoS One.* 10 (4), e0124602.
- Grissmer S., Nguyen A.N., Aiyar J., Hanson D.C., Mather R.J., Gutman G.A., Karmilowicz M.J., Auperin D.D., Chandy K.G. 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* 45 (6), 1227– 1234.
- Madeja M., Müller V., Mußhoff U., Speckmann E.-J. 2000. Sensitivity of native and cloned hippocampal delayed-rectifier potassium channels to verapamil. *Neuropharmacol.* **39** (2), 202–210.
- Gunthorpe M.J., Lummis S.C. 1999. Diltiazem causes open channel block of recombinant 5-HT3 receptors. *J. Physiol.* 519 Pt 3, 713–722.
- Marshall M.R., Clark J.P., Westenbroek R., Yu F.H., Scheuer T., Catterall W.A. 2011. Functional roles of a C-terminal signaling complex of CaV1 channels and Akinase anchoring protein 15 in brain neurons. *J. Biol. Chem.* 286 (14), 12627–12639.
- Jenkins M.A., Christel C.J., Jiao Y., Abiria S., Kim K.Y., Usachev Y.M., Obermair G.J., Colbran R.J., Lee A. 2010. Ca²⁺-dependent facilitation of Cav1.3 Ca²⁺ channels by densin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurosci.* **30** (15), 5125–5135.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

- Wang Y., Deng X., Mancarella S., Hendron E., Eguchi S., Soboloff J., Tang X.D., Gill D.L. 2010. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science*. 330 (6000), 105–109.
- 22. Wheeler D.G., Barrett C.F., Groth R.D., Safa P., Tsien R.W. 2008. CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling. *J. Cell Biol.* **183** (5), 849–863.
- Zhang H., Fu Y., Altier C., Platzer J., Surmeier D.J., Bezprozvanny I. 2006. Ca1.2 and CaV1.3 neuronal L-type calcium channels: Differential targeting and signaling to pCREB. *Eur. J. Neurosci.* 23 (9), 2297– 2310.
- Kamijo S., Ishii Y., Horigane S.I., Suzuki K., Ohkura M., Nakai J., Fujii H., Takemoto-Kimura S., Bito H. 2018. A critical neurodevelopmental role for L-type voltagegated calcium channels in neurite extension and radial migration. J. Neurosci. 38 (24), 5551–5566.
- 25. Kim S.-H., Park Y.-R., Lee B., Choi B., Kim H., Kim C.-H. 2017. Reduction of Cav1.3 channels in dorsal hippocampus impairs the development of dentate gyrus newborn neurons and hippocampal-dependent memory tasks. *PLoS One.* **12** (7), e0181138.
- 26. Xu W., Lipscombe D. 2001. Neuronal Ca V 1.3α 1 L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. J. Neurosci. 21 (16), 5944–5951.

The Effectiveness of Various Blockers of L-Type Voltage-gated Ca²⁺ Channels in Suppression of KCl-induced Calcium Responses in Hippocampal Neurons

D. P. Laryushkin^{1, 2, *}, S. A. Maiorov¹, S. G. Gaidin¹, V. P. Zinchenko¹, A. M. Kosenkov¹

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia ²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia *e-mail: mr.ldp@vandex.ru

Voltage-gated L-type calcium channels are expressed by various types of mammalian cells. These channels are usually located postsynaptically in neurons and are responsible for transmitting the excitatory signal and activation of Ca^{2+} -dependent signaling cascades. One of the main approaches for studying the functions of voltage-gated channels is the use of various synthetic blockers. This work aimed to compare four blockers from three pharmacological groups and determine the concentration required to completely suppress the influx of Ca^{2+} through L-type channels in cultured hippocampal neurons in response to depolarization induced by the application of KCl. We show that although an increase in intracellular Ca^{2+} concentration in response to depolarization is primarily mediated by the entry of Ca^{2+} through L-type channels, the activation of other voltage-dependent calcium channels also significantly contributes to Ca^{2+} influx in this case. In this regard, nifedipine and isradipine, which, apparently, are more selective in relation to L-channels, approximately halve the amplitude of the calcium response. In turn, diltiazem and verapamil completely blocked KCl-induced Ca^{2+} influx due to non-specific blocking of other non-L-type calcium channels. It should be noted that the concentration of blockers required for the complete suppression of Ca²⁺ influx through voltage-gated channels was 300 μ M in both cases, while the IC50 in the case of diltiazem and verapamil was $54.2 \,\mu\text{M}$ and $56.4 \,\mu\text{M}$, respectively. Thus, substances from the dihydropyridine group are preferable to use if substantial selectivity to L-type channels is required. In turn, high concentrations of verapamil and diltiazem can be used if it is necessary to block most of the voltage-dependent calcium channels.

Keywords: L-type voltage-gated calcium channels, diltiazem, verapamil, isradipine, nifedipine, neurons, Ca²⁺

УДК 576.54

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТРАНСПОРТ СУБСТРАТА Р-ГЛИКОПРОТЕИНА ЧЕРЕЗ КЛЕТОЧНЫЙ МОНОСЛОЙ

© 2021 г. А. В. Щулькин^{*a*, *}, Ю. В. Абаленихина^{*a*}, А. А. Сеидкулиева^{*a*}, И. В. Черных^{*a*}, Е. Н. Якушева^{*a*}

^аРязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, 390026 Россия *e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru Поступила в редакцию 13.01.2021 г. После доработки 24.03.2021 г. Принята к публикации 24.03.2021 г.

Р-гликопротеин (Pgp) – АТР-зависимый трансмембранный белок, участвующий в эффлюксе липофильных веществ. Цель работы – оценить влияние окислительного стресса на транспорт субстрата Рдр через монослой клеток линии Сасо-2, гиперэкспрессирующих данный белок-транспортер. Окислительный стресс моделировали инкубированием клеток с H₂O₂. Воздействие H₂O₂ в концентрациях 10 и 50 мкМ в течение 3 ч снижало активность (но не количество) Рдр при сохранении целостности клеточного монослоя. Увеличение концентрации прооксиданта до 100 мкМ снижало количество Рдр, нарушало целостность клеточного монослоя и повышало трансцеллюлярный и парацеллюлярный транспорт фексофенадина. При длительности воздействия 24 ч Н₂O₂ в концентрациях 0.1-1 мкМ приводил к увеличению количества Pgp, опосредованному транскрипционным фактором Nrf2, но активность белка-транспортера оставалась неизменной. При концентрации прооксиданта 10 мкМ активность Рер снижалась и повышалась проницаемость клеточной мембраны, а при концентрациях 50-100 мкМ происходило снижение количества (100 мкМ) и активности Рдр, повышение пара- и трансцелюллярной проницаемости клеточного монослоя для субстрата белкатранспортера – фексофенадина. Таким образом, H₂O₂ повышает транспорт субстрата Рgp фексофенадина через клеточный монослой за счет ингибирования активности белка-транспортера, снижения его количества, а также нарушения целостности клеточной мембраны и межклеточных контактов. Клетки могут адаптироваться к данным воздействиям, повышая количество Рдр.

Ключевые слова: Р-гликопротеин, окислительный стресс, клеточная линия Caco-2, трансмембранный транспорт, фексофенадин

DOI: 10.31857/S0233475521040101

введение

Транспорт веществ через клеточный монослой может происходить трансцеллюлярно (через билипидную мембрану клеток) или парацеллюлярно (через межклеточные щелевые контакты). Парацеллюлярный транспорт осуществляется только пассивной диффузией по градиенту концентрации, в то время как трансцеллюлярный транспорт может происходить путем пассивной и облегченной диффузии, активным транспортом и трансцитозом [1].

Одним из самых изученных трансмембранных белков, участвующих в транспорте веществ через билипидную мембрану клеток, является Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) [2].

Pgp — это ATP-зависимый эффлюксный белок-транспортер, который относится к суперсемейству ABC-транспортеров (ATP-binding cassette). Молекула Pgp состоит из двух одинаковых

частей, каждая из которых включает большой гидрофобный трансмембранный домен и консервативный цитоплазматический домен с ATP-связывающим сайтом [3].

Рдр обладает широкой субстратной специфичностью. Его субстратами являются биогенные вещества — сфинголипиды, фактор активации тромбоцитов, короткоцепочечные фосфолипиды, цитокины [4], а также липофильные лекарственные средства — противоопухолевые препараты, иммунодепрессанты, стероидные и тиреоидные гормоны, антибиотики, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, сердечные гликозиды, антикоагулянты и др. [5].

Являясь липофильными молекулами, субстраты Pgp легко растворяются в цитоплазматической мембране. Pgp, работая как "гидрофобный пылесос", связывает данные вещества в липидном бислое и выводит их во внеклеточную среду. То есть транспортер способен перехватывать субстраты прежде, чем они смогут войти в цитозоль. Некоторые авторы считают, что Pgp может также работать как "флоппаза", транспортируя вещества от цитоплазматического к внеклеточному монослою билипидной мембраны [4, 6].

Активность Pgp может изменяться под воздействием ряда факторов внешней и внутренней среды (гипоксия, pH, уровень гормонов) и различных веществ. Так, индукторы (рифампицин, карбамазепин) повышают активность белкатранспортера, а ингибиторы (верапамил, амиодарон) — ее снижают [5, 7].

Окислительный стресс — патологический процесс, развивающийся в результате дисбаланса между продукцией и утилизацией активных форм кислорода, когда образующиеся свободные радикалы не успевают инактивироваться из-за повышения их продукции или из-за снижения емкости антиоксидантной системы защиты [8].

При широком спектре патологий, таких как атеросклероз, сахарный диабет, воспалительные, инфекционные заболевания, снижение кровоснабжения, а также при воздействии ряда ксенобиотиков развивается окислительный стресс [8], что, в свою очередь, может оказывать воздействие на транспорт экзогенных и эндогенных веществ через биологические барьеры, представляющие, прежде всего, монослой клеток.

В ряде исследований было показано, что окислительный стресс повышает экспрессию и активность Pgp [9, 10].

С другой стороны, в исследованиях Basuroy и соавт. показано, что при окислительном стрессе происходит повреждение межклеточных контактов и повышение парацеллюлярного транспорта веществ [11]. Кроме того, активные формы кислорода при взаимодействии с цитоплазматической мембраной клеток вызывают активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к образованию пор, повреждению билипидного слоя и в конечном счете повышению проницаемости цитоплазматической мембраны и трансцеллюлярного транспорта [12].

Таким образом, при развитии окислительного стресса может происходить как снижение проницаемости субстратов Pgp через клеточный монослой за счет повышения активности белка-транспортера, так и активация транспорта вследствие усиления парацеллюлярной и трансцеллюлярной диффузии.

Кроме того, исследований, в которых бы оценивалось влияние окислительного стресса одновременно на парацеллюлярный и трансцеллюлярный транспорт с участием белков-транспортеров не проводилось, что и явилось целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследование выполнено на линии клеток аленокаршиномы ободочной кишки человека (Сасо-2) (ЦКП "Коллекция культур клеток позвоночных", Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°С и 5% содержании СО₂ в инкубаторе WS-189C (World Scienc, Корея) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (Sigma-Aldrich, США), с добавлением *L*-глутамина (4 мМ) (Sigma-Aldrich), 15% бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 100 ед/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich), соответственно. Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Рдр [13].

Окислительный стресс моделировали добавлением в культуральную среду пероксида водорода H_2O_2 (Sigma-Aldrich) в конечных концентрациях 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 и 100 мкМ и инкубацией в течение 3 и 24 ч. Контрольным клеткам в эквивалентном объеме в культуральную среду добавляли воду для инъекций. Каждый эксперимент был выполнен в 3 повторах.

Для исследования цитотоксичности пероксида водорода клетки высевали в 96-луночный планшет (Corning, США), для изучения влияния пероксида водорода на количество Pgp и транскрипционного фактора Nrf2, концентрацию продуктов ПОЛ, карбонильных производных белков, содержание тиоловых SH-групп клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning), а для оценки действия прооксиданта на проницаемость клеточного монослоя для субстрата Pgp — в специальной трансвеллсистеме (12 mm Transwell with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, Corning) [14].

Цитотоксический тест (МТТ-тест). Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета 10^4 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли питательную среду с H_2O_2 . После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0.5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия) [15]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Жизнеспособность клеток Caco-2 в присутствии пероксида водорода рассчитывали по формуле:

Жизнеспособность =

<u>ОП опытных лунок – ОП среды</u> ×100%,

ОП контрольных лунок – ОП среды где ОП – оптическая плотность. Получение тотальных клеточных лизатов. После окончания экспозиции с пероксидом водорода клетки снимали с лунок раствором трипсин—EDTA (0.25% трипсина и 0.2% EDTA, Sigma-Aldrich). Клетки в расчете 2 × 10⁶ трехкратно промывали фосфатным буфером pH 7.4 (ПанЭко) и лизировали трехкратным циклом замораживания—размораживания в 200 мкл фосфатного буфера при –20°С, далее полученный лизат использовали для иммуноферментного анализа.

Клетки из расчета 1 × 10⁶ промывали изотоническим солевым раствором (Мелпро, Россия) и ресуспендировали в 150 мкл ледяного буфера для лизиса (50 мМ трис-HCl, pH 7.4, 150 мМ KCl, 0.5% тритон Х-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензолсульфонилфторид гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ; апротинин 0.3 мкМ; бестатин 130 мкМ; EDTA 1 мМ; эпоксисукциниллейцингуанидинобутиламид (Е-64) 14 мкМ; лейпептин 1 мкМ (Sigma-Aldrich)), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем пентрифугировали в течение 10 мин при 5000g (CM-50, Eppendorf, Германия). Цитоплазматическую фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения концентрации продуктов ПОЛ (малоновый диальдегид (МДА) и 4-гидроксиолефины).

Получение клеточных мембран. Полученную аналогичным образом с других лунок суспензию клеток (3 × 10⁶) использовали для выделения клеточных мембран методом дифференциального центрифугирования [16]. Клетки осаждали при 100g в течение 10 мин и ресуспендировали в буфере для лизиса с добавлением 0.25 М сахарозы, встряхивали на шейкере, инкубировали на льду в течение 20 мин. Полученные лизаты центрифугировали 10 мин при 800 g (CM-50, Eppendorf, Германия) для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость центрифугировали 15 мин при 14000 g для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант при 20000 g 30 мин для осаждения лизосом. Полученную цитоплазматическую фракцию центрифугировали при 100000 g 35 мин (Avanti JXN-3, Beckman Coulter, США) для осаждения мембран, полученный осадок ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера и использовали для оценки степени окисления белков по уровню SH-групп и карбонильных производных.

Определение количества Рдр и транскрипционного фактора Nrf2 в клетках линии Caco-2 проводили методом гетерогенного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов (Human Permeability glycoprotein ELISA kit и Human Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ELISA kit, Blue gene, Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, ThermoFisher, США) [17].

Анализ содержания тиоловых SH-групп проводили по методу Эллмана с 5,5'-дитиобис(2-нитро)-бензоатом (DTNB) в неденатурирующих условиях [18]. Уровень SH-групп количественно оценивали по уровню 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США). Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\varepsilon_{412} = 13.6 \text{ мM}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [19], полученные результаты выражали в мкмоль/мг белка.

Определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов. В лизате клеток с помощью коммерческого набора определяли концентрацию продуктов ПОЛ (Elabscience, Китай). Метод определения продуктов ПОЛ – МДА и 4-гидроксиолефинов (4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя) – основан на их взаимодействии с 1-метил-2-фенилиндолом с образованием стабильного хромофора, который имеет максимум поглощения при 586 нм (Awareness Technology, США) [20]. Полученные результаты выражали в мкмоль/мг белка.

Определение концентрации карбонильных производных белков проводили с помощью коммерческого набора (Sigma-Aldrich).

Метод определения продуктов карбонильных производных белков основан на их взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов [21], которые регистрировали при длине волны 375 нм (Awareness Technology, США). Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\varepsilon_{375} =$ = 22 мM⁻¹ см⁻¹ и выражали в нмоль/мг белка. Анализ выполняли на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Оценка транспорта субстрата Рдр фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2. В качестве субстрата белка-транспортера Рдр использовали фексофенадин (Sigma-Aldrich) [22]. Транспорт субстрата оценивали по его проникновению через монослой клеток линии Сасо-2 в специальной трансвелл-системе (рис. 1). Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Сасо-2 с плотностью $10^5/см^2$ и культивировали в течение 21 сут.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра



Рис. 1. Структура трансвелл-системы. Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высеивали клетки линии Caco-2 с плотностью 10⁵/см².

Millicell ERS-2 (Millipore, США). При его значении выше 500 мОм см² к клеткам добавляли тестируемые концентрации пероксида водорода в питательной среде. После окончания инкубации питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хенкса (Sigma-Aldrich) с 25 мМ HEPES (Sigma-Aldrich) и 1% диметилсульфоксида (ПанЭко). Затем добавляли субстрат Pgp фексофенадин в апикальную камеру в концентрации 150 мкМ [23]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (a-b транспорт, обусловленный пассивной диффузией против работы транспортера).

В аналогичной трансвелл-системе оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную (b-a транспорт, обусловленный пассивной диффузией и работой Pgp). Для этого субстрат в той же концентрации добавляли в базолатеральную камеру, а затем через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Транспорт маркерного субстрата рассчитывали по формуле [24]:

$$Papp = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{(AC_0)}$$

где Рарр — коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient, см/с), dQ/dt изменение количества субстрата в камере-реципиенте за время инкубации (мкМ мл/с), A площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе (см²), C_0 — начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкМ).

Концентрации фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполнялось на хроматографе (Стайер, Россия) по оригинальной методике [25]. Полученную пробу транспортной среды, содержащую фексофенадин, в количестве 50 мкл, разводили в 150 мкл подвижной фазы и 100 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

При анализе использовали хроматографическую колонку (Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A, 250 × 4.6, США) с зернением 4 мкм. Температура разделения: 45°С, скорость потока: 1 мл/мин, состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила (PanReac AppliChem, Испания), 267.4 мл воды деионизированной, 6.33 мл кислоты уксусной ледяной (PanReac AppliChem), с добавлением триэтиламина (PanReac AppliChem) до рН 6.7. Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12.8 мин. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1.2–57.4 мкМ.

Оценка плотности межклеточных контактов. Влияние H_2O_2 на плотность межклеточных контактов клеток оценивали по величине трансэпителиального сопротивления (TEER), которое измеряли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 (Millipore, США). Показано, что чем выше плотность межклеточных контактов, тем выше трансэпителиальное сопротивление [26].

Измеряли данный показатель до начала инкубации монослоя клеток с пероксидом водорода и по окончании экспозиции, то есть непосредственно перед выполнением транспортных экспериментов.

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали с помощью программ Stat-Soft Statistica 13.0 (США, номер лицензии JPZ8111521319AR25ACD-W) и Microsoft Excel for MAC ver. 16.24 (ID02984-001-000001). Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ ANOVA, попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюме-



Рис. 2. Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации пероксида водорода при инкубации 3 и 24 ч, ($M \pm SD$, n = 3). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. * – достоверное отличие от контроля, $p \le 0.01$.

на—Кейлса. Статистически значимыми считали различия при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическое и прооксидантное действие H_2O_2 на клетки линии Сасо-2. Цитотоксическое действие H_2O_2 оценивалось в ходе МТТ-теста. В контрольной группе жизнеспособность клеток составила 100% и статистически значимо не отличалась от значений в группе клеток, подвергавшихся воздействию пероксида водорода в концентрациях 0.1–10 мкМ в течение 3 и 24 ч. При инкубации клеток с H_2O_2 в течение 3 и 24 ч при концентрации прооксиданта 50 мкМ жизнеспособность клеток собность клеток снижалась до 71.3 ± 12.1% (p = 0.01) и 54.1 ± 9.5% (p = 0.001), а при 100 мкМ – до 70.9 ± 12.2% (p = 0.006) и 26.8 ± 14.3% (p = 0.0003), соответственно (рис. 2).

Оценку окислительного повреждения белков клеток линии Caco-2 под действием H_2O_2 проводили по анализу содержания SH-групп и карбонильных производных белков в мембранной фракции клеточного лизата, а повреждения липидов — по концентрации продуктов ПОЛ в тотальном лизате клеток.

Концентрация SH-групп в мембранах клеток при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0.1-5 мкМ в течение 3 ч статистически значимо не изменялась по сравнению с показателями контроля, а в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ снижалась на 40.8% (p = 0.039), 56.7% (p = 0.016) и 74.2% (p = 0.007), соответственно (рис. 3).

При инкубировании клеток Caco-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч во всех тестируемых концентрациях 0.1–100 мкМ уровень белковых SH-групп мембран достоверно снижался с максимальными изменениями при концентрации 100 мкМ (на 74.4% ниже значений контроля, *p* = = 0.01) (рис. 3).

При воздействии H_2O_2 на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч уровень карбонильных производных белков в мембране клеток статистически значимо не изменялся в диапазоне концентраций от 0.1 до 10 мкМ и повышался в концентрации 50 мкМ на 87.3% (p = 0.005), а в концентрации 100 мкМ на 130.4% (p = 0.001) по сравнению с показателями контроля (рис. 4).

При увеличении длительности воздействия прооксиданта до 24 ч уровень карбонильных производных белков увеличивался по сравнению со значениями контроля при концентрациях пероксида водорода 5, 10, 50 и 100 мкМ на 74.8% (p = 0.01), 97.1% (p = 0.01), 150.5% (p = 0.001) и 189.3% (p = 0.0005), соответственно (рис. 4).

Воздействие пероксида водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч приводило к увеличению уровня продуктов ПОЛ лишь в концентрации 100 мкМ на 35.7% (p = 0.04) по сравнению с контролем. Увеличение длительности экспозиции H_2O_2 до 24 ч сопровождалось повышением содержания МДА и 4-гидроксиолефинов уже при двух концентрациях прооксиданта: 50 мкМ – на 42.1% (p = 0.006) и 100 мкМ – на 57.1% (p = 0.0007), соответственно (рис. 5).

Таким образом, цитотоксичными для клеток линии Сасо-2 являются концентрации H_2O_2 50 и 100 мкМ при длительности воздействия 3 и 24 ч. При этом окислительные изменения в белках наблюдаются и при более низких концентрациях прооксиданта (10 мкМ при инкубации 3 ч, 0.1–10 мкМ при 24-часом воздействии).

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Так, в исследованиях на культуре клеток фибробластов установлено, что пероксид водорода в концентрации 50 мкМ запускает апоптоз, а выше 100 мкМ — некроз [27], аналогичные результаты были описаны для клеток линии 293T



Рис. 3. Изменение концентрации белковых SH-групп мембран клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч ($M \pm SD$, n = 3). Количественное определение тиоловых SH-групп проводили фотометрическим методом. * – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.



Рис. 4. Изменение концентрации карбонильных производных белков мембран клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч ($M \pm SD$, n = 3). Количественное определение карбонилированных белков проводили фотометрическим методом. * – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.

(клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека) и клеток миокарда при сроке инкубации от 6 до 36 ч [28]. Следовательно, полученные результаты указывают, что концентрации $H_2O_2 0.1-10$ мкМ являются физиологическими и имеют регуляторное значение.

Влияние H_2O_2 на количество Pgp в клетках линии Caco-2. Количество Pgp в лизате клеток линии Caco-2, оцененное методом иммуноферментного анализа, составило 118.1 ± 10.6 нг/мг белка.

Количество Pgp статистически значимо не изменялось при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0.1-50 мкМ в течение 3 ч, однако при максимальной концентрации H_2O_2 100 мкМ статистически значимо снижалось на 55.3% (p = 0.003) по сравнению с контролем (рис. 6).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

При инкубации клеток Сасо-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч количество белкатранспортера повышалось при концентрациях прооксиданта 0.1 мкМ, 0.5 мкМ и 1 мкМ на 78.9% (p = 0.01), 67.1% (p = 0.02) и 44.6% (p = 0.04), соответственно, по сравнению с контролем. В концентрациях H₂O₂ 5, 10 и 50 мкМ уровень Рдр не отличался от контроля (p > 0.05), а в максимальной концентрации 100 мкМ его уровень достоверно снижался на 65.1% (p = 0.02) (рис. 6).

Влияние H_2O_2 на количество Nrf2. Ранее нами было показано, что повышение количества Pgp при развитии окислительного стресса может быть связано с активацией транскрипционного фактора Nrf2 (Nuclear erythroid 2-related factor) [29]. Поэтому в данном исследовании также был оценен



Рис. 5. Изменение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (МДА и 4-гидроксиолефинов) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч ($M \pm SD$, n = 3). Количественное определение продуктов ПОЛ проводили фотометрическим методом. * – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.



Рис. 6. Изменение количества Рдр в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч, ($M \pm SD$, n = 3). Количество Рдр определяли с помощью ИФА. * – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.

уровень Nrf2 и его взаимосвязь с количеством белка-транспортера.

При воздействии пероксида водорода во всех протестированных концентрациях в течение 3 ч на клетки линии Сасо-2 количество транскрипционного фактора Nrf2 не изменялось (рис. 7). Увеличение срока инкубации до 24 ч способствовало повышению количества Nrf2 при концентрациях H_2O_2 0.1, 0.5 и 1 мкМ на 394.1% (p = 0.006), 311.7% (p = 0.01) и 214.7% (p = 0.03), соответственно (рис. 7).

При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая корреляционная зависимость между количеством Nrf2 и Pgp при длительности воздействия пероксида водорода 24 ч (коэффициент корреляции Пирсона r = 0.76, p = 0.00002) (рис. 8).

Таким образом, пероксид водорода в концентрациях 0.1-1 мкМ повышает уровень транскрипционного фактора Nrf2, который в свою очередь увеличивает количество белка-транспортера Pgp. Повышение концентрации H_2O_2 выше 5 мкМ нивелирует индуцирующее действие прооксиданта как на количество Nrf2, так и на уровень Pgp.

Влияние H_2O_2 на плотность межклеточных контактов клеток линии Caco-2. Влияние H_2O_2 на плотность межклеточных контактов оценивали по величине трансэпителиального сопротивления монослоя клеток. До начала экспериментов



Рис. 7. Изменение количества Nrf2 в лизате клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1–100 мкМ в течение 3 и 24 ч, ($M \pm SD$, n = 3). Количество Nrf2 определяли с помощью $U\Phi A$. * – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.



Рис. 8. Корреляционная зависимость между количеством Nrf2 (нг/мг белка) и Pgp (нг/мг белка) при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1–100 мкМ в течение 24 ч.

сопротивление клеточного монослоя составляло 775.3 \pm 34.7 мОм см².

При экспозиции 3 ч пероксид водорода в концентрациях 0.1-50 мкМ достоверно не влиял на значение трансэпителиального сопротивления, данный показатель достоверно не отличался от значений контроля (p > 0.05). Однако в концентрации 100 мкМ прооксидант вызывал снижение трансэпителиального сопротивления на 62.5% (p = 0.0001) (рис. 9).

При инкубации в течение 24 ч H_2O_2 в концентрациях 0.1—1 мкМ достоверно не влиял на значение трансэпителиального сопротивления, а в концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкМ вызывал сни-

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

жение данного показателя на 28.4% (p = 0.008), 28.2% (p = 0.003), 43.8% (p = 0.0003) и 74.5% (p = 0.0002), соответственно (рис. 9).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что плотность межклеточных контактов уменьшается при воздействии пероксида водорода в концентрации 100 мкМ при экспозиции в течение 3 ч и в концентрациях 5– 100 мкМ при 24-часовой экспозиции.

Влияние H_2O_2 на транспорт субстрата Pgp фексофенадина через монослой клеток линии Caco-2. Коэффициент кажущейся проницаемости Papp b-a фексофенадина, характеризующий его транспорт из базолатеральной камеры в апикальную за



Рис. 9. Значения трансэпителиального сопротивления (TEER) монослоя клеток линии Caco-2 (мОм см²) при воздействии пероксида водорода в диапазоне концентраций 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч. ($M \pm SD$, n = 3). Трансэпителиальное сопротивление определяли с помощью вольтметра. * – достоверное отличие от контроля, p < 0.01.

счет пассивной диффузии и работы Pgp, в среднем составил $3.08 \times 10^{-6} \pm 0.94 \times 10^{-6}$ см/с, а коэффициент кажущейся проницаемости Papp a-b, оценивающий транспорт из апикальной камеры в базолатеральную за счет пассивной диффузии против работы Pgp, равнялся $1.13 \times 10^{-6} \pm 0.6 \times$ $\times 10^{-6}$ см/с Представленные данные показывают, что транспорт, обусловленный Рдр, почти в 3 раза интенсивнее транспорта, происходящего за счет пассивной диффузии против функционирования белка-транспортера (p = 0.004) (табл. 1).

При возлействии пероксила водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч были получены следующие результаты: при концентрациях H₂O₂ 0.1-5 мкМ коэффициенты кажущейся проницаемости Рарр b-a фексофенадина и Рарр a-b достоверно не отличались от показателей контроля.

В концентрации 10 мкМ пероксил водорода вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр b-a на 56.3% (p = 0.0004) и повышение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр a-b на 50.4% (p = 0.01). Аналогичным образом при концентрации 50 мкМ пероксид водорода вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр b-a на 18.4% (p == 0.01) и повышение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр a-b на 155.6% (p = 0.01). При этом стоит отметить, что при данных концентрациях (10 и 50 мкМ) прооксиданта значения коэффициентов кажущейся проницаемости Рарр b-a и Рарр a-b фексофенадина выравнивались и достоверно между собой не различались. Полученные результаты свидетельствуют о снижении

H ₂ O ₂ , мкМ	Рарр $b-a$, ×10 ⁻⁶ см/с	Рарр $a-b$, ×10 ⁻⁶ см/с	Рарр <i>b—a</i> , ×10 ⁻⁶ см/с	Рарр <i>a—b</i> , ×10 ⁻⁶ см/с	
	3 ч		24 ч		
Контроль	3.09 ± 0.13	1.17 ± 0.15	3.06 ± 0.35	1.03 ± 0.34	
0.1	3.08 ± 0.11	0.94 ± 0.16	2.96 ± 0.25	0.95 ± 0.11	
0.5	2.90 ± 0.59	1.17 ± 0.03	3.65 ± 0.76	1.18 ± 0.08	
1	2.79 ± 0.42	1.16 ± 0.09	3.59 ± 0.61	1.36 ± 0.43	
5	2.52 ± 0.43	1.26 ± 0.06	2.85 ± 0.76	1.19 ± 0.05	
10	$1.35 \pm 0.13^{*}$	$1.76 \pm 0.18^{*}$	3.82 ± 0.65	$2.53 \pm 0.39^{*}$	
50	$2.52\pm0.16*$	$2.99\pm0.65^*$	$5.16 \pm 0.47*$	$5.52 \pm 0.38*$	
100	$4.92 \pm 0.96^{**}$	$5.15 \pm 1.81^{**}$	$7.81 \pm 0.18^{*}$	$8.95 \pm 1.05^{*}$	

Таблица 1. Влияние H_2O_2 в диапазоне концентраций 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч на транспорт субстрата Pgp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 ($M \pm SD$, n = 3)

Примечание. Клетки линии Сасо-2 после экспозиции с пероксилом водорода (3 и 24 ч) инкубировали в транспортной среде с добавлением фексофенадина (150 мкМ) в апикальную и базолатеральную камеры соответствующих трансвелл-систем. Забирали образцы через 1, 2 и 3 ч из противоположной камеры-реципиента: базолатеральной (а-b транспорт) и из апикальной камеры (*b-a* транспорт) для определения концентрации фексофенадина. Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. * – Достоверное отличие от контроля, $p \le 0.01$, ** – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.

активности Pgp при воздействии пероксида водорода в указанных концентрациях.

При увеличении концентрации прооксиданта до 100 мкМ происходило повышение как коэффициента кажущейся проницаемости Рарр b-a на 59.2% (p = 0.03), так и коэффициента кажущейся проницаемости Рарр a-b – на 340.2% (p = 0.02). Данные показатели между собой также не различались. Выявленные изменения свидетельствуют об усилении транспорта фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2 как в эффлюксном направлении функционирования Рдр, так и в противоположном, то есть о повышении проницаемости клеточного монослоя.

При воздействии пероксида водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 24 ч были получены следующие результаты: H_2O_2 в концентрациях 0.1-5 мкМ достоверно не влиял на коэффициенты кажущейся проницаемости Рарр b-a и Рарр a-b фексофенадина, их значения достоверно не отличались от показателей контроля.

В концентрации 10 мкМ пероксид водорода повышал коэффициент кажущейся проницаемости Рарр a-b фексофенадина на 145.6% (p = 0.04) по сравнению с контролем и не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости Рарр b-a, что свидетельствует о снижении активности Рдр и повышении проницаемости клеточного монослоя.

Увеличение концентрации H_2O_2 до 50 и 100 мкМ вызывало повышение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр *b*–*a* на 68.6% (*p* = 0.006) и 155.2% (*p* = 0.0003) и повышение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр *a*–*b* на 435.9% (*p* = 0.0003) и 768.9% (*p* = 0.0005), соответственно (табл. 1), что является следствием дальнейшего повышения проницаемости клеточного монослоя в обоих направлениях.

Таким образом, при воздействии H_2O_2 в течение 3 ч в концентрациях выше 10 мкМ происходит снижение активности Pgp, а в концентрации 100 мкМ также повышение проницаемости клеточного монослоя в обоих направлениях для субстрата белка-транспортера, как трансцеллюлярно, так и парацеллюлярно.

Увеличение длительности экспозиции до 24 ч не только снижает активность Pgp, но и повышает проницаемость клеточного монослоя для субстрата Pgp уже с концентрации прооксиданта 10 мкМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки линии Сасо-2 представляют собой клетки аденокарциномы толстого кишечника человека. При культивировании данных клеток в течение 21 сут происходит их спонтанная дифференцировка в столбчатые поляризованные эпителиальные клетки, подобные энтероцитам тонко-

го кишечника [30]. Исторически клетки линии Caco-2 после их спонтанной дифференцировки используют для изучения абсорбции лекарственных веществ, а также оценки проникновения веществ через билипидную мембрану [31]. При этом особенностью образуемого монослоя клеток линии Caco-2 является то, что на нем можно изучать все виды транспорта веществ: парацелюллярный и трансцеллюлярный (пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт, в том числе с помощью белка-транспортера Pgp), трансцитоз [32].

В настоящем исследовании в опытах *in vitro* оценивалось влияние окислительного стресса на транспорт субстрата белка-транспортера Рдр фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2 после их спонтанной дифференцировки.

Окислительный стресс моделировали инкубированием клеток с H_2O_2 в диапазоне концентрации 0.1–100 мкМ в течение 3 и 24 ч. Показано, что H_2O_2 может непосредственно контактировать с цитоплазматической мембраной и межклеточными контактами и проникать внутрь клетки путем пассивной диффузии [33] или через аквапорины [34].

В ходе реакции Фентона и Габера-Вейса из пероксида водорода образуется гидропероксидный радикал НО, который вызывает повреждение белков, липидов и нуклеиновых кислот [35].

В ходе выполнения настоящего исследования нами было показано, что воздействие пероксида водорода в течение 3 ч на клетки линии Сасо-2 в концентрациях 0.1-5 мкМ не вызывало окислительного повреждения биомакромолекул, существенно не влияло на функционирование белкатранспортера Рдр и на проницаемость клеточного монослоя для его субстрата фексофенадина. Повышение концентрации H₂O₂ до 10-50 мкМ сопровождалось повреждением белков, снижением активности Рдр (скорее всего вследствие окисления SH-групп в его молекуле, доля которых составляет примерно 1% [36]), при этом количество белка-транспортера не изменялось, также как сохранялась целостность клеточного монослоя. Увеличение концентрации прооксиданта до 100 мкМ приводило к усилению окислительного стресса, повреждению белков, липидов, снижению количества Pgp, его активности, повышению парацелюллярного и трансцелюллярного транспорта фексофенадина через клеточный монослой и снижению жизнеспособности клеток.

При инкубировании клеток линии Caco-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч было показано, что H_2O_2 уже в концентрациях 0.1–1 мкМ снижал содержание белковых SH-групп. Однако при этом происходило повышение количества Pgp, что, видимо, предотвращало снижение активности белка-транспортера (данный показа-

тель достоверно не отличался от контроля), несмотря на окисление SH-групп в его молекуле.

Увеличение концентрации H_2O_2 до 5–10 мкМ сопровождалось усилением окислительного стресса, что, видимо, приводило к снижению уровня Рдр до величин нормы и уменьшению по сравнению с контролем активности белка транспортера при концентрации прооксиданта 10 мкМ.

В концентрациях H_2O_2 50—100 мкМ наблюдалось дальнейшее усиление окислительного стресса, повреждение как белков, так и липидов, снижение количества Рдр при концентрации прооксиданта 100 мкМ, его активности, повышение парацелюллярного и трансцелюллярного транспорта фексофенадина через клеточный монослой и снижение жизнеспособности клеток.

Таким образом, при воздействии H_2O_2 на транспорт субстрата Pgp через монослой клеток линии Caco-2 в течение 3 и 24 ч отмечалась аналогичная картина: сначала снижается транспорт фексофенадина, опосредованный Pgp, а затем при повышении концентрации прооксиданта до 50—100 мкМ нарушается целостность клеточного монослоя и растет транспорт субстрата за счет пассивной диффузии пара- и трансцеллюлярно.

Однако есть и ряд отличий. При длительности воздействия пероксида водорода 24 ч описанные выше изменения начинаются при более низких концентрациях прооксиданта. С другой стороны, при увеличении срока экспозиции до 24 ч клетки начинают адаптироваться к возникшим патологическим условиям, повышая количество белкатранспортера Рgp при концентрации H₂O₂ – 0.1–1 мкМ.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Так, в исследовании Ziemann и соавт. на культуре крысиных гепатоцитов было показано, что H_2O_2 в концентрации 0.5–1 мМ при инкубации в течение 72 ч вызывал повышение количества Pgp, экспрессии его гена и активности белка-транспортера [9]. В работе Felix и Barrand [10] выявлено, что H_2O_2 в концентрации до 500 мкМ при воздействии в течение 48 ч на первичную культуру эндотелия крыс повышал экспрессию Pgp и в меньшей степени влиял на активность белка-транспортера.

В то же время Hoshi и соавт. установлено, что обработка клеток hCMEC/D3 (модель гематоэнцефалического барьера *in vitro*) H_2O_2 в концентрации 0.5–5 мМ при экспозиции 20 мин снижал транспортную активность Pgp [37], что согласуется с нашими результатами при длительности воздействия прооксиданта 3 ч.

В отличие от ряда процитированных работ в нашем исследовании, несмотря на повышение количества Рдр при воздействии пероксида водорода в течение 24 ч, активность белка-транспортера не изменялась. Данные различия могут быть связаны с разной длительностью экспозиции, концентрацией H_2O_2 и типами клеток, используемых в исследованиях, а также методиками оценки активности Pgp, учетом или не учетом вклада парацеллюлярного транспорта в перенос субстрата, что в цитируемых работах не изучалось.

В ограничении парацеллюлярного транспорта наибольшее значение имеют плотные соединения (tight junction). Три типа трансмембранных белков: окклюдин, клаудины и zonula occludens (ZO, относяшиеся к семейству каркасных белков мембраносвязанных гуанилаткиназ) были идентифицированы в области плотных соединений [38]. В исследовании на клетках линии Сасо-2 было показано, что окислительный стресс вызывал повышение парацеллюлярного транспорта, что было связано с нарушением плотных соединений из-за фосфорилирования тирозина окклюдина. ZO-1, Е-кадгерина и бета-катенина [39], что согласуется с нашими результатами и объясняет увеличение транспорта фексофенадина через клеточный монослой в обоих направлениях при увеличении концентрации Н₂O₂ и времени его экспозиции.

В рамках настоящего исследования также был изучен возможный механизм увеличения количества белка-транспортера в условиях окислительного стресса. В частности, было показано, что повышение уровня Рgp прямопропорционально повышению количества транскрипционного фактора Nrf2.

Nrf2 — редокс-чувствительный транскрипционный фактор. Его экспрессия повышается при развитии окислительного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов [40]. В условиях нормы данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap 1, который, с одной стороны, способствует убиквитированию и протеасомной деградации Nrf2, а с другой — предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро.

После активации комплекс Keap1–Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с ARE (antioxidant-response elements) и активирует транскрипцию защитных ферментов [41].

Полученные результаты могут иметь важное практическое значение. Проникновение веществ через монослой клеток линии Caco-2 является классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике [31, 32]. Выявленное в нашем исследовании снижение активности Рдр и повышение проницаемости монослоя клеток для субстрата белка-транспортера при воздействии пероксида водорода может свидетельствовать о повышении абсорбции веществ-субстратов белка-транспортера в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом, что в свою очередь может приводить к увеличению их концентрации в плазме крови и сопровождаться развитием побочных эффектов фармакотерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами показано, что кратковременное воздействие H_2O_2 в течение 3 ч в концентрации 10—50 мкМ снижает активность (но не количество) Pgp и, соответственно, транспорт его субстрата, опосредованный данным белкомтранспортером, при сохранении целостности клеточного монослоя. Увеличение концентрации прооксиданта до 100 мкМ приводит к снижению количества Pgp и нарушению целостности клеточного монослоя, что приводит к повышению трансцеллюлярного и парацеллюлярного транспорта фексофенадина.

При инкубировании клеток линии Caco-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч в концентрациях 0.1–1 мкМ повышается количество Pgp, опосредованное транскрипционным фактором Nrf2, но активность белка-транспортера остается неизменной. В концентрации прооксиданта 10 мкМ снижается активность Pgp и повышается проницаемость клеточной мембраны, а в концентраци-ях 50–100 мкМ происходит снижение количества (100 мкМ) и активности Pgp и повышение пара- и трансцелюллярной проницаемости клеточного монослоя для субстрата Pgp фексофенадина.

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

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук MK-1856.2020.7.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maiti S. 2017. Nanometric biopolymer devices for oral delivery of macromolecules with clinical significance. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*. 6, 109–138. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00006-X
- Subramanian N., Condic-Jurkic K., O'Mara M.L. 2016. Structural and dynamic perspectives on the promiscuous transport activity of P-glycoprotein. *Neurochem. Int.* 98, 146–152.

https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.005

 Esser L., Zhou F., Pluchino K.M., Shiloach J., Ma J., Tang W.K., Gutierrez C., Zhang A., Shukla S., Madi-

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

gan J.P., Zhou T., Kwong P.D., Ambudkar S.V., Gottesman M.M., Xia D. 2017. Structures of the multidrug transporter P-glycoprotein reveal asymmetric ATP binding and the mechanism of polyspecificity. *J. Biol. Chem.* **292**, 446–461.

https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755884

- Якушева Е.Н., Титов Д.С., Правкин С.К. 2017. Локализация, модели функционирования и физиологические функции гликопротеина-Р. *Успехи физиол. наук.* 48 (4), 70–87.
- 5. Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. 2008. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей. М.: Гэотар-Медиа, 2008. 304 с.
- Aller S.G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell P.M., Trinh Y.T., Zhang Q., Urbatsch I.L., Chang G. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*. 323 (5922), 1718–1722. https://doi.org/10.1126/science.1168750.
- Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Попова Н.М., Черных И.В., Титов Д.С. 2014. Структура, функции гликопртеина-Р и его значение для рациональной фармакотерапии. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 12 (2), 3–11.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2015. Free radicals in biology and medicine. 5th Edition. New York: Oxford University Press. 905 p. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478. 001.0001
- 9. Ziemann C., Bürkle A., Kahl G.F., Hirsch-Ernst K.I. 1999. Reactive oxygen species participate in mdr1b mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis*. **20** (3), 407– 414.

https://doi.org/10.1093/carcin/20.3.407

Felix R.A., Barrand M.A. 2002. P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress. *J. Neurochem.* 80 (1), 64–72.

https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00660.x

- Basuroy S., Sheth P., Kuppuswamy D., Balasubramanian S., Ray R.M., Rao R.K. 2003. Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer. *J. Biol. Chem.* 278 (14), 11916–11924. https://doi.org/10.1074/jbc.M211710200
- Van der Paal J., Neyts E.C., Verlackt C.C.W., Bogaerts A. 2016. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress, *Chem. Sci.* 7, 489–498. https://doi.org/10.1039/C5SC02311D
- Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S. 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmac. Res.* 7 (9), 902–910. http://dx.doi.org/10.1023/A:1015937605100
- 14. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В., Попова Н.М., Котлярова А.А., Слепнев А.А. 2019. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р in vitro. Обзоры по клинической

фармакологии и лекарственной терапии. 17 (1), 71–78. https://doi.org/10.7816/RCF17171-78

- 15. Tolosa L., Donato M.T., Gómez-Lechón M. J. 2015 general cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. Methods Mol. Biol. 1250, 333-348. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7 26
- 16. Wibo M. 1976. Cell Fractionation by Centrifugation Methods. In: Eukaryotic Cell Function and Growth. Eds Dumont J.E., Brown B.L., Marshall N.J. Boston: Springer, p. 1-17. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4322-6 1
- 17. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 7 (72), 248-254. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999

18. Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., Talfournier F., Dorsselear A.V., Branlant G. 2000. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 275, 35908-35913.

https://doi.org/10.1074/jbc.M006137200

- 19. Ellman L.G. 1959 Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.
 - https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6
- 20. Gérard-Monnier D., Erdelmeier I., Régnard K., Moze-Henry N., Yadan J.C., Chaudière J. 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, Chem. Res. Toxicol. 11 (10), 1176-1183. https://doi.org/10.1021/tx9701790
- 21. Weber D., Davies M.J., Grunea T. 2015. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. Redox Biol. 5, 367-380.

https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.005

22. Bronsky E.A., Falliers C.J., Kaiser H.B., Ahlbrandt R., Mason J.M. 1998. Effectiveness and safety of fexofenadine, a new nonsedating H1-receptor antagonist in the treatment of fall allergies. Allergy Asthma Proc. 19, 135-141.

https://doi.org/10.2500/108854198778604112

- 23. Petri N., Tannergren C., Rungstad D., Lennernäs H. 2004. Transport Characteristics of Fexofenadine in the Caco-2 Cell Model. Pharmac. Res. 21 (8), 1398-1404. https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1
- 24. Elsby R., Surry D.D., Smith V.N., Gray A.J. 2008. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions, Xenobiotic, 38, 1140-1164. https://doi.org/10.1080/00498250802050880
- 25. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Черных И.В., Попова Н.М., Слепнев А.А., Якушева Е.Н. 2020. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-Р in vitro. Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. 28 (2), 135-142.

https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020282135-142

- 26. Srinivasan B., Kolli A.R., Esch M.B., Abaci H.E., Shuler M.L., Hickman J.J. 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. J. Lab. Autom. 20 (2), 107-126. https://doi.org/10.1177/2211068214561025
- 27. Hirsch I., Prell E., Weiwad M. 2014. Assessment of cell death studies by monitoring hydrogen peroxide in cell culture. Analyt. Biochem. 456 (1), 22-24. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.009
- 28. Xiang J., Wan C., Guo R., Guo D. 2016. Is hydrogen peroxide a suitable apoptosis inducer for all cell types? Biomed Res Int. Article ID 7343965. https://doi.org/10.1155/2016/7343965
- 29. Shchulkin A.V., Abalenikhina Y.V., Erokhina P.D., Chernykh I.V., Yakusheva E.N. 2021. The role of P-glycoprotein in decreasing cell membranes permeability during oxidative stress. Biochemistry (Moscow). 86 (2), 197-206.

https://doi.org/10.1134/S0006297921020085

- 30. Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastroenterology. 96 (3), 736-749.
- 31. Sun H., Chow E.C., Liu S., Du Y., Pang K. S. 2008. The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 4 (4), 395-411. https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.395
- 32. Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A. 2006. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. Biotechnology Progress., 22 (1), 186-198. https://doi.org/ 10.1021 / bp050208u
- 33. Möller M.N., Cuevasanta E., Orrico F., Lopez A.C., Thomson L., Denicola A. 2019. Diffusion and transport of reactive species across cell membranes. Adv. Exp. Med. Biol. 1127, 3-19. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11488-6 1
- 34. Hara-Chikuma M., Watanabe S., Satooka H. 2016. Involvement of aquaporin-3 in epidermal growth factor receptor signaling via hydrogen peroxide transport in cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 471 (4), 603-609. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.010
- 35. Sies H. 2019. Oxidative stress: eustress and distress in redox homeostasis. Handbook of Stress Series. 3, 153-163.

https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8

36. Sim H.M., Bhatnagar J., Chufan E.E., Kapoor K., Ambudkar S.V. 2013. Share conserved walker A cysteines 431 and 1074 in human P-glycoprotein are accessible to thiol-specific agents in the apo and ADP-vanadate trapped conformations. Biochemistry. 52 (41), 7327-7338.

https://doi.org/10.1021/bi4007786

37. Hoshi Y., Uchida Y., Tachikawa M., Ohtsuki S., Couraud P., Suzuki T., Terasaki T. 2019. Oxidative stress-induced activation of Abl and Src kinases rapidly induces P-glycoprotein internalization via phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14, decreasing cortisol efflux at the blood-brain barrier. J. Cerebral Blood Flow Metabolism. 40 (2), 420-436. https://doi.org/10.1177/0271678X18822801

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ 2021 том 38 Nº 4

305

- Kim S., Kim G.H. 2017. Roles of claudin-2, ZO-1 and occludin in leaky HK-2 cells. *PLoS One.* 12 (12), e0189221. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189221
- Rao R.K., Basuroy S., Rao V.U., Karnaky K. J., Gupta A. 2002. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem. J.* 368, 471–481.

https://doi.org/10.1042/BJ20011804

- Kang K.A., Hyun J.W. 2017. Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance. *Toxicol. Res.* 33, 1–5. https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.1.001
- Wen Zh., Liu W., Li X., Chen W., Liu J., Wen Zh., Liu Zh. 2019. A Protective Role of the NRF2-Keap1 Pathway in Maintaining Intestinal Barrier Function, *Oxid. Med. Cell Longev.* Article ID 1759149. https://doi.org/10.1155/2019/1759149

Effect of Oxidative Stress on the Transport of P-Glycoprotein Substrate through the Cell Monolayer

A. V. Shchulkin¹, Yu. V. Abalenikhina¹, A. A. Seidkulieva¹, I. V. Chernykh¹, E. N. Yakusheva^{1, *}

¹Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026 Russia *e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

P-glycoprotein (Pgp) is an ATP-dependent transmembrane protein that is involved in the efflux of lipophilic substances. The aim of this work was to evaluate the effect of oxidative stress (OS) on the transport of Pgp substrate through the monolayer of Caco-2 cells, which overexpress this transporter. OS was simulated by incubating cells with H_2O_2 . Exposure to H_2O_2 at concentrations 10 and 50 μ M for 3 h caused a decrease in the activity (but not the amount) of Pgp with preservation of intercellular contacts and the integrity of the cell membrane. An increase in the concentrations of H_2O_2 to 100 μ M decreased the amount of Pgp, disrupted the integrity of the cell monolayer, and increased the transcellular and paracellular transport of the Pgp substrate fexofenadine. Exposure to H_2O_2 at concentrations of $0.1-1 \mu$ M for 24 h increased the amount of Pgp mediated by the transcription factor Nrf2, but the activity of the transporter protein remained unchanged. At a concentration of 10 μ M, H_2O_2 decreased the Pgp activity and increased the para- and transcellular permebrane, while at 50–100 μ M the amount and activity of Pgp decreased and the para- and transcellular permebrane, while at 50–100 μ M the cell monolayer by inhibiting the activity of the transporter protein, reducing its amount, as well as disrupting the integrity of the cell membrane and intercellular contacts. Cells can adapt to these influences by increasing the amount of Pgp.

Keywords: P-glycoprotein, oxidative stress, Caco-2 cells, transmembrane transport, fexofenadine

УДК 577.352.3:576.311.347

АНАЛИЗ УПОРЯДОЧЕННОСТИ ЛИПИДОВ РАФТОВЫХ СТРУКТУР В МЕМБРАНАХ МИТОХОНДРИЙ ГАЛОФИТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2021 г. В. Н. Нурминский^{*a*, *}, В. Н. Нестеров^{*b*}, О. А. Розенцвет^{*b*}, А. Л. Ракевич^{*c*}, Ю. С. Букин^{*d*}, И. С. Капустина^{*a*}, Н. В. Озолина^{*a*}

^аСибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033 Россия ^bСамарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, 445003 Россия ^cИркутский филиал Института лазерной физики СО РАН, Иркутск, 664033 Россия ^dЛимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033 Россия *e-mail: cell@sifibr.irk.ru Поступила в редакцию 31.12.2020 г. После доработки 18.02.2021 г. Принята к публикации 24.02.2021 г.

Проведен анализ распределения параметра упорядоченности рафтоподобных микродоменов в митохондриальных мембранах галофитов, отличающихся по типу солеустойчивости – Salicornia perennans, Halocnemum strobilaceum и Artemisia santonica. Плотность упаковки (упорядоченность) липидов мембран оценивали на основе измерения обобщенной поляризации флуоресценции зонда лаурдан. В распределении GP мембранного материала митохондрий *S. perennans, H. strobilaceum* и *A. santonica* выявлено от четырех до шести компонент, предположительно связанных с рафтовыми структурами, в градиенте плотности сахарозы в области 15 и 25%. Установлено, что липиды, выделенные из упорядоченных областей, обогащены стеринами, цереброзидами и насыщенными жирными кислотами; а количественное содержание рафтообразующих липидов зависит от стратегии солеустойчивости галофитов.

Ключевые слова: упорядоченность мембран, липидные рафты, лаурдан, митохондрии, солеустойчивость **DOI:** 10.31857/S0233475521040083

ВВЕДЕНИЕ

Биологические мембраны неоднородны по своей структуре, в них имеются более упорядоченные, плотно упакованные области (кластеры, микро- и нанодомены). Они выполняют важную функциональную роль, участвуя в мембранном переносе и передаче сигналов в клетках [1]. Известно, что микродомены устойчивы к действию детергентов, благодаря специфическому составу липидов, в сравнении с остальными участками мембран [2]. Детергент-устойчивые домены мембран принято называть липидными рафтами [3]. Для рафтов характерно наличие следующих групп липидов: стеринов, сфинголипидов/цереброзидов и глицеролипидов с насыщенными жирными кислотами (ЖК) [1, 4].

Вышеуказанные плотно упакованные домены высокодинамичны, они быстро образуются и

также быстро распадаются. Вследствие малого размера и нестабильности рафты мембран довольно сложно регистрировать и изучать в живых клетках. Поскольку их размер находится за дифракционным пределом разрешающей способности светового микроскопа, визуализировать липидные рафты непосредственно практически невозможно. Для их изучения интенсивно используют метод флуоресцентной микроскопии. Например, широко используются флуорофоры, связанные с В-субъединицей холерного токсина, который соединяется с обязательной составляющей рафтов – ганглиозидом GM1 [5]. Также используются липофильные мембранные красители (флуоресцентные зонды), которые либо встраиваются между рафтами и остальной частью мембраны, либо изменяют свои флуоресцентные свойства в зависимости от фазы мембраны [6]. Примером таких красителей может служить часто используемый зонд лаурдан [7, 8].

Сокращения: GP – обобщенная поляризация; ЖК – жирные кислоты; МКС – мембранные контактные сайты.
Параметры флуоресценции лаурдана используются для выявления изменений в упорядоченности фосфолипидов. Показано, что амфифильный флуоресцентный зонд лаурдан встраивается в мембрану в гидрофильно-гидрофобной области липидного бислоя, при этом остаток лауриновой кислоты располагается в области углеводородных цепочек жирных кислот фосфолипидов, а его флуоресцентный нафталиновый остаток находится на уровне их полярных головок [9]. В зависимости от липидного окружения меняются значения обобщенной (генерализованной) поляризации (GP) флуоресценции лаурдана, что дает возможность составить представление о степени упорядоченности липидов в гидрофильно-гидрофобной области липидного бислоя. Значения величин GP варьируют в диапазоне от -1 (наиболее жидкая фаза мембраны) до +1 (наиболее упорядоченная фаза). При этом концентрация лаурдана должна быть достаточно низка, чтобы, с одной стороны, не было влияния на ацильные цепи липидов в мембране, а с другой стороны, чтобы избежать быстрого тушения флуоресценции [10].

К настоящему времени рафты обнаружены в плазматической мембране [11, 12], мембранах эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи [2, 13], в вакуолярной мембране [14] и в мембранах митохондрий [15] животных и растительных клеток. Митохондрии являются энергетическими станциями и играют центральную роль в метаболизме клеток. Это высокодинамичные органеллы, которые непрерывно сливаются, делятся и перемещаются внутри клетки, образуя митохондриальную сеть. Митохондрии выполняют ряд важных функций, таких как производство АТР посредством дыхания, производство тепла, хранение ионов кальция, регулирование клеточной пролиферации и пр. [16]. Митохондрии выполняют и множество дополнительных функций, среди которых участие в механизмах защиты растений от абиотических стрессовых факторов [17, 18].

Микродомены митохондриальных мембран имеют в своем составе специальные рафтобразующие белки (прохибитины, стоматины), которые формируют и стабилизируют их [19]. Известно, что стоматины могут регулировать ионный трафик и функционирование митохондрий [20].

Способность клеток контролировать транспорт ионов через мембраны характерна для всех растений, в том числе для галофитных. Поступление Na⁺ в растительную клетку осуществляется с помощью ионных каналов и транспортеров, локализованных в мембранах плазмалеммы, вакуоли и хлоропластов [21]. Показано также существование ионопроводящих путей в митохондриях [22]. Кроме того, в мембранах митохондрий обнаружены рафтоподобные структуры, называе-

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

мые "мембранными контактными сайтами" (МКС), которые образуют контактные области с другими клеточными органеллами, например с эндоплазматическим ретикулумом, пероксисомами и вакуолями [23–25]. Митохондриальные МКС играют важную роль в аутофагии [26]. Несмотря на определенный прогресс в этой области, доменные структуры в мембранах митохондрий растений и их функциональная роль мало исследованы. В связи с этим объектом исследования мы выбрали митохондрии растений-галофитов, произрастающих при высоком содержании солей в почве.

Цель настоящей работы — провести анализ упорядоченности липидов рафтовых структур мембран митохондрий галофитов, различающих-ся по типу солеустойчивости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали соленакапливающие эугалофиты Salicornia perennans Willd., Halocnemum strobilaceum Bieb. и гликогалофит Artemisia santonica L. – растение с соленепроницаемым типом солевого обмена. Пробы растительного материала для исследований отбирали в бассейне соленого озера Эльтон (49°07' с.ш., 46°50' в.д.). Листья A. santonica и надземные побеги S. perennans и *H. strobilaceum* замораживали в жидком азоте и хранили в морозильнике при -80°C до начала анализов. Выделение митохондрий осуществляли с помощью метода дифференциального центрифугирования [27]. Для получения детергентустойчивой фракции мембран (липидных рафтов) использовали общепринятый метод [28]. Фракции митохондрий галофитов солюбилизировали 1% тритоном X-100 (Sigma-Aldrich, США) 30 мин при 4°C, наносили на градиент сахарозы 35-25-15-5% и центрифугировали при 200000 g в течение 2 ч (при 4°С) и разделяли полученный мембранный материал на зоны, каждую область с определенной плотностью сахарозы делили на две зоны (табл. 1). После центрифугирования в градиенте плотности в районе 15% сахарозы была выявлена опалесцирующая область (схема в табл. 1), в которой, судя по предыдущим работам, содержится наибольшее количество рафтов [8, 28].

Далее был проведен общий анализ липидов митохондриальных мембран и анализ липидов детергентустойчивой фракции мембран из опалесцирующих областей мембранного материала после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (1:2). Разделение липидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии. Количество глицеролипидов (фосфолипидов и гликолипидов), стеринов и цереброзидов

Таблица 1. Распределение и разделение на зоны мембранного материала, солюбилизированного 1% тритоном X-100, после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (35–25–15–5%)

№ зоны	Концентрация сахарозы, %	Плотность, г/см ³	Схема
1	5	1.018	$\left(\right)$
2			
3	45	1.050	
4			
5	25	1.083	
6	23		
7	35	1.110	\square
8			\bigcirc

Π	0	1		~		
Πημωραστικο	(entime	TOUOM	отмецеца	ODTACTL	опалеси	енник
mpane aunae.	CODDIM	ponom	01 MC 1011a	00110010	Unancen	СПЦИИ

определяли денситометрическим методом, используя программу Денскан-04 (Ленхром, Россия). Хроматограммы анализировали в режиме параболической аппроксимации по градуировочным зависимостям, используя фосфатидилхолин, моногалактозилдиацилглицерин, холестерин и сфинголипид в качестве стандартов. Метанолиз ЖК осуществляли кипячением в 5% растворе HCl в метаноле. Полученные эфиры анализировали на хроматографе Кристалл 5000.1 (Хроматэк, Россия) в изотермическом режиме с использованием капиллярной колонки длиной 105 м и диаметром 0.25 мм (Restek, США). Температура колонки 180° С, испарителя и детектора — 260° С, скорость тока газа-носителя (гелий) – 2 мл/мин. ЖК идентифицировали по времени удерживания, используя стандарт 37 Comp. FAME Mix (Supelco, USA). Для оценки ненасыщенности ЖК в липидах митохондриальных мембран использовали индекс ненасыщенности (ИН, индекс двойных связей) [29]:

$$\mathbf{M}\mathbf{H} = \frac{\sum P_j n_j}{100},\tag{1}$$

где P_j – содержание (вес. %) ненасыщенных ЖК, n_j – число двойных связей в каждой кислоте.

Изменение физического состояния липидных рафтов мембран митохондрий оценивали с помощью конфокального люминесцентного сканирующего лазерного микроскопа MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Германия) с флуоресцентным зондом 2-диметиламино-6-лауроилнафталина (лаурдан) (Sigma-Aldrich, США). Для связывания зонда с фракцией мембран к суспензии фракции митохондрий добавляли лаурдан, растворенный в метаноле, до конечной концентрации 10 мкМ. Суспензию инкубировали при $20 \pm 2^{\circ}$ С в течение 10 мин и анализировали на конфокальном микроскопе. Регистрацию изображений фракций митохондрий (300×300 пикселей) осуществляли по двум каналам (при длинах волн 440 и 490 нм соответственно, $I_{возб} = 340$ нм). В качестве примера приведены конфокальные изображения мембранного материала митохондрий полыни (*A. santonica*) в зоне 5 градиента плотности сахарозы (рис. 1*a*, 1*б*). Величину GP флуоресценции лаурдана для каждого пикселя полученного изображения рассчитывали в программе Microsoft Excel 2007, как описано в работе [14], по формуле:

$$GP = \frac{I_{(400-460)} - I_{(470-530)}}{I_{(400-460)} + I_{(470-530)}},$$
(2)

где $I_{(400-460)}$ и $I_{(470-530)}$ — интенсивность флуоресценции лаурдана в диапазонах длин волн от 400 до 460 нм и от 470 до 530 нм соответственно. На основе полученных данных формировали GP-изображения (рис. 1*в*).

При статистической обработке данных распределения величин GP визуализировались в виде гистограмм. Для каждой гистограммы строилось теоретическое многомодальное распределение как суперпозиция (наложение) нескольких нормальных распределений, задаваемое формулой:

$$P(\text{GP}) = \sum_{i=1}^{k_m} \frac{h_i}{\delta_i} e^{\frac{-(\text{GP}-m_i)^2}{2\delta_i^2}},$$
(3)

где k_m — количество нормально распределенных мод в многомодальном распределении, h_i — доля значений GP от общего их количества, распределенных по моде *i* в многомодальном распределении, δ_i — дисперсия для моды *i*, m_i — математическое ожидание для моды *i*. Значение параметров h_i , δ_i , m_i для выбранных значений *k* определялось методом наименьших квадратов. Для каждого значения *k* рассчитывалось значение коэффициента ковариации R^2 и два показателя информативной значимости — информационный критерий Акаике (AIC) и Байесовский информационный критерий (BIC). AIC рассчитывали по формуле:

$$AIC = \frac{2k_p}{n} + \ln\hat{\delta}^2, \qquad (4)$$

где k_p – количество использованных (оценен-

ных) параметров, n – объем выборки, $\hat{\delta}^2$ – состоятельная оценка (метода максимального правдоподобия) дисперсии случайной ошибки модели, равная отношению суммы квадратов остатков к объему выборки; а BIC – по формуле:

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021



Рис. 1. Конфокальные изображения мембранного материала митохондрий *A. santonica* в зоне 5 (верхняя часть области 25% сахарозы, табл. 1) градиента плотности сахарозы (300 × 300 пикселей), канал 1 (*a*), канал 2 (*b*) при регистрации длин волн от 400 до 460 нм и от 470 до 530 нм соответственно (флуоресцентный зонд – лаурдан, *I*_{возб} = 340 нм), окраска отражает интенсивность флуоресценции, масштабный отрезок – 10 мкм, и соответствующее GP-изображение (*b*), псевдоокраска отражает величину GP, стрелками отмечены более плотно упакованные участки мембранного материала.

$$BIC = n \ln\left(\frac{SSE}{n}\right) + k_p \ln\left(n\right),\tag{5}$$

где SSE — сумма квадратов остатков. В качестве оптимального выбиралось многомодальное распределение с таким значением k_m , для которого $R^2 > 0.99$ при минимальных значениях AIC и BIC. Таким образом, было введено ограничение по количеству компонент-мод для описания распределения GP.

Для анализа результатов использовали программы Microsoft Excel 2007 и R (авторский скрипт Ю.С. Букина) При статистической обработке результатов использовали программы SigmaPlot v. 12.5, Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения липидных рафтов предварительно были получены фракции митохондрий из свежих листьев эугалофитов *S. perennans*, *H. strobilaceum* и гликогалофита *A. santonica*. Липидные рафты изолировали после обработки митохондрий тритоном X-100 с последующим центрифугированием в градиенте плотности сахарозы.

Измерение степени упорядоченности липидов детергент-устойчивых областей мембран фракций митохондрий галофитов проводили на основе расчета GP флуоресцентного зонда лаурдан по данным флуоресцентной микроскопии. Было показано, что в исследуемых мембранах присутствуют небольшие области, обладающие более плотной упаковкой и повышенной микровязкостью по сравнению с остальной частью мембран (рис. 1*в*). Выполнена оценка формы (подгонка параметров) экспериментальных распределений значений GP в разных зонах мембранного материала митохондрий. Модельное распределение представляло собой смесь нормальных распределений и состояло из нескольких компонент (составляющих). В результате анализа осуществляли подбор оптимальных параметров компонент, наиболее близко подходящих к экспериментальному распределению (рис. 2). В качестве примера приведена гистограмма экспериментального распределения величин GP фракции митохондрий полыни в зоне 3 (верх 15% сахарозы, табл. 1) и подобранное к нему теоретическое многомодальное распределение, представляющее собой суперпозицию нескольких нормальных распределений (рис. 2). Рассчитанные параметры компонент распределений значений GP мембранного материала митохондрий S. perennans, H. strobilaceum и A. santonica в зонах градиента плотности сахарозы (15 и 25%) приведены в табл. 2.

Подгонка экспериментальных распределений значений GP мембранного материала митохондрий позволила выявить от четырех до шести компонент в каждом варианте. Наиболее весомая компонента практически во всех анализируемых зонах исследуемых растений - компонента, характеризующая жилко-неупорядоченные области мембраны (α (средние значения GP): $-0.65 \dots -0.42$, вклад: 34.2-86.0%). Компоненты, характеризующие более плотно упакованные участки мембран, были минорными и были выявлены почти в каждой зоне: у фракции митохондрий S. perennans – в зоне 3 (верхняя область 15% сахарозы) (α : -0.10, вклад: 2.6%), в зоне 4 (нижняя область 15% сахарозы) (α: -0.05, вклад: 0.8%) и в зоне 5 (верхняя область 5% сахарозы) (α: -0.14, вклад: 3.3%); у фракции митохондрий *H. strobilaceum* – в зоне 3 (α: -0.02, вклад: 1.8%) и в зоне 5 (α: -0.13, вклад: 4.6%), у фракции митохондрий A. santonica — в зоне 3 (α: 0.11, вклад: 3.5%), в зоне 4 (α: 0.30, вклад:



Рис. 2. Гистограмма экспериментального распределения величин GP мембранного материала митохондрий *A. santonica* в зоне 3 (верхняя часть 15% сахарозы, табл. 1) градиента плотности сахарозы и кривая теоретического многомодального распределения, представляющего собой суперпозицию нескольких нормальных распределений.

1.1%) и в зоне 5 (α : -0.03, вклад: 11.0%). Таким образом, по данным анализа упорядоченности липидов мембранного материала митохондрий рафтовые структуры у *S. perennans*, *H. strobilaceum* и *A. santonica* могут присутствовать в зонах 15 и 25% сахарозы.

Анализ липидов детергент-устойчивых мембран в сравнении с липидами митохондрий выявил интересные закономерности. Так, относительное содержание глицеролипидов в зоне опалесценции было в 3-8 раз меньше, чем во всех мембранах органелл (рис. 3а). При этом в этой зоне отмечен высокий уровень содержания стеринов — 70% от суммы мембранных липидов (рис. 3δ). Кроме того, у S. perennans и A. santonica в данной зоне в сравнении с митохондриями выявлено большее содержание цереброзидов – в 2 и 4 раза, соответственно (рис. 3в). Данные типы липидов (стерины и цереброзиды), как отмечалось выше, служат маркерами рафтовых структур и их высокая концентрация (в среднем в 3 раза выше, чем в целой мембране) является дополнительным доказательством наличия рафтовых структур в зоне опалесценции. Липиды, выделенные из данной зоны, отличаются также повышенным содержанием насышенных ЖК. Индекс ненасышенности ЖК липидов детергент-устойчивых мембран был в 3-5 раз ниже по сравнению с липидами митохондрий, что также свидетельствует о наличии плотно упакованных участков мембран (рис. 3г).

S. perennans и H. strobilaceum являются соленакапливающими растениями. Однако, если первый вид встречается в экотопах с высокой степенью минерализации и увлажнения, то для второго вида характерны как высокая степень засоленности – до 8% от сухой массы почвы, так и засушливые условия с содержанием влаги в почве всего 4%. В отличие от них A. santonica представляет собой соленепроницаемый тип растений, которые предпочитают менее засоленные условия с содержанием влаги в почве до 25% [30]. Кроме того, исследованные растения различаются по жизненной форме. S. perennans является однолетним травянистым растением, а *H. strobilaceum* и *А. santonica* – многолетними полукустарничками. Многократное увеличение содержания стеринов в рафтах исследованных галофитов не зависело от характера солеустойчивости и жизненной формы растений. Наибольшее обогащение цереброзидами было характерно для однолетника S. perennans, а наибольшая насыщенность ЖК липидов – для двух соленакапливающих видов эугалофитов. Различия в составе липидов рафтовых структур у разных типов галофитов имеют видоспецифичный характер. Основываясь на данных об участии рафтов в защитных механизмах растительной клетки, можно предположить, что различные стратегии солеустойчивости и особенности солевого обмена исследованных видов растений связаны с количественным и качественным составом рафтовых структур, присутствующих в мембранах митохондрий [31-33].

Таким образом, анализ данных по плотности (упорядоченности) липидной фазы мембраны с помощью измерения GP флуоресценции зонда лаурдан может использоваться для идентифика-

Таблица 2.	Теоретически рассчитанные параметры компонентов распределений значений GP мембранного ма-
териала ми	тохондрий S. perennans, H. strobilaceum и A. santonica в зонах градиента плотности сахарозы (см. табл. 1),
n = 5 - 10	

Вид растения	Зона градиента (% сахарозы)	Компонента	Среднее GP, α	Стандартное отклонение, σ	Вклад, %
Солерос S. perennans Willd.	3 (верх 15%)	1	-0.53	0.08	86.0
		2	-0.32	0.08	5.0
		3	-0.53	0.02	3.4
		4	-0.61	0.03	3.1
		5	-0.10	0.11	2.6
	4 (низ 15%)	1	-0.56	0.07	82.8
		2	-0.45	0.04	9.3
		3	-0.34	0.06	5.2
		4	-0.52	0.02	1.2
		5	-0.19	0.03	0.8
		6	-0.05	0.06	0.8
	5 (верх 25%)	1	-0.54	0.07	75.6
		2	-0.48	0.10	17.8
		3	-0.67	0.03	3.3
		4	-0.14	0.19	3.3
Сарсазан <i>H. strobilaceum</i> Bieb.	3 (верх 15%)	1	-0.51	0.08	76.2
		2	-0.62	0.04	13.5
		3	-0.55	0.03	5.9
		4	-0.32	0.09	2.7
		5	-0.02	0.15	1.8
	4 (низ 15%)	1	-0.53	0.08	73.5
		2	-0.22	0.27	10.2
		3	-0.65	0.04	9.2
		4	-0.55	0.04	7.1
	5 (Bepx 25%)	1	-0.62	0.05	34.2
		2	-0.50	0.09	34.1
		3	-0.53	0.05	26.6
		4	-0.13	0.25	4.6
		5	-0.54	0.01	0.5

Вид растения	Зона градиента (% сахарозы)	Компонента	Среднее GP, α	Стандартное отклонение, σ	Вклад, %
Полынь	3 (верх 15%)	1	-0.53	0.09	68.6
A. santonica L.		2	-0.25	0.15	24.3
		3	-0.39	0.04	3.7
		4	0.11	0.12	3.5
	4 (низ 15%)	1	-0.42	0.06	62.6
		2	-0.21	0.17	25.9
		3	-0.27	0.05	10.4
		4	0.30	0.12	1.1
	5 (верх 25%)	1	-0.54	0.06	49.6
		2	-0.52	0.12	34.8
		3	-0.03	0.15	11.0
		4	-0.65	0.03	4.6

Таблица 2. Окончание

Примечание. Серым фоном отмечены компоненты, характеризующие более плотно упакованные участки мембран.

ции в мембране более плотно упакованных рафтовых структур наряду с анализом липидов. Обогащение стеринами, цереброзидами и насыщенными ЖК является маркером рафтовых структур в митохондриях. При этом содержание стеринов не зависело от стратегии солеустойчивости, в то



Рис. 3. Относительное содержание мембранных липидов (в % от общего количества липидов) глицеролипидов (*a*), стеринов (*б*), цереброзидов (*в*) и индекс ненасыщенности жирных кислот липидов (*г*) в митохондриях (Мит, светлые столбики) и после разделения их мембранного материала в градиенте плотности в области 15% сахарозы (Рафты, темные столбики). SP – *S. perennans*, HS – *H. strobilaceum*, AS – *A. santonica*.

время как содержание цереброзидов и насышенных ЖК имело видоспецифичный характер. Поэтому есть основания полагать, что рафты митохондрий могут участвовать в защитных механизмах растительной клетки при абиотических стрессах, в частности при засолении почвы.

Работа выполнена с частичным использованием средств гранта РФФИ № 19-04-00013 на оборудовании ЦКП "Биоаналитика" Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Raghunathan K., Kenworthy A.K. 2018. Dynamic pattern generation in cell membranes: Current insights into membrane organization. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1860 (10), 2018–2031.
- Laloi M., Perret A.M., Chatre Lio, Melser S., Cantrel C., Vaultier M.N., Zachowski A., Bathany K., Schmitter J.M., Vallet M., Lessire R., Hartmann M.A., Moreau P. 2007. Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol.* 143, 461– 472.
- Jacobson K., Dietrich C. 1999. Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol.* 9 (3), 87–91.
- 4. Radyukhin V.A., Baratova L.A. 2020. Molecular mechanisms of raft organization in biological membranes. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **46** (3), 269–279.
- Blank N., Schiller M., Krienke S., Wabnitz G., Ho A.D., Lorenz H.-M. 2007. Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1. *Immunol. Cell Biol.* 85 (5), 378–382.
- 6. Klymchenko A.S., Kreder R. 2014. Fluorescent probes for lipid rafts: From model membranes to living cells. *Chem. Biol.* **21** (1), 97–113.
- Kaiser H.-J., Lingwood D., Levental I., Sampaio J.L., Kalvodova L., Rajendran L., Simons K. 2009. Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106** (39), 16645–16650.
- Sanchez S.A., Tricerri M.A., Gratton E. 2012. Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity *in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109 (19), 7314–7319.
- Bagatolli L.A., Gratton E., Fidelio G.D. 1998. Water dynamics in glycosphingolipids aggregates studied by LAURDAN fluorescence. *Biophys. J.* 75 (1), 331–341.
- Wheeler G., Tyler K. M. 2011. Widefield microscopy for live imaging of lipid domains and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1808 (3), 634–641.
- 11. Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J., Blein J., Simon-Plast F. 2006. Proteomics

of plant detergent-resistent membranes. *Mol. Cell. Proteomics.* **5** (8), 1396–1411.

- Lefebvre B., Furt F., Hartmann M.A., Michaelson L.V., Carde J.P., Sargueil-Boiron F., Rossignol M., Napier J.A., Cullimore J., Bessoule J.J., Mongrand S. 2007. Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: A proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol.* 144, 402–418.
- Hansen G.H., Niels-Christiansen L.L., Thorsen E., Immerdal L., Danielsen E.M. 2000. Cholesterol depletion of enterocytes. Effect on the Golgi complex and apical membrane trafficking. *J. Biol. Chem.* 275 (7), 5136–5142.
- Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Chernyshov M.Yu. 2013. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergen-resistant membrane microdomains. *Planta*. 237 (3), 859–871.
- Poston C., Duong E., Cao Y., Bazemore-Walker C. 2011. Proteomic analysis of lipid raft-enriched membranes isolated from internal organelles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425 (2), 355–360.
- Zorov D.B., Isaev N.K., Plotnikov E.Yu., Zorova L.D., Stelmashook E.V., Vasileva A.K., Arkhangelskaya A.A., Khrjapenkova T.G. 2007. The mitochondrion as janus bifrons. *Biochemistry (Moscow)*. 72 (10), 1115–1126.
- Войников В.К. 2011. Митохондрии растений при температурном стрессе. Иркутск: Изд-во "Гео". 63 с.
- 18. J.-K. Zhu. 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell.* **167** (2), 313–324.
- Зборовская И.Б., Галецкий С.А., Комельков А.В. 2016. Белки мембранных микродоменов и их участие в онкогенезе. *Усп. мол. онкол.* 3 (3), 16–29. https://doi.org/10.17650/2313-805X-2016-3-3-16-29
- Lapatsina L., Brand J., Poole K., Daumke O., Lewin G.R. 2012. Stomatin-domain proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 91 (4), 240–245.
- Khan M.S. 2011. Role of sodium and hydrogen (Na⁺/H⁺) antiporters in salt tolerance of plants: Present and future challenges. *Afr. J. Biotechnol.* **10** (63), 13693–13704.
- Trono D., Laus M.N., Soccio M., Pastore D. 2014. Transport pathways-proton motive force interrelationship in durum wheat mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (5), 8186–8215.
- Stacchiotti A., Favero G., Lavezza A., Garcia-Gomez R., Monsalve M., Rezzani R. 2018. Perspective: Mitochondria-ER contacts in metabolic cellular stress assessed by microscopy. *Cells.* 8, 1–9.
- Camões F., Bonekamp N.A., Delille H.K., Schrader M. 2009. Organelle dynamics and dysfunction: A closer link between peroxisomes and mitochondria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32, 163–180.
- Honscher C., Mari M., Auffarth K., Bohnert M., Griffith J., Geerts W., van de Laan M., Cabrera M., Reggiori F., Ungermann C. 2014. Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev. Cell.* **30** (1), 86–94.
- M. Tagaya, K. Arasaki. 2017. Regulation of mitochondrial dynamics and autophagy by the mitochondria-associated membrane. *Adv. Exp. Med. Biol.* 997, 33–47.

- Розенцвет О.А., Нестеров В.Н., Синютина Н.Ф., Танкелюн О.В. 2012. Влияние ионов Cu²⁺ и Cd²⁺ на метаболизм мембранных липидов и белков *Hydrilla verticillata. Биол. мембраны.* 29 (4), 284–292.
- Mellgren R.L. 2008. Detergent-resistant membrane subfractions containing proteins of plasma membrane, mitochondrial, and internal membrane origins. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **70** (6), 1029–1036.
- 29. Lyons J.M., Wheaton T.A., Pratt H.K. 1964. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiol.* **39** (2), 262–268.
- Розенцвет О.А., Нестеров В.Н., Богданова Е.С., Табаленкова Г.Н., Захожий И.Г. 2016. Биохимическая обусловленность дифференциации галофи-

тов по типу регуляции солевого обмена в условиях Приэльтонья. Сиб. эколог. журн. 1, 117–126.

- Yepes-Molina L., Carvajal M., Martínez-Ballesta M.C. 2020. Detergent resistant membrane domains in broccoli plasma membrane associated to the response to salinity stress. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7694.
- 32. Нестеров В.Н., Нестеркина И.С., Розенцвет О.А., Озолина Н.В., Саляев Р.К. 2017. Обнаружение липид-белковых микродоменов (рафтов) и изучение их функциональной роли в хлоропластных мембранах галофитов. ДАН. 476 (3), 350–352.
- Rozentsvet O., Nesterkina I., Ozolina N., Nesterov V. 2019. Detergent-resistant microdomains (lipid rafts) in endomembranes of the wild halophytes. *Func. Plant Biol.* 46 (9), 869–876.

Analysis of Lipid Order of Raft Structures in Mitochondrial Membranes of Halophites with the Aid of Fluorescent Microscopy

V. N. Nurminsky^{1, *}, V. N. Nesterov², O. A. Rosentsvet², A. L. Rakevich³, Yu. S. Bukin⁴, I. S. Kapustina¹, N. V. Ozolina¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

²Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Ecology of the Volga Basin, Russian Academy of Sciences, Tolyatti, 445003 Russia

³Irkutsk Division of Institute of Laser Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,

Irkutsk, 664033 Russia

⁴Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,

Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: cell@sifibr.irk.ru

We analyzed the distribution of the ordering parameter of raft-like microdomains in the mitochondrial membranes of halophytes, which differ in the type of salt tolerance: *Salicornia perennans, Halocnemum strobilaceum*, and *Artemisia santonica*. The packing density of the membrane lipids (lipid order) was assessed by measuring generalized polarization (GP) of Laurdan fluorescence. In the mitochondrial membrane material of *S. perennans, H. strobilaceum*, and *A. santonica*, in the range of 15 and 25% of the sucrose density gradient, the GP distributions contain 4–6 components presumably related to the raft structures. Lipids isolated from ordered domains are found to be enriched in sterols, cerebrosides, and saturated fatty acids; the quantitative content of raft-forming lipids depends on the salt tolerance strategy of halophytes.

Keywords: membrane order, lipid rafts, laurdan, mitochondria, salt tolerance