

СОДЕРЖАНИЕ

Том 37, номер 2, 2020

- Латеральное взаимодействие влияет на кинетику метастабильных сквозных пор в липидных мембранах
Т. Р. Галимзянов, Р. Ю. Молотковский, М. А. Калуцкий, К. В. Пинигин, П. И. Кузьмин, О. В. Батищев, С. А. Акимов 83
- Влияние высоко- и низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на высвобождение омега-3 и омега-6 кислот при активации толл-подобных рецепторов в астроцитах
Н. В. Азбукина, А. А. Астахова, С. В. Гориянов, В. В. Чистяков, М. Г. Сергеева 94
- Мелатонин усиливает химиотерапевтическое действие цитарабина в клетках HL-60
А. И. Ломовский, Ю. Л. Бабурина, М. И. Кобякова, Р. С. Фадеев, В. С. Акатов, О. В. Крестинина 103
- Свидетельства в пользу преимущественной локализации рецепторов цитокининов картофеля в эндоплазматическом ретикулуме
С. Н. Ломин, Е. М. Савельева, Д. В. Архипов, Г. А. Романов 110
- Влияние галоперидола и ципрогептадина на цитоскелет дробящихся зародышей морского ежа
Д. А. Никишин, Л. А. Мальченко, И. Милошевич, Л. Ракич, Ю. Б. Шмуклер 120
- Динамика содержания в мышечных ядрах транскрипционных регуляторов экспрессии медленной изоформы миозина в камбаловидной мышце крыс на фоне гравитационной разгрузки
И. И. Парамонова, К. А. Шарло, Н. А. Вильчинская, Б. С. Шенкман 126
- Влияние умеренной гипотермии на фосфолипидный и жирнокислотный состав мембран эритроцитов крыс
З. Г. Раджабова, С. А. Забелинский, М. А. Чеботарева, Е. П. Шуколюкова, Н. К. Кличханов, А. И. Кривченко 134
- Тетранитрозильный биядерный комплекс железа повышает устойчивость проростков гороха и клеток *E. coli* к стрессовым воздействиям
И. В. Жигачева, С. В. Васильева, И. П. Генерозова, М. М. Расулов 149
-

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Изоформы P1₃-киназы в пуриnergических мезенхимных стромальных клетках
П. Д. Котова, М. Ф. Быстрова 156
-
-

Contents

Vol. 37, No. 2, 2020

Lateral Interactions Influence the Kinetics of Metastable Pores in Lipid Membranes <i>T. R. Galimzyanov, R. J. Molotkovsky, M. A. Kalutsky, K. V. Pinigin, P. I. Kuzmin, O. V. Batishchev, S. A. Akimov</i>	83
Influence of High- and Low-molecular Weight Hyaluronic Acid on the Toll-like Receptor-mediated Omega-3 and Omega-6 Fatty Acid Release in Astrocytes <i>N. V. Azbukina, A. A. Astachova, S. V. Goriainov, V. V. Chistyakov, M. G. Sergeeva</i>	93
Melatonin Strengthens a Chemotherapeutic Effect of Cytarabine in HL-60 cells <i>A. I. Lomovsky, Yu. L. Baburina, M. I. Kobayakova, R. S. Fadeev, V. S. Akatov, O. V. Krestinina</i>	103
Evidences for Preferential Localization of Cytokinin Receptors of Potato in the Endoplasmic Reticulum <i>S. N. Lomin, E. M. Savelieva, D. V. Arkhipov, G. A. Romanov</i>	110
Effects of Haloperidol and Cyproheptadine on the Cytoskeleton of the Sea Urchin Embryos <i>D. A. Nikishin, L. A. Malchenko, I. Milošević, L. Rakić, Y. B. Shmukler</i>	120
The Time Course of Muscle Nuclear Content of Transcription Factors Regulating the MyHC I(β) Expression in the Rat Soleus Muscle under Gravitational Unloading <i>I. I. Paramonova, K. A. Sharlo, N. A. Vilchinskaya, B. S. Shenkman</i>	126
The Effect of Moderate Hypothermia on Phospholipid and Fatty Acid Composition of Rat Erythrocyte Membranes <i>Z. G. Radzhabova, S. A. Zabelinskii, M. A. Chebotareva, E. P. Shukolyukova, N. K. Klichkhanov, A. I. Krivchenko</i>	134
Tetranitrosyl Binuclear Complex of Iron Increases the Resistance of Pea Seedlings and <i>E. coli</i> Cells to Stress <i>I. V. Zhigacheva, S. V. Vasilieva, I. P. Generozova, M. M. Rasulov</i>	149

SHORT COMMUNICATIONS

PI ₃ Kinase Isoforms in Purinergic Mesenchymal Stromal Cells <i>P. D. Kotova, M. F. Bystrova</i>	156
--	-----

УДК 577.352

ЛАТЕРАЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВЛИЯЕТ НА КИНЕТИКУ МЕТАСТАБИЛЬНЫХ СКВОЗНЫХ ПОР В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2020 г. Т. Р. Галимзянов^{a, b}, Р. Ю. Молотковский^a, М. А. Калущкий^{a, b},
К. В. Пинигин^{a, c}, П. И. Кузьмин^a, О. В. Батищев^{a, c}, С. А. Акимов^{a, b, *}

^aИнститут физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия
^bНациональный исследовательский технологический университет “МИСиС”, Москва, 119049 Россия
^cМосковский физико-технический институт (государственный университет),
г. Долгопрудный, Московская обл., 141700 Россия

*e-mail: akimov@misis.ru

Поступила в редакцию 04.04.2019 г.

После доработки 26.04.2019 г.

Принята к публикации 26.04.2019 г.

Формирование сквозных пор в липидных бислойных мембранах происходит в ряде клеточных процессов; кроме того, порация мембран используется в различных биотехнологических и биомедицинских приложениях. В классической теории порообразования рассматривается диффузия мембранных дефектов в пространстве радиусов. Когда первая пора достигает критического радиуса, происходит необратимый разрыв мембраны. Обычно считается, что диффузия дефектов происходит независимо, их возможное латеральное взаимодействие не учитывается. В настоящей работе рассматривается возможное влияние латерального взаимодействия метастабильных сквозных пор на их кинетику. Предполагается, что взаимодействие происходит за счет перекрытия упругих деформационных полей, возникающих на краях двух пор. Энергия взаимодействия двух круглых пор рассчитывалась в приближении Дерягина. В рамках теории упругости жидких кристаллов, адаптированной к липидным мембранам, вычислен одномерный потенциал взаимодействия двух линейных параллельных кромок пор, сформированных в мембранах различного липидного состава. Показано, что взаимодействие должно приводить к эффективному уменьшению измеряемого линейного натяжения кромки поры. Кроме того, за счет взаимодействия время жизни двух оптимально расположенных метастабильных пор может увеличиваться приблизительно в 10 раз. Экстраполяция полученных результатов на случай большего числа взаимодействующих пор позволяет предсказать увеличение времени жизни еще на один-два порядка величины.

Ключевые слова: липидная мембрана, пора, взаимодействие пор, приближение Дерягина, теория упругости

DOI: 10.31857/S0233475520010053

ВВЕДЕНИЕ

Липиды являются важными структурными элементами клеточных мембран. Липидные молекулы амфифильны, т.е. в их составе комбинируются полярные и гидрофобные группы. В воде такие молекулы самоорганизуются в разнообразные структуры, стремясь уменьшить площадь контакта своих гидрофобных частей и воды. Тип образующейся структуры зависит от соотношения количества липида и воды в системе, т.е. смесь вода–липид является лиофильной [1]. Некоторые липиды способны формировать протяженные ламеллярные фазы — липидные бислои, которые и составляют основу клеточных мембран. Амфифильная природа липидных молекул является причиной чрезвычайно низкой проницаемости мембран по отношению к различным

веществам [2, 3]. Полярные молекулы не могут преодолеть гидрофобную зону бислоя, в то время как гидрофобные молекулы, напротив, задерживаются в ней и не могут покинуть мембрану. Этим обусловлена основная функция клеточных мембран — барьерная. Клетки являются открытыми неравновесными системами, для жизнедеятельности которых необходимо создание и поддержание неоднородных распределений различных веществ и градиентов электрохимических потенциалов. Барьерные свойства мембран позволяют поддерживать внутри клеточных органелл химический состав, отличающийся от состава цитоплазмы, а в цитоплазме — отличный от состава внешней среды.

Повышение проницаемости мембран за счет образования в них сквозных пор происходит в ря-

де клеточных процессов, как нормальных, так и патологических. В результате некоторых видов апоптоза в плазматической мембране и в мембранах митохондрий формируются сквозные поры [5, 6]. Амфипатические пептиды, вырабатываемые иммунной системой некоторых организмов, способны индуцировать образование пор в бактериальных мембранах [7–9]. Порация клеточных мембран и модельных липосом используется в различных биотехнологических и биомедицинских приложениях, в частности для электротрансфекции [10, 11], для заполнения водного объема липосом требуемым веществом [12], для отбора проб крови из подкожных капилляров [13] и т.д. Липидные мембраны, как правило, очень стабильны, поэтому для образования поры необходимо сильное внешнее воздействие. Обычно для порации к мембране прикладывается либо латеральное натяжение [14–17], либо трансмембранная разность электрических потенциалов [18–20]. В мембранах, сформированных из “обычных” липидов (например, диолеоилфосфатидилхолина (ДОФХ) или пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ)), поры формируются при латеральном натяжении ~ 7 мН/м или при трансмембранном потенциале ~ 200 мВ за характерное время порядка десяти секунд [14, 16, 18, 19]. Мембрана, окруженная электролитом, при приложении трансмембранного потенциала аналогична электрическому конденсатору. Статическая диэлектрическая проницаемость липида приблизительно равна 2, воды – 81. В такой системе энергетически выгодно увеличение емкости конденсатора, что может достигаться за счет частичного замещения среды с низкой диэлектрической проницаемостью (мембраны) средой с высокой диэлектрической проницаемостью (водой), т.е. за счет формирования сквозной поры. Электрическое поле индуцирует эффективное латеральное давление в мембране, в результате чего образуются многочисленные сквозные “дефекты”, заполняемые водой. Если мембрана рассматривается как бесконечно тонкая бесструктурная пленка, то латеральное давление оказывается аналогично латеральному натяжению. В этом приближении энергия мембраны, к которой приложено латеральное натяжение (или давление) σ и в которой образовалась сквозная пора радиуса R , может быть записана в виде [21]:

$$E = 2\pi R\gamma - \pi R^2\sigma, \quad (1)$$

где γ – линейное натяжение, т.е. энергия кромки поры, отнесенная к ее периметру. Зависимость (1) схематически изображена на рис. 1а (сплошная черная кривая). При малом радиусе поры основной вклад в энергию дает линейное по радиусу слагаемое, и пора стремится закрыться, поскольку ее энергия уменьшается при уменьшении R . При больших радиусах энергия определяется

квадратичным по радиусу слагаемым, и энергия поры уменьшается с ростом R , что соответствует необратимому разрыву мембраны. При критическом радиусе поры $R^* = \gamma/\sigma$ энергия системы максимальна и равна $E^* = \pi\gamma^2/\sigma$; при $R = R^*$ имеется неустойчивое положение равновесия. Зависимость энергии вида (1) характерна для метастабильных систем [21]. Для “обычного” липида линейное натяжение кромки поры составляет $\gamma \approx 8\text{--}20$ пН [22], и, соответственно, критический радиус $R^* \approx (8\text{--}20 \text{ пН})/(7 \text{ мН/м}) \approx 1\text{--}3$ нм.

Применимость выражения (1) для расчета энергии поры ограничена. Толщина “типичной” липидной мембраны составляет около 4 нм [23]. Приближение бесконечно тонкой бесструктурной пленки корректно применять к мембране, только если радиус поры в ней значительно превышает толщину мембраны. Действительно, при малых радиусах свойства поры, в частности ее электрическая проводимость, существенно зависят от конкретной формы поверхности кромки. Однако, как следует из приведенной выше оценки, критический радиус поры, как правило, меньше толщины мембраны и может быть даже меньше толщины липидного монослоя. Считается, что величина линейного натяжения определяется, прежде всего, энергией упругих деформаций липида на кромке поры. Основной вклад в эту энергию дает деформация поперечного изгиба, при которой между осями, характеризующими среднюю ориентацию липидов, возникает угол; липиды формируют веерообразную структуру (рис. 1б). Энергия этой деформации пропорциональна квадрату геометрической кривизны поверхности монослоя и немонотонно зависит от радиуса поры [24–26]. Кроме того, упругая энергия возрастает при приложении латерального натяжения, однако не изменяется, если к кромке поры приложено латеральное давление [26]. Это приводит к тому, что линейное натяжение оказывается не постоянным, а зависит как от радиуса поры R , так и от латерального натяжения σ , т.е., вообще говоря, выражение (1) должно быть переписано в виде:

$$E = 2\pi R\gamma(R, \sigma) - \pi R^2\sigma. \quad (2)$$

Типичные зависимости энергии поры от радиуса показаны на рис. 1а [25, 26]. Практически для всех липидов эти зависимости имеют локальный минимум (обозначен буквой M на рис. 1а) при радиусах $R_m \sim 1\text{--}2$ нм, т.е. пора может быть метастабильной и обладать конечным временем жизни. Для закрытия (т.е. $R \rightarrow 0$) поре необходимо преодолеть энергетический барьер, обозначенный буквой X на рис. 1а. Положение и высота этого барьера определяются физико-химическими свойствами липида (в том числе спонтанной кривизной и толщиной монослоя, гидрофобностью углеводородных цепей) и слабо зависят от внешних

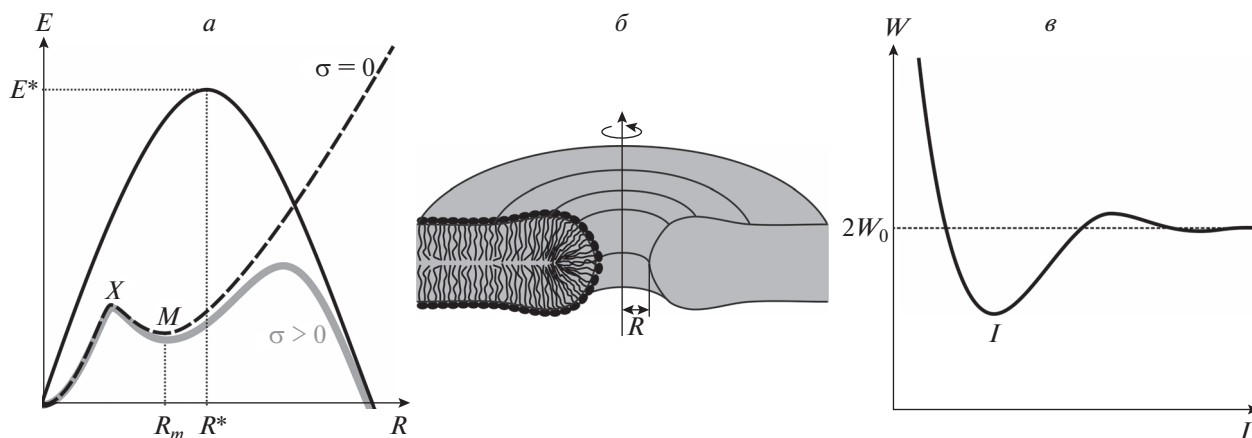


Рис. 1. *a* – Зависимости энергии поры от ее радиуса в различных моделях. Сплошная черная кривая – приближение бесконечно тонкой бесструктурной пленки с приложенным латеральным натяжением σ , зависимость описывается уравнением (1). При критическом радиусе поры R^* энергия максимальна (E^*). Поры, радиус которых меньше критического, спонтанно закрываются. Если радиус поры больше критического, пора неограниченно растет. Черная штриховая кривая – энергия деформаций мембраны на кромке поры, рассчитываемая в рамках теории упругости сплошной среды, при нулевом латеральном натяжении. Зависимость имеет локальный минимум (M) при радиусе поры R_m ; для закрытия поры ($R \rightarrow 0$) необходимо преодолеть энергетический барьер (X). Серая толстая кривая – энергия деформаций мембраны на кромке поры, рассчитываемая в рамках теории упругости сплошной среды, при ненулевом латеральном натяжении. *б* – Схематическое изображение сечения мембраны с круглой порой радиуса R плоскостью, проходящей через ось цилиндрической симметрии. Мембрана показана серым цветом. Липид на кромке поры испытывает деформацию поперечного изгиба; в среднем, молекулы формируют всеорообразную структуру. *в* – Типичная зависимость энергии деформаций мембраны, индуцированных двумя мембранными включениями, от расстояния между включениями L . При больших L включения не взаимодействуют, и энергия равна сумме энергий деформаций, индуцированных изолированными включениями ($2W_0$). Зависимость имеет глобальный минимум (I).

факторов, в частности от латерального натяжения (рис. 1*a*) [25, 26]. Экспериментально было показано, что при трансмембранном потенциале 250 мВ среднее время жизни проводящих дефектов в мембране, сформированной из азолектина, составляет 3 мс, однако некоторые поры остаются открытыми в течение 1 с; при этом необратимый электрический пробой мембраны не наступает [18]. В мембране с высоким содержанием лизолипидов и холестерина время жизни проводящих пор может составлять до 7 с [12]. Возможность образования метастабильных пор предполагалась уже в самых ранних работах по электропорации мембран [19]. В работе [27] было показано, что при приложении к мембране серии электрических импульсов плотность метастабильных пор может достигать 10^5 см^{-2} .

В кинетической теории электропорации обычно предполагается, что в мембране имеется большое количество так называемых пор нулевого радиуса или предпор – структур, в которых липиды ориентированы, как и в обычной проводящей поре (рис. 1*б*), но радиус просвета которых настолько мал, что ионы не могут пройти через предпору [28, 29]. Далее рассматривается диффузия таких дефектов в пространстве радиусов от нулевого радиуса до критического, по аналогии с кинетической теорией фазового разделения [30]. Считается, что происходит необратимый электрический

пробой мембраны, когда первая пора достигает критического радиуса. При этом рассматривается идеальная диффузия, т.е. считается, что все предпоры развиваются независимо, и какое-либо взаимодействие предпор между собой не учитывается. Однако липид на кромке поры сильно деформирован [31, 32]. Упругие деформации мембраны распространяются в латеральном направлении на несколько нанометров [33–35]. Когда поры находятся достаточно далеко друг от друга, индуцируемые ими деформации действительно независимы, и энергия пор аддитивна. Однако при сближении пор деформации начинают перекрываться, что должно приводить к эффективному латеральному взаимодействию [36–39]. Ранее мы показали, что энергия взаимодействия различных мембранных включений, индуцирующих деформации мембраны, немонотонно зависит от расстояния между ними: как правило, при некотором расстоянии энергия имеет локальный (или глобальный) минимум. В качестве включений рассматривались амфипатические и гидрофобные пептиды, трансмембранные белки и т.д. [37–39]. Типичная зависимость энергии деформаций мембраны, индуцированных двумя мембранными включениями, от расстояния между включениями схематически изображена на рис. 1*в* (ср. с рис. 3*a*, 3*б*). Таким образом, если в мембране имеются две метастабильные поры, расположенные на рассто-

жнии, соответствующем минимуму энергии их взаимодействия (обозначен буквой I на рис. 1а), то их время жизни должно быть выше, чем время жизни таких же изолированных (бесконечно удаленных друг от друга) пор. Действительно, время жизни поры определяется высотой энергетического барьера на закрытие поры (обозначен буквой X на рис. 1а) относительно локального минимума энергии (обозначен буквой M на рис. 1а). При оптимальном расстоянии между порами энергия деформаций мембраны оказывается ниже, чем суммарная энергия деформаций, индуцированных двумя изолированными порами. Это означает, что энергия каждой поры эффективно уменьшается, когда на оптимальном расстоянии от нее находится такая же пора. Высота энергетического барьера X на закрытие поры ($R \rightarrow 0$) определяется физико-химическими свойствами липида и практически не зависит от внешних факторов [25, 26]. Таким образом, взаимодействие метастабильных пор должно приводить к понижению энергии в точках их локальных минимумов M , при неизменной высоте барьера на закрытие поры X . Это означает, что высота барьера на закрытие поры относительно локального минимума энергии M возрастает, что должно приводить к увеличению времени жизни метастабильной проводящей поры.

В настоящей работе мы рассмотрели взаимодействие двух пор, опосредованное упругими деформациями мембраны, возникающими на их кромках. Деформации, возникающие вблизи изолированной круглой поры, обладают цилиндрической симметрией. Это позволяет получить аналитические выражения для пространственного распределения деформаций и их энергии [25, 26]. Однако при взаимодействии двух круглых пор цилиндрическая симметрия системы в целом теряется, и решить задачу о нахождении распределения деформаций и энергии аналитически не удастся. Ранее мы показали, что для расчета энергии взаимодействия произвольно расположенных мембранных включений можно пользоваться аналогом приближения Дерягина для взаимодействия трехмерных объектов [39, 40]. В рамках этого приближения аналитически рассчитывается одномерный потенциал взаимодействия двух линейных параллельных кромок пор (энергия, отнесенная к единице длины кромки). Для получения энергии взаимодействия двух круглых пор радиуса R , одномерный потенциал нужно умножить на эффективную длину L_{eff} , которая приближенно может быть записана в виде $L_{\text{eff}} \approx 2R + 2l_w$, где $l_w \sim 1$ нм — характерная длина затухания плотности упругой энергии [39]. Согласно нашим расчетам, время жизни двух метастабильных пор, расположенных на оптимальном расстоянии друг от друга, может увеличиваться приблизительно в

10 раз по сравнению со временем жизни изолированных пор.

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Будем рассматривать мембрану в качестве анизотропной жидкокристаллической сплошной среды. Среднюю ориентацию липидных молекул в составе липидного монослоя будем характеризовать векторным полем единичных векторов \mathbf{n} , называемых директорами. Деформации, модули упругости и поле директоров будем относить к некоторой поверхности, называемой разделяющей, проходящей внутри монослоя параллельно его внешней (полярной) границе. Разделяющая поверхность определяется векторным полем ее единичных нормалей \mathbf{N} . Будем рассматривать три основные деформации мембраны [41]: 1) поперечный изгиб, поверхностная плотность энергии которого пропорциональна $(\text{div}(\mathbf{n}))^2$ (дивергенция берется вдоль разделяющей поверхности); 2) наклон, поверхностная плотность энергии которого пропорциональна квадрату вектор наклона, $t^2 = (\mathbf{n} - \mathbf{N})^2$; 3) латеральное растяжение—сжатие, поверхностная плотность энергии которого пропорциональна квадрату относительного изменения площади разделяющей поверхности, $\alpha^2 = [(a - a_0)/a_0]^2$ (a — текущая площадь элемента разделяющей поверхности; a_0 — его площадь в исходном недеформированном состоянии). Деформации считаются малыми, и поверхностная плотность энергии вычисляется во втором порядке по ним. Поверхностная плотность энергии деформированного монослоя может быть записана в следующем виде [41]:

$$w = \frac{B}{2}(\text{div}(\mathbf{n}) + J_0)^2 - \frac{B}{2}J_0^2 + \frac{K_t}{2}t^2 + \frac{K_A}{2}\alpha^2, \quad (3)$$

где B , K_t , K_A — модули поперечного изгиба, наклона и латерального растяжения/сжатия, соответственно; J_0 — спонтанная кривизна монослоя, которая равна геометрической кривизне разделяющей поверхности свободного монослоя (в отсутствие внешних сил и моментов). Энергия отсчитывается от энергии плоского монослоя, имеющего нулевую геометрическую кривизну. Формально, свободная энергия деформаций во втором порядке малости должна содержать перекрестное слагаемое по деформациям поперечного изгиба и латерального растяжения—сжатия вида $\sim \alpha \text{div}(\mathbf{n})$; при этом энергия не может содержать слагаемых, перекрестных по деформации наклона, поскольку \mathbf{t} — векторная величина, которая не может линейно входить в энергию, являющуюся скаляром. Деформации и модули упругости относятся к разделяющей поверхности и, очевидно, зависят от положения этой поверхности внутри монослоя. Экспериментально было показано, что коэффициент (модуль), стоящий

перед перекрестным слагаемым $\sim \alpha \operatorname{div}(\mathbf{n})$, можно сделать нулевым за счет специфического выбора положения разделяющей поверхности. Такая разделяющая поверхность называется нейтральной; она проходит на расстоянии ~ 0.7 нм от внешней полярной границы монослоя [42]. В дальнейшем мы будем относить деформации и модули упругости к нейтральной поверхности. Для получения полной упругой энергии участка деформированного монослоя поверхностную плотность энергии (3) необходимо проинтегрировать по нейтральной поверхности монослоя.

Модуль объемного сжатия мембраны очень велик [43], что позволяет считать ее объемно несжимаемой средой. Условие объемной несжимаемости налагает связь на возможные деформации. С требуемой точностью его можно записать в следующем виде [41]:

$$h_c = h - \frac{h^2}{2} \operatorname{div}(\mathbf{n}) - h\alpha, \quad (4)$$

где h_c — текущая толщина гидрофобной части монослоя; h — толщина гидрофобной части монослоя в исходном недеформированном состоянии. Для простоты в дальнейшем будем называть h_c и h просто толщиной монослоя в текущем и исходном состояниях соответственно.

Деформации мембраны на кромке поры велики, и предположения, в которых были получены выражения (3), (4), вообще говоря, не выполняются. Однако мембрану вблизи кромки поры можно разбить на несколько участков таким образом, чтобы внутри каждого участка деформации были относительно невелики. Формально это соответствует введению нескольких систем координат, расположенных таким образом, чтобы в каждой из них для некоторого участка липидного монослоя выполнялись условия $|\operatorname{div}(\mathbf{n})| \ll 1/h$; $|t| \ll 1$; $\alpha \ll 1$. Деформации, параметризованные в разных системах координат, сопрягаются на границах участков, исходя из непрерывности директора и нейтральной поверхности. Затем полная энергия системы, записываемая как сумма упругих энергий соответствующих участков монослоя, минимизируется по координатам границ участков, определяемых в лабораторной системе координат. Ранее нами было показано, что можно разбить кромку поры на два участка таким образом, что добавление новых участков (с новыми системами координат) не приводит к изменению расчетной величины упругой энергии [25, 26, 33].

Чтобы задать участки, на которые разбивается кромка поры, рассмотрим горизонтальную мембрану с двумя сквозными порами (рис. 2). Будем считать, что система обладает зеркальной симметрией относительно плоскости межмонослойной поверхности. Для расчета одномерного по-

тенциала взаимодействия пор также будем считать, что в системе имеется трансляционная симметрия вдоль кромки поры. Расстояние между точками пересечения межмонослойной плоскости и нейтральных поверхностей обозначим через L (рис. 2). Введем декартову систему координат $Oxuz$, начало координат O которой расположено на межмонослойной поверхности посередине между двумя кромками пор; ось Oz направлена перпендикулярно плоскости невозмущенной мембраны; ось Oy параллельна направлению трансляционной симметрии (вдоль кромки поры; на рис. 2 эта ось направлена от читателя), ось Ox перпендикулярна осям Oy и Oz . Каждая кромка разбивается на два участка: 1) “горизонтальный бислойный” участок, в котором директора и нормали к нейтральной поверхности слабо отклоняются от направления оси Oz ; 2) “вертикальный монослойный” участок, в котором директора и нормали слабо отклоняются от направления оси Ox . Участки двух кромок сопрягаются вдоль линий $\{\pm X_0, \pm Z_0\}$ (рис. 2).

Горизонтальный бислойный участок. Вследствие трансляционной симметрии системы вдоль оси Oy все величины, относящиеся к горизонтальному бислойному участку, зависят только от координаты x . В этом случае векторные величины можно заменить их проекциями на ось Ox : $\mathbf{n} \rightarrow n_x = n$, $\mathbf{N} \rightarrow N_x = N$, а дивергенция директора с необходимой точностью равна $\operatorname{div}(\mathbf{n}) \approx n'(x)$, где штрих обозначает производную по координате x . Зеркальная симметрия системы относительно межмонослойной поверхности позволяет рассматривать только один монослой бислойного участка, для определенности, верхний. Форму нейтральной поверхности верхнего монослоя будем характеризовать функцией $H(x)$, равной расстоянию от межмонослойной поверхности до нейтральной поверхности монослоя, измеренному вдоль перпендикуляра к межмонослойной поверхности. С требуемой точностью $\mathbf{N} \approx \operatorname{grad}(H)$ и, соответственно, $N_x = N = H'$. Для горизонтального бислойного участка условие локальной объемной несжимаемости (4) может быть переписано в виде:

$$H = h - \frac{h^2}{2} n' - h\alpha, \quad (5)$$

где для простоты опущен аргумент x . Проекция вектора наклона на ось Ox равна $t = n - N \approx n - H'$. Выражая относительное растяжение-сжатие α из уравнения (5) и подставляя α , дивергенцию директора $\operatorname{div}(\mathbf{n}) \approx n'$ и проекцию вектора наклона $t \approx n - H'$ в выражение для поверхностной плотности энергии (3), интегрируя по нейтральной поверхности верхнего монослоя, получим функционал энергии горизонтального бислойного участка:

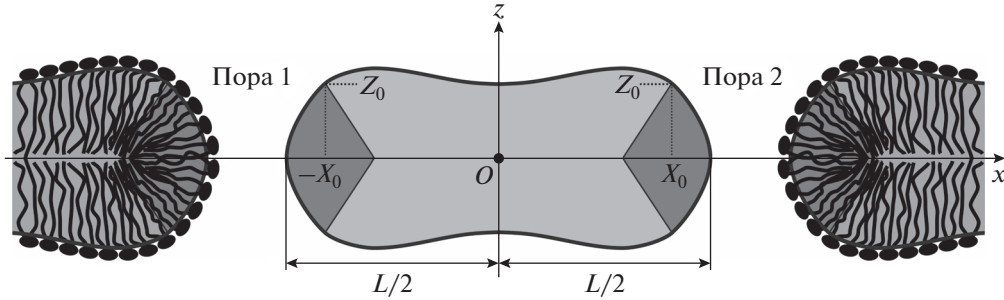


Рис. 2. Схематическое изображение сечения мембраны плоскостью, перпендикулярной линейным параллельным кромкам двух пор. Горизонтальный бислойный участок мембраны между двух кромок, в котором директора и нормали направлены приблизительно вдоль оси Oz , показан светло-серым цветом. Вертикальные монослойные участки мембраны, в которых директора и нормали слабо отклоняются от направления оси Ox , показаны темно-серым цветом. Вертикальные и горизонтальные участки сопрягаются вдоль линий $\{\pm X_0, \pm Z_0\}$. Расстояние между кромками двух пор L . Ось Oz направлена от читателя.

$$W_b = 2 \int_{-X_0}^{X_0} \frac{K_t}{2} \left\{ l^2 (n' + J_0)^2 - l^2 J_0^2 + (n - H')^2 + \frac{A}{h^2} \left(h - \frac{h^2}{2} n' - H \right)^2 \right\} dx, \quad (6)$$

где $l^2 = B/K_r$, $A = K_A/K_r$. Множитель 2 перед интегралом учитывает два монослоя в составе горизонтального бислойного участка. Вариация этого функционала по функциям $n(x)$ и $H(x)$ приводит к линейной системе дифференциальных уравнений Эйлера–Лагранжа:

$$\begin{cases} \left(l^2 + \frac{h^2 A}{4} \right) n'' - n + \left(1 + \frac{A}{2} \right) H' = 0 \\ \left(1 + \frac{A}{2} \right) n' - H'' + \frac{A}{h^2} (H - h) = 0. \end{cases} \quad (7)$$

Общее решение этих уравнений может быть записано в виде:

$$\begin{aligned} H(x) &= h + c_1 e^{\lambda x} + c_2 e^{-\lambda x} + c_1^* e^{\lambda^* x} + c_2^* e^{-\lambda^* x}, \\ n(x) &= 2c_1 \frac{h^2 \lambda^2 - A}{\lambda h^2 (A+1)} e^{\lambda x} - 2c_1 \frac{h^2 \lambda^2 - A}{\lambda h^2 (A+1)} e^{-\lambda x} + \\ &+ 2c_1^* \frac{h^2 (\lambda^*)^2 - A}{\lambda^* h^2 (A+1)} e^{\lambda^* x} - 2c_1^* \frac{h^2 (\lambda^*)^2 - A}{\lambda^* h^2 (A+1)} e^{-\lambda^* x}, \quad (8) \\ \lambda &= \frac{1}{h} \sqrt{\frac{2Al^2 - 2h^2 A - 2il \sqrt{4h^2 A + A^2 (2h^2 - l^2)}}{h^2 A + 4l^2}}, \end{aligned}$$

где звездочка в верхнем индексе обозначает комплексное сопряжение, i – мнимая единица; c_1, c_2 – комплексные коэффициенты, которые следует определить из граничных условий. Найденное общее решение (8) затем подставляется в функционал энергии (6). Интегрируя по нейтральной поверхности верхнего монослоя, получим аналитическое выражение для энергии деформирован-

ного горизонтального бислойного участка. Это выражение очень громоздкое, поэтому здесь не приводится.

Вертикальный монослойный участок. Деформации в системе симметричны по отношению к отражению относительно плоскости $x = 0$, поэтому мы опишем ниже построение функционала упругой энергии только для одной из кромок, для определенности, правой. Форму нейтральной поверхности вертикального монослойного участка будем характеризовать функцией $H_v(z)$, равной расстоянию от плоскости $x = L/2$ до нейтральной поверхности вертикального монослоя, измеренному вдоль направления оси Ox . Эта функция также определяет проекцию нормали к нейтральной поверхности, $N_v(z)$, на ось Oz . Проекцию директора на ось Oz обозначим $v(z)$, относительное латеральное растяжение–сжатие нейтральной поверхности – через $\beta(z)$. Форму поверхности, огибающую концы липидных цепей (поверхность, аналогичную межмонослойной поверхности в случае бислоя), будем описывать функцией $M(z)$, равной расстоянию от плоскости $x = L/2$ до этой поверхности, измеренному вдоль направления оси Ox . При слабом отклонении директора от направления оси Ox $\text{div}(\mathbf{n}) \approx v'$, где штрих обозначает производную по координате z . В таких обозначениях функционал упругой энергии может быть записан в следующем виде:

$$W_m = 4 \int_0^{z_0} \sqrt{1 + (H_v')^2} \times \left\{ \frac{B}{2} (v' + J_0)^2 - \frac{B}{2} J_0^2 + \frac{K_t}{2} (v - N_v)^2 + \frac{K_A}{2} \beta^2 \right\} dz. \quad (9)$$

Множитель 4 учитывает, что в системе имеются две симметричные кромки поры, обладающие также зеркальной симметрией относительно межмонослойной поверхности. В этом выражении для простоты опущен аргумент z ; штрих обо-

значает производную по координате z . Заметим, что с необходимой точностью проекция единичной нормали на ось Oz равна $N_v = -H'_v(z)$. Для вертикального монослойного участка условие локальной объемной несжимаемости (4) может быть записано в виде:

$$M - H_v = h - \frac{h^2}{2} v' - h\beta. \quad (10)$$

Это условие задействует дополнительную функцию $M(z)$, не входящую явно в функционал энергии (9), и одновременно налагает дополнительную связь на деформации. Таким образом, число независимых функций остается неизменным. Функционал энергии (9) можно минимизировать по функциям $\beta(z)$, $v(z)$, $H_v(z)$ и их производным (предварительно разложив по малым величинам в ряд Тейлора до второго порядка), не используя условие локальной объемной несжимаемости; это условие может потребоваться для нахождения функции $M(z)$. Минимизируя функционал, получим систему трех линейных дифференциальных уравнений Эйлера–Лагранжа. Общее решение этих уравнений может быть записано в виде:

$$\begin{aligned} \beta(z) &= 0, \\ v(z) &= -d_1 l^2 - d_1 \frac{z^2}{2} - d_2 z - d_3, \\ H_v(z) &= d_1 \frac{z^3}{6} + d_2 \frac{z^2}{2} + d_3 z + d_4, \end{aligned} \quad (11)$$

где d_1, d_2, d_3, d_4 – вещественные коэффициенты, которые следует определить из граничных условий.

Граничные условия. Решения, полученные для горизонтального бислойного и вертикального монослойного участков, необходимо согласовать на их границах – прямых линиях $\{\pm X_0, Z_0\}$, – исходя из непрерывности нейтральных поверхностей и директора. В первом порядке по деформациям граничные условия на правой верхней линии сопряжения могут быть записаны в виде:

$$\begin{aligned} H(X_0) &= Z_0, \quad H_v(Z_0) = X_0, \\ n(X_0) - v(Z_0) &= 1. \end{aligned} \quad (12)$$

Здесь n – проекция директора на ось Ox , v – проекция директора на ось Oz . Аналогичные условия ставятся на остальных линиях сопряжения участков. Кроме того, необходимо, чтобы все функции были вещественны при любых вещественных значениях z и x . Это налагает условия на мнимые и вещественные части комплексных коэффициентов c_1, c_2 и d_1, d_2, d_3, d_4 . Из приведенных условий можно определить часть неопределенных коэффициентов c_1, c_2 и d_1, d_2, d_3, d_4 . Остальные коэффициенты находятся из условия минимума полной энергии, которая равна

$$W = W_b + W_m. \quad (13)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты проиллюстрируем графически для метастабильных пор, сформированных в мембранах, состоящих из ДОФХ, ПОФХ и димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ). Для ДОФХ экспериментально были определены следующие значения упругих параметров: модуль изгиба $B = 10 k_B T$ ($k_B T \approx 4 \times 10^{-21}$ Дж) [23]; модуль латерального растяжения–сжатия $K_A = 134$ мН/м [23]; толщина гидрофобной части монослоя $h = 1.45$ нм [23]. Для ПОФХ были измерены следующие величины упругих параметров: модуль изгиба $B = 11 k_B T$ [23, 44]; модуль латерального растяжения–сжатия $K_A = 117$ мН/м [23]; толщина гидрофобной части монослоя $h = 1.46$ нм [23]. Для ДМФХ были экспериментально определены следующие значения упругих параметров: модуль изгиба $B = 6.8 k_B T$ [23, 44]; модуль латерального растяжения–сжатия $K_A = 117$ мН/м [23]; толщина гидрофобной части монослоя $h = 1.37$ нм [23]. Приведенные величины модулей упругости относятся к одному монослою. Модуль наклона считается для всех липидов одинаковым и равным $K_r = 40$ мН/м (на монослой) [41, 45]. Спонтанная кривизна монослоя не дает вклада в энергию взаимодействия пор, поскольку она не входит в уравнения Эйлера–Лагранжа (см. уравнения (7) и (11)), и при фиксированных граничных директорах соответствующий вклад сводится к постоянному слагаемому, не зависящему от расстояния между порами. Это видно, если раскрыть скобки в выражении (3). Слагаемые, относящиеся к деформации поперечного изгиба, сводятся к $\frac{B}{2}(\text{div}(\mathbf{n}) + J_0)^2 - \frac{B}{2}J_0^2 = \frac{B}{2}(\text{div}(\mathbf{n}))^2 + BJ_0 \text{div}(\mathbf{n})$. Второе слагаемое, содержащее спонтанную кривизну, при последующем интегрировании по нейтральной поверхности сведется к постоянному члену, пропорциональному произведению спонтанной кривизны и граничного директора.

Зависимость энергии двух линейных параллельных кромок пор (в расчете на 1 нм длины вдоль кромки) от расстояния между кромками приведена на рис. 3а для мембран, сформированных из ДОФХ, ПОФХ, ДМФХ. Из рисунка видно, что глобальный минимум упругой энергии достигается при расстоянии между порами $L = 4–5$ нм. При сближении, $L < 4$ нм, поры отталкиваются. При увеличении расстояния между кромками $4 \text{ нм} < L < 8 \text{ нм}$ поры притягиваются друг к другу. При расстоянии между кромками $L \approx 12$ нм имеется локальный минимум упругой энергии, однако его глубина крайне мала ($< 0.1 k_B T$). В целом, можно считать, что поры практически не взаимодействуют друг с другом при расстоянии между их кромками $L > L_0 \approx 10$ нм. Ранее в ряде работ проводилось численное моделирование пор в мем-

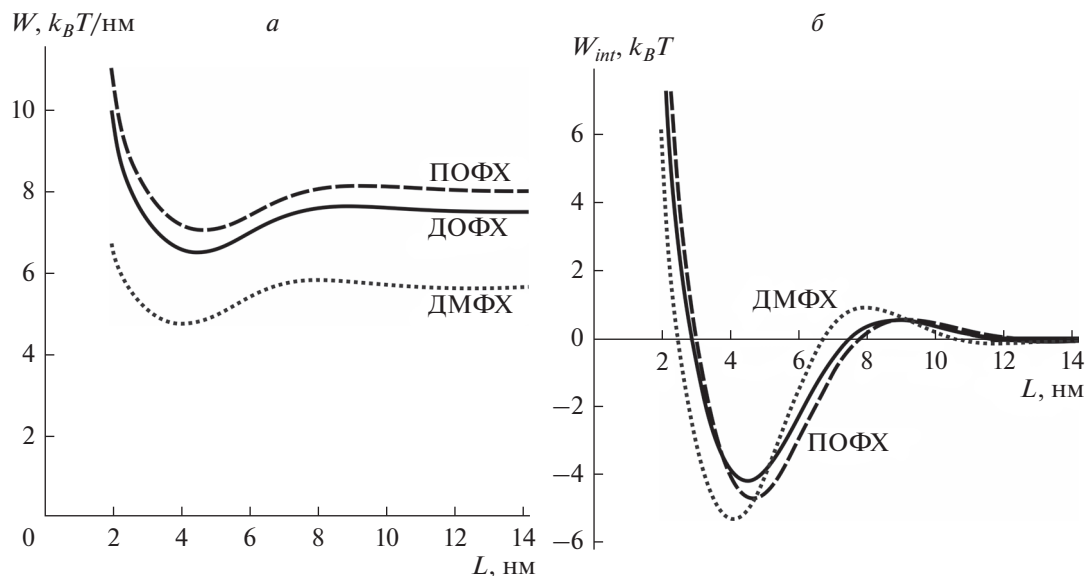


Рис. 3. *a* – Зависимость энергии двух линейных параллельных кромок пор (в расчете на 1 нм длины вдоль кромок) от расстояния между кромками. *б* – Энергия взаимодействия двух метастабильных пор. Результаты представлены для мембран, сформированных из ДОФХ (сплошные кривые), ПОФХ (штриховые кривые), ДМФХ (пунктирные кривые).

бранах методом молекулярной динамики [31, 32, 46, 47]. В таких расчетах, как правило, используются периодические граничные условия. Из зависимостей энергии от расстояния между кромками пор, представленных на рис. 3*a*, следует, что для исключения взаимодействия моделируемых методом молекулярной динамики кромок пор с границей расчетной ячейки латеральный размер ячейки должен быть больше, чем $(2R + L_0) \approx 16$ нм при максимальном радиусе моделируемой поры $R \approx 3$ нм.

Из графиков рис. 3*a* видно, что за счет взаимодействия двух оптимально расположенных пор может понижаться погонная энергия частей их кромок. Это эквивалентно понижению линейного натяжения на части периметра поры и, как следствие, среднего линейного натяжения всей кромки поры. Для двух кромок понижение погонной энергии составляет $\sim 1 k_B T/nm$ (рис. 3*a*); в силу симметрии понижение линейного натяжения одной кромки поры составляет $0.5 k_B T/nm \approx 2$ пН. Если предположить, что во взаимодействии участвует примерно половина периметра каждой кромки поры, то за счет взаимодействия среднее линейное натяжение кромки поры будет уменьшаться приблизительно на 1 пН. Экстраполируя полученные результаты на случай взаимодействия оптимальным образом расположенных трех пор и предполагая независимость попарных взаимодействий, можно предсказать уменьшение среднего линейного натяжения кромки поры на ~ 1.3 пН, считая, что во взаимодействии участвует $2/3$ периметра каждой поры.

Для того чтобы определить полную (а не погонную) энергию взаимодействия двух круглых

пор, погонную плотность энергии необходимо умножить на эффективную длину взаимодействия $L_{eff} \approx 2R + 2l_w$, где $l_w = 1/Re(2\lambda) \approx 1$ нм – характерная длина затухания плотности упругой энергии (см. выражение (8)) [39]. Из выражения (8) видно, что деформации мембраны на горизонтальном бислое участке, определяющие взаимодействие двух пор, затухают экспоненциально, что обеспечивает применимость приближения Дерягина. Энергию взаимодействия W_{int} нормируем (сдвинем на константу) таким образом, чтобы она была равна нулю для двух бесконечно удаленных пор. В качестве радиуса поры R используем радиус R_m , соответствующий локальному минимуму энергии поры, т.е. ее метастабильному состоянию (см. рис. 1*a*). Ранее в работах [25, 26] было показано, что в случае мембраны, сформированной из ДОФХ, $R_m \approx 1.1$ нм, для ПОФХ – $R_m \approx 1.4$ нм, для ДМФХ – $R_m = 1.9$ нм, т.е. эффективные длины взаимодействия пор для этих мембран составляют $L_{eff} \approx 4.2, 4.8, 5.8$ нм соответственно. Зависимости энергии взаимодействия пор, рассчитанные для этих трех липидов, представлены на рис. 3*b*. Из рисунка видно, что за счет оптимального расположения двух пор их энергия может понижаться на $4-5 k_B T$ по сравнению с суммарной энергией двух изолированных пор. В силу симметрии системы можно считать, что энергия каждой поры уменьшается на половину этой величины, т.е. на $2-2.5 k_B T$. В предположении, что высота энергетического барьера на закрытие поры не изменяется при взаимодействии, такое понижение энергии метастабильных пор должно приводить к увеличению их времени

жизни в $\sim e^{2-2.5} \approx 7.5-12$ раз. Экстраполируя полученные результаты на случай взаимодействия оптимальным образом расположенных трех пор и предполагая независимость попарных взаимодействий, можно предсказать увеличение времени жизни метастабильных пор до $\sim e^5 \approx 150$ раз (выигрыш в энергии за счет взаимодействия по $\sim 5 k_B T$ на каждую пару пор, которых всего 3 пары, т.е. в среднем по $5 k_B T$ на каждую пору, что дает увеличение времени жизни в $\sim e^5$ раз). Аналогично, для семи пор, расположенных в вершинах и центре правильной стороны шестиугольника с оптимальной длиной стороны, увеличение времени жизни может составлять $\sim e^{8.57} \approx 5250$ раз (выигрыш в энергии за счет взаимодействия по $\sim 5 k_B T$ на каждую пару пор, которых всего 12 пар, что дает в сумме $5 k_B T \times 12 \text{ пар} = 60 k_B T$, т.е. в среднем по $60/7 \approx 8.57 k_B T$ на каждую пору, что дает увеличение времени жизни в $\sim e^{8.57}$ раз) в предположении о независимости попарных взаимодействий пор.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, а также при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 17-04-02070 и № 18-54-74001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Davis H.T. 1996. *Statistical mechanics of phases, interfaces, and thin films*. New York: Wiley-VCH.
- Cass A., Finkelstein A. 1967. Water permeability of thin lipid membranes. *J. Gen. Physiol.* **50**, 1765–1784.
- Peterlin P., Arrigler V., Diamant H., Haleva E. 2012. Permeability of phospholipid membrane for small polar molecules determined from osmotic swelling of giant phospholipid vesicles. *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. **16**, 301–335.
- Nicholls D. 2013. *Bioenergetics*. 4th edn. Amsterdam: Acad. Press. 434 p.
- Renault T.T., Floros K.V., Elkholi R., Corrigan K.A., Kushnareva Y., Wieder S.Y., Lindtner C., Serasinghe M.N., Ascioia J.J., Buettner C., Newmeyer D.D., Chipuk J.E. 2015. Mitochondrial shape governs BAX-induced membrane permeabilization and apoptosis. *Mol. Cell*. **57**, 69–82.
- Basañez G., Sharpe J.C., Galanis J., Brandt T.B., Hardwick J.M., Zimmerberg J. 2002. BAX-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J. Biol. Chem.* **277**, 49360–49365.
- Li C., Salditt T. 2006. Structure of magainin and alamethicin in model membranes studied by X-ray reflectivity. *Biophys. J.* **91**, 3285–3300.
- Sychev S.V., Balandin S.V., Panteleev P.V., Barsukov L.I., Ovchinnikova T.V. 2015. Lipid-dependent pore formation by antimicrobial peptides arenicin-2 and melittin demonstrated by their proton transfer activity. *J. Pept. Sci.* **21**, 71–76.
- Karal M.A.S., Alam J.M., Takahashi T., Levadny V., Yamazaki M. 2015. Stretch-activated pore of the antimicrobial peptide, magainin 2. *Langmuir* **31**, 3391–3401.
- Cervia L.D., Chang C.C., Wang L., Mao M., Yuan F. 2018. Enhancing electrotransfection efficiency through improvement in nuclear entry of plasmid DNA. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **11**, 263–271.
- Pavlin M., Kandušer M. 2015. New insights into the mechanisms of gene electrotransfer—experimental and theoretical analysis. *Sci. Rep.* **5**, 9132.
- Карпунин Д.В., Акимов С.А., Фролов В.А. 2005. Формирование пор в плоских липидных мембранах, содержащих лизолипиды и холестерин. *Биол. мембраны*. **22**, 429–432.
- Bruen D., Delaney C., Florea L., Diamond D. 2017. Glucose sensing for diabetes monitoring: Recent developments. *Sensors*. **17**, 1866.
- Evans E., Smith B.A. 2011. Kinetics of hole nucleation in biomembrane rupture. *New J. Phys.* **13**, 095010.
- Karal M.A.S., Yamazaki M. 2015. Communication: Activation energy of tension-induced pore formation in lipid membranes. *J. Chem. Phys.* **143**, 081103.
- Karal M.A.S., Levadny V., Yamazaki M. 2016. Analysis of constant tension-induced rupture of lipid membranes using activation energy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 13487–13495.
- Evans E., Heinrich V., Ludwig F., Rawicz W. 2003. Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes. *Biophys. J.* **85**, 2342–2350.
- Melikov K.C., Frolov V.A., Shcherbakov A., Samsonov A.V., Chizmadzhev Y.A., Chernomordik L.V. 2001. Voltage-induced nonconductive pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer. *Biophys. J.* **80**, 1829–1836.
- Abidor I.G., Arakelyan V.B., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Y.A., Pastushenko V.F., Tarasevich M.R. 1979. Electric breakdown of bilayer lipid membranes I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *J. Electroanal. Chem.* **104**, 37–52.
- Панов П.В., Акимов С.А., Батищев О.В. 2014. Изопреноидные цепи липидов повышают устойчивость мембран к формированию сквозных пор. *Биол. мембраны*. **31**, 331–335.
- Derjaguin B.V. 1989. *Theory of stability of colloids and thin films*. Springer US. 258 p. ISBN 978-0-306-11022-1.
- Portet T., Dimova R. 2010. A new method for measuring edge tensions and stability of lipid bilayers: Effect of membrane composition. *Biophys. J.* **99**, 3264–3273.
- 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.
- Helfrich W. 1973. Elastic properties of lipid bilayers: Theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. C* **28**, 693–703.
- Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane I: Continuous reversible tra-

- jectory from intact bilayer through hydrophobic defect to transversal pore. *Sci. Rep.* **7**, 12152.
26. Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane II: Energy landscape under external stress. *Sci. Rep.* **7**, 12509.
 27. Маркин В.С., Козлов М.М. 1985. Статистика пор в бислоиных липидных мембранах. *Биол. мембраны.* **2**, 205–223.
 28. Pastushenko V.F., Chizmadzhev Y.A., Arakelyan V.B. 1979. Electric breakdown of bilayer lipid membranes II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation. *J. Electroanal. Chem.* **104**, 37–52.
 29. Weaver J.C., Chizmadzhev Y.A. 1996. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **41**, 135–160.
 30. Лифшиц Е.М., Ландау Л.Д., Питаевский Л.П. 2002. *Курс теоретической физики.* Т. 10. *Физическая кинетика.* Под ред. Питаевского Л.П. М.: Физматлит.
 31. Awasthi N., Hub J.S. 2016. Simulations of pore formation in lipid membranes: reaction coordinates, convergence, hysteresis, and finite-size effects. *J. Chem. Theory Comput.* **12**, 3261–3269.
 32. Kirsch S.A., Böckmann R.A. 2016. Membrane pore formation in atomistic and coarse-grained simulations. *Biochim. Biophys. Acta.* **1858**, 2266–2277.
 33. Молотковский Р.Ю., Акимов С.А. 2009. Расчет линейного натяжения в различных моделях кромки поры в липидном бислое. *Биол. мембраны.* **26**, 149–158.
 34. Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И., Акимов С.А. 2011. Стабилизация бислоиной структуры рафтов за счет упругих деформаций мембраны. *Биол. мембраны.* **28**, 307–314.
 35. Akimov S.A., Frolov V.A., Kuzmin P.I., Zimmerberg J., Chizmadzhev Y.A., Cohen F.S. 2008. Domain formation in membranes caused by lipid wetting of protein. *Phys. Rev. E.* **77**, 051901.
 36. Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Kheyfets B.B., Akimov S.A. 2013. Energy of the interaction between membrane lipid domains calculated from splay and tilt deformations. *JETP Lett.* **96**, 681–686.
 37. Акимов С.А., Александрова В.В., Галимзянов Т.Р., Батищев О.В. 2017. Взаимодействие амфипатических пептидов, опосредованное упругими деформациями мембраны. *Биол. мембраны.* **34**, 162–173.
 38. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Akimov S.A. 2018. Membrane elastic deformations modulate gramicidin A transbilayer dimerization and lateral clustering. *Biophys. J.* **115**, 478–493.
 39. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Jiménez-Munigua I., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2019. Membrane-mediated interaction of amphipathic peptides can be described by a one-dimensional approach. *Phys. Rev. E.* **99**, 022401.
 40. Israelachvili J. 2011. *Intermolecular and surface forces.* New York: Academic Press.
 41. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
 42. Leikin S., Kozlov M.M., Fuller N.L., Rand R.P. 1996. Measured effects of diacylglycerol on structural and elastic properties of phospholipid membranes. *Biophys. J.* **71**, 2623–2632.
 43. Nagle J.F., Wilkinson D.A. 1978. Lecithin bilayers. Density measurement and molecular interactions. *Biophys. J.* **23**, 159–175.
 44. Dimova R. 2014. Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Adv. Colloid Interface Sci.* **208**, 225–234.
 45. Hamm M., Kozlov M.M. 1998. Tilt model of inverted amphiphilic mesophase. *Eur. Phys. J. B.* **6**, 519–528.
 46. Bennett W.D., Sapay N., Tieleman D.P. 2014. Atomistic simulations of pore formation and closure in lipid bilayers. *Biophys. J.* **106**, 210–219.
 47. Wohlert J., den Otter W.K., Edholm O., Briels W.J. 2006. Free energy of a trans-membrane pore calculated from atomistic molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **124**, 154905.

Lateral Interactions Influence the Kinetics of Metastable Pores in Lipid Membranes

T. R. Galimzyanov^{1,2}, R. J. Molotkovsky¹, M. A. Kalutsky^{1,2}, K. V. Pinigin^{1,3},
P. I. Kuzmin¹, O. V. Batishchev^{1,3}, S. A. Akimov^{1,2,*}

¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, 119049 Russia*

³*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudnyy, Moscow oblast, 141700 Russia*

*e-mail: akimov@misis.ru

The formation of through pores in lipid bilayer membranes occurs in a number of cellular processes and is also applied for biotechnological and biomedical purposes. In the classical theory of pore formation, diffusion of membrane defects in space of radii is considered. When the first pore reaches a critical radius, the membrane irreversibly ruptures. It is usually presumed that the diffusion of defects occurs independently; their possible lateral interactions are not taken into account. In this paper, we consider a possible influence of lateral interactions of metastable through pores on their kinetics. It is assumed that the interaction occurs due to the overlap

of elastic deformation fields arising at the edges of two pores. The interaction energy of two circular pores was calculated in the Derjaguin approximation for rapidly decaying potentials. The unidimensional potential of interaction of two linear parallel edges of pores formed in membranes of different lipid composition was calculated in the framework of the theory of elasticity of liquid crystals adapted to lipid membranes. It is shown that this interaction should lead to a considerable reduction of the measured line tension of the pore edge. In addition, the lifetime of two optimally situated metastable pores can increase approximately 10 times due to the interaction. Extrapolation of the obtained results to the case of a larger number of interacting pores makes it possible to predict an additional increase in the lifetime by one or two orders of magnitude.

Keywords: lipid membrane, pore, pore interaction, Derjaguin approximation, theory of elasticity

УДК 612.017.1:612.112.31

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКО- И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 КИСЛОТ ПРИ АКТИВАЦИИ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В АСТРОЦИТАХ

© 2020 г. Н. В. Азбукина^{а, *}, А. А. Астахова^{б,}, С. В. Горьянов^{с,}, В. В. Чистяков^{с,}, М. Г. Сергеева^{б, **}

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119992, Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119992, Россия

^сРоссийский университет дружбы народов, Москва, 117198, Россия

*e-mail: ridernadya@gmail.com

**e-mail: mg.sergeeva@gmail.com

Поступила в редакцию 06.04.2019 г.

После доработки 25.04.2019 г.

Принята к публикации 14.05.2019 г.

Гиалуроновая кислота (НА) – один из ключевых полимерных компонентов межклеточного матрикса, в зависимости от молекулярной массы может по-разному влиять на внутриклеточную сигнализацию. Сравнили действие низко- (LMW) и высокомолекулярных (HMW) полимеров НА на способность первичных астроцитов, глиальных клеток мозга, высвобождать во внеклеточную среду омега-3-ненасыщенные жирные кислоты: докозагексаеновую (ДНА) и эйкозапентаеновую (ЕРА) и омега-6-ненасыщенную арахидоновую кислоту (АА), определяемые методом HPLC-MS/MS. Показано, что добавление LMW НА на 4.5 ч снижает концентрацию АА. HMW НА не влияет на АА, увеличивает высвобождение ДНА и ЕРА. Адаптация клеток в течение 48 ч к действию полимеров разной молекулярной массы НА приводила к снижению высвобождения омега-3- и омега-6-ненасыщенных жирных кислот астроцитами. Сравнение способности НА модулировать ответы астроцитов на стимуляцию агонистами Толл-подобных рецепторов (TLR) показало, что НА влияет на TLR4-стимулированную индукцию гена провоспалительного маркера IL-1 β при 0.5 ч экспозиции с LMW НА и HMW НА при дальнейшей стимуляции TLR4-агонистом в течение 4 ч. Таким образом, высвобождение полиненасыщенных жирных кислот в астроцитах: 1) чувствительно к действию НА; 2) чувствительно к молекулярной массе полимеров НА; 3) длительная (48 ч) экспозиция с НА приводит к адаптации астроцитов; 4) НА по-разному влияет на высвобождение омега-6 (АА) и омега-3 (ДНА)-ненасыщенных жирных кислот, что указывает на различие в механизмах их высвобождения. Поскольку считается, что ДНА выполняет противовоспалительную и протекторную функции в мозге, то полученные данные открывают перспективы использования полимеров НА как модуляторов воспалительных ответов астроцитов.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, астроциты, Толл-подобные рецепторы, интерлейкин-1-бета, полиненасыщенные жирные кислоты, нейровоспаление

DOI: 10.31857/S0233475519060033

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время показано, что большинство патологий центральной нервной системы (ЦНС), таких, как нейродегенеративные заболевания (болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона), аутоиммунные заболевания (рассеянный склероз), травматические повреждения (в том числе, вследствие острого нарушения мозгового кровообращения) и психические заболевания сопровождаются развитием воспалительных процессов [1, 2]. Основные клетки, регулирующие развитие воспалительных процессов в ЦНС – астроглия и

микроглия, содержат рецепторы к различным веществам, вызывающим воспалительные ответы [2, 3]. Важнейшим семейством рецепторов этих сигналов являются Толл-подобные рецепторы (TLR), активация которых приводит к выбросу различных цитокинов и других сигнальных медиаторов клетками глии [4–6]. Понимание молекулярных механизмов процессов нейровоспаления позволит понять механизмы развития указанных патологий, разработать терапевтические подходы для коррекции и направленной регуляции состояний.

Известно, что внеклеточный матрикс, один из ключевых структурных компонентов, отвечающих за поддержание гомеостаза тканей ЦНС, составляет приблизительно 20% от объема ткани. Состав внеклеточного матрикса ЦНС отличается от состава внеклеточного матрикса периферических структур [7]. Основными компонентами матрикса ЦНС являются гиалуроновая кислота (НА) и протеогликаны [7–9]. НА выполняет разнообразные биологические функции, включая регуляцию клеточной адгезии, пролиферацию клеток, диффузию питательных веществ и факторов роста, а также участвует в реакциях репарации тканей после повреждений и в воспалительных процессах [10]. На клетках микроглии показано, что НА влияет на высвобождение цитокинов при стимуляции липополисахаридом (LPS), агонистом рецептора TLR4 [11]. НА влияет также на пролиферацию астроцитов [12], что указывает на возможность модуляции этим полимером ответов астроцитов на действие провоспалительных стимулов. Однако возможность такой модуляции не была изучена ранее и стала целью нашей работы.

Следует отметить, что НА – это полимер с повторяющимися дисахаридными цепями N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты. Известно, что характер влияния НА на развитие воспалительного ответа зависит от молекулярной массы полимера [14]. Различают низкомолекулярную (< 500 кДа, LMW) и высокомолекулярную (> 500 кДа, HMW) НА, причем на большинство клеток миелоидного происхождения LMW НА оказывает провоспалительное, а HMW НА – противовоспалительное действие. Астроциты относятся к клеткам эктодермального происхождения, т.е. отличаются от микроглии, которые, как и макрофаги, имеют миелоидное происхождение. Исследования последних лет показали, что экспрессия многих регуляторных генов и белков сигнального пути TLR в астроцитах отличается от других клеток [15–17]. Поэтому нами проведено сравнение действия LMW НА и HMW НА на ответы астроцитов при стимуляции TLR3- и TLR4-агонистами. Влияние НА на действие TLR-агонистов оценивали по уровню экспрессии одного из основных провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1 β (IL-1 β) [18].

Полиненасыщенные жирные кислоты и их метаболиты играют важную роль в регуляции функций астроцитов [19–22]. Известно, что активация сигнальных путей TLR в астроцитах приводит к активации выброса омега-6-ненасыщенной арахидоновой кислоты (AA) и ее метаболитов [5, 19, 23, 24]. При этом в астроцитах повышено содержание омега-3-ненасыщенных жирных кислот: докозагексаеновой (DHA) и эйкозапентаеновой (EPA) в sn-2-положении фосфолипидов мембран [25, 26]. Интересно, что при активации клеток омега-3- и омега-6-ненасыщенные кислоты вы-

свобождаются под действием различных типов фосфолипазы A2 [23]. Влияние LMW НА и HMW НА на высвобождение омега-3- и омега-6-ненасыщенных жирных кислот ранее не было исследовано, поэтому явилось целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Липополисахарид (LPS, Sigma-Aldrich, США; кат. № L2630), стрептомицин-пенициллин (кат. № A063), трипсин (кат. № P037), бычья сыворотка (кат. № BS-110/500) (ПАНЭКО, Россия). Культуральная среда DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США; кат. № 21885-025). Дейтерированные стандарты эйкозаноидов: EPA-d5 (кат. № 10005056), DHA-d5 (кат. № 10005057), AA-d8 (кат. № 390010) (Cayman Chemical, США). Колонки для твердофазной экстракции Oasis® PRIME HLB (60 мг, 3cc, Waters, Германия; кат. № 186008056). Poly I:C (PIC, InVivoGen, США; кат. № tlr1-pic). HMW НА (1.01 мДа–1.8 мДа, кат. № HA15M-1, HMW) и LMW НА (41 кДа–65 кДа, кат. № HA40K-1, LMW) – Lifecore Biomedical (США).

Клеточная культура. Первичная культура астроцитов получена по методике, описанной ранее [15, 27]. Изолированный мозг новорожденных крысят линии Wistar (не старше 2 дней) измельчали посредством последовательного перетирания сквозь сита, далее клетки культивировали в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 1 г/л глюкозы, 10% сыворотки (FBS) и антибиотиков (50 ед./мл стрептомицина и 50 мкг/мл пенициллина) в течение 14 дней. Первую смену среды проводили на 3-й день, предварительно флакон отряхивали для отделения микроглии (орбитальный шейкер Biosan OS-20, 180 об/мин в течение 90 мин). Затем среду заменяли каждые 2 дня, на 9-й день клетки пересаживали в 12-луночный планшет с плотностью 350000 клеток на лунку. За 2 ч до начала экспериментов проводили смену среды в лунках.

Для оценки влияния HMW и LMW НА на экспрессию IL-1 β клетки предварительно инкубировали по отдельности с указанными кислотами (30 мин или 48 ч) и стимулировали LPS (100 нг/мл) и PIC (10 мкг/мл) в течение 4 ч.

ПЦР в режиме реального времени. Суммарную РНК выделяли из клеток с помощью GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, США). Синтез первой цепи проводили с помощью MMLV RT kit (Evrogen, Россия). Относительный уровень экспрессии определяли с помощью количественной ПЦР с SYBR GREEN (использовали коммерческий 5 \times PCR-HS-SYBR микс, Evrogen, Россия). Последовательности используемых праймеров (5'-3'): *IL1B*, прямой: CACCTCTCAAGCAGAGCACAG, обратный: GGGTTC-

CATGGTGAAGTCAAC, *ACTB* (референсный ген), прямой: AGATGACCCAGATCATGTTTGAG, обратный: GGCATACAGGGACAACACAG. Температура плавления – 57°C. В одну реакционную смесь объемом 25 мкл брали 50 нг кДНК.

Детекция липидов. Липидные компоненты для масс-спектрометрического анализа экстрагировали из 700 мкл клеточной среды при помощи 1 мл метанола, затем использовали колонки Oasis HBL 3сс для твердофазной экстракции согласно рекомендациям производителя. Анализ проводили с использованием квадрупольного масс-спектрометра Shimadzu 8040 (Shimadzu, Япония), оборудованного системой ультра HPLC Nexera, и колонки Phenomenex C8 (2.1 мм × 150 мм × 2.6 мкм). Регистрацию проводили путем мониторинга множественных реакций по методике, описанной ранее [19]. Для количественного определения детектируемых кислот использовали стандарты: EPA-d5, DHA-d5, AA-d8.

Статистический анализ. Значения представляли как среднее со стандартным отклонением. Статистическую значимость различий между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Максимально допустимую вероятность отвергнуть верную нулевую гипотезу *p* для определения отличий между группами принимали равной 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние высоко- и низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на экспрессию мРНК IL-1β

Для определения эффективной концентрации LMW HA и HMW HA добавляли на 30 мин, затем клетки стимулировали агонистами TLR3 (PIC, 10 мкг/мл) и TLR4 (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч и оценивали уровень экспрессии мРНК IL-1β. Показано что стимуляция астроцитов агонистами TLR3 и TLR4 увеличивает экспрессию гена *il1b* в среднем в 20 и в 110 раз соответственно (рис. 1а). Далее оценивали влияние предварительной инкубации клеток с различными концентрациями HMW и LMW HA (10, 100, 450 мкг/мл) на стимулированную агонистом экспрессию мРНК гена *il1b*. Показано, что оба варианта HA во всех концентрациях не влияют на экспрессию гена *il1b* при стимуляции PIC (рис. 1б). Показано, что HMW и LMW HA в концентрациях 10 и 100 мкг/мл не влияют на экспрессию гена *il1b* в ответ на 4-часовую стимуляцию LPS, HMW HA в дозе 450 мкг/мл уменьшает ее в 2 раза, а LMW HA в такой же дозе увеличивает в 1.5 раза (рис. 1в). Эффекты, полученные на стимулированных LPS клетках, подтверждают гипотезу о провоспалительном действии LMW HA и противовоспалительном – HMW HA.

Влияние высоко- и низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на высвобождение полиненасыщенных жирных кислот

В качестве оптимальной концентрации HMW HA и LMW HA, использованной в дальнейших исследованиях, нами была выбрана доза 450 мкг/мл. Изучено влияние HMW HA и LMW HA в этих концентрациях на выброс полиненасыщенных жирных кислот. Влияние HA оценивали после предварительной инкубации в течение 30 мин (S) и 48 ч (L). Длительное время инкубации выбрано для оценки возможности адаптации клеток к условиям культивирования в присутствии HMW или LMW HA. Установлено, что длительная инкубация как с HMW HA, так и LMW HA приводит к снижению высвобождаемой AA и DHA (рис. 2а, 2б). Снижение EPA происходит только при длительной инкубации с HMW HA (рис. 2в). При кратковременной инкубации с HA наблюдалось незначительное снижение выброса AA, DHA и EPA во внеклеточную среду при действии HMW HA в течение 4.5 ч (рис. 2). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что высвобождение полиненасыщенных жирных кислот в астроцитах: 1) чувствительно к действию HA; 2) длительная (48 ч) экспозиция приводит к адаптации клеток к обработке HA; 3) влияние HMW HA и LMW HA различается для омега-6 (AA) и омега-3 (DHA)-ненасыщенных жирных кислот, что указывает на различия в механизмах их высвобождения.

Гиалуроновая кислота модулирует стимулированный агонистом TLR выброс полиненасыщенных жирных кислот

Добавление различных агонистов к астроцитам активирует в них различные фосфолипазы A2 [5, 21, 28], которые выщепляют полиненасыщенные жирные кислоты из фосфолипидов, далее эти кислоты метаболизируются по циклооксигеназному, липоксигеназному, эпоксигеназному пути [29]. Часть кислот выходит во внеклеточное пространство и может модулировать различные функции астроцитов, в частности, осцилляции внутриклеточного кальция [30]. Чтобы ответить на вопрос, изменяют ли HMW HA и LMW HA стимулированный агонистами TLR выброс омега-3 и омега-6- ненасыщенных жирных кислот во внеклеточное пространство, мы добавляли HMW HA или LMW HA (450 мкг/мл) за 30 мин (S) или 48 ч (L) до добавления TLR-агонистов (рис. 3). Длительная экспозиция с LMW HA приводит к снижению высвобождения AA при стимуляции TLR3- и TLR4-агонистами (рис. 3а), снижению высвобождения DHA при стимуляции TLR4-агонистом (рис. 3б), EPA при стимуляции TLR3- и TLR4-агонистами (рис. 3в). HMW HA статистически значимо действовала как индуктор высво-

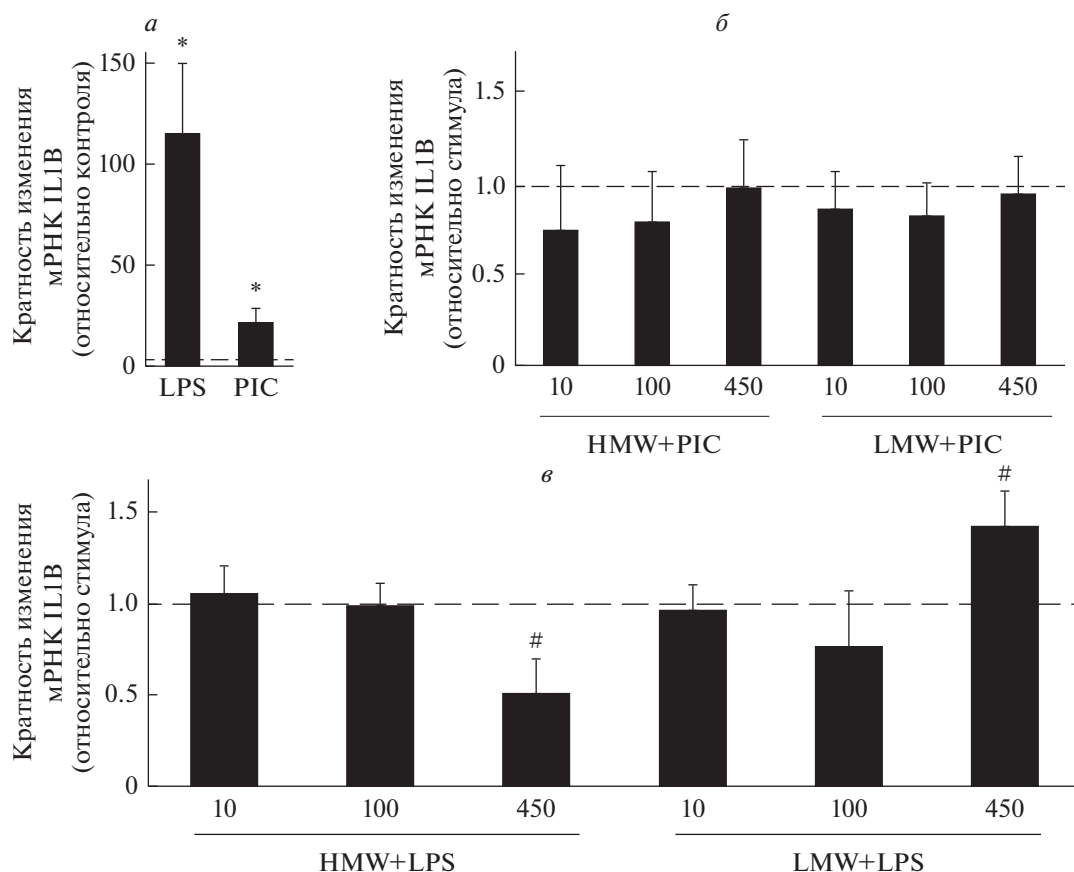


Рис. 1. Влияние HMW и LMW HA на экспрессию мРНК IL-1 β в стимулированных астроцитах. Клетки обрабатывали (а) LPS (100 нг/мл, 4 ч) или PIC (10 мкг/мл, 4 ч); или HMW или LMW HA в указанных концентрациях (10, 100, 450 мкг/мл) в течение 30 мин, затем стимулировали PIC (10 мкг/мл, 4 ч) (б) или LPS (100 нг/мл, 4 ч) (в), затем измеряли относительный уровень мРНК методом ПЦР в реальном времени. Полученные значения нормировали на экспрессию гена β -актина. В (а) за единицу принимали уровень экспрессии IL-1 β в нестимулированных клетках, в (б), (в) за единицу был принят уровень экспрессии в стимулированных клетках. * – $p < 0.05$ по сравнению с контрольными клетками, # – $p < 0.05$ по сравнению со стимулированными клетками.

бождения ДНА при стимуляции клеток TLR3-агонистом при длительной экспозиции (рис. 3б). Таким образом, высвобождение омега-3 и омега-6-ненасыщенных жирных кислот при действии TLR3- и TLR4-агонистов чувствительно ко времени экспозиции с HA и молекулярной массе ее полимеров.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ответы астроцитов на провоспалительные стимулы играют важную роль в развитии патологий мозга [3], поэтому выявление механизмов регуляции этих ответов имеют перспективу поиска новых терапевтических подходов и средств их реализации. Нами впервые показано, что HA влияет на функции астроцитов при моделировании воспалительных условий, т.е. при стимуляции клеток агонистами TLR. При этом наблюдается схожесть астроцитов с клетками неэктодермального происхождения, т.е. LMW HA стимулируют,

а HMW HA снижают TLR-стимулируемую индукцию провоспалительных цитокинов [31–34]. Эти данные позволяют предположить, что сигнальные пути действия HA в астроцитах имеют общие черты с ранее показанными механизмами вовлечения HA в регуляцию клеточного воспалительного ответа на других типах клеток.

Обнаружена особая чувствительность астроцитов к действию HA и их способность к адаптации при длительном воздействии HA. Эта чувствительность проявляется при высвобождении во внеклеточную среду полиненасыщенных жирных кислот. Следует отметить, что астроциты отличаются от многих других клеток тем, что в sn-2-положении фосфолипидов у них высокое содержание омега-3 ДНА [23, 26]. Показано, что в астроцитах омега-6 AA высвобождается из фосфолипидов при стимуляции фосфолипаз sPLA2, sPLA2A, а омега-3 ДНА при действии фосфолипазы iPLA2 [23]. Ранее мы показали, что возможно направленное модулирование фосфолипаз

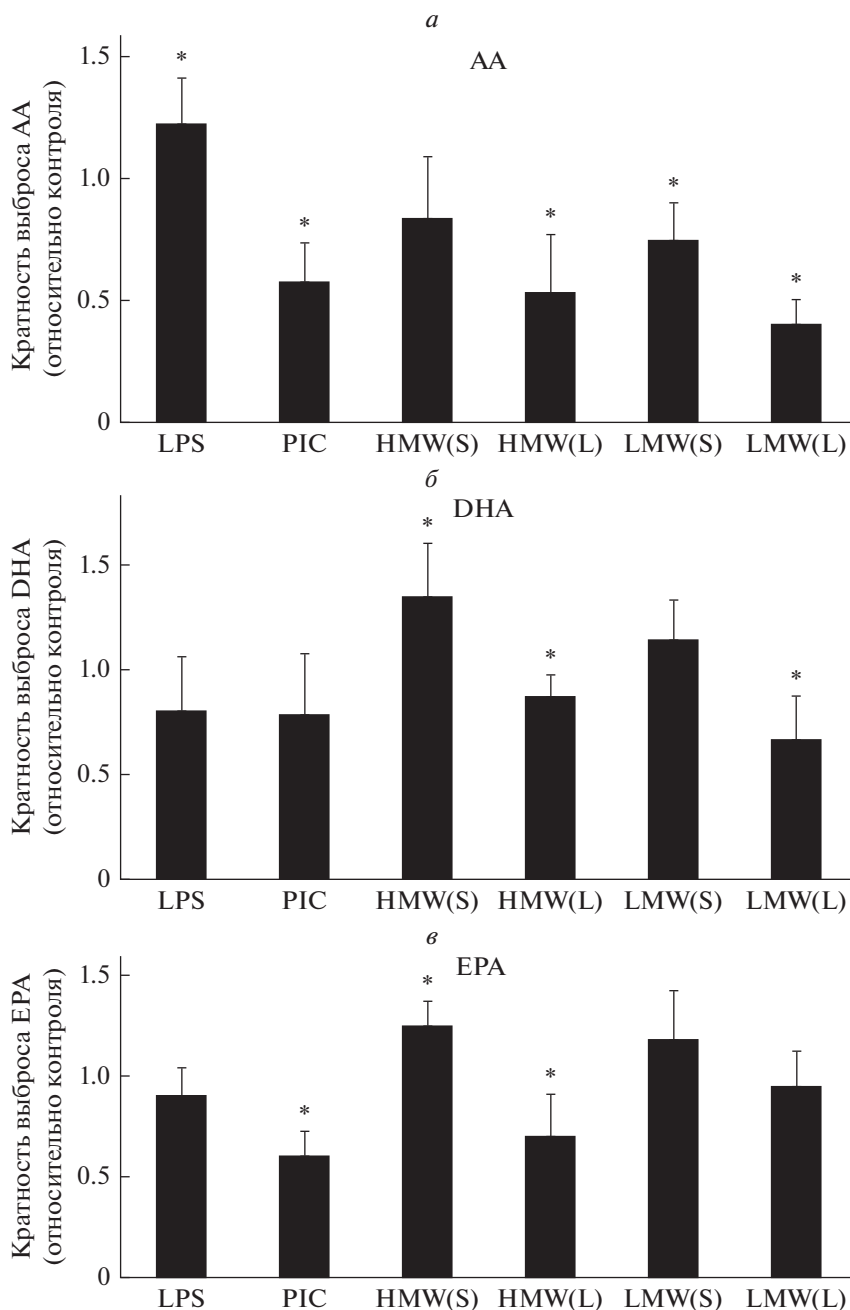


Рис. 2. Влияние PIC, LPS, HMW и LMW НА на выбросы AA (арахионовая кислота), DHA (докозагексаеновая кислота), EPA (эйкозапентаеновая кислота). Клетки обрабатывали HMW или LMW НА (450 мкг/мл) в течение 30 мин (S) или 48 ч (L), PIC (10 мкг/мл, 4 ч) или LPS (100 нг/мл, 4 ч), затем измеряли уровень выбрасываемых во внеклеточную среду кислот методом HPLC-MS/MS. За единицу принимался уровень выбросов кислот в контрольных клетках. * – $p < 0.05$ по сравнению с контрольными клетками.

синтетическими агонистами ядерных рецепторов PPAR [35]. Целью данной работы было выявление возможных различий во влиянии НА на омега-3 и омега-6-ненасыщенные жирные кислоты. Впервые показано, что НА стимулирует высвобождение омега-3 DHA. Результаты позволяют предположить возможность регуляции баланса между выбрасываемыми омега-3 и омега-6-нена-

сыщенными жирными кислотами с помощью олигомеров НА различной длины. Действительно, LMW и HMW НА прямо влияют на высвобождение полиненасыщенных жирных кислот. При этом наблюдается возникновение адаптации к длительному воздействию НА. Если короткие времена инкубации с LMW и HMW НА увеличивают высвобождение жирных кислот, то культи-

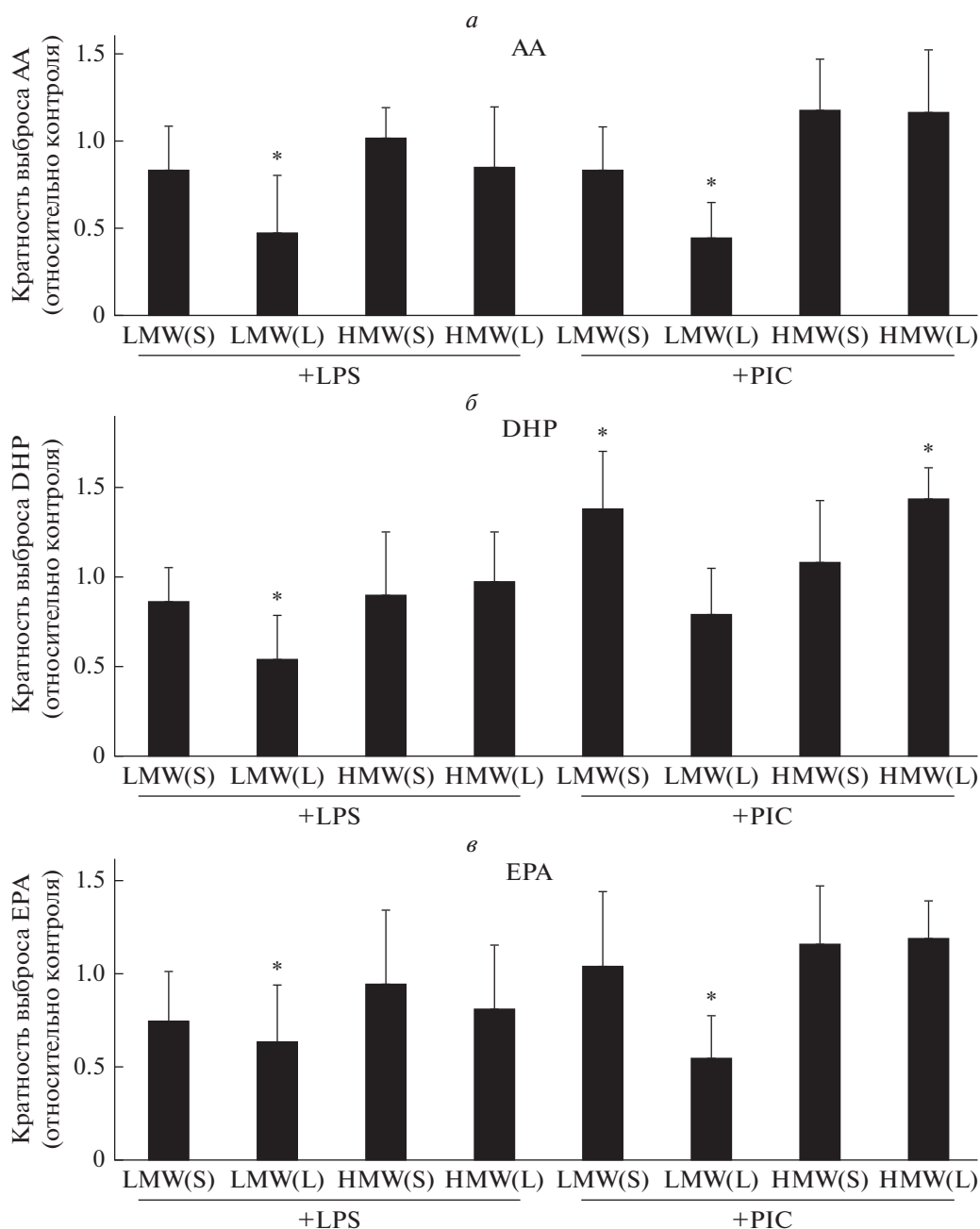


Рис. 3. Влияние HMW и LMW HA на выбросы DHP (докозагексаеновая кислота), AA (арахидоновая кислота), EPA (эйкозапентаеновая кислота) в контрольных и стимулированных астроцитах. Клетки обрабатывали HMW или LMW HA (450 мкг/мл) в течение 30 мин (S) или 48 ч (L) и затем стимулировали PIC (10 мкг/мл, 4 ч) или LPS (100 нг/мл, 4 ч), затем измеряли уровень выбрасываемых во внеклеточную среду кислот методом HPLC-MS/MS. За единицу принимался уровень выбросов кислот в стимулированных клетках. * – $p < 0.05$ по сравнению со стимулированными клетками.

вирование клеток в течение 2 дней с HA приводит к снижению высвобождения во внеклеточную среду как омега-6, так и омега-3-кислот. Интересно, что осцилляции внутриклеточного кальция, важные показатели функций астроцитов, чувствительны к действию омега-6 и омега-3-жирных кислот [20]. Насколько связаны воздействия олигомеров HA различной массы с фосфолипаза-

ми и существует ли обратная связь между высвобождаемыми омега-6 и омега-3-ненасыщенными жирными кислотами и чувствительностью к воздействию HA, еще не ясно и требует дальнейшего изучения.

Существует много возможных механизмов воздействия HA на сигнальные пути TLR и другие функции клеток. Предполагается, что HA связы-

вается с различными белками плазматической мембраны клетки, такими как CD44 и др. [10].

В пользу реализации эффекта НА через поверхностные рецепторы говорят наши данные о низкой чувствительности ответов клеток при стимуляции агонистом TLR3 к кратковременной экспозиции с НА — значимый эффект оказывала только кратковременная инкубация с LMW НА на выброс ДНА. Такая разница в эффектах, наблюдаемых при различных стимуляциях, может быть объяснена расположением целевых рецепторов: рецептор TLR4 расположен на поверхности клеточной мембраны, а TLR3 — на мембране эндосом. При более длительной инкубации возможно, проявляется эффект взаимосвязи сигнальных путей TLR2/TLR3, показанный ранее [36, 37]. Все эти предположения требуют дальнейших исследований.

В данной работе впервые показана связь между действием различных олигомеров НА и сигнальными путями TLR, включая высвобождение омега-3 и омега-6-ненасыщенных жирных кислот. НА широко используется в различных биомедицинских приложениях, включая дерматологию, ортопедию, артриты, офтальмологию [38]. Данное исследование открывает перспективы использования НА при патологиях мозга с нейровоспалительной компонентой.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-74-00069.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chistyakov D.V., Astakhova A.A., Sergeeva M.G. 2018. Resolution of inflammation and mood disorders. *Exp. Mol. Pathol.* **105** (2), 190–201.
- Lucas S.-M., Rothwell N.J., Gibson R.M. 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.* **147 Suppl**, S232–S240.
- Sofroniew M.V., Vinters H.V. 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119** (1), 7–35.
- Kumar V. 2019. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.* **332**, 16–30.
- Chistyakov D.V., Azbukina N.V., Lopachev A.V., Kulichenkova K.N., Astakhova A.A., Sergeeva M.G. 2018. Rosiglitazone as a modulator of TLR4 and TLR3 signaling pathways in rat primary neurons and astrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (1), 113.
- Chistyakov D.V., Aleshin S., Sergeeva M.G., Reiser G. 2014. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ expression and activity levels by toll-like receptor agonists and MAP kinase inhibitors in rat astrocytes. *J. Neurochem.* **130** (4), 563–574.
- Lau L.W., Cua R., Keough M.B., Haylock-Jacobs S., Yong V.W. 2013. Pathophysiology of the brain extracellular matrix: A new target for remyelination. *Nat. Rev. Neurosci.* **14** (10), 722–729.
- Bignami A., Hosley M., Dahl D. 1993. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat. Embryol. (Berl).* **188** (5), 419–433.
- Bonneh-Barkay D., Wiley C.A. 2009. Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathol.* **19** (4), 573–585.
- Garantziotis S., Savani R.C. 2019. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biol.* **78–79**, 1–10.
- Austin J.W., Gilchrist C., Fehlings M.G. 2012. High molecular weight hyaluronan reduces lipopolysaccharide mediated microglial activation. *J. Neurochem.* **122** (2), 344–355.
- Struve J., Maher P.C., Li Y.Q., Kinney S., Fehlings M.G., Kuntz I.V.C., Sherman L.S. 2005. Disruption of the hyaluronan-based extracellular matrix in spinal cord promotes astrocyte proliferation. *Glia.* **52** (1), 16–24.
- Khaing Z.Z., Milman B.D., Vanscoy J.E., Seidlits S.K., Grill R.J., Schmidt C.E. 2011. High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury. *J. Neural. Eng.* **8** (4), 046033.
- D'Agostino A., Stellavato A., Corsuto L., Diana P., Filosa R., La Gatta A., Schiraldi C. 2017. Is molecular size a discriminating factor in hyaluronan interaction with human cells? *Carbohydr. Polym.* **157**, 21–30.
- Astakhova A.A., Chistyakov D.V., Sergeeva M.G., Reiser G. 2018. Regulation of the ARE-binding proteins, TTP (tristetraprolin) and HuR (human antigen R), in inflammatory response in astrocytes. *Neurochem. Int.* **118**, 82–90.
- Buyanova S.M., Chistyakov D.V., Astakhova A.A., Sergeeva M.G. 2017. The effect of dehydroepiandrosterone on inflammatory response of astroglial cells. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **11** (4), 304–310.
- Chistyakov D.V., Azbukina N.V., Astakhova A.A., Goriainov S.V., Chistyakov V.V., Sergeeva M.G. 2018. Sex-mediated differences in lps induced alterations of TNF α , IL-10 expression, and prostaglandin synthesis in primary astrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (9), 2793.
- Ren K., Torres R. 2009. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res. Rev.* **60** (1), 57–64.
- Chistyakov D.V., Grabeklis S., Goriainov S.V., Chistyakov V.V., Sergeeva M.G., Reiser G. 2018. Astrocytes synthesize primary and cyclopentenone prostaglandins that are negative regulators of their proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **500** (2), 204–210.
- Sergeeva M., Strokin M., Wang H., Ubl J.J., Reiser G. 2002. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid suppress thrombin-evoked Ca²⁺ response in rat astrocytes by endogenous arachidonic acid liberation. *J. Neurochem.* **82** (5), 1252–1261.
- Strokin M., Sergeeva M., Reiser G. 2007. Prostaglandin synthesis in rat brain astrocytes is under the control of the n-3 docosahexaenoic acid, released by group VIB calcium-independent phospholipase A2. *J. Neurochem.* **102** (6), 1771–1782.

22. Sun G.Y., Simonyi A., Fritsche K.L., Chuang D.Y., Hannink M., Gu Z., Greenleaf C.M., Yao J.K., Lee J.C., Beversdorf D.Q. 2018. Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **136**, 3–13.
23. Strokin M., Sergeeva M., Reiser G. 2003. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A 2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺. *Br. J. Pharmacol.* **139** (5), 1014–1022.
24. Bazinet R.P., Layé S. 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **15** (12), 771–785.
25. Strokin M., Sergeeva M., Reiser G. 2004. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 and n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid in prostanoic acid production in brain: Perspectives for protection in neuroinflammation. *Int. J. Dev. Neurosci.* **22** (7), 551–557.
26. Rapoport S.I., Ramadan E., Basselin M. 2011. Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **96** (1–4), 109–113.
27. Astakhova A.A., Chistyakov D.V., Pankevich E.V., Sergeeva M.G. 2015. Regulation of cyclooxygenase 2 expression by agonists of PPAR nuclear receptors in the model of endotoxin tolerance in astrocytes. *Biochemistry (Mosc.)*. **80** (10), 1262–1270.
28. Sun G.Y., He Y., Chuang D.Y., Lee J.C., Gu Z., Simonyi A., Sun A.Y. 2012. Integrating cytosolic phospholipase A2 with oxidative/ nitrosative signaling pathways in neurons: A novel therapeutic strategy for AD. *Mol. Neurobiol.* **46** (1), 85–95.
29. Gabbs M., Leng S., Devassy J.G., Monirujjaman M., Aukema H.M. 2015. Advances in our understanding of oxylipins derived from dietary PUFAs. *Adv. Nutr.* **6** (5), 513–540.
30. Sergeeva M., Strokin M., Reiser G. 2005. Regulation of intracellular calcium levels by polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, in astrocytes: Possible involvement of phospholipase A2. *Reprod. Nutr. Dev.* **45** (5), 633–646.
31. Campo G.M., Avenoso A., Campo S., D'Ascola A., Nastasi G., Calatroni A. 2010. Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes. *Biochimie.* **92** (2), 204–215.
32. Albano G.D., Bonanno A., Cavalieri L., Ingrassia E., Di Sano C., Siena L., Riccobono L., Gagliardo R., Profita M. 2016. Effect of high, medium, and low molecular weight hyaluronan on inflammation and oxidative stress in an *in vitro* model of human nasal epithelial cells. *Mediators Inflamm.* **2016**, 1–13.
33. Gómez-Aristizábal A., Kim K.P., Viswanathan S. 2016. A systematic study of the effect of different molecular weights of hyaluronic acid on mesenchymal stromal cell-mediated immunomodulation. *PLoS One* **11** (1), e0147868.
34. Rayahin J.E., Buhman J.S., Zhang Y., Koh T.J., Gemeinhart R.A. 2015. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **1** (7), 481–493.
35. Sergeeva M.G., Aleshin S.E., Grabeklis S., Reiser G. 2010. PPAR activation has dichotomous control on the expression levels of cytosolic and secretory phospholipase A2 in astrocytes; inhibition in naïve, untreated cells and enhancement in LPS-stimulated cells. *J. Neurochem.* **115** (2), 399–410.
36. Kim M.Y., Muto J., Gallo R.L. 2013. Hyaluronic acid oligosaccharides suppress TLR3-dependent cytokine expression in a TLR4-dependent manner. *PLoS One* **8** (8), e72421.
37. Sloane J.A., Batt C., Ma Y., Harris Z.M., Trapp B., Vartanian T. 2010. Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107** (25), 11555–11560.
38. Jiang D., Liang J., Noble P.W. 2011. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol. Rev.* **91** (1), 221–264.

Influence of High- and Low-Molecular Weight Hyaluronic Acid on the Toll-Like Receptor-Mediated Omega-3 and Omega-6 Fatty Acid Release in Astrocytes

N. V. Azbukina^{1,*}, A. A. Astachova², S. V. Goriainov³, V. V. Chistyakov³, M. G. Sergeeva^{2,**}

¹Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119992 Russia

²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119992 Russia

³Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia

*e-mail: ridernadya@gmail.com

**e-mail: mg.sergeeva@gmail.com

Hyaluronic acid (HA) is one of the key polymer components of the extracellular matrix and, depending on its molecular weight, can exert different effects on intracellular signaling. Using HPLC-MS/MS method, we assessed the influence of low- (LMW) and high- (HMW) molecular weight HA polymers on the ability of primary astrocytes, glial brain cells, to release omega-3 polyunsaturated fatty acids (docosahexaenoic acid, DHA, and eicosapentaenoic acid, EPA) and omega-6 polyunsaturated fatty acid (arachidonic acid, AA) into the extracellular medium. The addition of LMW HA for 4.5 h reduced the AA concentration and increased

the DHA concentration in the culture medium. HMW HA did not affect the AA release but increased the release of DHA and EPA. A 48-h exposure of cells to HA of different molecular weights resulted in a decrease in the release of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by astrocytes. Comparison of the HA ability to modulate astrocyte responses to stimulation with agonists of Toll-like receptors (TLR) showed that HA affects the TLR4-stimulated induction of the gene of the pro-inflammatory marker IL-1 β after a 0.5-h exposure to LMW and HMW HA and further stimulation by the TLR4 agonist for 4 h. Overall, we have found that the release of polyunsaturated fatty acids in astrocytes: i) is sensitive to HAs; ii) is sensitive to the molecular weight of HA polymers; iii) a prolonged (48 h) exposure of astrocytes to HA leads to the cell adaptation and attenuation of the HA effects; iv) HAs exert different effects on the release of omega-6 (AA) and omega-3 (DHA) polyunsaturated fatty acids, suggesting different mechanisms of these processes. Since DHA is believed to perform anti-inflammatory and protective functions in the brain, our results open new opportunities of the use of HA polymers as modulators of astrocyte inflammatory responses.

Keywords: hyaluronic acid, astrocytes, Toll-like receptors, interleukin-1-beta, polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation

УДК 577.23

МЕЛАТОНИН УСИЛИВАЕТ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИТАРАБИНА В КЛЕТКАХ HL-60

© 2020 г. А. И. Ломовский^а, Ю. Л. Бабурина^а, М. И. Кобякова^а,
Р. С. Фадеев^а, В. С. Акатов^а, О. В. Крестинина^а, *

^аИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, 142290 Московской обл., Россия

*e-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2019 г.

После доработки 22.05.2019 г.

Принята к публикации 23.05.2019 г.

Изучено совместное действие мелатонина и цитарабина в низкой концентрации на клетки острого промиелоцитарного лейкоза HL-60. Показано, что совместное действие этих веществ приводит к снижению количества клеток на 70% и индекса митотической активности на 75%. Установлено, что комбинированное действие мелатонина и цитарабина способствует также снижению экспрессии митохондриальных белков. Показано, что совместное применение мелатонина и цитарабина в низкой концентрации (2 нМ) снижает экспрессию потенциал-зависимого анионного канала (VDAC1). Мелатонин в сочетании с цитарабином аналогичным образом влиял на экспрессию транслокаторного белка (TSPO) и антиапоптотического белка Bcl-2. Выявлен синергический эффект мелатонина при комбинированном действии с цитарабином, который обеспечивает повышение эффективности его противоопухолевого действия.

Ключевые слова: мелатонин, цитарабин, острый промиелоцитарный лейкоз, апоптоз

DOI: 10.31857/S0233475519060070

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания представляют одну из основных проблем современной медицины, в решении которой важное значение имеет поиск новых подходов к терапии опухолей. С этой целью необходимо изучение комбинированного действия уже известных препаратов и поиск новых, более эффективных, что позволит повысить выживаемость больных и замедлить развитие злокачественных опухолей. Мелатонин (МЕЛ, N-ацетил-5-метокситриптамин) — гормон, секретируемый шишковидной железой и другими тканями, обладает сходством с производными биогенного амина серотонина, синтезируемого из триптофана [1, 2]. Изучение МЕЛ и его влияния на организм человека показало, что МЕЛ обладает онкостатическими, антиоксидантными и иммунорегуляторными свойствами, поэтому он может рассматриваться как противоопухолевый агент. МЕЛ применяют в комбинированной терапии опухолей. Аномальные уровни МЕЛ у онкологических больных указывают на его участие в онкогенезе [3, 4]. Сообщается о значительных противоопухолевых эффектах МЕЛ в различных типах опухолевых клеток [5].

Цитарабин (ЦИТ) — противоопухолевый препарат на основе пиримидинового нуклеозида и арабинозы, широко используется в терапии лейкозов. ЦИТ применяется преимущественно при остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ), неходжкинской лимфоме (НХЛ) и хроническом миелоцитарном лейкозе [6, 7]. ЦИТ можно использовать самостоятельно или в сочетании с другими противоопухолевыми агентами, такими как даунорубин, доксорубин, тиогуанин или винкристин.

ЦИТ действует на быстро делящиеся клетки и ингибирует синтез ДНК в S-фазе клеточного цикла, а также препятствует переходу клеток из G1-фазы в S-фазу. Точный механизм действия цитарабинтрифосфата не выяснен, но он, по-видимому, ингибирует ДНК-полимеразу, конкурируя с дезоксицитидинтрифосфатом [8]. Помимо противоопухолевой активности ЦИТ обладает и токсическим побочным действием.

Формирование неспецифической поры (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) и увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий происходит в процессе ответа на окислительный стресс и перегрузку митохондриального матрикса кальцием. Регуляторами/моду-

латорами мРТР являются потенциал-зависимый анионный канал (VDAC), транслоказа адениновых нуклеотидов, белок-транслокатор (translocator protein, TSPO) и другие белки. VDAC представляет собой белок 32 кДа, у человека представленный тремя изоформами (VDAC1, VDAC2, VDAC3). Наиболее распространена изоформа VDAC1 [9]. Взаимодействие VDAC с про- и антиапоптотическими белками наружной митохондриальной мембраны могут как способствовать гибели клеток, так и предотвращать ее. Таким образом, митохондриальный VDAC может быть перспективной терапевтической мишенью при различных типах опухолей. TSPO является не только партнером, но и модулятором VDAC [10]. Кроме того, некоторые исследователи считают, что TSPO играет ключевую роль в росте опухолевых клеток [11–13]. Показано также, что экспрессия TSPO увеличивается в опухолях разного типа, включая опухоли головного мозга и глиому. Установлено, что TSPO участвует в клеточной пролиферации и регуляции апоптоза в некоторых типах опухолевых клеток [13–15]. TSPO, локализованный рядом с VDAC, образует прочный комплекс с данным белком, регулируя тем самым проницаемость VDAC и функции митохондрий [16]. Ранее мы показали, что МЕЛ (1 мкМ) совместно с *транс*-ретиноевой кислотой (ATRA, 10 нМ) увеличивает ее цитотоксичность в отношении клеток HL-60 и подавляет экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2, а также VDAC1 и TSPO [17].

В настоящей работе мы исследовали совместное действие МЕЛ (1 мМ) и ЦИТ в низкой концентрации (2 нМ) на пролиферативную активность клеток ОПЛ, используя в качестве модели клетки HL-60, и анализировали изменение уровня таких митохондриальных белков, как Bcl-2, VDAC1 и TSPO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки ОПЛ человека HL-60 (CCL-240) получены из ATCC (Manassas, VA, США). Клетки выращивали в среде RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 20% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Grand Island, NY, США) и 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США) при 37°C, 95% влажности и 5% CO₂. Удвоение культуры клеток наблюдали приблизительно через 24 ч.

Анализ жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью ресазурина. Клетки высевали в 96-луночный планшет с плотностью 5×10^3 клеток на лунку. Через 24 ч клетки обрабатывали МЕЛ и ЦИТ в указанных дозах. Через 24 ч после обработки в каждую лунку добавляли ресазурин (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 100 мкг/мл, клетки инку-

бировали в течение 4 ч при 37°C. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов Infinite F200 (Tecan, Grodig, Австрия) при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны излучения 595 нм. Данные представлены как процент от контроля (необработанные образцы клеток).

Определение митотического индекса. Митотическую активность определяли следующим образом: клетки, инкубированные в течение 96 ч в различных условиях, центрифугировали (250 г, 10 мин), ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и фиксировали 70% этанолом (30 мин, при комнатной температуре). Затем фиксированные клетки окрашивали бисбензими́дом H33342 (Sigma-Aldrich, США) и рассчитывали число митотических клеток, используя флуоресцентный микроскоп DM 6000 (Leica, Германия). Митотический индекс (MI) определяли по формуле $MI = (P + M + A + T)/N$, где $P + M + A + T$ – сумма всех клеток в фазах: профазы, метафазы, анафазы и телофазы соответственно, и N – общее количество клеток.

Анализ роста клеток. Рост клеток оценивали путем подсчета клеток в разные моменты времени после обработки. Клетки собирали центрифугированием в течение 10 мин при 250 г и промывали PBS. Затем клетки окрашивали 0.4% трипановым синим (Sigma-Aldrich, США) для оценки количества и жизнеспособности клеток. В каждом эксперименте подсчитывали по три образца на группу. Эксперименты выполняли не менее чем в трех повторах.

Электрофорез и Вестерн-блот-анализ. Клетки HL-60 (2×10^5 клеток/мл), обработанные МЕЛ и/или ЦИТ, собирали, дважды промывали охлажденным PBS и лизировали в буфере для лизиса (50 мМ Трис-HCl (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 мМ EDTA, 1 мМ Na₃VO₄ и 1 мМ NaF) с добавлением ингибиторов протеиназы/фосфатазы. Экстракты инкубировали на льду в течение 30 мин и затем центрифугировали при 13000 г в течение 20 мин при 4°C. Супернатанты собирали и количественно определяли концентрацию белка с использованием метода Брэдфорда. Затем супернатанты солибилизировали с помощью буфера для образцов 4× Laemmli (Bio-Rad, США). Для определения уровня митохондриальных белков образцы нагревали до 95°C в течение 5 мин и наносили на гель. Образцы белка разделяли с помощью 12.5% денатурирующего гель-электрофореза (SDS-PAGE) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану при 300 мА в течение 1 ч. Мембрану блокировали в растворе Roti-block (ROTH, Германия) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи, а затем с вторичными антителами, конъюгиро-

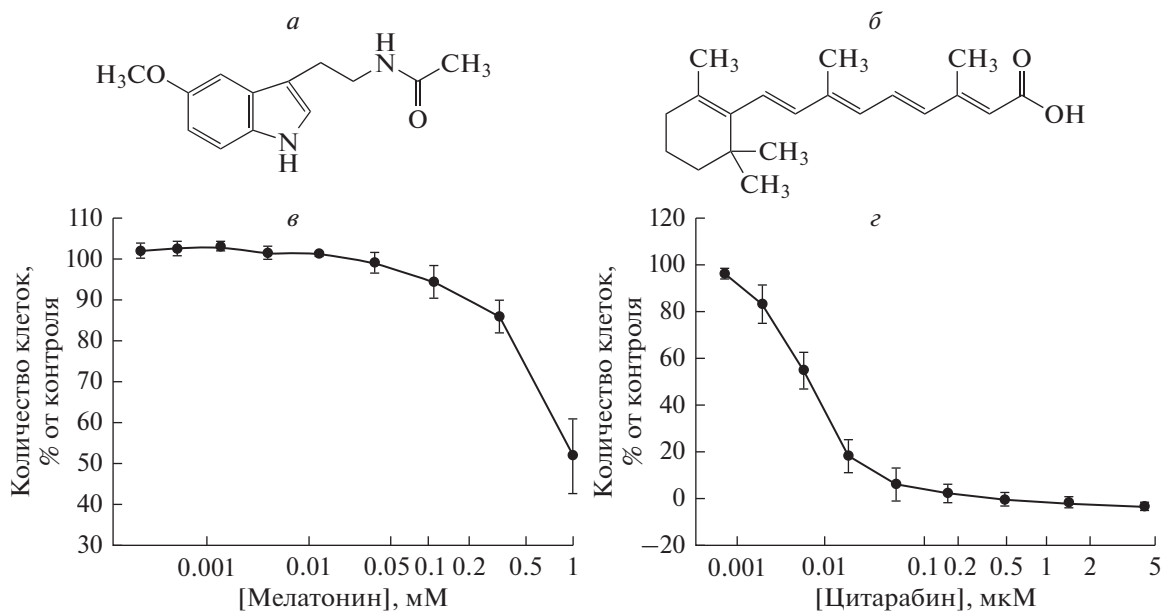


Рис. 1. Химическая структура мелатонина (МЕЛ, *а*) и цитарабина (ЦИТ, *б*). *в*, *г* – Концентрационная зависимость цитотоксических эффектов МЕЛ (*в*) и ЦИТ (*г*). Клетки высевали в 96-луночный планшет с плотностью 5×10^3 клеток на лунку и обрабатывали МЕЛ и ЦИТ в указанных концентрациях в течение 96 ч. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD), вычисленного по результатам 10 отдельных экспериментов.

ваным с пероксидазой хрена (HRP). Поликлональные антитела к TSPO и VDAC1 получены от Abcam (Великобритания), моноклональные антитела к Bcl-2 были из Santa Cruz, США. Антитела к α -тубулину (Cell Signaling, Danvers, MA, США) использовали в качестве контроля белковой нагрузки. Пероксидазную активность определяли хемилюминесцентными реагентами (BioRad, США). Количественный анализ интенсивности белковых полос проводили с помощью денситометрии (программа Image Lab, Bio Rad, США).

Статистический анализ. Все данные представлены как среднее значение \pm SD. Статистическая значимость подтверждена *t*-тестом Стьюдента с использованием программного обеспечения Sigma plot (Systat Software Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ЦИТ как сам по себе, так и в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами широко используется в терапии лейкозов и солидных опухолей [18]. Комбинации препаратов, обладающие синергическим эффектом, обычно улучшают результаты терапии [19]. Понимание механизма действия и метаболизма ЦИТ позволило преодолеть его низкую биодоступность и повысить стабильность, однако негативные эффекты препарата ЦИТ и его токсичность по-прежнему представляют проблему для его применения. Известно, что МЕЛ оказывает благоприятное воздействие,

снижает рост и прогрессию клеток рака печени и поджелудочной железы [20, 21]. В настоящей работе изучено совместное действие МЕЛ и ЦИТ в концентрации, ниже используемой в медицинской практике, на пролиферативную активность клеток HL-60 и изменение экспрессии митохондриальных белков, таких как Bcl-2, VDAC1 и TSPO. Сначала было проанализировано действие различных концентраций МЕЛ и ЦИТ на клетки линии HL-60. ОПЛ клетки обрабатывали МЕЛ в течение 96 ч в различных концентрациях (10^{-3} , 3.3×10^{-4} , 1.1×10^{-4} , 4×10^{-5} , 10^{-5} , 4.1×10^{-6} , 1.4×10^{-5} , 5×10^{-6} , 2×10^{-6} М) и ЦИТ (4.4×10^{-6} , 1.5×10^{-6} , 0.5×10^{-6} , 5.4×10^{-10} , 1.8×10^{-10} , 6×10^{-10} , 2×10^{-10} , 7×10^{-11} М). Нами была выбрана максимальная нетоксичная концентрация ЦИТ – 2 нМ и рабочая концентрация МЕЛ, равная 1 мМ.

Затем мы оценили пролиферативную активность клеток HL-60, обработанных ЦИТ и МЕЛ в течение 96 ч (рис. 2). Рисунок 2*а* показывает прирост клеток в различных условиях относительно контроля. Видно, что количество клеток, обработанных МЕЛ и ЦИТ, снижалось на 50 и 20%, соответственно, по сравнению с контролем (100%). Таким образом, МЕЛ (1 мМ) и ЦИТ в низкой концентрации (2 нМ) оказывают цитостатическое действие на клетки ОПЛ и не влияют на их жизнеспособность. Совместное действие МЕЛ и ЦИТ привело к снижению количества клеток на 70% по сравнению с контролем. При совместном

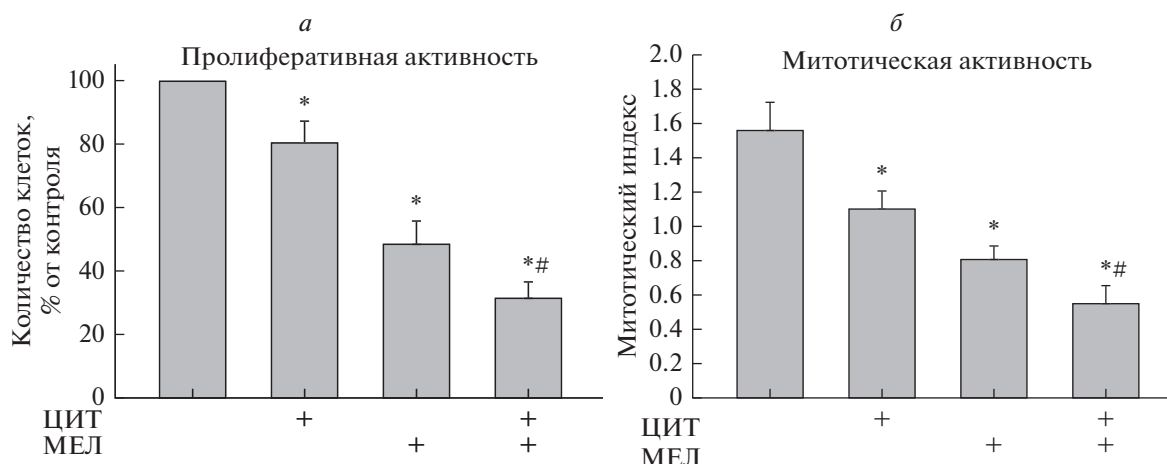


Рис. 2. Совместное влияние МЕЛ и ЦИТ на пролиферацию клеток HL-60. Клетки высевали на чашку с плотностью 200×10^3 клеток и обрабатывали МЕЛ и ЦИТ. Контроль (колонка 1), ЦИТ (колонка 2), МЕЛ (колонка 3), ЦИТ и МЕЛ (колонка 4). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD), вычисленного по результатам 10 отдельных экспериментов. * $p < 0.05$ – достоверное отличие от контрольной величины. # $p < 0.05$ – достоверное отличие от величины, полученной при обработке только МЕЛ.

применении МЕЛ значительно усиливал действие ЦИТ.

Мерой статуса пролиферации клеточной популяции является митотический индекс (МИ), который определяется как отношение количества клеток в фазе митоза к общему количеству клеток. Нами проанализирован МИ клеток в различных условиях. На рис. 2б показано, как влияют МЕЛ и ЦИТ на митотическую активность клеток HL-60. Таким образом, показано, что действие МЕЛ и ЦИТ способствует снижению МИ на ~50 и 25% соответственно. При совместном действии этих веществ МИ снижался на 64% по сравнению с контролем (необработанные клетки) и на 50% по сравнению с МИ при действии только ЦИТ. Эти результаты показывают, что МЕЛ может усиливать противоопухолевое действие ЦИТ в клетках HL-60.

Ранее Кинтана и его соавт. сообщали, что МЕЛ модулирует индукцию апоптоза в клетках лейкоза человека (U937), подвергнутых воздействию гипертермии [22]. Нами определено изменение уровня белка Bcl-2 в наших экспериментальных условиях. На верхней панели рис. 3 приведены Вестерн-блоты Bcl-2 в лизированных клетках ОПЛ (HL-60), обработанных МЕЛ, ЦИТ и МЕЛ + ЦИТ. Количественное изменение уровня белка Bcl-2 показано на рис. 3 (нижняя панель). Количественное соотношение белковых полос оценивали после нормирования белка по α -тубулину. Уровень белка Bcl-2 в клетках HL-60 в присутствии ЦИТ был в 2 раза выше, чем в контрольных условиях. МЕЛ способствовал снижению уровня Bcl-2 на ~45%. Аналогичный результат получен при действии МЕЛ + ЦИТ (снижение

Bcl-2 на ~40%). Интересно, что совместное действие МЕЛ и ЦИТ способствовало снижению повышенного уровня Bcl-2, которое наблюдалось в присутствии только ЦИТ. Возможно, снижение уровня Bcl-2 под действием МЕЛ + ЦИТ снижает клеточный ответ на ЦИТ, активируя тем самым запуск сигнального каскада апоптоза.

Молекулярные взаимодействия VDAC с про- и антиапоптотическими белками наружной митохондриальной мембраны являются многогранными, и они могут как способствовать, так и предотвращать гибель клеток. Митохондриальный VDAC – основной компонент, который можно рассматривать как перспективную мишень для противоопухолевой терапии. Поскольку сообщается, что VDAC инициирует апоптотические сигнальные каскады [23], и VDAC используется как противоопухолевая мишень [24], мы определяли содержание VDAC1 в наших экспериментальных условиях (рис. 4а). В клетках, обработанных ЦИТ, уровень VDAC1 повышался на ~70%. Анализ результатов действия МЕЛ и МЕЛ + ЦИТ показал снижение уровня VDAC1 на ~30 и ~35%, соответственно, что указывает на изменения в регуляции метаболических и энергетических функций митохондрий и дальнейшей выживаемости опухолевых клеток. Как сказано ранее, VDAC в митохондриях может образовывать прочный комплекс с TSPO. Таким образом, TSPO может влиять на проницаемость образованных VDAC каналов и модулировать функции митохондрий. Также известно, что экспрессия TSPO возрастает в различных опухолях, включая опухоли головного мозга и глиому [25–27]. Учитывая сказанное, мы оценили изменение уровня

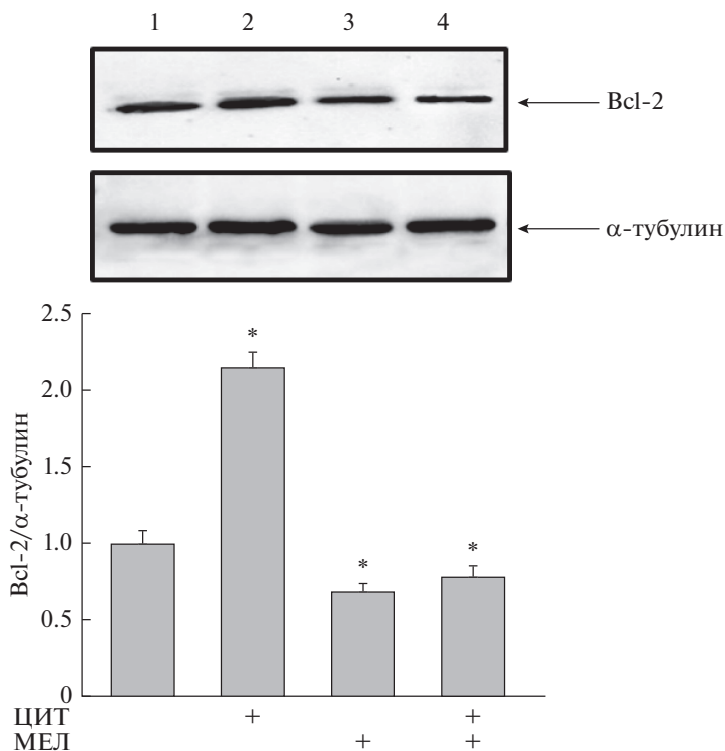


Рис. 3. Комбинированное действие МЕЛ и ЦИТ на уровень белка Bcl-2 в клетках HL-60. Клетки высевали на чашки с плотностью 5×10^5 и обрабатывали МЕЛ (столбец 2), ЦИТ (столбец 3), совместное действие МЕЛ и ЦИТ (столбец 4), контрольные необработанные клетки (столбец 1). Иммунодетекцию α -тубулина использовали в качестве контроля нагрузки. Верхняя часть – иммуноокрашивание Bcl-2 и α -тубулина. Нижняя часть – диаграмма количественного определения иммуноокрашивания с использованием компьютерной денситометрии. Гистограммы представляют уровни белков в относительных единицах. Уровень белка в клеточном лизате без каких-либо добавок принят за единицу и служит контролем. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD), вычисленного по результатам 5 отдельных экспериментов, * $p < 0.05$.

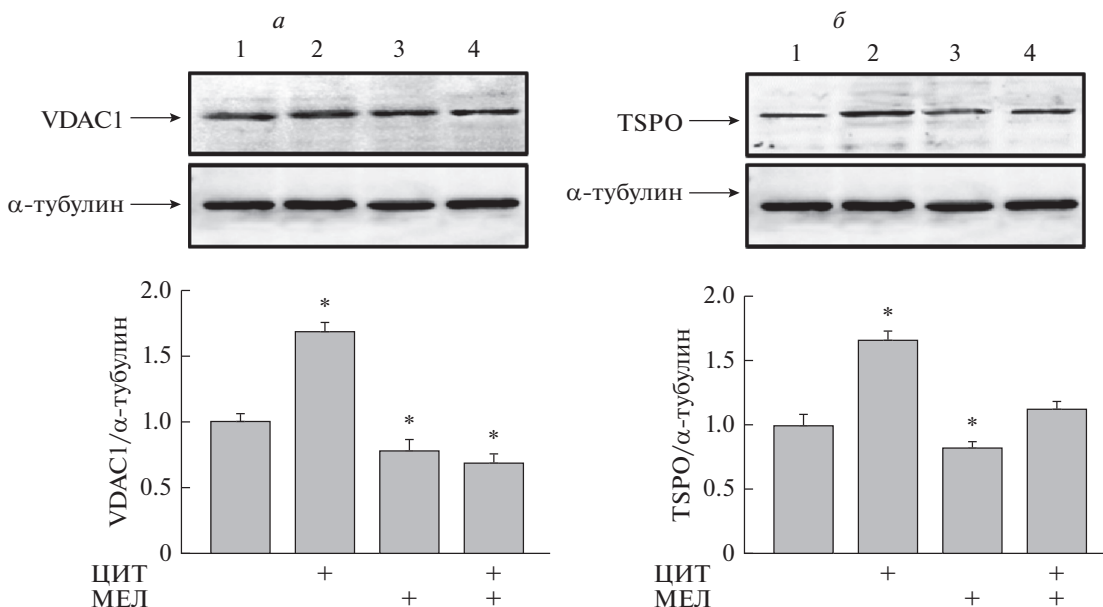


Рис. 4. Комбинированное влияние МЕЛ и ЦИТ на уровень TSPO и VDAC1 в клетках HL-60. Клетки высевали на чашки с плотностью 5×10^5 и обрабатывали МЕЛ (столбец 2), ЦИТ (столбец 3), совместное действие МЕЛ и ЦИТ (столбец 4), контрольные необработанные клетки (столбец 1). Иммунодетекция α -тубулина использована в качестве контроля нагрузки. *a* – Иммуноокрашивание (верхняя часть) и количественное определение (нижняя часть) уровня белка VDAC1. *б* – TSPO. На гистограммах представлены уровни соответствующих белков в относительных единицах. Уровень белка в клеточном лизате без каких-либо добавок принят за единицу и служит контролем. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD), вычисленного по результатам 5 отдельных экспериментов, * $p < 0.05$.

TSPO в наших экспериментальных условиях. На рис. 4б показано, что в присутствии ЦИТ уровень и TSPO, и VDAC1 повышался на ~70%. МЕЛ, напротив, снижал уровень исследуемых белков на ~20%. В случае применения МЕЛ + ЦИТ МЕЛ компенсировал повышение уровня TSPO, вызванное ЦИТ. Следовательно, можно предположить, что МЕЛ способствует снижению экспрессии TSPO в условиях совместного действия с ЦИТ и может вызывать снижение онкогенности.

Таким образом, МЕЛ увеличивал цитостатическое действие ЦИТ в клетках HL-60 и подавлял экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2. Применение МЕЛ способствует усилению действия низкой концентрации ЦИТ, приводя к значительным изменениям пролиферативной и митотической активности клеток HL-60, модели ОПЛ. Экспрессия VDAC1 и TSPO в этих условиях снижалась. В целом, наши результаты показывают, что МЕЛ способен усиливать действие других химиотерапевтических агентов и может использоваться в новых стратегиях терапии рака.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00747.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carlberg C. 2000. Gene regulation by melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 387–396.
2. Stehle J.H., Saade A., Rawashdeh O., Ackermann K., Jilg A., Sebesteny T., Maronde E. 2011. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J. Pineal Res.* **51** (1), 17–43.
3. Bizzarri M., Proietti S., Cucina A., Reiter R.J. 2013. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: A review. *Expert Opin. Ther. Targets.* **17** (12), 1483–1496.
4. Vijayalaxmi, Thomas C.R., Jr., Reiter R.J., Herman T.S. 2002. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J. Clin. Oncol.* **20** (10), 2575–2601.
5. Shiu S.Y. 2007. Towards rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention and treatment. *J. Pineal Res.* **43** (1), 1–9.
6. Pinilla-Ibarz J., Bello C. 2008. Modern approaches to treating chronic myelogenous leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* **10** (5), 365–371.
7. Shah M., Agarwal B. 2008. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). *Indian J. Pediatr.* **75** (8), 831–837.
8. Kantarjian H.M., O'Brien S., Smith T.L., Cortes J., Giles F.J., Beran M., Pierce S., Huh Y., Andreeff M., Koller C., Ha C.S., Keating M.J., Murphy S., Freireich E.J. 2000. Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **18** (3), 547–561.
9. Bayrhuber M., Meins T., Habeck M., Becker S., Giller K., Villinger S., Vornrhein C., Griesinger C., Zweckstetter M., Zeth K. 2008. Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105** (40), 15370–15375.
10. McEnery M.W., Snowman A.M., Trifiletti R.R., Snyder S.H. 1992. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** (8), 3170–3174.
11. Landau M., Weizman A., Zoref-Shani E., Beery E., Wasseman L., Landau O., Gavish M., Brenner S., Nordenberg J. 1998. Antiproliferative and differentiating effects of benzodiazepine receptor ligands on B16 melanoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **56** (8), 1029–1034.
12. Veenman L., Gavish M. 2012. The role of 18 kDa mitochondrial translocator protein (TSPO) in programmed cell death, and effects of steroids on TSPO expression. *Curr. Mol. Med.* **12** (4), 398–412.
13. Wu X., Gallo K.A. 2013. The 18-kDa translocator protein (TSPO) disrupts mammary epithelial morphogenesis and promotes breast cancer cell migration. *PLoS One.* **8** (8), e71258.
14. Beinlich A., Strohmeier R., Kaufmann M., Kuhl H. 2000. Relation of cell proliferation to expression of peripheral benzodiazepine receptors in human breast cancer cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **60** (3), 397–402.
15. Ikezaki K., Black K.L. 1990. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepine. *Cancer Lett.* **49** (2), 115–120.
16. McEnery M.W., Dawson T.M., Verma A., Gurley D., Colombini M., Snyder S.H. 1993. Mitochondrial voltage-dependent anion channel. Immunohistochemical and immunohistochemical characterization in rat brain. *J. Biol. Chem.* **268** (31), 23289–23296.
17. Krestinina O., Fadeev R., Lomovsky A., Baburina Y., Kobyakova M., Akatov V. 2018. Melatonin can strengthen the effect of retinoic acid in HL-60 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (10), 2873.
18. Matsumura I. 2009. Standard therapies for acute myeloid leukemia. *Rinsho Ketsueki.* **50** (10), 1389–1400.
19. Robak T., Wierzbowska A. 2009. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clin. Ther.* **31 Pt 2**, 2349–2370.
20. Fan L.L., Sun G.P., Wei W., Wang Z.G., Ge L., Fu W.Z., Wang H. 2010. Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. *World J. Gastroenterol.* **16** (12), 1473–1481.
21. Leja-Szpak A., Jaworek J., Pierzchalski P., Reiter R.J. 2010. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J. Pineal. Res.* **49** (3), 248–255.
22. Quintana C., Cabrera J., Perdomo J., Estevez F., Loro J. F., Reiter R. J., Quintana J. 2016. Melatonin enhances hyperthermia-induced apoptotic cell death in human leukemia cells. *J. Pineal. Res.* **61** (3), 381–395.
23. Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* **399** (6735), 483–487.
24. Mathupala S.P., Pedersen P.L. 2010. Voltage dependent anion channel-1 (VDAC-1) as an anti-cancer target. *Cancer Biol. Ther.* **9** (12), 1053–1056.

25. Black K.L., Ikezaki K., Santori E., Becker D.P., Vinters H.V. 1990. Specific high-affinity binding of peripheral benzodiazepine receptor ligands to brain-tumors in rat and man. *Cancer*. **65** (1), 93–97.
26. Ferrarese C., Appollonio I., Frigo M., Gaini S. M., Piolti R., Frattola L. 1989. Benzodiazepine receptors and diazepam-binding inhibitor in human cerebral-tumors. *Ann. Neurol.* **26** (4), 564–568.
27. Veenman L., Levin E., Weisinger G., Leschiner S., Spanier I., Snyder S. H., Weizman A., Gavish M. 2004. Peripheral-type benzodiazepine receptor density and *in vitro* tumorigenicity of glioma cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **68** (4), 689–698.

Melatonin Strengthens a Chemotherapeutic Effect of Cytarabin in HL-60 Cells

A. I. Lomovsky¹, Yu. L. Baburina¹, M. I. Kobyakova¹, R. S. Fadeev¹,
V. S. Akatov¹, O. V. Krestinina^{1,*}

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Science,
ul. Institutskaya 3, Pushchio, Moscow oblast 142290 Russia*

**e-mail: ovkres@mail.ru*

We investigated the combined effect of melatonin (MEL) and cytarabin (CYT) at a low concentration on acute promyelocytic leukemia cells HL-60. A combined application of these substances led to a decrease in the number of cells by 70% and in the index of mitotic activity, by 75%. A combined effect of MEL and CYT also contributed to a decrease in the expression of mitochondrial proteins. The mitochondrial isoform of VDAC1 can be a target in the treatment of various tumors. A combined application of MEL and CYT at a low concentration (2 nM) reduced the expression of VDAC1. MEL in combination with CYT exerted a similar effect on the expression of the translocator protein (TSPO) and anti-apoptotic protein Bcl-2. The results show that MEL is able to produce a synergistic effect when combined with CYT, thereby increasing the effectiveness of its antitumor action.

Keywords: melatonin, cytarabine, acute promyelocytic leukemia, apoptosis

УДК 581.1

СВИДЕТЕЛЬСТВА В ПОЛЬЗУ ПРЕИМУЩЕСТВЕННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ КАРТОФЕЛЯ В ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ РЕТИКУЛУМЕ¹

© 2020 г. С. Н. Ломин^а, Е. М. Савельева^а, Д. В. Архипов^а, Г. А. Романов^{а, *, **}

^аИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276 Россия

*e-mail: gar@ippras.ru

**e-mail: gromanov@yahoo.com

Поступила в редакцию 20.04.2019 г.

После доработки 27.07.2019 г.

Принята к публикации 29.07.2019 г.

Цитокинины, классические гормоны растений, узнаются клеткой благодаря рецепторам — гибридным сенсорным гистидинкиназам, мультидоменным трансмембранным белкам. Субклеточная локализация рецепторов во многом определяет характер воздействия гормона на клетку, так и путь трансдукции гормонального сигнала до первичных мишеней. Недавно мы клонировали и исследовали семейство рецепторов цитокининов у картофеля *Solanum tuberosum* L. Два типичных представителя этого семейства, рецепторы StНК2а и StНК4b, были отобраны для изучения их субклеточной локализации. Мы провели фракционирование в двухфазной системе суммарных мембран, выделенных из листьев табака, в которых транзитивно экспрессировали отобранные рекомбинантные рецепторы картофеля, соединенные с GFP-репортером. Были получены две мембранные фракции, одна из которых была обогащена эндоплазматическим ретикуломом (ЭР), другая — плазматической мембраной (ПМ). Содержание StНК2а и StНК4b в каждой из фракций определяли радиолигандным методом. Каждый из рецепторов был выявлен в обеих фракциях, с некоторым перевесом во фракции, обогащенной ЭР (для StНК4b). Поскольку содержание мембран ЭР в клетке значительно превосходит содержание ПМ, основная масса рецепторов должна быть в составе ЭР. Сайты специфического связывания цитокинина были обнаружены и в аналогичных фракциях мембран из корней картофеля. Хотя удельное содержание цитокинин-связывающих сайтов было выше в ПМ, большая часть этих сайтов, т.е. рецепторов в клетке, все же находилась в ЭР. Для того чтобы выяснить, нет ли ограничений функциональной активности у рецепторов в ЭР, был применен недавно предложенный рН-критерий. Согласно этому критерию, рецепторы цитокининов картофеля, как и их ортологи из других видов, настроены на работу в условиях ЭР, но не ПМ. В пользу ЭР свидетельствуют и результаты молекулярного моделирования интерфейса димеризации рецепторов при разных значениях рН. Таким образом, основным местом субклеточной локализации функционально активных цитокининовых рецепторов картофеля является ЭР, хотя существенная доля рецепторов находится и в составе ПМ. При этом вопрос о функциональности рецепторов в ПМ остается открытым.

Ключевые слова: рецептор цитокининов, эндоплазматический ретикулум, плазмалемма, апопласт, молекулярное моделирование, рН-критерий, картофель

DOI: 10.31857/S0233475520010077

ВВЕДЕНИЕ

Характер и значимость функционирования белка в эукариотической клетке во многом зависят от клеточного компартмента, в котором локализуется данный белок. Это в полной мере относится к гормональным рецепторам, субклеточная локализация которых определяет сайты инициации гормонального сигналинга и местоположение ак-

тивного пула гормонов. В этой связи становится понятным то повышенное внимание, которое уделяется проблеме субклеточной локализации белков, особенно таких, которые необходимы для сигналинга гормонов.

Мы изучали субклеточную локализацию рецепторов цитокининов картофеля, крупных трансмембранных белков. Цитокинины — это классические гормоны растений, они регулируют множество процессов, таких, как деление клеток, скорость роста побега и корня, развитие хлоро-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.1134/S0233475520010077 для авторизованных пользователей.

пластов, старение листьев, устойчивость к повреждающим факторам и др. [1]. Рецепторы цитокининов представляют собой сенсорные гибридные гистидинкиназы, гомологичные сенсорным гистидинкиназам бактерий так называемой двухкомпонентной системы передачи сигнала [2]. У бактерий эти белки находятся на мембране клетки и воспринимают сигналы из межклеточного пространства. После открытия рецепторов цитокининов в 2000–2001 гг. возникло представление об их локализации на плазматической мембране (ПМ), видимо, по аналогии с бактериальной клеткой [3–6]. В пользу локализации на ПМ также свидетельствовали биоинформатические оценки [7] и отдельные экспериментальные факты [8].

Однако более основательное изучение свойств рецепторов заставило пересмотреть эти представления. Оказалось, что рецепторы активно связывают гормон, т.е. цитокинин, в условиях нейтрального или слабощелочного значения pH, но резко теряют связывающую способность при снижении pH до 5–5.5 [9–11]. Как известно, такие клеточные компоненты, как ядро, эндоплазматический ретикулум (ЭР), цитозоль, характеризуются слабощелочным pH, близким к нейтральному, тогда как внешняя среда клеток (апопласт) обычно закислена до pH 4.5–6 (ссылки в [12]). Это указывает на то, что локализация сенсорного модуля рецептора на внешней стороне ПМ, как предполагали вначале, неблагоприятна для его функционирования из-за сильного закисления внешней среды, тогда как локализация на внутренних мембранах, например ЭР, снимала бы это ограничение. Последующие прямые опыты, выполненные в основном на арабидопсисе, четко указали на нахождение основной массы цитокининовых рецепторов в составе ЭР [13–15]. Аналогичные данные в пользу преимущественной локализации цитокининовых рецепторов на ЭР были получены на растениях других видов: кукурузы [16], риса [17] и яблони [18]. В то же время появилась статья, авторы которой на основании полученного ими экспериментального, хотя и косвенного, материала утверждали, что активные цитокининовые рецепторы локализуются главным образом на ПМ [19]. Хотя эта работа вызвала серьезную критику [12] и до сих пор не получила независимого подтверждения, она характеризует остроту дискуссии о субклеточной локализации рецепторов цитокининов, которая еще далеко не закончена.

В этой связи мы попытались определить субклеточную локализацию рецепторов у нового для таких исследований вида растений, а именно у картофеля. Недавно рецепторы цитокининов картофеля были клонированы и детально охарактеризованы [11], что создало базу для дальнейше-

го изучения этих белков. Все полученные разными методами результаты свидетельствовали в пользу локализации основного пула активных цитокининовых рецепторов картофеля на мембранах ЭР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмидные конструкции. В работе использованы конструкции для транзientной экспрессии генов рецепторов в листьях табака *Nicotiana benthamiana*, как описано у Lomin *et al.* [11]. Тотальная РНК была получена из растений картофеля сорта Désirée, выращенных *in vitro* на агаризованной среде Мурасиге и Скуга. Эту РНК использовали для синтеза кДНК. Затем на матрице кДНК были амплифицированы кодирующие последовательности генов рецепторов *StHK2a* и *StHK4b*. Для амплификации гена *StHK2a* использовали праймеры 5'-TACAAAAAGCAGGCTTGATGAGCTTTTCTGCTCTGGGTG-3' (*StHK2_attB1*) и ACAAGAAAGCTGGGTAACCTGACCCGAAGAAG (*StHK2_attB2*), предполагаемая длина ампликона *StHK2a* – 3823 пн. Для амплификации гена *StHK4b* использовали праймеры ACTAGTATGGGTGAGAAGATGCAAAGCC (*StHK4_BcuI*) и AGGAATTCCAAGTCTCTTTCAGATGGTATC (*StHK4_EcoRI*), предполагаемая длина ампликона *StHK4* – 2163 пн.

StHK2a был встроен с помощью технологии GATEWAY (ThermoScientific) в плазмиду pB7FWG2 [20]. *StHK4b* был встроен в конструкцию pB7FWG2-АНК3 [10] вместо *АНК3* по сайтам рестрикции *BcuI* и *EcoRI*. В полученных конструкциях ген рецептора был на 5'-конце объединен с конститутивным промотором 35S CaMV, а на 3'-конце – с геном флуоресцентного белка GFP, причем в случае *StHK4b* – через сохранившийся фрагмент 3'-концевой последовательности *АНК3* длиной 804 пн. Затем полученными плазмидными конструкциями трансформировали агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV3101.

Экспрессия генов рецепторов. Трансформацию листьев табака *N. benthamiana* осуществляли согласно Sparkles *et al.* [21]. Для инфильтрации использовали растения возрастом 8 недель. Инфильтрацию проводили смесью клонов *A. tumefaciens*: клона с плотностью OD600 0.035, несущего ген рецептора, и клона с плотностью OD600 0.05, несущего рекомбинантную плазмиду с геном *p19* [22]. Экспрессию целевых генов детектировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager Z2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Листья с выраженной транзientной экспрессией рецепторов использовали для получения мембран. Иммуноблоттинг с антителами против GFP показал, что экспрессируемые рекомбинантные рецепторы обладают массой, близкой к ожидаемой.

Получение мембранных фракций. Все операции проводили при 4°C. Мембранные фракции не-трансенного картофеля выделяли из корней и листьев растений сорта Жуковский ранний возрастом 55 дней, выросших в условиях поля. Листья табака (10 г), экспрессирующие рецепторы цитокининов, или органы (корней или листьев) картофеля, растирали с помощью ступки и пестика в 30 мл буфера гомогенизации 100 мМ Трис-НСl рН 7.6, 0.33 М сахарозы, 10 мМ EDTA, 5 мМ метабисульфата калия, 0.6% PVP K30, 5 мМ дитиотреитола, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида. Полученный гомогенат фильтровали через ткань Miracloth (Calbiochem®). Фильтрат центрифугировали при 10000 g 10 мин, удаляя клеточный дебрис и крупные органеллы. Супернатант далее центрифугировали при 100000 g 30 мин. Последний супернатант удаляли, а осадок мембран тщательно ресуспендировали с помощью стеклянного гомогенизатора до отдельных везикул в фазовом буфере 5 мМ K_2HPO_4/KH_2PO_4 , рН 7.8, 0.33 М сахарозы, 3 мМ KCl, 0.1 мМ EDTA. Аналогично выделяли суммарные мембраны из листьев и корней картофеля. Фракционирование мембран осуществляли в водной полимерной двухфазной системе на основе декстрана 500000 и PEG 3350. Разделение проводили в 36 г раствора при равной концентрации полимеров 7.2% в/в для листьев табака и 6.6% в/в для корней и листьев картофеля. Для этого соответственно 2.59 г или 2.38 г декстрана 500000 и PEG 3350 смешивали с фазовым буфером до общей массы 27 г. Затем к полученной смеси добавляли 9 г суспензии тотальных мембран в фазовом буфере. Полученную смесь перемешивали и разделяли фазы центрифугированием при 3000 g 10 мин в бакет-ротаторе. Далее верхнюю фазу объемом около 18 мл, обогащенную ПМ, переносили в новую пробирку, содержащую 1.224 г KH_2PO_4 и 0.784 г K_2HPO_4 . После растворения солей в содержимом верхней фазы смесь центрифугировали при 3000 g 10 мин в бакет-ротаторе. При этом смесь разделялась на две фазы, а мембраны перемещались в интерфазу. Содержимое интерфазы переносили в новую пробирку и разбавляли 30 мл фазового буфера. 2 мл нижней фазы, содержащей все внутриклеточные мембраны, переносили в новую пробирку и разбавляли 30 мл фазового буфера. Затем полученные смеси центрифугировали повторно при 100000 g 30 мин. Полученные осадки ресуспендировали в 0.5 мл раствора 50 мМ KCl и 10% глицерина. Определяли содержание белка по методу Брэдфорд.

Анализ гомогенности мембранных фракций. Степень гомогенности мембранных фракций проверяли с помощью иммуноблотинга с антителами против белков-маркеров мембран. Маркером ПМ была плазмалеммная H^+ -АТФ-аза, мар-

кером ЭР – белок-шаперон BiP. Мембраны в количестве 7 мкг тотального белка каждой фракции смешивали с буфером нанесения на гель. Образец инкубировали в течение часа при 37°C, затем наносили на 10% полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия (SDS). После электрофореза белки из геля переносили на мембрану из поливинилиденфторида. После этого проводили иммуноблотинг с первичными кроличьими поликлональными антителами против плазмалеммной H^+ -АТФ-азы (Agrisera, AS07 260) при разведении 1 : 600, против BiP (Agrisera, AS09 481) при разведении 1 : 1000 и против GFP (Agrisera, AS15 2987) при разведении 1 : 5000. Инкубацию с антителами проводили в течение 2 ч в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 5% обезжиренного сухого молока. Прочно связанные первичные антитела “проявляли” вторичными козьими антителами против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Millipore, AP132P), в разведении 1 : 30000 в буфере PBS с 5% обезжиренного сухого молока. Активность пероксидазы выявляли с помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad). Люминесценцию детектировали с применением рентгеновской фотопленки CL-XPosure™ Film (ThermoScientific).

Детектирование рецепторов в мембранных фракциях. Рецепторы в мембранных фракциях детектировали по связыванию меченного тритием изопентениладенина ($[^3H]iP$, 17.4 Ки/ммоль) [10, 23]. Реакцию проводили в 0.75 мл PBS с $[^3H]iP$ в концентрации 2.6 нМ (2 пмоль на пробу) с суспензией мембран (25 мкг тотального белка) при температуре 4°C в течение часа. Затем мембраны осаждали при 16000 g в течение 20 мин. Супернатант удаляли, а связанный с мембранами $[^3H]iP$ экстрагировали в 200 мкл этанола в течение 16 ч. Затем экстракт смешивали со сцинтилляционной жидкостью и определяли радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика. Для определения неспецифического связывания инкубацию с $[^3H]iP$ проводили в присутствии большого избытка (10 мкМ) немеченого iP. Специфическое связывание определяли количественно по разнице между тотальным и неспецифическим связыванием. Анализ влияния рН на связывание гормона рецептором был выполнен, как описано ранее [10, 11].

Молекулярное моделирование структуры и взаимодействия сенсорных модулей рецепторов. Молекулярное моделирование белковых структур по гомологии проводили в программе Modeller 9.20 [24] с использованием класса automodel. Шаблоном для моделирования служила кристаллическая структура сенсорного модуля цитокининового рецептора АНК4 (PDB ID: 3T4L) [25]. После

добавления атомов водорода, структуры были минимизированы в программе USCF Chimera 1.13.1 [26] в силовом поле AMBER ff14SB [27]. Стереохимическую достоверность и качество упаковки моделей проверяли в программе ProCheck [28]. Для изучения комплементарности интерфейсов по гидрофобности и электростатическому потенциалу в программе MolSurfer были получены 2D проекции интерфейсов [29] с использованием PQR-файлов, подготовленных с помощью сервера PDB2PQR [30], при различных значениях pH для симуляции среды, характерной для апопласта и ЭР.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В тетраплоидном картофеле сорта Désirée ранее мы идентифицировали шесть рецепторов цитокининов: StНК2a, StНК2b, StНК3a, StНК3b, StНК4a и StНК4b [11]. Целью нашей работы было установить субклеточную локализацию рецепторов цитокининов картофеля на примере белков StНК2a и StНК4b. В каждой паре паралога (a и b) рецепторы очень похожи друг на друга. Поэтому мы ограничились характеристикой одного представителя из каждой из этих двух групп. Что касается рецепторов группы StНК3, то при экспрессии в гетерологичных системах возникли проблемы с детекцией связывания лиганда. Гены анализируемых рецепторов были соединены в векторе с геном флуоресцентного белка GFP, что позволило оценивать экспрессию таких рекомбинантных рецепторов по уровню флуоресценции. Гены рецепторов были транзигентно экспрессированы в листьях табака *N. benthamiana*. На пятый день после инокуляции листьев соответствующим клоном *A. tumefaciens* проводили оценку уровня экспрессии с помощью флуоресцентной микроскопии. Затем из экспрессирующих листьев выделяли суммарную фракцию мембран с помощью дифференциального центрифугирования. Мембраны представляли собой осадок микросом, полученный в результате центрифугирования при 100 000 g. Выделенные микросомы разделяли на фракции, предположительно обогащенные ПМ или внутриклеточными мембранами, с помощью двухфазной полимерной водной системы декстран–полиэтиленгликоль [31]. После этого мембраны концентрировали путем вторичного ультрацентрифугирования. По общему количеству в пересчете на тотальный белок фракция, соответствующая внутриклеточным мембранам, преобладала над фракцией ПМ в среднем в 10–15 раз. Степень фактического обогащения фракций мембранами ПМ и ЭР определяли с помощью иммуноблотинга с антителами против плазмалеммной H⁺-АТФ-азы и белка-шаперона BiP, резидента ЭР. Согласно иммуноблотингу,

плазмалеммная H⁺-АТФ-аза ожидаемо преобладала в верхней фракции, а BiP – в нижней (рис. 1). По нашим оценкам, во фракциях, обогащенных ПМ, содержание H⁺-АТФ-азы превышало такое во фракции внутриклеточных мембран в 3.1 и 2.4 раза в опытах с рецепторами StНК2a и StНК4b соответственно, тогда как во фракциях, обогащенных внутриклеточными мембранами, преобладало содержание маркера BiP (в 3.7 и 2.7 раза в опытах с рецепторами StНК2a и StНК4b соответственно). Наличие цитокининовых рецепторов в мембранных фракциях оценивали по уровню специфического связывания с меченым тритием изопентениладенином. Присутствием эндогенных рецепторов табака можно было пренебречь, так как их специфическое связывание не превышало 5% от общего уровня специфически связанной метки [10]. Тестируемые рецепторы картофеля были обнаружены в обеих фракциях мембран (рис. 1). В случае рецептора StНК2a его удельное содержание (в расчете на 1 мкг белка) во фракциях было примерно равным, тогда как содержание StНК4b было заметно выше в ЭР, чем в ПМ. Известно, что основная масса внутренних мембран клетки относится к мембранам ЭР, поэтому было естественно ожидать присутствия рецепторов именно в ретикулуме. На это же указывали ранее полученные данные конфокальной микроскопии и сахарозных градиентов для рецепторов арабидопсиса [13–15], кукурузы [16], риса [17] и яблони [18]. По-видимому, оба рецептора присутствуют как в ЭР, так и в ПМ, с несколько более высоким удельным содержанием StНК4b в ЭР. Однако, поскольку внутренние мембраны (т.е. ЭР) в общем пуле микросом преобладают [32], то получается, что основная масса рецепторов цитокининов картофеля находится на мембранах ЭР (см. Приложение на сайте www.elibrary.ru).

Следует отметить, что эктопическая экспрессия рецепторов при участии конститутивного промотора в принципе может приводить к артефактной избыточной локализации рецепторов в ЭР. Чтобы проверить эту возможность, мы провели аналогичное двухфазное разделение нативных мембран, выделенных из нетрансгенных зрелых растений тетраплоидного картофеля (сорт Жуковский ранний). Содержание рецепторов в полученных фракциях определяли количественно по связыванию меченого цитокинина [³H]iP. Специфическое связывание метки, характеризующее присутствие эндогенных рецепторов цитокининов, достоверно проявилось у микросом корней, но не листьев (рис. 2). Это качественно соответствовало данным о низком уровне специфического связывания цитокинина микросомами из листьев интактных растений табака ([10], данная работа) и кукурузы [16], причем в послед-

нем случае наблюдалось высокое специфическое связывание меченого цитокина мембранами корней, в отличие от листьев.

Результаты количественных определений связывания [^3H]iP мембранами корней картофеля представлены на рис. 2. Из рисунка следует, что эндогенные рецепторы картофеля локализируются на мембранах обеих фракций, причем удельное связывание гормона фракцией ПМ в 1.8 раза выше, чем фракцией ЭР. Однако расчеты, сделанные с учетом степени гомогенности (чистоты) полученных фракций и соотношения их количеств, привели к выводу, что большая часть рецепторов цитокининов в клетках корней картофеля все же находится в составе ЭР (см. Приложение на сайте www.elibrary.ru). Таким образом, данные на основе интактных корней картофеля качественно вполне соответствуют результатам, полученным при транзientной экспрессии рецепторов картофеля в листьях табака.

Присутствие белка в том или ином компартменте клетки не означает, что он функционирует в этом же компартменте. Особенно это относится к ЭР, через который проходят практически все трансмембранные белки, направляемые затем в разные мембраны клетки. В работе [33] показано, что белок липаза липопротеинов действительно аккумулируется (на 95%) в ЭР и не проявляет там ферментативной активности. Эта липаза активируется лишь после секреции во внеклеточное пространство. В этой связи нельзя исключить того, что цитокининовые рецепторы активны только в составе ПМ, тогда как в составе ЭР они представляют собой некий резервный пул инертных белков.

В случае локализации рецептора на ПМ естественно ожидать, что сенсорный модуль рецептора находится вне клетки, тогда как каталитический и ресиверный (принимающий фосфат и передающий его на фосфотрансмиттер) модули – в цитозоле. Иная топология рецептора не позволит ему выполнять свои функции как инициатора сигналинга фитогормона. Для выполнения той же сигнальной функции в ЭР рецепторы должны быть ориентированы таким образом, чтобы сенсорный модуль выступал в люмен ЭР, а остальная часть рецептора пребывала в цитозоле. Именно такая топология рецептора цитокина в ЭР была подтверждена экспериментально на примере АНК3 [15].

Таким образом, в зависимости от локализации рецептора его сенсорный модуль может находиться либо в кислом растворе апопласта, либо в слабощелочном содержимом ЭР. Рассматриваемые компартменты (ПМ и ЭР) сильно различаются по значениям pH омывающей среды. Поэтому для выбора компартмента функционирова-

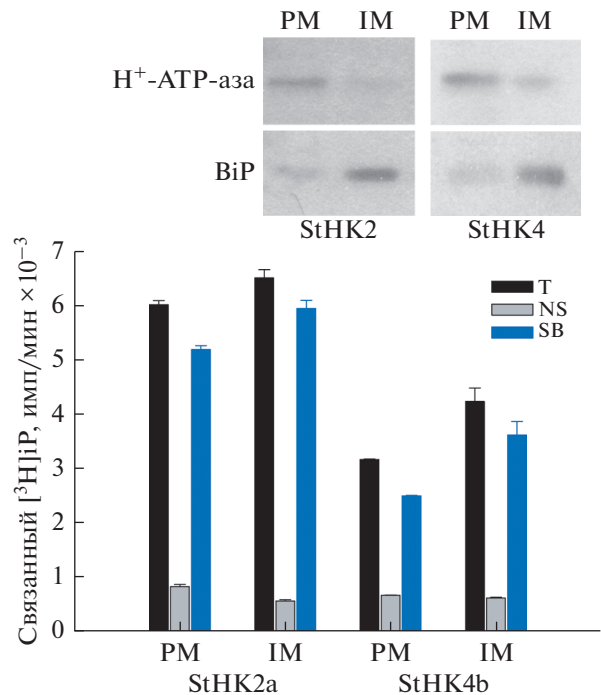


Рис. 1. Связывание меченого цитокина [^3H]iP фракциями мембран табака *N. benthamiana* в результате экспрессии рецепторов цитокининов картофеля StHK2a и StHK4b. Т, NS и SB обозначают тотальное, неспецифическое и специфическое связывание, соответственно; ПМ – плазматическая мембрана; ИМ – внутриклеточные мембраны. Вверху показано распределение специфических маркеров ПМ (H^+ -АТФ-аза) и ЭР (BiP) в полученных фракциях мембран.

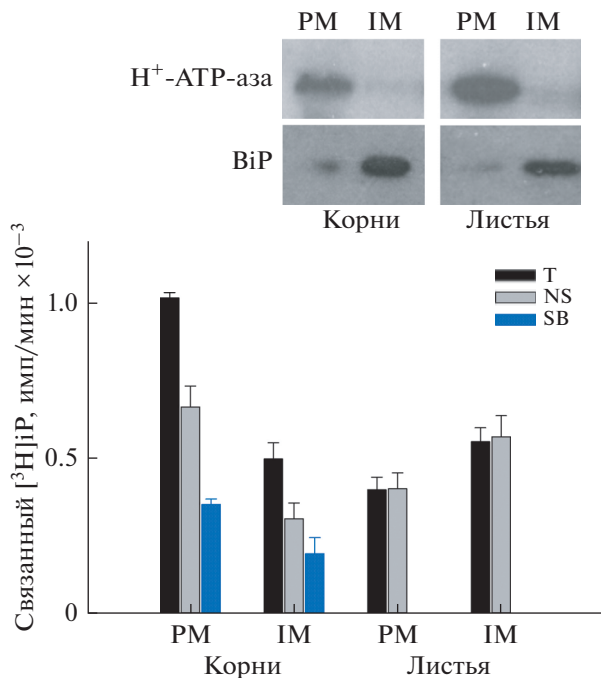


Рис. 2. Связывание меченого цитокина [^3H]iP фракциями мембран из корней и листьев зрелых растений картофеля. Обозначения те же, что на рис. 1.

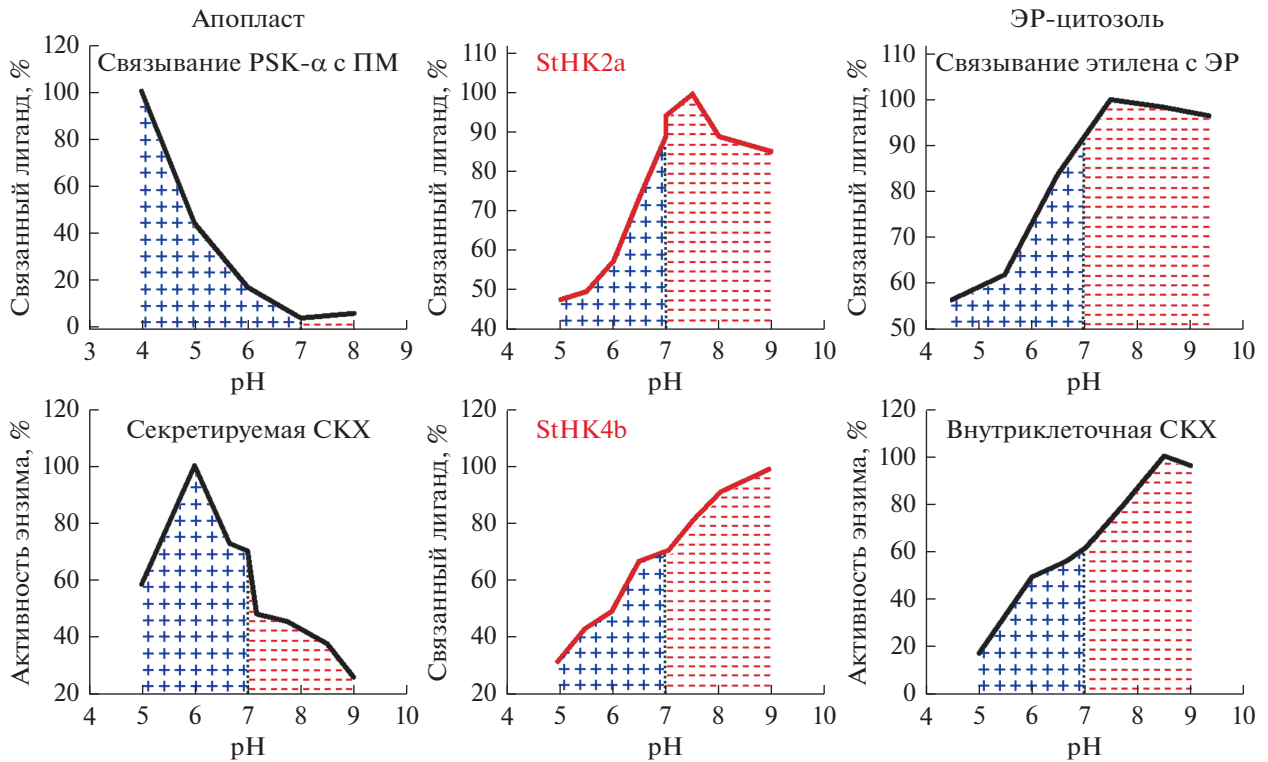


Рис. 3. Кривые pH-зависимости активности белков: в левой колонке – примеры типичных белков, функционирующих в кислой среде апопласта; в правой колонке – типичных белков, функционирующих в слабощелочной среде внутри клетки. PSK- α – фитосульфоксин- α , дисульфатированный пентапептид; ПМ – плазматическая мембрана; СКХ – цитокининоксидаза/дегидрогеназа. Очевидно подобие кривых pH-зависимости активности изучаемых цитокининовых рецепторов картофеля (средняя колонка) аналогичным кривым правой колонки и явное несходство с ходом кривых левой колонки. Соотношение ограниченных кривой pH областей выше/ниже pH 7 на графиках смещено в сторону кислых pH (плюсы) у белков, функционирующих на ПМ и в апопласте, а у белков, функционирующих в ЭР, в том числе у испытуемых рецепторов, смещено, наоборот, в сторону щелочных pH (минусы). Обоснование pH-критерия дано в статье [12].

ния рецепторов картофеля можно применить предложенный недавно pH-критерий [12]. В отличие от прямых методов, позволяющих выявлять физическое присутствие изучаемого белка в том или ином компартменте клетки, pH-критерий дает основание для выбора компартмента, где белок реально функционирует. Это следует из того установленного факта, что практически у всех белков pH-оптимум активности коррелирует с типичными диапазонами pH среды, в которой белок осуществляет свою функцию. Так, для апопласта максимальная активность белков приходится на значения pH в районе 4.5–6 (в основном 5.4 ± 0.5). Что касается белков, функционирующих внутри клетки (в частности, в ЭР), то здесь пик их активности приходится на pH в интервале 7–8 (в среднем 7.8 ± 0.8). Дополнительным критерием служит соотношение площадей под графиками pH-зависимостей (заштрихованы на рис. 3) в щелочной и в кислой областях pH на графиках pH-зависимости связывания. Это простой, но

четкий и наглядный критерий, который ранее уже был применен к рецепторам цитокининов арабидопсиса и кукурузы [12]. Рисунок 3 показывает, что рецепторы картофеля не стали исключением и полностью отвечают критериям функционирования внутри клетки, в компартментах со слабощелочным pH. Для StHK2a максимум активности наблюдался при pH 7.5, а для StHK4b – при pH 9.0, причем в последнем случае пик активности, возможно, еще не был достигнут. Соотношение площадей под графиками pH-зависимостей также полностью соответствует белкам, функционирующим в слабощелочной среде, характерной для цитозоля, ядер и ЭР. На основе всех этих результатов можно заключить, что изучаемые рецепторы картофеля настроены на работу внутри клетки, точнее – в ЭР.

Еще одним pH-зависимым критерием может служить способность рецепторов образовывать совершенные димеры, которые, как полагают [34], необходимы для их нормального функцио-

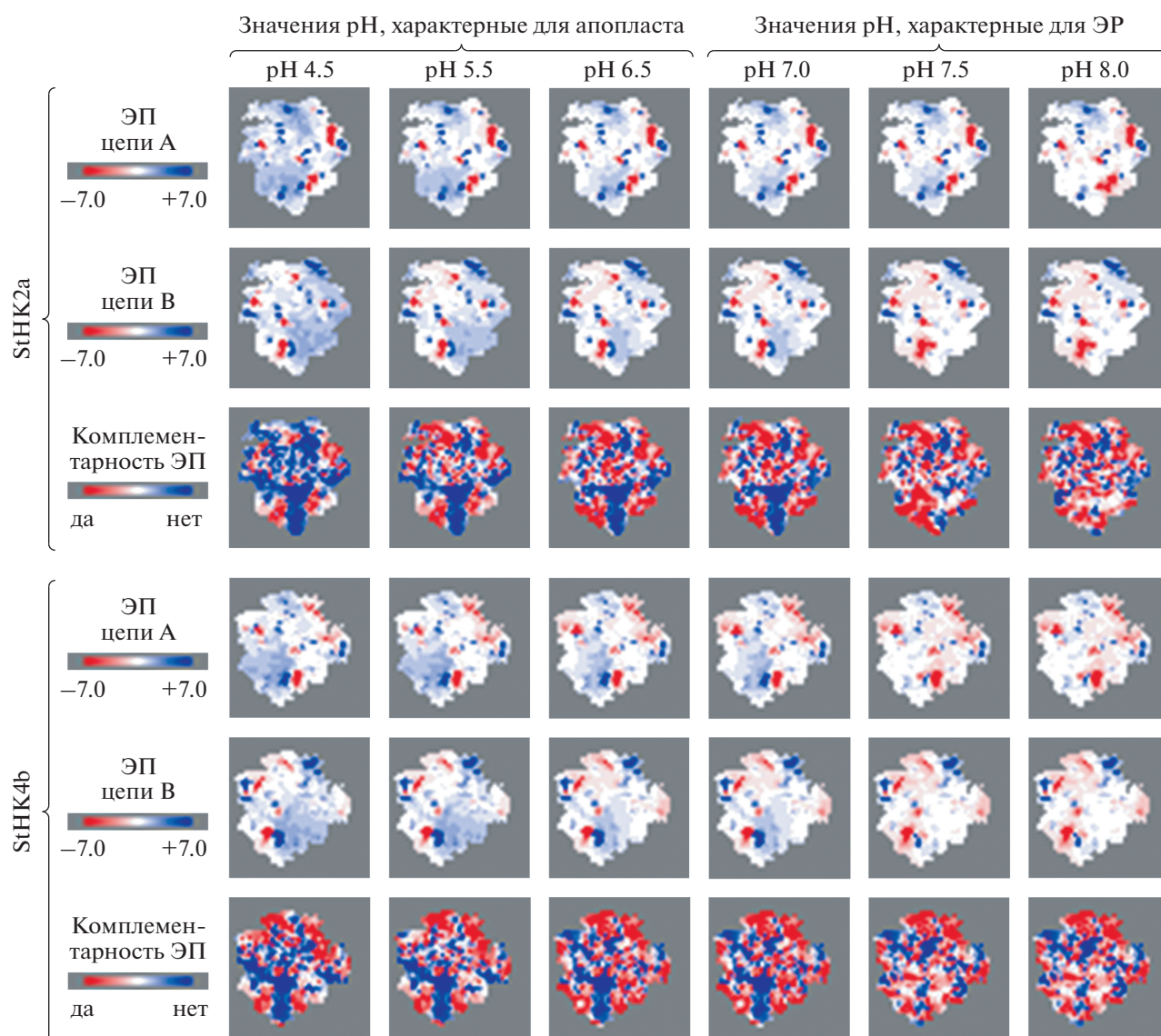


Рис. 4. Визуализация комплементарности взаимодействующих поверхностей сенсорных модулей гомодимеров рецепторов цитокининов картофеля, при имитации разных рН среды. ЭП – электростатический потенциал, определен для областей димеризации каждого из изучаемых рецепторов (ряды 1–2 и 4–5). Третий и шестой ряды демонстрируют зоны комплементарности, рассчитанные на основе сопоставления электростатических паттернов областей контакта гомодимеров рецептора. В этих рядах зоны электростатической комплементарности отмечены красным цветом, а некомплементарности – синим.

нирования. Одна из областей димеризации расположена на сенсорном модуле рецептора. Эта область высококонсервативна, что позволяет паралограм рецепторов образовывать как гомо-, так и гетеродимеры [15]. Ранее с применением методов молекулярного моделирования нами были построены модели 3D-структур рецепторов картофеля [11], в том числе сенсорных модулей в форме мономеров и димеров. Здесь мы попытались оценить с помощью специализированных биоинформатических программ, как влияет рН среды на характеристики димеризационного интерфейса рецепторов.

Расчеты, проведенные с помощью программы Molsurfer, показали, что электростатическая комплементарность поверхностей интерфейса сенсорных модулей рецепторов высока в растворах с рН выше 7 (что характерно для ЭР), но существенно уменьшается при закислении среды ниже рН 7 (что характерно для апопласта) (рис. 4). Степень комплементарности поверхностей интерфейса положительно коррелирует с прочностью образованных димеров, поэтому полученные результаты моделирования также свидетельствуют в пользу функционирования рецепторов цитокининов картофеля в форме димеров в со-

ставе ЭР. Эти результаты соответствуют аналогичным данным для рецептора АНК3 арабидопсиса [35].

В целом, проведенное исследование с белками картофеля подтвердило наличие и возможность функционирования рецепторов цитокининов в составе ЭР. Хотя транзистентную экспрессию рецепторов проводили в листьях другого растения, а именно табака, тем не менее, среду нахождения экспрессируемых рецепторов нельзя считать чужеродной, так как табак является близким родственником картофеля (виды одного семейства пасленовых). Маловероятно, что транспортные системы клетки не справились со своевременной транспортировкой из ЭР рекомбинантного белка из-за его сверхвысокой продукции при временной трансфекции. При экспрессии в аналогичных условиях гомологичной гистидинкиназы АНК1 последняя успевала за считанные дни практически полностью встроиться в ПМ, место своей окончательной субклеточной локализации [13]. Опыты с фракционированием собственных мембран из корней картофеля полностью подтвердили присутствие цитокининовых рецепторов как в ПМ, так и в ЭР. Хотя плотность рецепторов в ПМ оказалась в 1.8 раза выше, чем в ЭР, большая часть общего количества рецепторов в клетках, согласно расчетам (см. Приложение на сайте www.elibrary.ru), все же находилась в составе ЭР. Отсутствие специфического связывания цитокинина мембранами листьев можно объяснить не только низким уровнем экспрессии рецепторов, но и тем, что в листьях превалирует StНК3 [11], который, в отличие от других рецепторов, при выделении мембран может терять способность связывать лиганд.

Проведенные ранее исследования [12] свидетельствуют о том, что основной пул активных рецепторов находится внутри клетки, на мембранах ЭР. Это указывает на важность внутриклеточного пула цитокининов для осуществления сигналинга этих фитогормонов. Особая роль в сигналинге цитокининов может принадлежать рецепторам, расположенным в непосредственной близости к ядру клетки [12, 14, 15]. Однако данная закономерность вовсе не исключает наличия определенной части рецепторов и в составе других мембран клетки, в первую очередь в ПМ, откуда они также могут посылать сигналы внутрь клетки. В этой связи особую значимость приобретают системы транспорта, активации и метаболизации цитокининов, от которых может зависеть соотношение их активных форм в люменах ЭР и в апопласте.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда, проект № 17-74-20181.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kieber J.J., Schaller G.E. 2014. Cytokinins. *Arabidopsis Book*. **12**, e0168.
2. Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Y., Osolodkin D.I., Romanov G.A. 2012. Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae*. **4** (3), 31–45.
3. Mähönen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N., Helariutta Y. 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev*. **14** (23), 2938–2943.
4. Романов Г.А. 2002. Рецепторы фитогормонов. *Физиология растений*. **49** (4), 615–625.
5. Kakimoto T. 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev. Plant Biol*. **54**, 605–627.
6. Ferreira F.J., Kieber J.J. 2005. Cytokinin signaling. *Curr. Opin. Plant Biol*. **8** (5), 518–525.
7. Ueguchi C., Sato S., Kato T., Tabata S. 2001. The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. **42** (7), 751–755.
8. Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103** (3), 814–819.
9. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmölling T. 2006. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J. Exp. Bot*. **57** (15), 4051–4058.
10. Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Y., Arkhipov D.V., Osolodkin D.I., Schmölling T., Romanov G.A. 2015. Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *J. Exp. Bot*. **66** (7), 1851–1863.
11. Lomin S.N., Myakushina Y.A., Kolachevskaya O.O., Getman I.A., Arkhipov D.V., Savelieva E.M., Osolodkin D.I., Romanov G.A. 2018. Cytokinin perception in potato: New features of canonical players. *J. Exp. Bot*. **69** (16), 3839–3853.
12. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmölling T. 2018. Cytokinin signaling: From the ER or from the PM? That is the question! *New Phytol*. **218** (1), 41–53.
13. Caesar K., Thamm A.M., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J., Harter K. 2011. Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot*. **62** (15), 5571–5580.
14. Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A., Schmölling T. 2011. The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol*. **156** (4), 1808–1818.
15. Lomin S.N., Myakushina Y.A., Arkhipov D.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Schmölling T., Romanov G.A. 2018. Studies of cytokinin receptor–phosphotransmitter interaction provide evidences for the initiation of cytokinin signalling in the endoplasmic reticulum. *Func. Plant Biol*. **45** (1–2), 192–202.

16. Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A., Sakakibara H. 2011. Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J. Exp. Bot.* **62** (14), 5149–5159.
17. Ding W., Tong H., Zheng W., Ye J., Pan Z., Zhang B., Zhu S. 2017. Isolation, characterization and transcriptome analysis of a cytokinin receptor mutant OsCKT1 in rice. *Front. Plant Sci.* **8**, 88.
18. Daudu D., Allion E., Liesecke F., Papon N., Courdavault V., Dugé de Bernonville T., Mélin C., Oudin A., Clastre M., Lanoue A., Courtois M., Pichon O., Giron D., Carpin S., Giglioli-Guivarc'h N., Crèche J., Besseau S., Glévarec G. 2017. CHASE-containing histidine kinase receptors in apple tree: From a common receptor structure to divergent cytokinin binding properties and specific functions. *Front. Plant Sci.* **8**, 1614.
19. Zürcher E., Liu J., di Donato M., Geisler M., Müller B. 2016. Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science*. **353** (6303), 1027–1030.
20. Karimi M., Bleys A., Vanderhaeghen R., Hilson P. 2007. Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol.* **145** (4), 1183–1191.
21. Sparkes I.A., Runions J., Kearns A., Hawes C. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat. Protoc.* **1** (4), 2019–2025.
22. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33** (5), 949–956.
23. Сидоров Г.В., Мясоедов Н.Ф., Ломин С.Н., Романов Г.А. 2015. Синтез меченного тритием и дейтерием изопентениладенина. *Радиохимия*. **57** (1), 94–96.
24. Sali A., Blundell T.L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234** (3), 779–815.
25. Hothorn M., Dabi T., Chory J. 2011. Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat. Chem. Biol.* **7** (11), 766–768.
26. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. 2004. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25** (13), 1605–1612.
27. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K. E., Simmerling C. 2015. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11** (8), 3696–3713.
28. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. 1993. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* **26** (2), 283–291.
29. Gabdoulline R.R., Wade R.C., Walther D. 2003. MolSurfer: A macromolecular interface navigator. *Nucl. Acids Res.* **31** (13), 3349–3351.
30. Dolinsky T.J., Nielsen J.E., McCammon J.A., Baker N.A. 2004. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucl. Acids Res.* **32**, W665–W667.
31. Трофимова М.С., Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Ломин С.Н. 2012. Получение плазмалеммы методом разделения микросомальных мембран в водной двухфазной полимерной системе. В сб. *Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений*. М.: БИНОМ, с. 456–466.
32. Morrè D.J., Brightman A.O., Sandelius A.S. 1987. Membrane fractions from plant cells. In: *Biological Membranes: A Practical Approach*. Eds Findlay J.B.C., Evans W.H., Washington, DC: IRL Press, p. 37–68.
33. Scow R.O., Schultz C.J., Park J.W., Blanchette-Mackie E.J. 1998. Combined lipase deficiency (*cld/cld*) in mice affects differently post-translational processing of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase. *Chem. Phys. Lipids*. **93** (1–2), 149–155.
34. Wolanin P.M., Thomason P.A., Stock J.B. 2002. Histidine protein kinases: Key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3** (10), REVIEWS3013.
35. Arkhipov D.V., Lomin S.N., Myakushina Yu.A., Savelieva E.M., Osolodkin D.I., Romanov G.A. 2019. Modeling of protein-protein interactions in cytokinin signal transduction. *Intern. J. Mol. Sciences*, **20** (9), 2096.

Evidences for Preferential Localization of Cytokinin Receptors of Potato in the Endoplasmic Reticulum

S. N. Lomin¹, E. M. Savelieva¹, D. V. Arkhipov¹, G. A. Romanov^{1, *, **}

¹Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

*e-mail: gar@ippras.ru

**e-mail: gromanov@yahoo.com

Cytokinins, classical plant hormones, are recognized by the cell through receptors – hybrid sensor histidine kinases, multidomain transmembrane proteins. The character of the hormonal effect on the cell and the mode of the hormonal signal transduction to the primary targets depends on the subcellular localization of the receptors. Recently, we cloned and investigated a family of cytokinin receptors from a new model plant, potato *Solanum tuberosum* L. Two typical representatives of this family, StHK2a and StHK4b, were selected to study their subcellular localization. In the current study, total membranes isolated from tobacco leaves were

fractionated by aqueous two phase partitioning, in which the selected recombinant potato receptors fused to GFP-reporter were transiently expressed. Two membrane fractions were obtained, one tentatively enriched with endoplasmic reticulum (ER) membranes and the other, with plasma membrane (PM). The content of StHK2a and StHK4b in each fraction was determined by the radioligand method. Both receptors were detected in the two fractions, with a slight predominance of StHK4b in the ER fraction. Given that the content of ER membranes in the cell is markedly higher than the content of PM, the bulk of the receptors should be attributed to the ER. Specific cytokinin-binding sites were detected in the analogous membrane fractions from potato roots. Although the specific content of the cytokinin-binding sites was 1.8-fold higher in the PM, the main part of these sites, i.e., cellular receptors, still resided in the ER. In order to find out whether the receptors in the ER are functional, a recently proposed pH criterion was applied. According to this criterion, potato cytokinin receptors, like their orthologs from other species, seem to be tuned for functioning in ER but not in PM. The results of molecular modeling of the dimerization interface of the receptors at different pH values also evidenced in favor of the ER. Thus, the main site of subcellular localization of the functionally active potato cytokinin receptors is the ER, although a certain amount of the receptors resides within the PM, too. The question of the functional role of PM-located receptors remains open.

Keywords: cytokinin receptor, endoplasmic reticulum, plasma membrane, apoplast, molecular modeling, pH criterion, potato

УДК 57.017.642,577.175.82

ВЛИЯНИЕ ГАЛОПЕРИДОЛА И ЦИПРОГЕПТАДИНА НА ЦИТОСКЕЛЕТ ДРОБЯЩИХСЯ ЗАРОДЫШЕЙ МОРСКОГО ЕЖА

© 2020 г. Д. А. Никишин^{a, b, *}, Л. А. Мальченко^a, И. Милошевич^c,
Л. Ракич^d, Ю. Б. Шмуклер^a

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

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия

^cИнститут биологии моря, Доброта, 85330 Черногория

^dСербская академия наук и искусств, Белград, 11000 Сербия

*e-mail: denisnikishin@gmail.com

Поступила в редакцию 15.04.2019 г.

После доработки 07.08.2019 г.

Принята к публикации 15.08.2019 г.

Ранние эмбрионы морских ежей обладают чувствительностью к агонистам и антагонистам рецепторов нейротрансмиттеров, как метабо-, так и ионотропных. В данной работе исследованы механизмы цитостатического действия ципрогептадина и галоперидола – антагонистов серотониновых 5HT₂-рецепторов и дофаминовых D₂-рецепторов соответственно – на модели блокады первого деления дробления морского ежа, позволяющей количественно оценить эффекты эмбриотоксических веществ. Эффект галоперидола и ципрогептадина опосредован влиянием на элементы цитоскелета. Оба антагониста вызывают увеличение степени полимеризации актинового цитоскелета, причем эффект наблюдается как в кортикальном слое, так и в цитоплазме. Кроме того, оба антагониста влияют на тубулиновый цитоскелет, причем если галоперидол преимущественно вызывает нарушения пространственной организации веретена деления, то ципрогепталин приводит к полной деполимеризации тубулина и прекращению митотических процессов. По всей вероятности, цитостатическое действие антагонистов дофамина и серотонина на дробящиеся зародыши морских ежей основано на сходных и/или пересекающихся молекулярных механизмах, которые требуют дальнейших исследований.

Ключевые слова: галоперидол, ципрогептадин, морской еж, цитоскелет, актин, тубулин

DOI: 10.31857/S0233475520020085

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин и дофамин хорошо известны как классические донервные трансмиттеры, которые выполняют большое количество регуляторных функций в эмбриогенезе. Наличие функционально активных серотониновой и дофаминовой систем показано на ранних стадиях эмбрионального развития, задолго до появления первых нервных клеток, у широкого ряда видов [1]. Классическими объектами исследования донервных функций нейротрансмиттеров являются морские ежи, для ранних эмбрионов которых показана высокая чувствительность к нейрофармакологическим препаратам [2]. Описаны некоторые механизмы их действия, связанные с активностью сигнальных каскадов метаболитных и ионотропных рецепторов и влиянием на механизмы клеточного деления, межбластомерные взаимодействия, состояние цитоскелета и ресничную активность [1, 3]. Ранние эмбрионы морских ежей обладают чувствительностью к агонистам и

антагонистам серотониновых, дофаминовых, ад-ренергических рецепторов, причем эти эффекты являются специфическими, поскольку ослабляются или устраняются самими трансмиттерами или их агонистами [4]. Однако специфичность эффектов, опосредованных рецепторами, в данном случае необходимо оценивать с учетом того, что фармакологические свойства рецепторов морских ежей могут довольно существенно отличаться от таковых млекопитающих. Ранее нами показано, что на всех стадиях развития морского ежа *Paracentrotus lividus* от ооцита до плутеуса экспрессируется ген, гомологичный дофаминовому рецептору D₂, а также несколько генов, аннотированных как гомологи серотониновых рецепторов [4]. Изучены некоторые компоненты сигнальных цепей донервных трансмиттеров в ранних эмбрионах морских ежей, в частности, показано, что эти механизмы включают аденилатциклазную систему и фосфатидил-инозитольный путь, включая изменение внутриклеточной концентра-

ции свободных ионов кальция [5, 6]. Существуют данные, свидетельствующие о том, что различные элементы цитоскелета являются конечными звеньями этих сигнальных цепей [3, 7]. В данной работе исследовано влияние антагонистов серотониновых и дофаминовых рецепторов на состояние актинового и тубулинового цитоскелета на модели блокады первого деления дробления морского ежа [8], позволяющей количественно оценить эффекты эмбриотоксических веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу с эмбрионами морского ежа *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), выловленными в заливе Траште Адриатического моря, проводили в Институте биологии моря (Доброта, Черногория). Содержание морских ежей, получение гамет и проведение искусственного оплодотворения проводили в соответствии со стандартными процедурами [9]. Через 5 мин после оплодотворения регистрировали отделение оболочки оплодотворения, в экспериментах использовали только качественный эмбриональный материал с процентом оплодотворения более 95%. Эксперименты на модели блокады первого деления дробления проводили согласно описанному ранее протоколу [8]. Действующие вещества – гидрохлорид галоперидола (0931 Tocris Bioscience, США), гидрохлорид ципрогептадина (С6022 Sigma Aldrich, США) – добавляли в необходимой концентрации через 10 мин после оплодотворения. Через 40 мин после оплодотворения производили фоторегистрацию с использованием инвертированного светового микроскопа Opton (Carl Zeiss, Германия) и цифровой окулярной насадки DCM130 (Scopetek, Китай), после чего на фотографиях, содержащих не менее 100 эмбрионов на группу, производили подсчет доли эмбрионов, завершивших деление дробления (% Clv). Для построения концентрационной зависимости проведено 8 экспериментов. Аппроксимацию экспериментальных данных и определение IC_{50} проводили в программе GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США) с применением модели четырех-параметрической кривой зависимости эффекта от дозы (4PL):

$$Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X) \text{HillSlope}}} \quad [10].$$

Зародыши, полученные в результате воздействия минимальных блокирующих концентраций, были фиксированы 4% параформальдегидом при 4°C в течение 16 ч и хранились в PBS с 0.05% азидом натрия до последующего иммуноцитохимического анализа. Фибриллярный актин окрашивали фаллоидином, конъюгированным с Alexa Fluor 546 (A12380 Invitrogen, США), микротрубочки выявляли иммуноокрашиванием с использованием мышиных моноклональных анти-

тел против тубулина (Т6793 Sigma-Aldrich, США) и козьих антител против мышиных иммуноглобулинов, конъюгированных с Alexa Fluor 488 (ab150113 Abcam, Великобритания), а ДНК окрашивали красителем Hoechst 33342 (40046 Biotium, США). Полученные препараты заключали в среду Fluoroshield (ab104135 Abcam, Великобритания) и просматривали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FV10i (лаборатория конфокальной микроскопии ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова). Срединные оптические срезы, полученные при одинаковых параметрах интенсивности облучения и чувствительности детектора, использовали для анализа состояния выявленных компонентов цитоскелета с применением программного пакета Fiji [11]. Количественная оценка распределения фибриллярного актина вдоль радиальной оси бластомеров проводилась по всей окружности клеток с помощью плагина Clock Scan [12], каждый график построен по усредненным значениям, полученным на 10 эмбрионах. Статистическую обработку всех данных проводили в программе GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На модели блокады первого деления дробления морского ежа были проведены эксперименты, уточняющие зависимость эффектов галоперидола и ципрогептадина от концентрации, продемонстрированную в предыдущих работах [4]. На рис. 1 представлены графики зависимости эффекта от концентрации антагонистов в диапазоне от 10 до 100 мкМ, полученные с применением модели четырехпараметрической кривой зависимости эффекта от дозы [13]. Статистически значимый эффект антагониста D_2 -подобных рецепторов галоперидола проявляется при концентрации 25 мкМ и составляет в среднем 27.1% дробящихся зародышей. При этом, согласно модели, IC_{50} для галоперидола составляет 21.14 мкМ. Минимальная концентрация антагониста серотониновых рецепторов 2-го типа ципрогептадина, вызывающая статистически значимый эффект, составляет 75 мкМ (средний процент дробления 32.9%), тогда как IC_{50} равна 59.99 мкМ. Установленные минимальные действующие концентрации исследуемых антагонистов согласуются с ранее полученными данными [4] и были использованы в последующих экспериментах. Следует отметить, что чувствительность зародышей к антагонисту дофаминовых рецепторов галоперидолу оказалась почти в 3 раза выше, чем к антагонисту рецепторов серотонина ципрогептадину.

Для выявления механизмов цитостатического воздействия антагонистов мембранных трансмиттерных рецепторов были проведены повторные эксперименты по воздействию минималь-

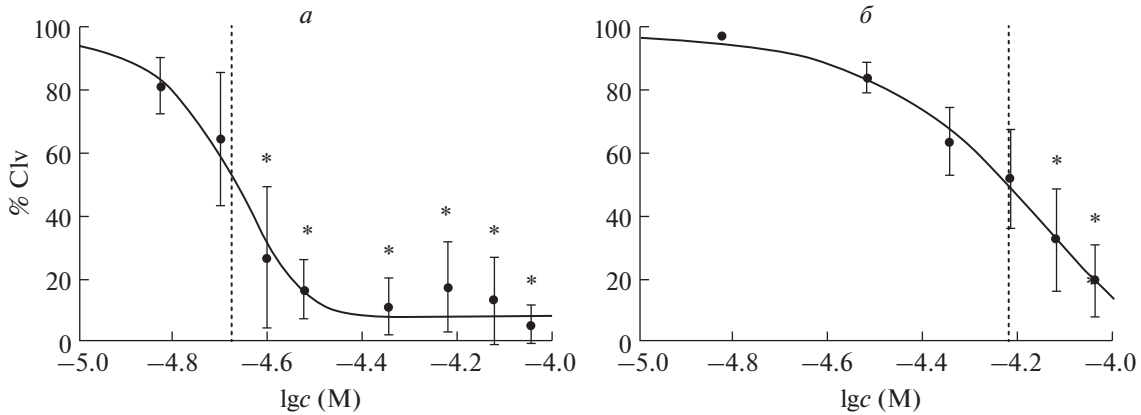


Рис. 1. Концентрационная зависимость эффектов галоперидола (а) и ципрогептадина (б) на модели блока первого деления дробления морского ежа *P. lividus*. % Clv – доля эмбрионов, завершивших первое деление дробления. $M \pm SEM$, * – $p < 0.05$ по критерию Данна. Пунктиром обозначена IC_{50} .

ных блокирующих концентраций дофамина и ципрогептадина на дробящиеся зародыши с последующим иммуноцитохимическим исследованием состояния цитоскелета. Галоперидол в концентрации 25 мкМ вызывает блокаду делений дробления (рис. 2б). В таких зародышах наблюдается некоторое увеличение толщины кортикального актинового цитоскелета и появление в цитоплазме гранул полимеризованного актина (рис. 2л, 2о). Количественная оценка распределения актина по радиальной оси зародыша (рис. 3а) показала, что при воздействии галоперидола происходит достоверное увеличение количества фибриллярного актина как в составе цитокортекса (рис. 3в), так и в цитоплазме (рис. 3г). Наблюдаемый эффект согласуется с литературными данными о влиянии трансмиттеров на цитоскелет зародышей морских ежей, из которых следует, что дофамин и антагонисты серотониновых рецепторов уменьшают, а серотонин и антагонисты дофаминовых рецепторов увеличивают жесткость кортикального слоя зигот морских ежей [3, 7]. Эти факты свидетельствуют о негативном влиянии D_2 -подобного рецептора на полимеризацию актина и механические параметры цитокортекса, играющие важную роль в процессе дробления. При иммуногистохимическом окрашивании микротрубочек в зародышах, инкубированных в галоперидоле, выявляются значительные нарушения организации тубулинового цитоскелета – отсутствие периферических микротрубочек, асимметричное митотическое веретено (рис. 2з), а также нарушение расхождения хромосом, приводящее к появлению микроядер (рис. 2д). Полученные данные свидетельствуют о возможной роли D_2 -подобного рецептора в поддержании правильной организации структур митотического веретена у дробящихся зародышей морского ежа.

При воздействии ципрогептадина в концентрации 75 мкМ на зиготы морского ежа происходит блокада первого деления дробления (рис. 2в). В таких зародышах наблюдается появление в цитоплазме гранул и многочисленных хаотично ориентированных коротких актиновых филаментов (рис. 2м, 2п). Анализ распределения фибриллярного актина вдоль радиальной оси зародыша (рис. 3б) выявил достоверное увеличение степени полимеризации актина как в цитоплазме (рис. 3з), так и в кортикальном слое (рис. 3в). Общее содержание выявленного иммуногистохимически тубулина у интактных и обработанных ципрогептадином зародышей не отличается. В то же время тубулиновый цитоскелет в зародышах, инкубированных с ципрогептадином, полностью деполимеризован (рис. 2и). Кроме того, в зародышах отсутствуют признаки кариотомии (рис. 2е), что свидетельствует о критическом воздействии ципрогептадина на самые ранние фазы первого клеточного цикла.

Таким образом, получены данные, свидетельствующие о том, что цитостатический эффект антагонистов рецепторов дофамина и серотонина на дробящиеся зародыши морского ежа связан с влиянием на элементы цитоскелета. Оба антагониста вызывают увеличение степени полимеризации актинового цитоскелета, причем эффект наблюдается как в кортикальном слое, так и в цитоплазме. Кроме того, оба антагониста влияют на тубулиновый цитоскелет, причем если галоперидол преимущественно вызывает нарушения пространственной организации веретена деления, то ципрогептадин приводит к полной деполимеризации тубулина и прекращению митотических процессов.

Анализ концентрационной зависимости цитостатического эффекта антагонистов показал, что зародыши морского ежа почти в 3 раза более чувствительны к антагонисту D_2 рецепторов галопе-

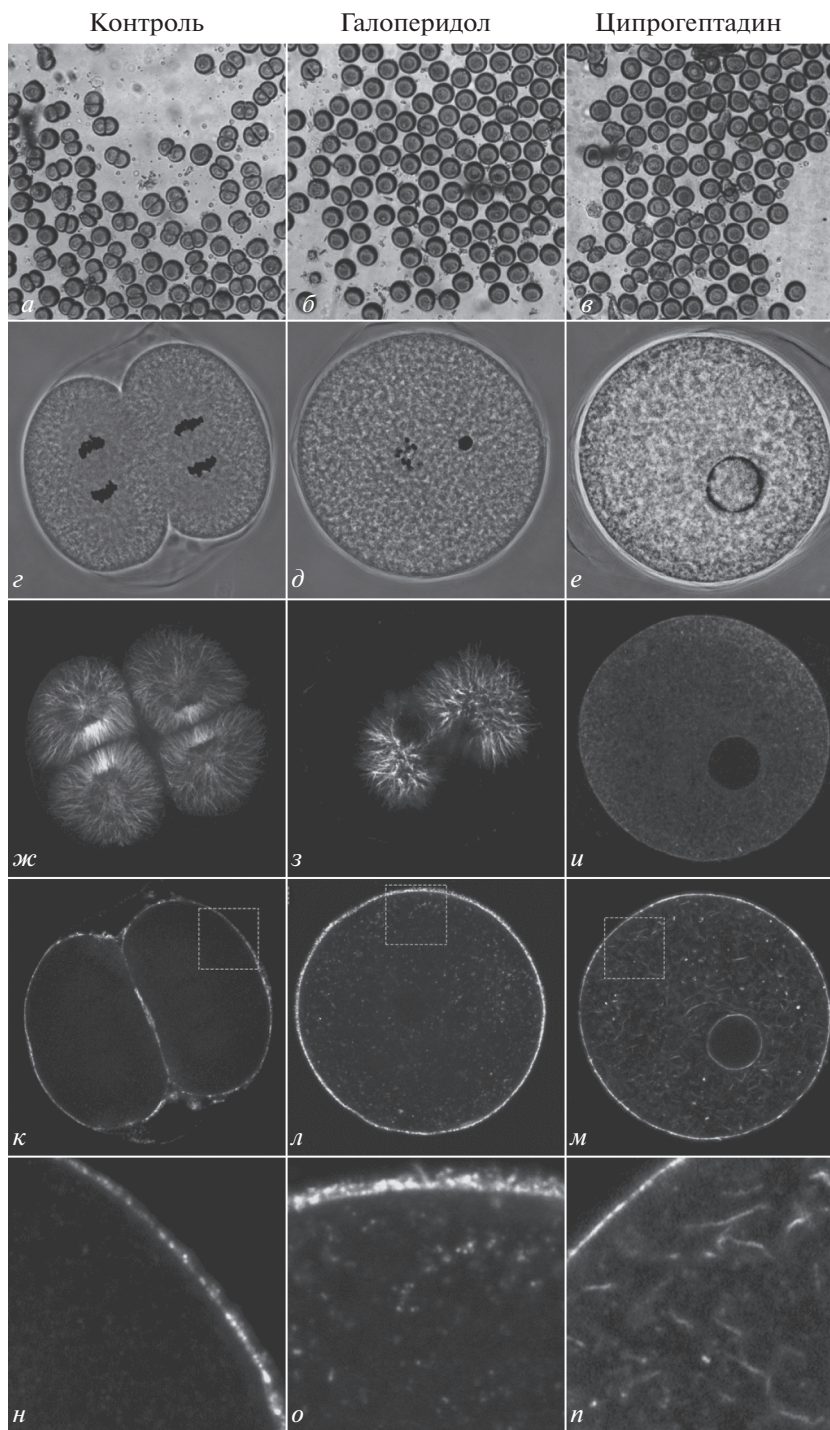


Рис. 2. Влияние галоперидола и ципрогептадина на цитоскелет дробящихся зародышей морского ежа *P. lividus*. Оптическая микроскопия (а–в), фазово-контрастная микроскопия, совмещенная с инвертированным флуоресцентным окрашиванием ДНК (г–е), иммунофлуоресценция тубулинового цитоскелета (ж–и), флуоресцентное мечение F-актина (к–п). Контроль (а, г, ж, к, н), галоперидол 25 мкМ (б, д, з, л, о), ципрогептадин 75 мкМ (в, е, и, м, п).

ридолу, чем к антагонисту рецепторов серотонина 5HT₂ ципрогептадину. В опубликованных ранее работах показано, что цитостатический эффект используемых веществ ослабляется в присутствии самих транмиттеров, причем эффек-

тивность дофамина, серотонина и адреналина, а также их липофильных аналогов сопоставима [4]. В нашей работе мы не выявили эффектов самих транмиттеров на деления дробления и состояние цитоскелета. При этом ципрогептадин и галопе-

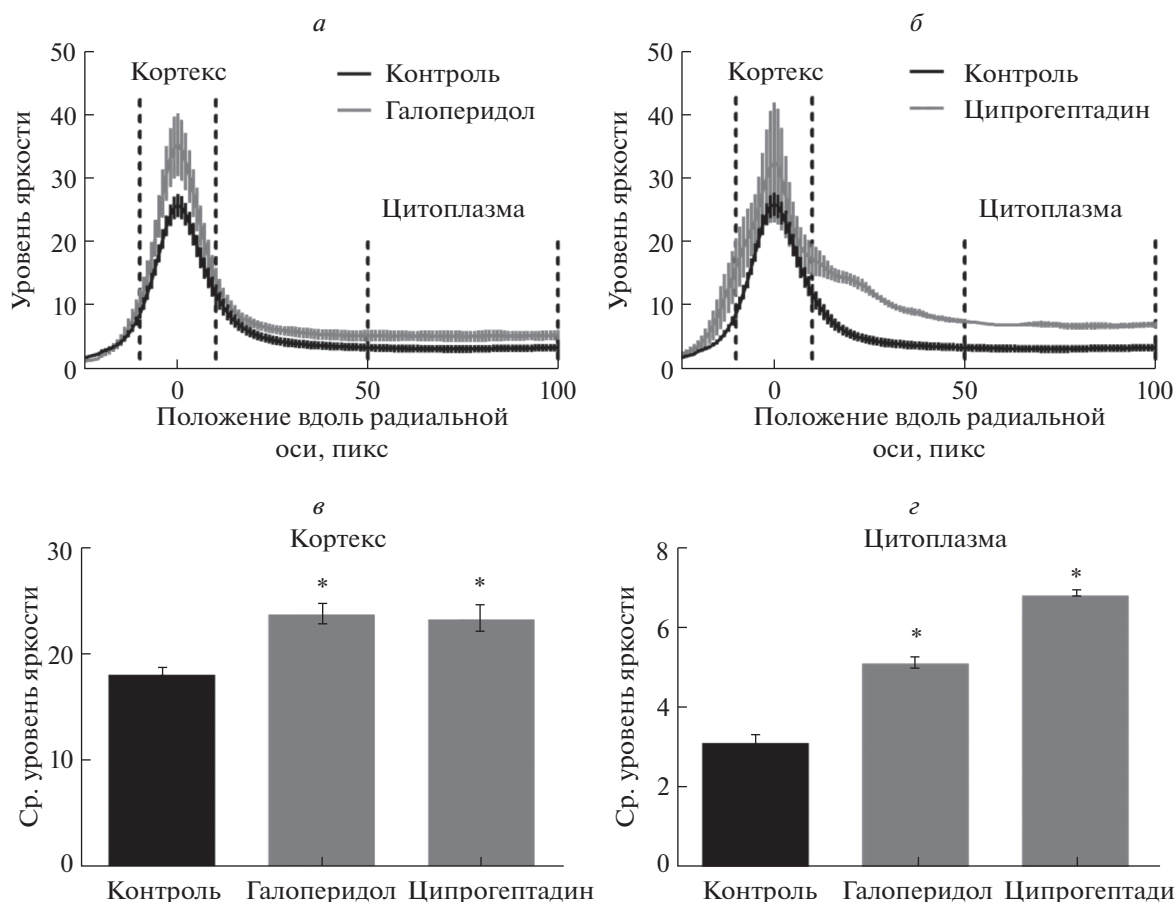


Рис. 3. Количественный анализ эффектов галоперидола (25 мкМ) и ципрогептадина (75 мкМ) на цитоскелет дробящихся зародышей *P. lividus*. Изменение распределения фибриллярного актина вдоль радиальной оси зародышей, инкубированных в присутствии ципрогептадина (а) и галоперидола (б). Количественная оценка степени полимеризации актина в составе цитокортекса (в) и в цитоплазме (г). $M \pm SEM$, * – $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни.

ридол влияют на состояние микрофиламентов сходным образом, что говорит о возможных перекрестных механизмах серотонин- и дофаминергических сигнальных путей в регуляции ранних стадий развития. Одним из вероятных ключевых звеньев в этих процессах является метаботропный рецептор, гомологичный D_2 -рецептору, экспрессия которого показана на ранних стадиях развития *P. lividus* начиная с зиготы [4]. Различное влияние галоперидола и ципрогептадина на состояние тубулинового цитоскелета, по всей вероятности, связано с различиями механизмов трансдукции сигнала, запускаемых D_2 -подобными и 5-HT₂-подобными рецепторами. В первом случае при воздействии антагониста происходит активация сАМР-сигнального каскада. Известно, что галоперидол способен выступать в качестве дезорганизатора тубулинового цитоскелета, воздействуя на активность киназ PKA и Akt [14] и эффекторные белки Tau [15], Aurora A [16] и KSP/Eg5 [17]. В случае же ципрогептадина происходит блок PKC-сигнального каскада, также играющего важную роль в стабилизации как акти-

нового, так и тубулинового цитоскелета [18]. По всей вероятности, цитостатическое действие антагонистов дофамина и серотонина на дробящиеся зародыши морских ежей основано на сходных и/или пересекающихся молекулярных механизмах, которые требуют дальнейших исследований.

Исследование выполнено Н.Д.А., М.Л.А. и Ш.Ю.Б. с использованием оборудования ЦКП Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН при поддержке Российской академии наук и Сербской академии наук и искусств (совместная программа “Neurotransmitters – Ontogenetic and Neurobiological Aspects”) в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № 0108-2019-0003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бузников Г.А. 1987. *Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе*. М.: Наука. 232 с.
2. Buznikov G.A., Nikitina L.A., Rakić L.M., Milosević I., Bezuglov V.V., Lauder J.M., Slotkin T.A. 2007. The sea urchin embryo, an invertebrate model for mammalian developmental neurotoxicity, reveals multiple neurotransmitter mechanisms for effects of chlorpyrifos:

- therapeutic interventions and a comparison with the monoamine depleter, reserpine. *Brain Res. Bull.* **74** (4), 221–231.
3. Бузников Г.А., Григорьев Н.К. 1990. Эффект био-генных моноаминов и их антагонистов на кортикальный цитоплазматический слой у ранних зародышей морских ежей. *Журн. эвол. биохим. и физиол.* **26**, 614–622.
 4. Nikishin D.A., Milošević I., Gojković M., Rakić L., Bezuglov V.V., Shmukler Y.B. 2016. Expression and functional activity of neurotransmitter system components in sea urchins' early development. *Zygote*. **24**, 206–218.
 5. Buznikov G.A., Marshak T.L., Malchenko L.A., Nikitina L.A., Shmukler Yu.B., Buznikov A.G., Rakić Lj., Whitaker M.J. 1998. Serotonin and acetylcholine modulate the sensitivity of early sea urchin embryos to protein kinase C activators. *Comp. Biochem. Physiol.* **120A** (2), 457–462.
 6. Shmukler Yu.B., Buznikov G.A., Whitaker M.J. 1999. Action of serotonin antagonists on cytoplasmic calcium level in early embryos of sea urchin *Lytechinus pictus*. *Int. J. Dev. Biol.* **42** (3), 179–182.
 7. Григорьев Н.Г. 1988. Кортикальный слой цитоплазмы – возможное место действия донервных трансммитеров. *Журн. эвол. биохим. и физиол.* **24** (5), 625–629.
 8. Григорьев Н.Г., Шмуклер Ю.Б. 1984. О роли ионных градиентов клеточной мембраны в раннем развитии зародышей морских ежей. *Докл. АН СССР.* **274** (2), 464–466.
 9. Бузников Г.А., Подмарев В.И. 1975. Морские ежи *Strongylocentrotus drobachiensis*, *S. nudus*, *S. intermedius*. В кн.: *Объекты биологии развития*. Ред. Детлаф Т.А. М.: Наука, с. 188–216.
 10. Bindslev N. 2017. *Drug-Acceptor Interactions*. London: CRC Press. 428 p.
 11. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* **9** (7), 676–682.
 12. Dobretsov M., Petkau G., Hayar A., Petkau E. 2017. Clock scan protocol for image analysis: ImageJ plugins. *J. Vis. Exp.* (124), e55819.
 13. Giraldo J., Vivas N.M., Vila E., Badia A. 2002. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models. *Pharmacol. Ther.* **95** (1), 21–45.
 14. Bowling H., Santini E. 2016. Unlocking the molecular mechanisms of antipsychotics – a new frontier for discovery. *Swiss Med. Wkly.* **146**, w14314.
 15. Liu X., Shi Y., Woods K.W., Hessler P., Kroeger P., Wilsbacher J., Wang J., Wang J.Y., Li C., Li Q., Rosenberg S.H., Giranda V.L., Luo Y. 2008. Akt inhibitor a-443654 interferes with mitotic progression by regulating Aurora A kinase expression. *Neoplasia.* **10** (8), 828–837.
 16. Benítez-King G., Ortíz-López L., Jiménez-Rubio G., Ramírez-Rodríguez G. 2010. Haloperidol causes cytoskeletal collapse in N1E-115 cells through tau hyperphosphorylation induced by oxidative stress: Implications for neurodevelopment. *Eur. J. Pharmacol.* **644** (1–3), 24–31.
 17. Lee M.S., Johansen L., Zhang Y., Wilson A., Keegan M., Avery W., Elliott P., Borisy A.A., Keith C.T. 2007. The novel combination of chlorpromazine and pentamidine exerts synergistic antiproliferative effects through dual mitotic action. *Cancer Res.* **67** (23), 11359–11367.
 18. Callender J.A., Newton A.C. 2017. Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later. *Neuronal Signal.* (1), NS20160005.

Effects of Haloperidol and Cyproheptadine on the Cytoskeleton of the Sea Urchin Embryos

D. A. Nikishin^{1,2,*}, L. A. Malchenko¹, I. Milošević³, L. Rakić⁴, Y. B. Shmukler¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119192 Russia

³Institute of Marine Biology, Kotor, 85330 Montenegro

⁴Serbian Academy of Science and Art, Belgrade, 11000 Serbia

*e-mail: denisnikishin@gmail.com

Early sea urchin embryos are sensitive to agonists and antagonists of transmitter receptors, both metabotropic and channel ones. In this work, we studied the cytostatic action mechanisms of cyproheptadine and haloperidol – antagonists of serotonin 5HT₂ receptors and dopamine D₂ receptors, respectively. For this purpose, we employed the model of the blockade of the first cleavage division of sea urchin, which allows quantifying the effects of embryotoxic substances. The action of haloperidol and cyproheptadine is mediated by effects on the elements of the cytoskeleton. Both antagonists caused an increase in the degree of polymerization of the actin cytoskeleton, both in the cortical layer and in the cytoplasm. In addition, both antagonists affected the tubulin cytoskeleton: haloperidol predominantly disturbed spatial organization of the mitotic spindle, while cyproheptadine caused a complete depolymerization of tubulin and arrest of mitotic processes. The results indicate that cytostatic effects of dopamine and serotonin antagonists on cleavage divisions of sea urchin embryos are mediated by similar and/or crosstalking molecular mechanisms but also have significant differences that require further research.

Keywords: haloperidol, cyproheptadine, sea urchin, cytoskeleton, actin, tubulin

УДК 576.32

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ В МЫШЕЧНЫХ ЯДРАХ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ЭКСПРЕССИИ МЕДЛЕННОЙ ИЗОФОРМЫ МИОЗИНА В КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЕ КРЫС НА ФОНЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2020 г. И. И. Парамонова^{а, *}, К. А. Шарло^а,
Н. А. Вильчинская^а, Б. С. Шенкман^а

^аГосударственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия

*e-mail: inna199221@gmail.com

Поступила в редакцию 15.04.2019 г.

После доработки 09.07.2019 г.

Принята к публикации 18.08.2019 г.

В условиях гравитационной разгрузки наблюдается сдвиг миозинового фенотипа мышц в быструю сторону. Причиной таких изменений является снижение экспрессии гена, кодирующего тяжелые цепи миозина (МуНС) медленного типа, и увеличение экспрессии генов, кодирующих МуНС быстрых типов. Известно, что такие сигнальные каскады, как кальцинейрин/NFAT и HDAC4/MEF-2D способны регулировать экспрессию гена МуНС I. В литературе практически отсутствуют данные о содержании транскрипционных факторов NFATc1 и MEF-2D, участвующих в регуляции экспрессии гена МуНС I, а также гистондеацетилазы HDAC4 и MAP-киназы ERK2 в камбаловидной мышце крыс при действии гравитационной разгрузки. Цель данного исследования заключалась в изучении вклада различных механизмов контроля экспрессии МуНС I типа на каждом этапе гравитационной разгрузки. Было обнаружено достоверное снижение уровня белков MEF-2D и ERK2 на 3 и 7 сут разгрузки, снижение NFATc1 на 1 и 7 сут в ядерной фракции. Однако содержание NFATc1, HDAC4, MEF-2D и ERK2 в ядерной фракции после 14 сут гравитационной разгрузки соответствует контрольному уровню. На основании этих данных можно сделать вывод, что содержание транскрипционных регуляторов в мышечных ядрах на поздней стадии гравитационной разгрузки не является лимитирующим фактором для поддержания их транскрипционной активности.

Ключевые слова: камбаловидная мышца, гравитационная разгрузка, NFATc1, MEF-2D, HDAC4, ERK2, МуНС I типа

DOI: 10.31857/S0233475520020097

ВВЕДЕНИЕ

Для скелетных мышц, как на уровне целого органа, так и для отдельных волокон, ключевой характеристикой является миозиновый фенотип, т.е. соотношение экспрессируемых быстрых и медленных изоформ тяжелых цепей миозина (МуНС). Миозиновый фенотип определяет основные функциональные, прежде всего, сократительные характеристики данного волокна и целой мышцы. При действии гравитационной разгрузки наблюдается уменьшение доли волокон, экспрессирующих “медленную” изоформу тяжелых цепей миозина (МуНС I типа), и увеличение доли волокон, экспрессирующих “быстрые” изоформы, т.е. сдвиг миозинового фенотипа в быструю сторону [1, 2]. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что в регуляции экс-

прессии МуНС I типа принимают участие как минимум два сигнальных пути: кальцинейрин/NFATc1 и MEF-2D/HDAC4, оба эти пути взаимодействуют с транскрипционным фактором MEF-2D (рис. 1) [3]. Кальцинейрин является серин-треониновой фосфатазой. При взаимодействии с комплексом кальций-кальмодулин он активируется и дефосфорилирует NFATc1 (ядерный фактор активированных T-клеток), который получает возможность проникновения в миоядра [4]. В ядре NFATc1 непосредственно взаимодействует с MEF-2D и p300, транскрипционными факторами, специфически связывающими промотор гена медленной МуНС [5]. Таким образом запускается интенсивная транскрипция гена “медленной” МуНС. Известно, что NFATc1 крайне важен для кальций-зависимой активации экспрессии МуНС I типа во время трансформа-

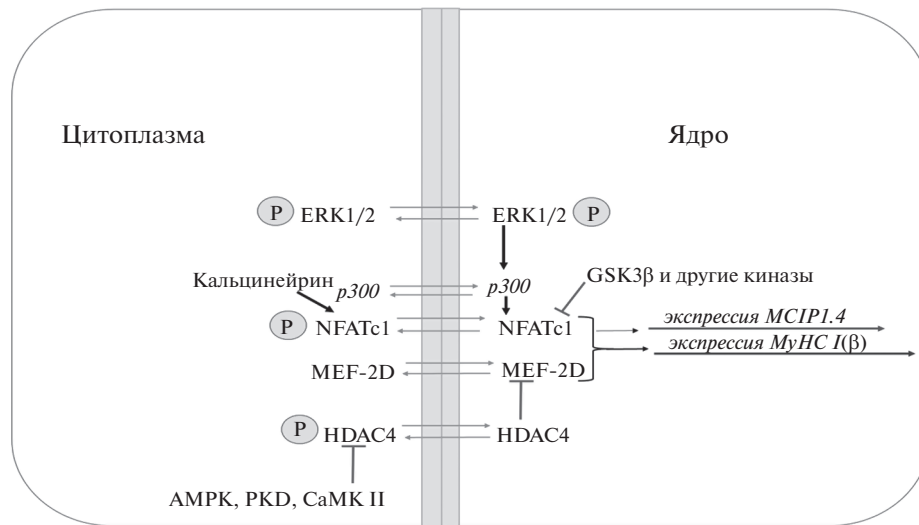


Рис. 1. Схема функционирования сигнальных путей кальцинейрин/NFATc1 и MEF-2D/HDAC4.

ции миозинового фенотипа. Недавно было показано, что митоген-активируемая киназа ERK1/2 активирует экспрессию MuHC I типа через ядерный NFATc1 [6]. Интересно что, ERK1/2 не влияет на субклеточную локализацию NFATc1, но оказывает активирующее влияние на промоторную активность MuHC I типа через ядерный NFATc1. ERK1/2 может фосфорилировать транскрипционный фактор p300, тем самым увеличивая связывание NFATc1 с ДНК в промоторе гена MuHC I типа. Активация промотора MuHC I типа с помощью p300 реализуется через ацетилирование двух консервативных сайтов в молекуле NFATc1, которые влияют на связывание с ДНК и стимуляцию транскрипции.

Транскрипционный фактор MEF-2 (фактор энхансер миоцитов 2) принадлежит к семейству транскрипционных факторов MADS-box и имеет четыре изоформы: А, В, С и D. Дефосфорилирование MEF-2А и -2D кальцинейрином было описано в исследованиях *in vivo* [7, 8]. Гистондеацетилаза 4 (HDAC4) подавляет экспрессию мышечных генов посредством прямого связывания и ингибирования активности MEF2. Гистондеацетилазы подразделяют на три основных класса: I, II и III. Известно, что HDAC класса IIa (HDAC4, 5, 7 и 9) в основном осуществляют регуляцию генов скелетных и сердечной мышц. В неактивном состоянии HDAC класса IIa дефосфорилированы и локализованы в ядрах, где взаимодействуют с различными транскрипционными факторами и подавляют экспрессию генов. Фосфорилирование HDAC приводит к их переходу из ядра в цитоплазму и к активации экспрессии генов. Фосфорилирование гистондеацетилаз класса IIa осуществляют CaMKII, PKD и AMPK [9].

В миоцитах HDAC4 деацетилюет не только гистон H3, но и транскрипционный фактор MEF-2D, взаимодействующий с промотором гена *myh 7* (т.е. гена MuHC I типа) [10]. Это приводит к снижению как общей транскрипционной активности генома, так и экспрессии MuHC I типа. В настоящее время мало известно о молекулярных механизмах трансформации миозинового фенотипа в быструю сторону при гравитационной разгрузке. Цель нашего эксперимента заключалась в исследовании динамики ядерного содержания NFATc1, MEF-2D, гистондеацетилазы HDAC4 и MAP-киназы ERK2 с целью определения относительного вклада различных механизмов контроля экспрессии MuHC I типа на каждом этапе гравитационной разгрузки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модели гравитационной разгрузки было проведено 1-, 3-, 7- и 14-суточное антиорто-статическое вывешивание задних конечностей крыс по методике Ильина–Новикова в модификации Морри-Холтон [11]. Для проведения этого эксперимента крысы линии Вистар (56 самцов массой 180–200 г) были случайным образом распределены на восемь групп по восемь животных в каждой: вывешивание в течение 24 ч (Hs), 3-суточное вывешивание (3Hs), 7-суточное вывешивание (7Hs), 14-суточное вывешивание (14Hs). Каждой вывешенной группе соответствовала группа виварного контроля (С, четыре группы по восемь животных в каждой); животных из контрольных групп и из соответствующих им вывешенных групп эвтаназировали в тот же день. После проведения эксперимента у каждого живот-

ного под авертиновым наркозом из обеих ног была выделена камбаловидная мышца *m. soleus* и заморожена в жидком азоте, после чего животные были эвтаназированы сверхдозой авертина. Все процедуры с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ–ИМБП РАН.

Содержание фосфорилированной (Y204) и тотальной ERK2, NFATc1, HDAC4 и MEF2-D определяли с использованием гель-электрофореза и иммуноблотинга. Для этого выделяли белок из мышечной ткани *m. soleus* крысы с помощью набора реагентов для выделения ядерной и цитоплазматической фракции белков NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction (Thermo Scientific, США). Электрофорез проводили в 10% разделяющем полиакриламидном геле (ПААГ). Использовали трис-глициновый буфер (192 мМ Tris-глицин (pH 8.6), 0.1% додецилсульфата Na (SDS)). Электроперенос белков проводили в буфере (25 мМ Tris (pH 8.3), 192 мМ глицин, 20% этанол, 0.02% SDS) на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В при температуре 4°C в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories) в течение 120 мин. Далее нитроцеллюлозные мембраны блокировали в растворе 5% сухого молока (Bio-Rad Laboratories) в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. После чего инкубировали с первичными антителами в течение 12 ч. Далее мембрану отмывали от первичных антител в PBST (3 раза по 5 мин). Инкубацию с вторичными антителами проводили в течение 1 ч. Для определения белковых полос использовали первичные поликлональные антитела против фосфо-ERK2 (Y204) в разведении 1 : 500 (Cell Signaling, США, #9102), против тотальной HDAC4 в разведении 1 : 500 (Cell Signaling, США, #2072); против тотальной MEF-2D в разведении 1 : 1000 (Abcam, США, #32845), против NFATc1 в разведении 1 : 1000 (Abcam, ab2796, США), против Lamin B1 в разведении 1 : 500 (Abcam, США, #16048), вторичные антитела goat-anti-rabbit в разведении 1 : 30000 (Jackson Immuno Research, США). Оптическая плотность полос белка была нормирована по референсному белку Lamin B1. Белковые полосы анализировали с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Фосфорилированные формы белков определяли, нормируя на тотальное содержание белков, оцененное на той же мембране, что и целевой белок после проведения стриппинга с использованием restore western blot stripping buffer (Thermo Scientific, США). Для определения количества каждого анализируемого белка вестерн-блоттинг был повторен не менее 3 раз.

Для определения статистической значимости результатов использовали непараметрический

критерий Манна–Уитни. Результаты приведены в процентах от медианы контрольной группы в виде максимума, минимума, медианы и интерквартильной широты (0.25–0.75).

РЕЗУЛЬТАТЫ

После первых суток вывешивания мы обнаружили достоверное снижение содержания в ядерной фракции транскрипционного фактора NFATc1 на 49% относительно группы контроля, однако на 3-и сут содержание NFATc1 составляло 71% от группы контроля и не имело достоверных отличий от контроля (рис. 2). После 7 сут гравитационной разгрузки содержание NFATc1 в ядерной фракции было достоверно снижено на 53% относительно контрольной группы (рис. 2). После 14 сут вывешивания содержание NFATc1 в ядерной фракции не отличалось от контроля (рис. 2). В результате 1-суточного вывешивания наблюдалось достоверное увеличение содержания HDAC4 на 243% в ядерной фракции белков относительно контрольной группы (рис. 3), однако после 3-, 7- и 14-суточного вывешиваний достоверных изменений не обнаружено (рис. 3). После 1-суточного вывешивания содержание MEF-2D в ядерной фракции было снижено на 20% в сравнении с контролем, однако эти отличия не были достоверными. После 3-суточного вывешивания выявлено достоверное снижение содержания MEF-2D на 60% в ядерной фракции по сравнению с группой контроля (рис. 4). После 7-суточного вывешивания обнаружено достоверное снижение содержания MEF-2D на 69% в ядерной фракции относительно группы контроля (рис. 4). После 14 сут вывешивания содержание MEF-2D в ядерной фракции не отличалось от контроля (рис. 4). После 3-суточного вывешивания выявлено достоверное снижение содержания фосфо-ERK 2 на 96% в ядерной фракции по сравнению с группой контроля (рис. 5). После 7-суточного вывешивания обнаружено достоверное снижение содержания фосфо-ERK 2 на 72% в ядерной фракции относительно группы контроля (рис. 5). После 1 и 14 сут вывешивания в содержании фосфо-ERK2 в ядерной фракции достоверных отличий не обнаружено (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Механизмы сдвига миозинового фенотипа в быстрю сторону остаются в значительной степени неизученными, но за последние годы нашему коллективу удалось несколько продвинуться в понимании физиологической регуляции экспрессии мРНК медленной и быстрых изоформ МуНС крысы при использовании стандартной модели антиортостатического вывешивания жи-

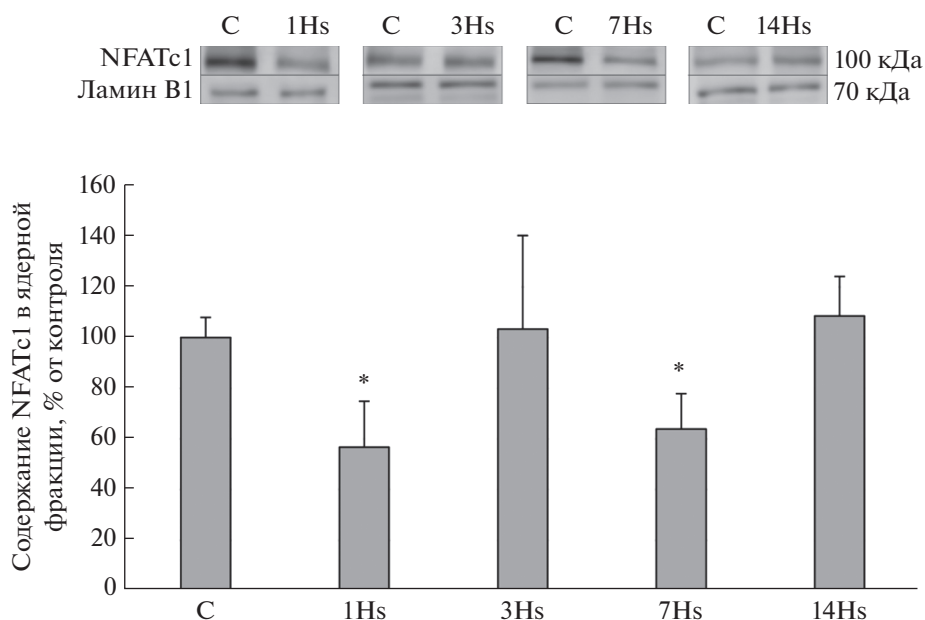


Рис. 2. Динамика содержания NFATc1 в ядерной фракции белков *m. soleus* крысы в условиях моделируемой гравитационной разгрузки. Здесь и на рис. 3, 4, 5 С – контроль, 1Hs – вывешивание 1-е сут, 3Hs – вывешивание 3 сут, 7Hs – вывешивание 7 сут, 14Hs – вывешивание 14 сут. * – достоверные отличия от группы “Контроль” ($p < 0.05$).

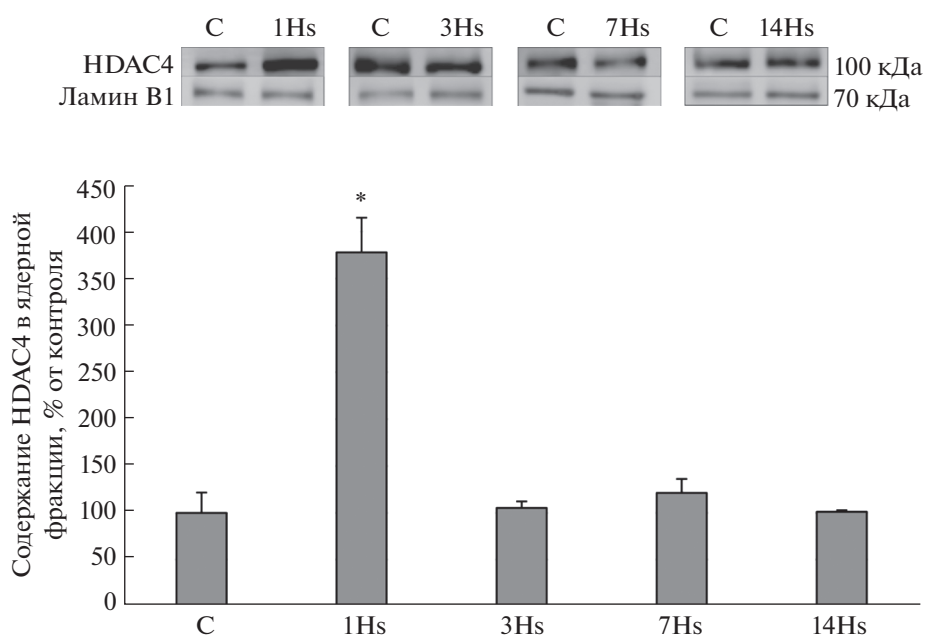


Рис. 3. Динамика содержания HDAC4 в ядерной фракции белков *m. soleus* крысы в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.

вотного. Было показано, что уже на 1 сут гравитационной разгрузки наблюдается снижение экспрессии мРНК медленной изоформы тяжелых цепей миозина в камбаловидной мышце крыс [12]. Также нами было выявлено значимое снижение содержания мРНК МуНС I типа на 7 сут вывешивания, некоторая тенденция к снижению на 3 сут

и существенное снижение содержания мРНК МуНС I типа на 14-е сут вывешивания в камбаловидной мышце крыс [13, 14].

Уже после первых суток вывешивания мы обнаружили достоверное снижение содержания в ядерной фракции транскрипционного фактора NFATc1 относительно группы контроля (рис. 4).

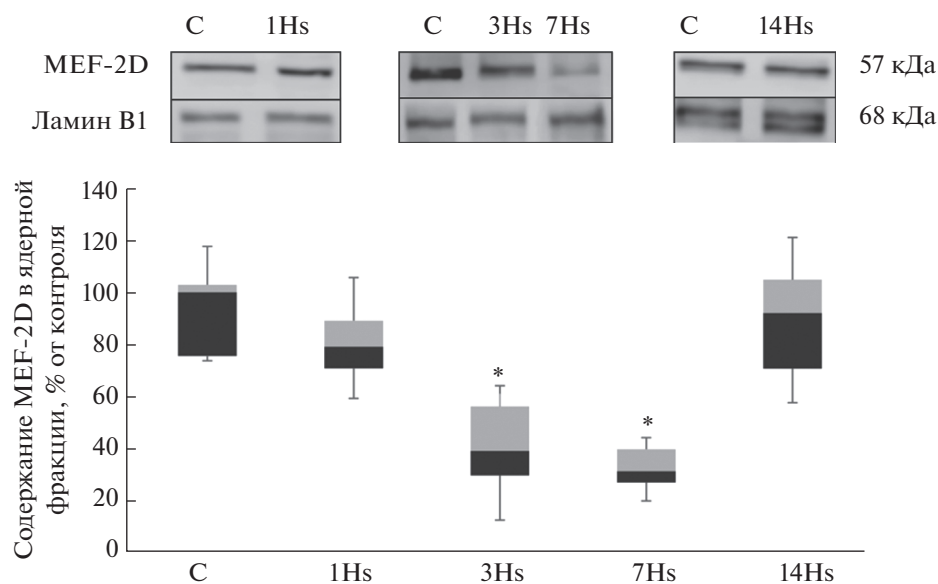


Рис. 4. Динамика содержания MEF-2D в ядерной фракции белков *m. soleus* крысы в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.

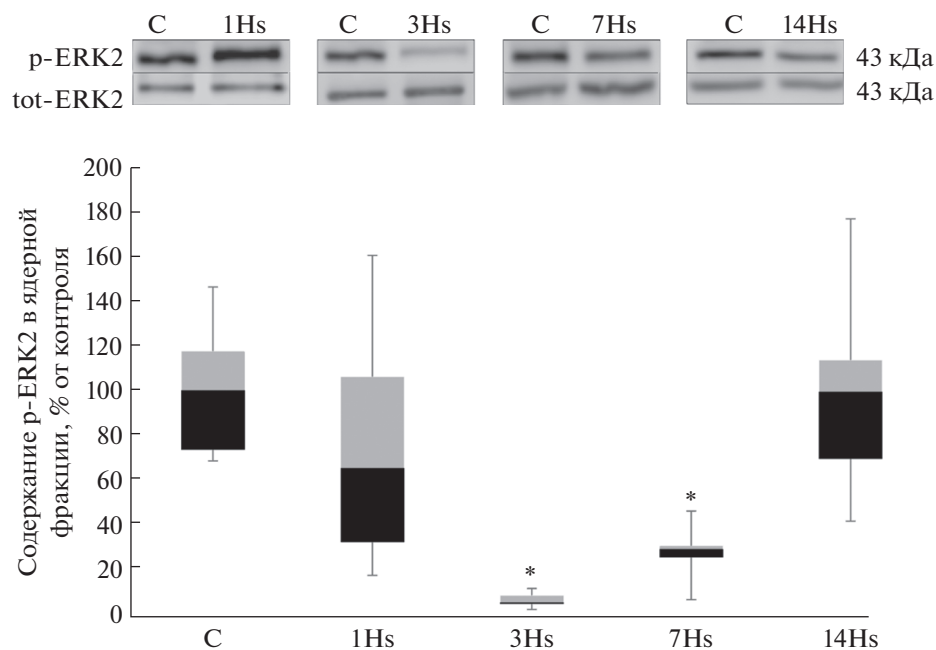


Рис. 5. Динамика содержания фосфо-ERK2(Y204) в ядерной фракции белков *m. soleus* крысы в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.

Мы предполагаем, что этот феномен может быть связан со снижением уровня фосфорилирования и соответствующей активацией GSK-3 β , активность которой приводит к фосфорилированию NFAT и его удалению из ядра [15]. Известно, что транспорт NFATc1 в мышечные ядра является кальций-зависимым, и после второго дня гравитационной разгрузки в миоплазме камбаловидной

мышцы повышается концентрация кальция [16]. Мы предполагаем, что повышение содержания NFATc1 в ядерной фракции после 3 сут вывешивания может быть обусловлено кальций-зависимой реактивацией системы кальцинейрин/NFATc1, при этом к 7 сут вывешивания данный эффект подавляется из-за роста экспрессии эндогенного ингибитора кальцинейрина кальсарцина-2 при

сохраняющейся повышенной активности GSK-3 β [15]. Данные о снижении содержания NFATc1 после 7 сут вывешивания согласуются с ранее полученными в нашей лаборатории данными [17]. Данные по отсутствию снижения NFATc1 в ядерной фракции после 14 сут вывешивания согласуются с данными, ранее полученными в 2002 [18] и 2016 годах [19]. Причины повышения содержания NFATc1 в мышечных ядрах к 14-м сут вывешивания пока не очень ясны. Возможно, некоторую роль в этом процессе играет возвращение уровня фосфорилирования GSK-3 β к уровню контроля на данном сроке вывешивания [15, 20, 21].

Второй, эпигеномный, механизм, контролирующей экспрессию MyHC I типа, реализуется через ядерную транслокацию HDAC4 и ингибирующее деацетилирование MEF-2D [22]. После 1 сут вывешивания мы обнаружили, что содержание HDAC4 в ядерной фракции камбаловидной мышцы крыс достоверно и значительно увеличилось относительно контроля, однако после 3, 7 и 14 сут вывешивания содержание HDAC4 в ядерной фракции не отличалось от контроля (рис. 2). Ранее было показано, что в медленном типе мышечных волокон HDAC4 преимущественно локализуется в цитоплазме, а в быстром типе волокон — в мышечных ядрах [23]. Мы предполагаем, что накопление HDAC4 в ядерной фракции позволяет деацетилировать гистон H3 и транскрипционный фактор MEF2D, контролирующей промоторную активность гена *myh7*. В результате снижается экспрессия мРНК MyHC I типа. Ранее в нашей лаборатории было показано, что накопление HDAC4 в миоцитах, обусловленное дефосфорилированием AMP-активируемой протеинкиназы (АМПК), сопровождается снижением интенсивности экспрессии гена *myh7* [24, 25]. Эти данные хорошо согласуются с результатами эксперимента зарубежных коллег, где было показано, что один из возможных механизмов воздействия АМПК на экспрессию генов медленного миозина и ферментов окислительного метаболизма связывают с фосфорилированием/дефосфорилированием гистондеацетилазы 4 [26]. Мы предполагаем, что локализация MEF-2D в миоцитах в норме может обеспечиваться активностью кальциейрина, так как показана кальциейрин-зависимая транслокация в ядро близкого гомолога MEF-2D, MEF-2C [27]. В настоящем исследовании после 3 сут вывешивания содержание MEF-2D в ядерной фракции достоверно снизилось и после 7 сут вывешивания оставалось сниженным в сравнении с контролем (рис. 3). Обращает на себя внимание тот факт, что содержание MEF-2D в миоцитах снижается после 3 сут разгрузки, когда ядерное содержание HDAC4 повышается до уровня контроля. Сейчас мы не мо-

жем судить о причинах экспорта MEF-2D из ядерного пространства, однако этот феномен, очевидно, может сказываться на интенсивности транскрипции гена *myh7*.

Meissner и соавт. [6] в 2011 году обнаружили, что фосфорилированные молекулы митоген-активируемой протеинкиназы ERK1/2 транслоцируются в ядерное пространство и фосфорилируют гистоацетилтрансферазу p300, ассоциированную с промотором гена *myh7*. Следствием этого взаимодействия является ацетилирование NFATc1, активирующее транскрипцию этого гена [6].

По нашим данным, после 3 сут вывешивания фосфорилированный ERK2 почти не обнаруживался в ядерной фракции. После 7 сут воздействия его содержание в ядерном пространстве оставалось значительно ниже контрольного уровня. Не исключено, что снижение ядерного содержания ERK1/2 является еще одним механизмом, ингибирующим экспрессию медленной изоформы MyHC в условиях разгрузки.

Обращает на себя внимание тот факт, что содержание NFATc1, HDAC4, MEF-2D и ERK2 в ядерной фракции после 14 сут гравитационной разгрузки соответствует контрольному уровню. На этом временном отрезке (вторая неделя вывешивания) продолжается снижение содержания мРНК MyHC I типа [14]. Этот феномен свидетельствует о том, что не всегда транскрипционная активность соответствует содержанию транскрипционного регулятора в ядерном пространстве. Не исключено, что на некоторых этапах гравитационной разгрузки существуют функционально-зависимые сайт-специфичные механизмы контроля экспрессии медленного миозина. Эти механизмы еще предстоит исследовать.

Однако сейчас можно с уверенностью утверждать, что на разных этапах гравитационной разгрузки снижение экспрессии медленного миозина может быть обусловлено действием разных физиологических сигнальных входов и различных транскрипционных регуляторов.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-15-00107.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kandarian S.C., Stevenson E.J. 2002. Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **30**, 111–116.
2. Шенкман Б.С. 2016. От медленных к быстрым. Гипогравитационная перестройка миофибриллярного фенотипа мышечных волокон. *Acta Naturae.* **8** 4(31), 52–64.
3. Shen T., Liu Y., Randall W.R., Schneider M.F. 2006. Parallel mechanisms for resting nucleo-cytoplasmic shuttling and activity dependent translocation provide dual control of transcriptional regulators HDAC and

- NFAT in skeletal muscle fiber type plasticity. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**, 405–411.
4. Chin E.R., Olson E.N., Richardson J.A., Yang Q., Humphries C., Shelton J.M., Wu H., Zhu W., Bassel-Duby R., Williams R.S. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* **12**, 2499–2509.
 5. Meissner J.D., Umeda P.K., Chang K.C., Gros G., Scheibe R.J. 2007. Activation of the beta myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the calcineurin/NFATc1 pathway. *J. Cell. Physiol.* **211**, 138–148.
 6. Meissner J.D., Freund R., Krone D., Umeda P.K., Chang K.C., Gros G., Scheibe R.J. 2011. Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of p300 enhances myosin heavy chain I/beta gene expression via acetylation of nuclear factor of activated T cells c1. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5907–5925.
 7. Dunn S.E., Simard A.R., Bassel-Duby R., Williams R.S., Michel R.N. 2001. Nerve activity-dependent modulation of calcineurin signaling in adult fast and slow skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.* **276**, 45243–45254.
 8. Wu H., Rothermel B., Kanatous S., Rosenberg P., Naya F.J., Shelton J.M., Hutcheson K.A., DiMaio J.M., Olson E.N., Bassel-Duby R., Williams R.S. 2001. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J.* **20**, 6414–6423.
 9. McGee S.L., Swinton C., Morrison S., Gaur V., Campbell D.E., Jorgensen S.B., Kemp B.E., Baar K., Steinberg G.R., Hargreaves M. 2014. Compensatory regulation of HDAC5 in muscle maintains metabolic adaptive responses and metabolism in response to energetic stress. *FASEB J.* **28**, 3384–3395.
 10. Liu Y., Randall W.R., Schneider M.F. 2005. Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **168**, 887–897.
 11. Morey-Holton E.R., Globus R.K. 2002. Hindlimb unloading rodent model: Technical aspects. *J. Appl. Physiol.* **92**, 1367–1377.
 12. Giger J.M., Bodell P.W., Zeng M., Baldwin K.M., Haddad F. 2009. Rapid muscle atrophy response to unloading: Pretranslational processes involving MHC and actin. *J. Appl. Physiol.* **107**, 1204–1212.
 13. Красный А.М., Лысенко Е.А., Козловская И.Б., Шенкман Б.С., Ломоносова Ю.Н. 2013. Фосфорилирование элонгационного фактора и экспрессия его киназы в *m. soleus* крысы в течение трех суток гравитационной разгрузки. *Докл. АН.* **453**, 106–108.
 14. Lomonosova Y.N., Turtikova O.V., Shenkman B.S. 2016. Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **37**, 7–16.
 15. Mirzoev T., Tyganov S., Vilchinskaya N., Lomonosova Y., Shenkman B. 2016. Key markers of mTORC1-dependent and mTORC1-independent signaling pathways regulating protein synthesis in rat soleus muscle during early stages of hindlimb unloading. *Cell. Physiol. Biochem.* **39**, 1011–1020.
 16. Ingalls C.P., Wenke J.C., Armstrong R.B. 2001. Time course changes in $[Ca^{2+}]_i$, force, and protein content in hindlimb-suspended mouse soleus muscles. *Aviat. Space Environ. Med.* **72**, 471–476.
 17. Шарло К.А., Ломоносова Ю.Н., Туртикова О.В., Митрофанова О.В., Каламкар Г.Р., Бугрова А.Е., Шевченко Т.Ф., Шенкман Б.С. 2017. Роль фосфорилирования GSK-3 β в процессах регуляции экспрессии медленного миозина в *m. soleus* при функциональной разгрузке. *Биол. мембраны.* **34** (6), 164–171.
 18. Dupont-Versteegden E.E., Knox M., Gurley C.M., Houle J.D., Peterson C.A. 2002. Maintenance of muscle mass is not dependent on the calcineurin-NFAT pathway. *Am. J. Physiol.* **282**, C1387–1395.
 19. Xia L., Cheung K.K., Yeung S.S., Yeung E.W. 2016. The involvement of transient receptor potential canonical type 1 in skeletal muscle regrowth after unloading-induced atrophy. *J. Physiol.* **594** (11), 3111–3126.
 20. van der Velden J.L., Langen R.C., Kelders M.C., Willems J., Wouters E.F., Janssen-Heininger, Y.M., Schols A.M. 2007. Myogenic differentiation during regrowth of atrophied skeletal muscle is associated with inactivation of GSK-3beta. *Am. J. Physiol.* **292**, C1636–1644.
 21. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Шенкман Б.С. 2017. Сигнальные пути регуляции синтеза белка в постуральной мышце крысы в период реадaptации после функциональной разгрузки. *Авиакосмическая и экологическая медицина.* **51** (7), 99–105.
 22. Miska E.A., Karlsson C., Langley E., Nielsen S.J., Pines J., Kouzarides T. 1999. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* **18**, 5099–5107.
 23. Cohen T.J., Choi M.C., Kapur M., Lira V.A., Yan Z., Yao T.P. 2015. HDAC4 regulates muscle fiber type-specific gene expression programs. *Mol. Cells.* **38**, 343–348.
 24. Vilchinskaya N.A., Mochalova E.P., Nemirovskaya T.L., Mirzoev T.M., Turtikova O.V., Shenkman B.S. 2017. Rapid decline in MyHC I(beta) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J. Physiol.* **595**, 7123–7134.
 25. Вильчинская Н.А., Мочалова Е.П., Белова С.П., Шенкман Б.С. 2016. Дефосфорилирование амфактивируемой протеинкиназы в постуральной мышце – ключевое сигнальное событие первых суток функциональной разгрузки. *Биофизика.* **61**, 1228–1235.
 26. Yoshihara T., Machida S., Kurosaka Y., Kakigi, R., Sugiura T., Naito H. 2016. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. *J. Physiol. Sci.* **66**, 337–343.
 27. Lynch J., Guo L., Gelebart P., Chilibeck K., Xu J., Molkentin J.D., Agellon L.B., Michalak M. 2005. Calcineurin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical Ca^{2+} -dependent signaling cascade. *J. Cell Biol.* **170**, 37–47.

The Time Course of Muscle Nuclear Content of Transcription Factors Regulating the MyHC I(β) Expression in the Rat Soleus Muscle under Gravitational Unloading

I. I. Paramonova^{1, *}, K. A. Sharlo¹, N. A. Vilchinskaya¹, B. S. Shenkman¹

¹*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia*

**e-mail: inna199221@gmail.com*

A decrease in the proportion of fibers expressing a “slow” isoform of myosin heavy chains (MyHC I(β)) and an increase in the proportion of fibers expressing “fast” isoforms is observed during hindlimb unloading, which leads to a slow-to-fast shift in the myosin phenotype. An important mechanism of the regulation of the gene expression is the import of transcription factors into the nucleus and their binding to the promoter of the target gene. Numerous studies indicate that at least two signaling pathways are involved in the regulation of expression of MyHC I(β): calcineurin/NFATc1 and MEF-2D/HDAC4. The aim of our experiments was to study the time course of the nuclear content of NFATc1, MEF-2D, histone deacetylase HDAC4, and MAP kinase ERK2 at different periods of hindlimb unloading in order to determine the contribution of different mechanisms controlling the MyHC I(β) expression. A significant decrease in the MEF-2D and ERK2 content was recorded on day 3 and 7 of the gravitational unloading, as well as a decrease in the nuclear content of NFATc1 on day 1 and 7. However, 14 days after the unloading the content of NFATc1, HDAC4, MEF-2D, and ERK2 in the nuclear fraction corresponded to the control level. These data indicate that the concentration of the transcription regulators in the muscle nuclei at late stages of the gravitation unloading is not a limiting factor for their transcriptional activity.

Keywords: soleus muscle, gravitational unloading, NFATc1, MEF-2D, HDAC4, ERK2, slow myosin, MyHC I(β)

УДК 577.115.085

ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ НА ФОСФОЛИПИДНЫЙ И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС

© 2020 г. З. Г. Раджабова^b, С. А. Забелинский^{a, *}, М. А. Чеботарева^a,
Е. П. Шуколокова^a, Н. К. Кличханов^b, А. И. Кривченко^a

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

^bДагестанский государственный университет,
Махачкала, Республика Дагестан, 367000 Россия

*e-mail: stas@iephb.ru

Поступила в редакцию 22.04.2019 г.

После доработки 24.05.2019 г.

Принята к публикации 27.05.2019 г.

Изучено влияние умеренной гипотермии (30°C) различной длительности на фосфолипидный и жирнокислотный состав мембран эритроцитов крыс. Установлено, что содержание фосфатидилхолина и сфингомиелина почти не зависит от длительности гипотермии, хотя содержание фосфолипидов (ФЛ) внутреннего слоя мембраны изменяется, и особенно значительно – содержание фосфатидилсерина и монофосфоинозита. В общих ФЛ эритроцитов кратковременная гипотермия не приводит к существенному изменению содержания насыщенных (НЖК), моноеновых (МНЖК), полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и индекса ненасыщенности (ИН), которое наблюдается при длительной гипотермии – увеличение НЖК и МНЖК и уменьшение ПНЖК и ИН. Длительность гипотермии не оказывает влияния на суммарные характеристики жирных кислот фосфатидилхолина, однако в других фосфолипидах отклонения, наблюдаемые при кратковременной гипотермии, практически возвращаются к норме после долговременного воздействия гипотермии. Нормализация состава липидов мембран после пролонгированной гипотермии частично связана с внесосудистым гемолизом поврежденных эритроцитов, о чем свидетельствует снижение количества эритроцитов и повышение уровня билирубина в крови. Полученные данные обсуждаются в связи с их значением для понимания механизмов липидной адаптации мембран эритроцитов крысы пониженным температурам.

Ключевые слова: эритроциты, крыса, гипотермия, фосфолипиды, жирные кислоты

DOI: 10.31857/S0233475520020115

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что у гомойотермных организмов температура тела постоянна в широком диапазоне температур окружающей среды, при долгом пребывании на холоде, особенно при отрицательной температуре, в холодной воде, в условиях гипоксии возникает так называемая непреднамеренная (случайная) гипотермия. В то же время гипотермию используют в клинической практике для снижения метаболических процессов в тканях, требующих кислорода [1]. Непреднамеренная гипотермия, в отличие от гипотермии, используемой в клинической практике, возникает без анестезиологической защиты, что способствует развитию холодового стресса, приводящего к активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и ускорению синтеза и секреции катехоламинов и глюкокортикоидов [2, 3]. При этом запускается гормонзависимый липолиз

депонированных липидов, что приводит к существенному росту уровня свободных жирных кислот (ЖК) в плазме крови [4, 5]. Исследования показали, что как ЖК плазмы, так и фосфолипиды (ФЛ) липопротеинов плазмы включаются в состав мембран эритроцитов [6], что в условиях гипотермии может привести к изменению фосфолипидного и жирнокислотного состава мембран этих клеток. Однако при кратковременной умеренной гипотермии у крыс, в отличие от сусликов, мы не обнаружили изменений в жирнокислотном составе ФЛ цельной крови [7]. Возможно, это связано с тем, что при гипотермии происходят разнонаправленные изменения в составе ФЛ и их ЖК в плазме крови и мембранах форменных элементов крови. В этой связи заслуживают внимания данные об изменении состава липопротеинов плазмы крови при гипотермии [8]. Так, кратковременная гипотермия 30°C более чем в 2 раза

увеличивает содержание липопротеинов очень низкой плотности и снижает содержание липопротеинов высокой плотности в плазме крови крыс. После пролонгированной (в течение 3 ч) умеренной гипотермии наблюдается тенденция к нормализации их уровня. Имеются сведения об изменении состава ФЛ мембран эритроцитов крыс при гипотермии [9]. Вместе с тем данные о влиянии умеренной гипотермии разной длительности на состав ФЛ и их ЖК в мембранах эритроцитов крыс отсутствуют.

Эритроциты представляют собой уникальные биологические структуры, содержащие высокие концентрации полиненасыщенных жирных кислот, кислорода и ионов железа в связанном состоянии, что делает их потенциально чувствительными к повреждающему действию активных форм кислорода (АФК), образующихся как в самом эритроците, так и в плазме крови [10]. По этой причине эритроциты имеют эффективную систему антиоксидантной защиты, которая включает глутатион, витамин С и витамин Е, а также ферменты – супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу, глутатион-S-трансферазу и глутатионредуктазу. Однако в условиях гипотермии генерация АФК может увеличиваться, а активность антиоксидантной системы может снижаться [5], что будет стимулировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), приводящие к изменению липидного состава мембран эритроцитов. Нами было установлено, что кратковременная умеренная гипотермия стимулирует, а ее пролонгирование в течение 3 ч снижает интенсивность ПОЛ эритроцитов крыс [11]. Активация свободнорадикальных процессов в мембране эритроцитов может способствовать заметному уменьшению количества ФЛ, имеющих в своем составе полиненасыщенные жирные кислоты – фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА). В свою очередь, избирательная делипидизация мембран может привести к росту отношения холестерин/ФЛ, изменению физико-химических свойств мембран и увеличению их микровязкости [12], что может значительно ухудшить функционирование эритроцитов, а, следовательно, и снабжение тканей кислородом.

Целью исследования является выяснение зависимости содержания ФЛ и состава их жирных кислот в мембранах эритроцитов крыс от длительности умеренной гипотермии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Кровь собирали в пробирки с гепарином (25 ед/мл), а затем эритроциты осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. В плазме определяли содержание

общего билирубина на биохимическом анализаторе UniCelDxC 800 PRO автомат (Beckman Coulter, США). Количество эритроцитов крови подсчитывали на гематологическом анализаторе Sismex KX-21 (Япония).

Для получения мембран эритроциты трижды промывали 0.9% раствором NaCl при 4°C, каждый раз осаждая клетки путем центрифугирования при 1500 g в течение 10 мин. Отмытые эритроциты гемолизировали в 10 mM трис-HCl буфере pH 7.4, содержащем 1.5 mM EDTA. Тени эритроцитов осаждали при 20000 g в течение 20 мин при 4°C, используя центрифугу MR23i (Thermo Scientific, Германия), а затем пятикратно отмывали от гемоглобина 10 mM трис-HCl буфером pH 8.2. Белые тени эритроцитов хранили при -70°C до использования.

Липиды из мембран эритроцитов экстрагировали по методу Фолча [13] смесью хлороформ : метанол (2 : 1). Состав ФЛ в полученных липидных экстрактах анализировали методом двумерной тонкослойной хроматографии на силикагеле КСК, используя систему растворителей [14]: 1-е направление – хлороформ, метанол и 28%-ный аммиак (81.2 : 31.2 : 6.0 по объему), 2-е направление – хлороформ, метанол, ацетон, уксусная кислота и вода (62.00 : 12.5 : 25.00 : 12.50 : 6.25 по объему). Содержание общих и отдельных фракций ФЛ оценивали по количеству липидсвязанного неорганического фосфора по методу Фиске и Субба-роу [15].

Метилловые эфиры ЖК получали щелочным метилированием 0.21 M NaOH на абсолютном метаноле [16]. Анализ метиловых эфиров проводили на газо-жидкостном хроматографе Pye-104 (Англия) на хромосорбе W, содержащем 3% диэтиленгликольсукцината, при 194°C. Газ-носитель – гелий (50 мл/мин). Содержание отдельных ЖК оценивали по площади пика. Результаты выражали в процентах от всех ЖК пробы. Идентификацию ЖК проводили как сравнением относительных времен удержания проб и стандартов, так и после обработки полученных масс-спектров.

Обработка данных произведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета Statistica8.0. Достоверность различий определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости $p = 0.05$. Результаты экспериментальных исследований представлены как среднее \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ эритроцитов в крови не выявил изменения их количества после кратковременной гипотермии, но после пролонгированной гипотермии их количество достоверно снижается на 10.6% относительно контроля (рис. 1). В плазме

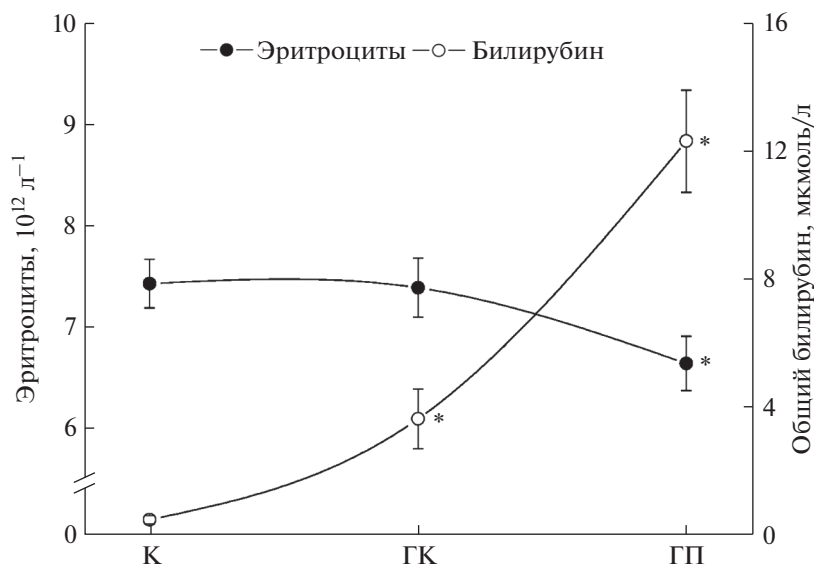


Рис. 1. Изменение количества эритроцитов и общего билирубина в плазме крови крыс при гипотермии. К — контроль; ГК — кратковременная гипотермия 30°C; ГП — пролонгированная 3 ч гипотермия 30°C. * — достоверные ($p < 0.05$) различия относительно контроля.

крови нами обнаружено зависимое от длительности гипотермии повышение уровня билирубина — продукта деградации гема гемоглобина клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Концентрация общего билирубина в плазме крови после кратковременной гипотермии возрастает в 7.9 раз, а после пролонгированной гипотермии — в 26.8 раз относительно контроля (рис. 1).

На рис. 2 приведены данные по содержанию ФЛ во фракции мембран эритроцитов в норме и при гипотермических состояниях. В липидах мембран эритроцитов доминирующим ФЛ является фосфатидилхолин (ФХ), а минорным — монофосфоинозитид (МФИ), что согласуется с данными литературы [17]. Это соотношение не изменяется при гипотермии. Как видно, при обоих гипотермических состояниях произошли изменения в процентном содержании различных ФЛ. Независимо от длительности гипотермии содержание ФХ в липидах мембран эритроцитов не изменяется. При кратковременной и пролонгированной гипотермии имеется тенденция к снижению содержания сфингомиелина (СФМ). Сразу после снижения температуры тела до 30°C имеется тенденция к повышению уровня ФС, а через 3 ч гипотермии его содержание в мембранных липидах достоверно увеличилось на 23.2%. После кратковременной гипотермии наблюдается некоторое повышение (на 11.1%) содержания ФЭА, но после пролонгирования гипотермии его содержание снижается до уровня контроля. В отличие от ФЭА количество плазмалогенной формы ФЭА (п-ФЭА) после кратковременной гипотермии недостоверно снижается на 10.2%, но после пролон-

гированной гипотермии его содержание увеличивается до уровня контроля. При гипотермии более существенно изменяется содержание МФИ в липидах мембран эритроцитов. Так, после кратковременной гипотермии обнаружена тенденция к снижению (на 15.1%) содержания МФИ, а через 3 ч гипотермии его уровень существенно (на 24.7%, $p < 0.05$) снижен относительно контроля. После кратковременной гипотермии на 37.7% по сравнению с контролем возросло содержание лизофосфолипидов (ЛФЛ). Однако через 3 ч гипотермии количество ЛФЛ в липидах мембран эритроцитов почти в 2 раза снижается относительно контроля.

При гипотермии, наряду с изменением содержания различных классов ФЛ, происходят изменения и их жирнокислотного состава. Изменение состава ЖК суммарных ФЛ в мембранах эритроцитов отражено в табл. 1. Полученные нами данные по составу ЖК суммарных ФЛ мембран контрольных крыс примерно соответствует данным литературы [18]. После кратковременной гипотермии из насыщенных жирных кислот (НЖК) суммарных ФЛ снижается (на 10.5%) количество только С18:0 (табл. 1). В составе моноеновых жирных кислот (МНЖК) количество С16:1 снижается на 10.1%, а С20:1 обнаруживается в надежно регистрируемых количествах. При гипотермии изменения происходят и в составе полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Так, содержание таких ПНЖК, как С20:4, С22:2, С22:5 возрастает на 4.6, 26.3 и 6% соответственно, а содержание С20:3, С22:4, С22:6 снижается на 10, 36.6, 8.9% соответственно по отношению к кон-

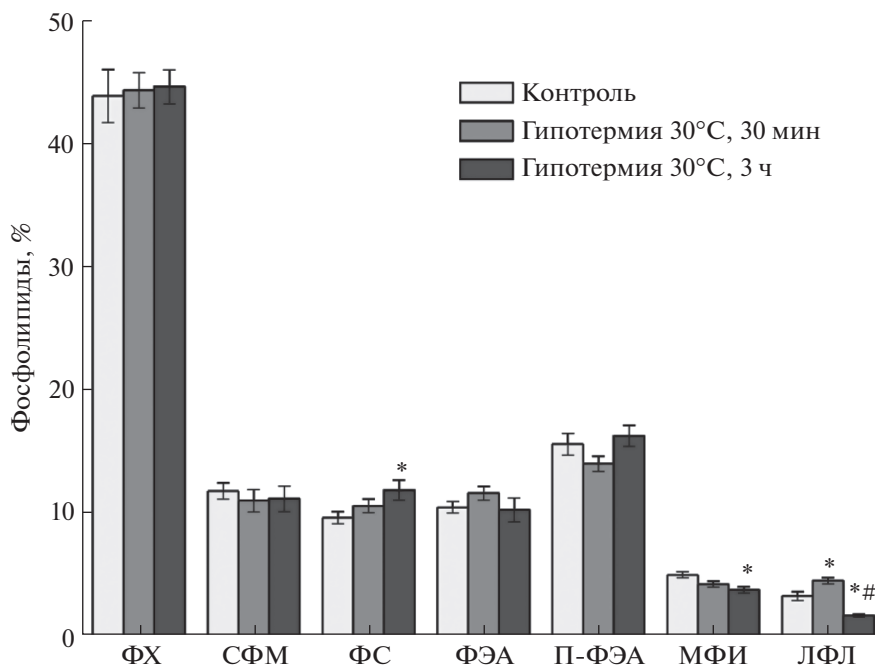


Рис. 2. Изменение содержания фосфолипидов (в % от суммы) в мембранах эритроцитов крыс при гипотермии. * – достоверные ($p < 0.05$) различия относительно контроля, # – достоверные ($p < 0.05$) различия относительно кратковременной гипотермии.

тролю. Следует указать, что обнаруженные изменения в содержании ПНЖК, за исключением С22:4, являются недостоверными. Однако в целом, обнаруженные изменения в содержании ЖК не отразились на общем содержании НЖК, МНЖК и ПНЖК, а также на индексе ненасыщенности.

После пролонгирования гипотермии общее количество НЖК в суммарных ФЛ возрастает на 7.3%, главным образом, за счет С17:0, содержание которого увеличивается на 98.1% относительно контроля (табл. 1). Количество МНЖК возрастает на 18.3% относительно контроля за счет значительного увеличения (на 139.2%) содержания С16:1. В отличие от НЖК и МНЖК, содержание ПНЖК при пролонгировании гипотермии снижается на 17%. Такое снижение происходит за счет уменьшения количества С20:3 (на 18.8%), С20:4 (на 15.7%), С22:4 (на 56.6%) и С22:6 (на 32%). При этом в составе ЖК не обнаруживается С22:5. В отличие от других ПНЖК при пролонгировании гипотермии содержание С22:2 достоверно увеличивается на 93.4% относительно контроля. После пролонгирования гипотермии за счет существенного снижения содержания большинства ПНЖК индекс ненасыщенности снижается на 17% ($p < 0.01$) как относительно контроля, так и кратковременной гипотермии (табл. 1).

Анализ ЖК в составе суммарных ФЛ не дает представления о том, в составе каких ФЛ происходят обнаруженные при гипотермии изменения

их содержания. Поэтому мы проанализировали изменения жирнокислотного состава различных классов ФЛ, вызванные гипотермией.

В табл. 2 приведены данные по влиянию гипотермии на жирнокислотный состав ФХ. В контроле в составе ФХ преобладающей НЖК является пальмитиновая, МНЖК – олеиновая, ПНЖК – арахидоновая. При кратковременной гипотермии обращает на себя внимание резкое увеличение содержания С16:1 (на 130.3%). В то же время содержание С20:1 моноена надежно не регистрируется. Содержание ПНЖК существенно снижается. Это связано с тем, что при гипотермии в составе ФХ надежно не регистрируется С20:3, а количество С20:4 снижается на 27.5% относительно контроля. Поэтому и индекс ненасыщенности для ФХ при гипотермии достоверно уменьшается. Отношение ПНЖК/МНЖК снижается с 1.47 в контроле до 1.30 при гипотермии (табл. 2).

У животных, перенесших пролонгированную гипотермию, как и после кратковременной гипотермии, общее содержание НЖК в составе ФХ, не отличается от контрольных значений (табл. 2). Общее содержание МНЖК также не отличается от контрольных значений. В то же время общее содержание ПНЖК, пониженное после кратковременной гипотермии, возрастает до уровня контроля после пролонгированной гипотермии. Это достигается за счет повышения содержания С18:2 (на 13.5%) и возрастания уровня С20:4 до контрольных значений. После пролонгирован-

Таблица 1. Содержание жирных кислот (ЖК) в суммарных фосфолипидах мембран эритроцитов крыс при гипотермии (% суммы всех ЖК)

ЖК	Контроль	Гипотермия 30°C	
		30 мин	через 3 ч
C16:0	32.98 ± 1.12	33.91 ± 1.50	35.05 ± 1.44
C16:1	1.58 ± 0.12	1.42 ± 0.11	3.78 ± 0.18*#
C17:0	0.52 ± 0.08	0.51 ± 0.07	1.03 ± 0.10*#
C18:0	13.37 ± 0.46	11.97 ± 0.40	14.23 ± 0.43
C18:1	10.55 ± 0.23	10.80 ± 0.41	10.57 ± 0.36
C18:2	9.60 ± 0.33	9.28 ± 0.23	9.74 ± 0.41
C20:1	Сл	0.60 ± 0.04	Сл
C20:3	0.80 ± 0.15	0.72 ± 0.16	0.65 ± 0.11
C20:4ω6	21.81 ± 0.72	22.82 ± 0.61	18.38 ± 0.52*#
C22:2	1.33 ± 0.11	1.68 ± 0.15	2.58 ± 0.20*#
C22:4ω6	2.35 ± 0.23	1.49 ± 0.12*	1.33 ± 0.07*
C22:5ω6	1.51 ± 0.09	1.60 ± 0.13	Сл
C22:6ω3	3.47 ± 0.34	3.16 ± 0.37	2.36 ± 0.15*
Насыщенные	46.78	46.39	50.31
Моноеновые	12.13	12.82	14.35
Полиеновые	40.87	40.75	35.04
Индекс ненасыщенности	161.4 ± 4.9	161.1 ± 4.7	133.9 ± 3.9*#

Примечание: здесь и в табл. 2–6 * – достоверность различий относительно контроля; # – достоверность различий относительно кратковременной гипотермии 30°C; *, # $p < 0.05$; Сл – следы, содержание жирной кислоты менее 0.5%.

Таблица 2. Содержание жирных кислот (ЖК) в фосфатидилхолинах мембран эритроцитов крыс при гипотермии (% суммы всех ЖК)

ЖК	Контроль	Гипотермия 30°C	
		30 мин	через 3 ч
C16:0	51.97 ± 1.28	52.46 ± 1.18	51.90 ± 2.40
C16:1	1.45 ± 0.19	3.34 ± 0.23*	3.00 ± 0.25*
C17:0	Сл	0.69 ± 0.17	1.00 ± 0.11
C18:0	13.26 ± 0.71	13.53 ± 0.54	12.00 ± 0.49
C18:1	11.62 ± 0.59	11.14 ± 0.82	10.70 ± 0.79
C18:2	12.98 ± 0.65	13.36 ± 0.74	14.73 ± 0.94
C20:0	Сл	0.55 ± 0.03	–
C20:1	0.95 ± 0.06	Сл	–
C20:3	0.92 ± 0.06	Сл	–
C20:4ω6	6.65 ± 0.25	4.82 ± 0.28*	6.47 ± 0.39#
Насыщенные	65.23	67.23	64.90
Моноеновые	14.02	14.48	13.70
Полиеновые	20.55	18.18	21.20
Индекс ненасыщенности	69.3 ± 2.3	60.5 ± 1.9*	69.0 ± 1.6#

ной гипотермии значение индекса ненасыщенности возрастает до уровня контроля. Отношение ПНЖК/МНЖК составляет 3.25. Оно существенно не отличается от значений, обнаруженных как

в контроле, так и при кратковременной гипотермии.

В табл. 3 приведены данные по влиянию гипотермии на жирнокислотный состав ФС. В контроле

Таблица 3. Содержание жирных кислот (ЖК) в фосфатидилсеридах мембран эритроцитов крыс при гипотермии (% суммы всех ЖК)

ЖК	Контроль	Гипотермия 30°C	
		30 мин	через 3 ч
C16:0	5.93 ± 0.29	4.33 ± 0.18*	4.27 ± 0.17*
C16:1	1.30 ± 0.09	0.63 ± 0.03*	0.57 ± 0.06*
C17:0	–	0.67 ± 0.09	0.57 ± 0.07
C18:0	21.86 ± 0.91	25.74 ± 0.73*	20.20 ± 0.35 [#]
C18:1	6.76 ± 0.36	7.13 ± 0.17	6.48 ± 0.26
C18:2	3.40 ± 0.16	3.87 ± 0.22	3.73 ± 0.11
C20:0	–	0.55 ± 0.03	–
C20:4ω6	49.20 ± 1.28	43.67 ± 1.89*	49.40 ± 1.37 [#]
C22:1	Сл	3.01 ± 0.45	3.33 ± 0.28
C22:2	2.29 ± 0.20	Сл	2.35 ± 0.10
C22:4ω6	3.43 ± 0.31	5.40 ± 0.25*	4.00 ± 0.26 [#]
C22:6ω3	5.67 ± 0.13	4.93 ± 0.28	5.03 ± 0.23
Насыщенные	27.79	31.29	25.04
Моноеновые	8.06	10.77	10.38
Полиеновые	63.99	57.87	64.51
Индекс ненасыщенности	264.0 ± 4.6	244.4 ± 4.4*	266.32 ± 3.1

в составе ФС преобладающей НЖК является стеариновая, МНЖК – олеиновая, ПНЖК – арахидоновая. При кратковременной гипотермии в составе НЖК содержание C16:0 снижается на 27%, но содержание C18:0 возрастает почти на 18% и появляются отсутствующие в контроле C17:0 и C20:0. При этом существенно снижается (на 51.5%) содержание C16:1 моноена. В то же время содержание C18:1 моноена повышается и выявляется нерегистрируемый в контроле C22:1 моноен. Общее содержание ПНЖК при кратковременной гипотермии снижается примерно на 10%. Это является результатом разнонаправленных изменений ПНЖК. Так, если содержание C18:2 имеет тенденцию к росту (на 13.8%), а содержание C22:4 достоверно возрастает (на 57.4%), то содержание C20:4 снижается на 11.2% ($p < 0.05$), а содержание C22:6 недостоверно снижается на 13.1% относительно контроля. В то же время C22:2 в составе ФС при гипотермии надежно не регистрируется. В целом эти изменения приводят к тому, что индекс ненасыщенности для ФС при гипотермии достоверно уменьшается. Отношение ПНЖК/МНЖК снижается с 7.94 в контроле до 5.37 при кратковременной гипотермии (табл. 3).

У животных, перенесших пролонгированную гипотермию, общее содержание НЖК в составе ФС, повышенное после кратковременной гипотермии, снижается не только до уровня контроля, но и на 10% ниже него (табл. 3). Это происходит за счет снижения C16:0 (на 28%), C18:0 (7.6%), а так-

же исчезновения C20:0. После пролонгирования гипотермии общее количество МНЖК остается повышенным, как и после кратковременной гипотермии. Общее количество ПНЖК возрастает до уровня контроля. Это достигается в основном за счет C20:4 и C22:4 полиенов, в результате чего индекс ненасыщенности возрастает до уровня контроля. Отношение ПНЖК/МНЖК снижается с 7.94 при кратковременной гипотермии до 6.21 после пролонгированной гипотермии, приближаясь к контрольным значениям.

Анализ жирнокислотного состава МФИ показал, что в контроле в их составе преобладающей НЖК является стеариновая, МНЖК – олеиновая, ПНЖК – арахидоновая (табл. 4). При кратковременной гипотермии общее содержание НЖК не изменяется относительно контроля. Общее содержание МНЖК возрастает на 21.4%. Это происходит как за счет C16:1 (на 12.8%), так и C18:1 (на 23.9%). Общее содержание ПНЖК при кратковременной гипотермии снижается на 10.1%. Такое падение уровня ПНЖК происходит за счет снижения содержания C20:4 (на 10.4%), C22:2 (на 28%) и C22:4 (на 32%). В то же время содержание C18:2 возрастает на 30.4%. В целом эти изменения приводят к тому, что индекс ненасыщенности для МФИ при гипотермии уменьшается на 10.1% по отношению к контролю. Отношение ПНЖК/МНЖК снижается с 4.77 в контроле до 3.53 при кратковременной гипотермии (табл. 4).

Таблица 4. Содержание жирных кислот (ЖК) в монофосфоинозитидах мембран эритроцитов крыс при гипотермии (% суммы всех ЖК)

ЖК	Контроль	Гипотермия 30°C	
		30 мин	через 3 ч
C16:0	20.57 ± 0.64	21.63 ± 0.92	23.85 ± 1.18*
C16:1	1.80 ± 0.09	2.03 ± 0.23	2.49 ± 0.12*
C18:0	34.06 ± 1.25	35.05 ± 1.36	30.25 ± 1.13#
C18:1	6.06 ± 0.31	7.51 ± 0.38*	6.45 ± 0.49
C18:2	4.15 ± 0.29	5.41 ± 0.34*	6.23 ± 0.33*
C20:4ω6	25.44 ± 0.98	22.80 ± 1.24	21.78 ± 1.19*
C22:2	2.86 ± 0.12	2.05 ± 0.16	4.55 ± 0.37*#
C22:4ω6	5.03 ± 0.14	3.42 ± 0.17*	3.62 ± 0.19*
Насыщенные	54.63	56.68	54.10
Моноеновые	7.86	9.54 ± 21.4	8.94 ± 13.7
Полиеновые	37.48	33.68	36.18
Индекс ненасыщенности	143.8 ± 5.9	129.3 ± 4.9	132.1 ± 4.4

При пролонгировании гипотермии содержание C16:0 возрастает на 15.9%, а C18:0 снижается на 11.2% относительно контроля, но эти изменения не оказывают влияния на общее содержание НЖК в составе МФИ относительно контроля (табл. 4). После пролонгирования гипотермии общее количество МНЖК снижается относительно кратковременной гипотермии, но остается на 13.7% выше уровня контроля. Общее содержание ПНЖК, пониженное после кратковременной гипотермии, возрастает до уровня контроля. Такое повышение достигается за счет существенного роста содержания C18:2 (на 50.1%) и C22:2 (на 59.1%) с одной стороны, и менее существенного снижения содержания C20:4 (на 14.4%) и C22:4 (на 28%) с другой стороны. В целом эти изменения приводят к тому, что индекс ненасыщенности для МФИ после пролонгированной гипотермии возрастает относительно кратковременной гипотермии, но остается сниженным по отношению к контролю. Отношение ПНЖК/МНЖК после пролонгированной гипотермии возрастает (4.05) относительно кратковременной гипотермии (3.53), но остается ниже контроля (4.77).

Исследование жирнокислотного состава ФЭА показало, что в контроле преобладающей НЖК является пальмитиновая, МНЖК – олеиновая, ПНЖК – арахидоновая (табл. 5). При кратковременной гипотермии общее содержание НЖК существенно не изменяется относительно контроля. При гипотермии значительные изменения происходят в составе ПНЖК. Если содержание C18:2, C20:3, C20:4 и C22:6 существенно не изменяется, то содержание таких полиенов, как C22:2, C22:4, C22:5 снижается на 23.7, 56.4 и 50% соот-

ветственно относительно контроля. Это, однако, существенно не изменяет общее содержание ПНЖК в составе ФЭА. В целом эти изменения лишь незначительно снижают индекс ненасыщенности для ФЭА при гипотермии по отношению к контролю. Отношение ПНЖК/МНЖК снижается с 2.10 в контроле до 1.88 при кратковременной гипотермии (табл. 5).

После пролонгирования гипотермии общее содержание НЖК и МНЖК в составе ФЭА существенно не отличается от уровня контроля (табл. 5). Обращает внимание на себя тот факт, что после пролонгирования гипотермии содержание большинства изученных ПНЖК, пониженное после кратковременной гипотермии, возрастает. Так, содержание C22:2 возрастает на 31.3%, C22:4 – на 13.5%, C22:6 – на 28.1% относительно контроля. Содержание C22:5 также возрастает относительно кратковременной гипотермии, хотя остается ниже контроля. В то же время общее содержание ПНЖК после пролонгированной гипотермии, как и после кратковременной гипотермии, не изменяется относительно контроля. Индекс ненасыщенности для ФЭА после пролонгированной гипотермии не отличается от значений контроля. Отношение ПНЖК/МНЖК возрастает до значений контроля.

В табл. 6 приведены данные по влиянию гипотермии на жирнокислотный состав п-ФЭА. В контроле в составе п-ФЭА преобладающей НЖК является пальмитиновая, МНЖК – олеиновая, ПНЖК – арахидоновая. Для п-ФЭА характерно очень высокое содержание ПНЖК. При кратковременной гипотермии общее содержание НЖК существенно возрастает (на 33.6%) относительно контроля. Это повышение происходит как за счет

Таблица 5. Содержание жирных кислот (ЖК) в фосфатидилэтаноламинах мембран эритроцитов крыс при гипотермии (% суммы всех ЖК)

ЖК	Контроль	Гипотермия 30°C	
		30 мин	через 3 ч
C16:0	17.59 ± 0.67	19.23 ± 1.19	16.43 ± 0.97
C16:1	1.97 ± 0.15	2.03 ± 0.11	1.97 ± 0.13
C17:0	0.62 ± 0.04	Сл	—
C18:0	6.78 ± 0.31	7.23 ± 0.29	6.97 ± 0.37
C18:1	21.04 ± 1.13	22.80 ± 1.47	21.76 ± 1.79
C18:2	10.34 ± 0.52	10.33 ± 0.68	9.30 ± 0.50
C20:1	1.15 ± 0.06	0.70 ± 0.05*	0.60 ± 0.04*
C20:3	Сл	0.80 ± 0.06	Сл
C20:4ω6	25.06 ± 1.31	26.87 ± 1.69	25.80 ± 1.26
C22:2	3.58 ± 0.13	2.73 ± 0.15*	4.70 ± 0.26*#
C22:4ω6	5.05 ± 0.38	2.20 ± 0.10*	5.73 ± 0.33#
C22:5ω3	3.14 ± 0.15	1.57 ± 0.13*	2.13 ± 0.11*
C22:6ω3	3.59 ± 0.16	3.47 ± 0.21	4.60 ± 0.18
Насыщенные	24.99	26.46	23.40
Моноеновые	24.16	25.53	24.33
Полиеновые	50.76	47.97	52.26
Индекс ненасыщенности	209.7 ± 9.3	199.0 ± 8.9	216.7 ± 11.1

C16:0 (14.9%), так и C18:0 (119%). При гипотермии общее количество МНЖК снижается на 20% по отношению к контролю, это происходит в основном за счет снижения содержания C16:1 (на 15.1%) и C18:1 (на 21.4%). При гипотермии разнонаправленные изменения происходят в составе ПНЖК. Так, содержание C18:2, C20:4, C22:4 возрастает, а содержание C22:2, C22:5ω3 и C22:5ω6 снижается. В целом при гипотермии значение индекса ненасыщенности для п-ФЭА не изменяется по отношению к контролю. Отношение ПНЖК/МНЖК возрастает с 18.6 в контроле до 23.1 при кратковременной гипотермии (табл. 6).

При пролонгировании гипотермии общее содержание НЖК в составе п-ФЭА снижается до уровня контроля (табл. 6). После пролонгирования гипотермии общее количество МНЖК продолжает снижаться. Общее содержание ПНЖК после пролонгированной гипотермии, как и после кратковременной гипотермии, не изменяется относительно контроля. Однако при этом содержание C18:2 и C22:4 существенно возрастает, в тоже время содержание C22:2, C22:5ω3 и C22:5ω6 — снижается. Содержание C20:4 после пролонгированной гипотермии, как и после кратковременной гипотермии не изменяется относительно контроля. Значение индекса ненасыщенности для п-ФЭА после пролонгированной гипотермии, как и после кратковременной гипотермии, не изменяется по отношению к контролю.

Пролонгирование гипотермии способствует увеличению отношения ПНЖК/МНЖК с 18.6 (контроль) до 25.3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эритроцитарная мембрана эволюционно адаптирована для реагирования на механический стресс путем быстрых и обратимых изменений формы. Эта своеобразная морфологическая гибкость обеспечивается сложным взаимодействием между компонентами мембраны: различными видами липидов, большим количеством интегральных мембранных белков и актин-спектриновой сети цитоскелета. Состав липидов плазматической мембраны зрелых эритроцитов млекопитающего поддерживается на протяжении жизни клетки. Его молекулярный состав включает более 250 различных видов глицерофосфолипидов [19]. В зрелом эритроците все липиды находятся в бислое мембраны и состоят из ФЛ и холестерина в молярном соотношении 1.2 : 1. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в липидах мембран эритроцитов крыс больше всего имеется ФХ, минорным компонентом является МФИ, остальные ФЛ представлены примерно в одинаковом количестве (рис. 2). Примерно половина жирных кислот в ФЛ мембран представлена ненасыщенными кислотами (табл. 1), что согласуется с литературными данными [20].

Таблица 6. Содержание жирных кислот (ЖК) в плазмалоген-фосфатидилэтаноламинах мембран эритроцитов крыс при гипотермии (% суммы всех ЖК)

ЖК	Контроль	Гипотермия 30°C	
		30 мин	через 3 ч
C16:0	4.18 ± 0.17	4.91 ± 0.27	4.22 ± 0.23
C16:1	1.06 ± 0.09	0.90 ± 0.10	0.91 ± 0.08
C18:0	0.79 ± 0.06	1.73 ± 0.12*	1.08 ± 0.2
C18:1	3.78 ± 0.27	2.97 ± 0.12	2.68 ± 0.13*
C18:2	1.50 ± 0.13	1.87 ± 0.09*	1.85 ± 0.07*
C20:4ω6	55.06 ± 0.42	59.03 ± 0.35*	57.88 ± 0.43
C22:2	3.83 ± 0.30	2.47 ± 0.13*	2.34 ± 0.17*
C22:4ω6	5.53 ± 0.28	6.27 ± 0.29	7.85 ± 0.41*
C22:5ω3	12.88 ± 0.67	10.30 ± 0.39*	10.91 ± 0.54
C22:5ω6	11.31 ± 0.68	9.43 ± 0.51	10.19 ± 0.79
Насыщенные	4.97	6.64	5.30
Моноеновые	4.84	3.87	3.59
Полиеновые	90.11	89.37	91.02
Индекс ненасыщенности	378.8 ± 9.6	372.4 ± 10.9	380.4 ± 11.2

В физиологических условиях эритроциты имеют асимметричное распределение ФЛ: ФХ и СФМ, составляющие большинство ФЛ, располагаются на внешнем слое, а ФС и ФЭА сконцентрированы на внутреннем слое мембраны [21]. Такие минорные ФЛ, как фосфатидная кислота, ФИ и его производные, также находятся на цитозольной стороне мембраны. Следует отметить, что при гипотермии, независимо от ее длительности, содержание холинсодержащих ФЛ (ФХ, СФМ), расположенных на внешнем слое мембраны, не изменилось (рис. 2). Содержание ФС, расположенного на внутреннем слое мембраны, сразу после падения температуры тела возрастает и продолжает увеличиваться при пролонгировании гипотермии. Несмотря на то что ФЭА также расположен на внутренней стороне мембраны, его количество при гипотермии не изменяется. Возможно, что различия в изменении количества ФЛ при гипотермии являются следствием различия функций, которые выполняют эти липиды в мембране эритроцитов. При гипотермии изменяется также жирнокислотный состав индивидуальных ФЛ, степень которого зависит от длительности гипотермии.

Метаболически эритроциты довольно простые клетки. Они имеют ограниченный энергетический обмен (отсутствуют митохондрии), не способны синтезировать ЖК (нет синтаз жирных кислот, десатураз и элонгаз), а также они не способны синтезировать ФЛ (отсутствует эндоплазматический ретикулум). Тогда каким образом изменяется липидный состав мембран эритроцитов при снижении температуры тела животного?

Анализ полученных нами результатов, а также данные литературы позволяют предположить, что в изменении липидного состава мембран эритроцитов при гипотермии могут быть задействованы несколько механизмов. Это может быть результатом (1) включения механизмов ремоделирования мембранных липидов путем деацилирования и реацилирования ФЛ, (2) обмена с ФЛ плазмы, а также (3) изменения возрастного состава популяции циркулирующих эритроцитов.

Известно, что эритроциты весьма чувствительны к АФК, образующимся в самой клетке и в плазме [22]. Основным источником внутриклеточных АФК в эритроцитах является процесс аутоокисления оксигемоглобина (Нб), дающий супероксид, после дисмутации которого образуется H_2O_2 [10]. Установлено, что в интактных эритроцитах небольшая часть Нб, связанная с мембранами, способствует генерации трудно нейтрализуемых АФК, поскольку в примембранном пространстве они менее доступны для клеточной антиоксидантной системы, которая локализована в основном в цитоплазме. При гипотермии существенно возрастает доля Нб, связанного с мембранами [23]. Это может быть причиной активации свободнорадикальных процессов в эритроцитах на начальных этапах снижения температуры тела у крыс, о чем свидетельствует повышение уровня продуктов ПОЛ и окислительной модификации белков мембран эритроцитов, а также снижение активности антиоксидантной защиты клеток [5, 11, 24].

В составе ФЛ ПНЖК более восприимчивы к перекисидации, что приводит к образованию в

мембранах эритроцитов ряда альдегидов, в том числе и малонового диальдегида (МДА) [25]. Как следствие, наблюдается заметное увеличение НЖК и снижение уровня МНЖК и ПНЖК в мембранах клеток. В ЖК суммарных ФЛ эритроцитарных мембран индекс ненасыщенности, а также отношение ПНЖК/НЖК и неНЖК/НЖК сразу после снижения температуры тела существенно не изменяется, но после пролонгированной гипотермии заметно снижается (табл. 1). Однако в пяти исследованных ФЛ (ФХ, ФС, МФИ, ФЭА, п-ФЭА) мы обнаружили обратную картину (табл. 2–6). Значительное снижение отношения ПНЖК/НЖК и неНЖК/НЖК, обнаруженное в индивидуальных классах ФЛ мембран эритроцитов после кратковременной гипотермии, свидетельствует об их перекисидации. Эти результаты согласуются с данными о более высоком уровне таких продуктов ПОЛ, как МДА, обнаруженном нами [11] и другими исследователями [26] в эритроцитах крыс после кратковременной гипотермии. В то же время после пролонгированной гипотермии значения отношения ПНЖК/НЖК и неНЖК/НЖК в исследованных классах ФЛ возрастают до уровня контроля или даже выше. Эти результаты также согласуются с нашими данными о снижении интенсивности процессов ПОЛ в эритроцитах крыс после пролонгированной 3 ч гипотермии [11]. Таким образом, в динамике умеренной гипотермии изменение жирнокислотного состава индивидуальных ФЛ коррелирует с изменением интенсивности ПОЛ в эритроцитах.

Поскольку после пролонгированной гипотермии происходит нормализация процессов окислительной модификации липидов и белков мембран эритроцитов, нормализация активности компонентов антиоксидантной защиты [11] и осмотической хрупкости эритроцитов [27], а также структурно-функционального состояния мембраны [28], то мы склонны думать, что и нормализация жирнокислотного состава индивидуальных ФЛ, обнаруженная в данной работе, является адаптивной реакцией, направленной на сохранение функциональной активности клеток.

Изменения в составе/структуре липидов под воздействием различных факторов имеют решающее значение для поддержания стабильности и функций мембраны эритроцитов. Несмотря на отсутствие возможности синтезировать липиды *de novo*, эритроциты способны обновлять липиды мембран. Ван ден Бум с коллегами [29] ввели в мембраны изолированных эритроцитов кролика радиоактивно меченные ФЛ, а затем реинфузировали их в кровотоки животным. По потере радиоактивности их жирнокислотных радикалов определили скорость обновления ФЛ. Оказалось, что наиболее быстро обновлялся ФХ (полупериод обновления составил 1.5 сут), медленнее всех обновлялся ФЭА (12 сут), а полупериод обновления

остальных ФЛ составлял примерно 5 дней. По данным авторов примерно 1/3 часть ФХ обновлялась в течение суток либо путем замены, либо за счет деацилирования и реацилирования. В целом исследование показало, что *in vivo* скорость обновления ФЛ мембран эритроцитов зависит от структуры их полярных головок, их локализации в мембране и, в большей степени, от состава ЖК.

Процессы обновления ФЛ ускоряются после их окислительной модификации, в ходе которого окисленные ацильные цепи быстро удаляются из ФЛ мембран под действием (кальций-зависимой) фосфолипазы А2 [30]. Свободные ЖК из плазмы крови поглощаются эритроцитами и этерифицируются с КоА в АТР-зависимой реакции, катализируемой ацил-КоА-синтетазой для ЖК с длинной цепью [31]. Переэтерификация ацильной группы из ацил-КоА в лизофосфолипид затем катализируется ацил-КоА : лизофосфолипид-ацилтрансферазой [32].

Выше мы отмечали, что при острой гипотермии запускается механизм гормонзависимого липолиза депонированных липидов, в результате чего в плазме крови существенно возрастает уровень свободных ЖК [4]. Причем в их спектре увеличивается количество неНЖК. Позже было установлено, что гормонзависимый липолиз приводит к селективной мобилизации неНЖК из триацилглицеролов белой жировой ткани [33], которые затем используются для ремоделирования ФЛ мембран различных тканей. В своей монографии В.Н. Гурин предполагал, что повышение уровня неНЖК в плазме необходимо для снижения вязкости мембран клеток в условиях гипотермии. Учитывая динамику изменения интенсивности процессов ПОЛ, индекса ненасыщенности, отношений ПНЖК/НЖК и неНЖК/НЖК в зависимости от длительности гипотермии, мы полагаем, что процессы перекисидации липидов доминируют в начале гипотермии, в период развития холодового стресса, а процессы ремоделирования липидов запускаются при пролонгировании этого состояния. В пользу этого предположения свидетельствуют также данные по изменению содержания ЛФЛ в мембранных липидах при гипотермии (рис. 2). Так, после кратковременной гипотермии их содержание возросло на 37.7% по сравнению с контролем, а через 3 ч гипотермии, наоборот, снизилось почти в 2 раза относительно контрольного уровня.

При гипотермии в зависимости от ее длительности происходит изменение содержания некоторых ФЛ в составе мембран. Такие изменения могут происходить не только за счет ремоделирования ФЛ, но также в результате их участия в метаболических и регуляторных процессах.

Полученные нами результаты показали, что сразу после снижения температуры тела до 30°C

имеется тенденция к повышению уровня ФС, а через 3 ч гипотермии его содержание в мембранных липидах достоверно на 23.2% увеличилось.

Известно, что в норме ФС локализуется исключительно на внутреннем листке клеточной мембраны [21], что важно для нормального функционирования эритроцитов. ФС взаимодействует со спектрином, что способствует поддержанию формы клеток и таких механических свойств мембраны, как деформируемость и стабильность. Гликирование определенных аминокислотных остатков спектрина приводит к значительному снижению деформируемости мембраны [21, 34]. ФС, связываясь с этими аминокислотными остатками-мишенями спектрина, блокирует их гликирование, что предотвращает снижение деформируемости мембраны. Следовательно, обнаруженное нами повышение уровня ФС в мембране может иметь адаптивное значение, поскольку это будет способствовать поддержанию деформируемости мембраны эритроцитов при гипотермии.

Большое значение для асимметричного распределения ФС имеет уровень свободного Ca^{2+} в эритроцитах. Базальная концентрация свободного Ca^{2+} в эритроцитах в физиологических условиях находится в диапазоне от 30 до 60 нМ [35]. Огромный градиент (не менее 40000 раз) между цитозолем и плазмой крови поддерживается из-за особенно низкой проницаемости мембран эритроцитов для Ca^{2+} (~50 мкмоль на клетку в час), а также эффективного удаления этих ионов из клетки Ca^{2+} -насосом. У молодых эритроцитов, когда внутриклеточный уровень АТР высокий, а Ca^{2+} низкий, асимметричное распределение ФС поддерживается за счет работы АТР-зависимой аминокислоттранслоказы – флипазы [21, 36]. Активность флипазы ингибируется высокими концентрациями Ca^{2+} . При старении эритроцитов концентрация Ca^{2+} в клетке повышается (>1 мкмоль/л), что приводит к ингибированию флипазы и активированию скрамблазы, осуществляющей перенос ФС с внутреннего листка мембраны на внешний [21]. Экстернализация ФС является одним из путей, вызывающих удаление эритроцитов из кровообращения путем фагоцитоза макрофагами ретикуло-эндотелиальной системы.

В условиях окислительного стресса флипаза может быть ингибирована в результате окисления важной для транслоказы тиоловой группы [37]. Кроме того, окислительный стресс приводит к ингибированию Ca^{2+} -АТР-азы [38], которая ответственна за поддержание низкой концентрации кальция в клетке. К тому же Ca^{2+} -насос чрезвычайно чувствителен к температуре: скорость оборота фермента падает примерно в 30 раз на каждые 10°C [39].

Полагают [40], что при гипотермии в эритроцитах происходит снижение уровня АТР и повышение содержания Ca^{2+} . Кроме того, после кратковременной гипотермии в эритроцитах обнаружено развитие окислительного стресса, который сопровождается существенным повышением окислительной модификации липидов и белков мембран, а также снижением уровня восстановленного глутатиона [11]. В нашей лаборатории также показано, что кратковременная умеренная гипотермия приводит к значительному сокращению продолжительности жизни эритроцитов [41]. Эти данные позволяют предположить, что при кратковременной гипотермии в части эритроцитов создаются условия для экстернализации ФС и элиминации таких клеток макрофагами ретикуло-эндотелиальной системы.

Одним из минорных ФЛ мембран эритроцитов является МФИ. Следует отметить, что сразу после снижения температуры тела и особенно после пролонгированной гипотермии содержание МФИ в мембранах эритроцитов снижается (рис. 2). Фосфоинозитиды, расположенные на цитоплазматической стороне мембраны, из-за их отрицательного заряда (до –4 при рН 7) служат сайтами для взаимодействия с цитозольными белками, имеющими специфические участки, и, таким образом, участвуют в сигнальных процессах и ремоделировании цитоскелета [36]. В плазматических мембранах МФИ находится в виде фосфатидилинозитол-4-фосфата, который в последующем подвергается фосфорилированию с образованием фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата. При активации фосфолипазы С_б из фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата образуются два вторичных мессенджера – диацилглицерол и инозитол-1,4,5-трифосфат, участвующие в сигнальных процессах. Следовательно, снижение содержания МФИ в структуре мембран может происходить вследствие его большого расходования в качестве предшественника вторичных мессенджеров внутриклеточных процессов. Снижение уровня МФИ может происходить также в результате его деградации из-за усиления свободнорадикального окисления ПНЖК, которыми богат данный ФЛ. Действительно, после кратковременной гипотермии как количество ПНЖК, так и индекс ненасыщенности в МФИ снижается (табл. 4).

В зависимости от длительности гипотермии в мембранных липидах изменяется также и содержание п-ФЭА. Уровень п-ФЭА, после кратковременной гипотермии снижается на 10%, но после пролонгированной гипотермии повышается до контрольных величин (рис. 2). Энгельман с сотр. [42] показали, что п-ФЭА, в отличие от диацил-ФЭА, быстро переходит из липопротеинов плазмы в мембрану эритроцитов. Можно предположить, что нормализация уровня п-ФЭА в мембранах эритроцитов после пролонгированной гипотермии

связана с поступлением их из липопротеинов плазмы крови.

Установлено, что плазмалогены являются естественными антиоксидантами, способными перехватывать свободные радикалы, тем самым защищая ПНЖК ФЛ от перекисидации [43]. Поскольку изменение содержания п-ФЭА в динамике гипотермии противоположно изменению интенсивности процессов перекисидации липидов мембран эритроцитах крыс [11], то можно предположить, что снижение уровня п-ФЭА после кратковременной гипотермии и повышение после пролонгированной гипотермии отражает также степень их участия в свободнорадикальных процессах в эритроцитах.

Снижение уровня п-ФЭА после кратковременной гипотермии может быть связано также с его метаболизмом. Поскольку плазмалогены обогащены арахидоновой кислотой, они могут функционировать в качестве резервуаров для этого биологически активного липидного медиатора. Плазмалоген-избирательная Ca^{2+} -независимая фосфолипаза А2 вызывает деградацию плазмалогена с образованием лизоплазмалогена и арахидоновой кислоты [44]. Последняя играет важную роль в передаче сигнала, являясь субстратом для синтеза простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов. Образующиеся лизоплазмалогены могут вызывать изменения проницаемости и текучести мембраны, а также способствовать поступлению Ca^{2+} извне через каналы мембраны.

Как было отмечено выше, эритроциты, в отличие от плазмы крови, содержат лишь незначительное количество кальция [35]. Интенсивное проникновение кальция через мембрану эритроцитов должно в первую очередь приводить к активации кальций-зависимых фосфолипаз. Повышение доли ЛФЛ (рис. 2), обнаруженное нами после кратковременной гипотермии, является свидетельством повышения в эритроцитах кальция и активации фосфолипазы А2. Следует подчеркнуть, что для фосфолипазы А2 предпочтительным субстратом являются окисленные ФЛ [46]. Образующиеся ЛФЛ и свободные ЖК имеют не цилиндрическую форму [23]. По этой причине их накопление в мембране приводит к появлению кривизны в мембране и изменяет латеральный профиль давления через мембрану, что приводит к дестабилизации мембраны и повышению ее проницаемости [46]. Возможно, в результате превращения в сфероциты такие эритроциты подвергаются внутрисосудистому гемолизу. Видимо, по этой причине после пролонгирования гипотермии количество ЛФЛ в мембране эритроцитов значительно снижается (рис. 2). Однако нельзя исключить того, что в ходе пролонгирования гипотермии ЛФЛ могут подвергаться этерификации.

Оиши и сотр. [47] при исследовании влияния иммобилизационного стресса на крыс обнаружили повышение активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах и одновременное уменьшение общего количества эритроцитов в крови. Авторы предположили, что одним из возможных механизмов таких изменений является лизис эритроцитов, имеющих низкую активность антиоксидантных ферментов, в результате чего остаются только клетки с высокой активностью ферментов.

Могут ли происходить такие изменения состава эритроцитов при гипотермии, которые отражаются и на составе липидов их мембран?

По нашим наблюдениям плазма крови крыс, полученная сразу после снижения температуры тела до $30^{\circ}C$, всегда имеет интенсивно розовый цвет. Количественный анализ уровня внеэритроцитарного гемоглобина подтвердил факт ускорения внутрисосудистого гемолиза эритроцитов [5]. Причем чем ниже температура тела ($30^{\circ}C \rightarrow 20^{\circ}C$), тем выше уровень гемолиза эритроцитов. Пролонгирование умеренной гипотермии в течение 3 ч уменьшает интенсивность внутрисосудистого гемолиза эритроцитов. Ускорение внутрисосудистого гемолиза эритроцитов при гипотермии может быть связано с процессами, происходящими как в плазме крови, так и в самих эритроцитах.

Установлено, что при снижении температуры тела происходит нарушение микроциркуляции, обусловленное вазоспазмом и централизацией кровотока, повышением вязкости крови, уровнем фибриногена и гематокрита [48, 49]. При этом уменьшается объем внутрисосудистой жидкости, возникают гиповолемия и гемоконцентрация [50]. Эритроцит в данном случае находится в условиях гипоксии, ацидоза, гипоосмолярности, что способствует развитию окислительного стресса. При кратковременной гипотермии снижение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах является дополнительным фактором, способствующим окислительной модификации белков и липидов мембран [11, 26]. Окислительная деструкция ПНЖК в составе ФЛ приводит к повышению уровня МДА, который, как известно, обладает цитотоксическими эффектами, образуя сшивки между ФЛ и белками мембран эритроцитов [51]. В условиях окислительного стресса накопление таких дефектов может привести к превращению части эритроцитов из классической двояковогнутой формы в эхиноциты и сфероциты с потерей их нормальной деформируемости [25]. Умеренная гипотермия действительно приводит к снижению количества дискоцитов и повышению доли их измененных форм (стоматоцитов и сфероцитов) [40]. Снижение деформируемости эритроцитов приводит к снижению капиллярного кровотока и уменьшению доставки кислорода к

тканям [52]. В условиях гипотермии, когда эти поврежденные клетки пытаются пройти через капиллярную сеть, они агрегируют [53] и разрушаются, что приводит к гемолизу [5, 40], микротромбозу и окклюзии этих мелких сосудов [49].

Следует также отметить, что окислительно поврежденные эритроциты узнаются и интернализируются макрофагами в отсутствие опсонизации антителами [54]. Кроме того, в условиях окислительного стресса происходит транслокация ФС на наружный монослой мембраны эритроцитов, что является сигналом для их удаления из кровотока путем фагоцитоза макрофагами ретикулоэндотелиальной системы [55]. Удаление окислительно поврежденных клеток из кровотока путем фагоцитоза, носящее название “внесосудистый гемолиз”, происходит в физиологических условиях во время старения эритроцитов, и он усиливается при некоторых патологических состояниях [56]. Показателем интенсивности этого “внесосудистого” гемолиза эритроцитов является уровень билирубина в плазме крови [57]. Результаты анализа уровня билирубина в плазме крови выявили повышение скорости элиминации эритроцитов сразу после снижения температуры тела и значительное ее ускорение после пролонгированной гипотермии (рис. 1).

Возрастной состав циркулирующих эритроцитов может измениться также за счет поступления в кровотока ретикулоцитов. Так, по данным нашей лаборатории [41] после кратковременной умеренной гипотермии в крови крыс на 50% увеличивается количество ретикулоцитов, существенно снижается продолжительность жизни эритроцитов и, как следствие, происходит усиление суточного эритропоэза в качестве компенсации. После пролонгированной 3 ч гипотермии показатели костномозговой продукции стабилизировались и приблизились к контрольным значениям.

Таким образом, после кратковременной гипотермии имеет место усиление элиминации из кровотока низкорезистентных, старых и дефектных клеток, что является адаптивной реакцией, направленной на стимулирование эритропоэза. Это, в свою очередь, способствует появлению в крови молодых эритроцитов с высокой антиоксидантной защитой, препятствующей перекисидации мембранных липидов.

Совокупность ранее полученных нами данных и результаты настоящего исследования позволяют утверждать, что изменение липидного состава мембран эритроцитов в динамике умеренной гипотермии связано не только с запуском процессов ремоделирования и обмена с липидами липопротеинов плазмы крови, но может отражать изменение возрастного состава циркулирующих в сосудистом русле эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьев Е.В., Шукевич Д.Л., Плотников Г.П., Тихонов Н.С. 2014. Терапевтическая гипотермия: возможности и перспективы. *Клиническая медицина*. **9**, 9–16.
2. Frank M.S., Cattaneo G.C., Wieneke-Brady B.M., El-Rahmany H., Gupta N., Lima A.C.J., Goldstein S.D. 2002. Threshold for adrenomedullary activation and increased cardiac work during mild core hypothermia. *Clinical Science*. **102**, 119–125.
3. Маяхи М.Т.Д., Кличханов Н.К. 2012. Влияние да-ларгина на содержание гормонов гипофизарно-надпочечникового и гипофизарно-тиреоидного эндокринного комплексов в крови крыс при гипотермии. *Изв. Самарского науч. центра РАН*. **14** (5), 273–277.
4. Гурин В.Н. 1986. *Обмен липидов при гипотермии, гипертермии и лихорадке*. Мн.: Беларусь. 190 с.
5. Эмирбеков Э.З., Кличханов Н.К. 2011. *Свободнорадикальные процессы и состояние мембран при гипотермии*. Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета. 200 с.
6. Ferreri C., Masi A., Sansone A., Giacometti G., Larocca A.V., Menounou G., Scanferlato R., Tortorella S., Rota D., Conti M., Deplano S., Louka M., Maranini A.R., Salati A., Sunda V., Chatgililoglu C. 2017. Fatty acids in membranes as homeostatic, metabolic and nutritional biomarkers: Recent advancements in analytics and diagnostics. *Diagnostics*. **7** (1), 1. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010001>
7. Забелинский С.А., Чеботарева М.А., Каландаров А.М., Фейзуллаев Б.А., Кличханов Н.К., Кривченко А.И., Казеннов А.М. 2011. Влияние общей гипотермии на жирнокислотный состав фосфолипидов крови крыс и сусликов и светового излучения на химические процессы в липидном экстракте. *Журн. эволюц. биохим. и физиол.* **47** (4), 284–289.
8. Маяхи Мохаммед Т. Джабер, Таджибова Л.Т., Дадудова Т.Н., Кличханов Н.К. 2012. Влияние гипотермии на содержание гормонов и липопротеинов в сыворотке крови крыс. *Вестник Дагестанского гос. университета. Естеств. науки*. **1**, 140–143.
9. Линчевская А.А., Кондратьева Л.А. 1989. Влияние гипотермии на структурно-функциональные свойства эритроцитов белых крыс. *Вопр. мед. химии*. **6**, 36–39.
10. Kuhn V., Diederich L., Keller T.C.S., Kramer C. M., Lückstädt W., Panknin C., Suvorava T., Isakson B.E., Kelm M., Cortese-Krott M.M. 2017. Red blood cell function and dysfunction: Redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia. *Antioxid. Redox Signal*. **26**, 718–742.
11. Аль-Раби М.А.М., Астаева М.Д., Кличханов Н.К. 2015. Свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии разной длительности. *Естественные науки*. **1** (50), 35–42.
12. Шишкина Л.Н., Шевченко О.Г. 2010. Липиды эритроцитов крови и их функциональная активность. *Успехи соврем. биол.* **130** (6), 587–602.

13. Folch J., Lees M., Sloane-Stanly G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.
14. Rouser G., Siakotos A.N., Fleischer S. 1966. Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids*. **1**, 85–86.
15. Fiske C.U., Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **68375** (2), 375–400.
16. Foote J.L., Allen R.J., Agranoff B.W. 1965. Fatty acids in esters and cerebrosides of human brain in phenylketonuria. *J. Lipid Res.* **6**, 518–524.
17. Шевченко О.Г., Шишкина Л.Н. 2011. Сравнительный анализ состава фосфолипидов эритроцитов крови различных видов мышевидных грызунов. *Журн. эвол. биохим. и физиол.* **47** (2), 151–156.
18. Nakbi A., Tayeb W., Dabbou S., Issaoui M., Grissa A. K., Attia N., Hammami M. 2010. Dietary olive oil effect on antioxidant status and fatty acid profile in the erythrocyte of 2,4-Dexposed rats. *Lipids Health Dis.* **9**, 89. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-89>
19. Myher J.J., Kuksis A., Pind S. 1989. Molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelins of human erythrocytes: improved method of analysis. *Lipids*. **24**, 396–407.
20. Yawata Y. 2003. *Cell membrane: The red blood cell as a model*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 439 p.
21. Arashiki N., Takakuwa Y. 2017. Maintenance and regulation of asymmetric phospholipid distribution in human erythrocyte membranes: Implications for erythrocyte functions. *Curr. Opinion Hematol.* **24** (3), 167–172.
22. Arias C.F., Arias C.F. 2017. How do red blood cells know when to die? *R. Soc. Open Sci.* **4**, 160850. <https://doi.org/10.1098/rsos.160850>
23. Кличханов Н.К., Халилов Р.А., Мейланов И.С. 2001. Влияние гипотермии на активность Na, K-АТФазы и связывание гемоглобина в мембранах эритроцитов крыс. *Биофизика*. **46** (6), 1092–1095.
24. Aslan L., Meral I. 2007. Effect of oral vitamin E supplementation on oxidative stress in guinea-pigs with short-term hypothermia. *Cell Biochem. Function*. **25** (6), 711–715.
25. Mohanty J., Nagababu E., Rifkind J. 2014. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front. Physiol.* **5**, 84. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>
26. Dede S., Deger Y., Mera I. 2002. Effect of short-term hypothermia on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats. *J. Vet. Med.* **A 49**, 286–288.
27. Аль-Рабии М.А.М., Чалабов Ш.И., Астаева М.Д., Кличханов Н.К. 2015. Осмотическая резистентность эритроцитов крыс и концентрация тиоловых групп белков их мембраны зависят от длительности умеренной гипотермии. *Современные проблемы науки и образования*. **3**, 539–545.
28. Кличханов Н.К., Джафарова А.М., Аль-Рабии М.А.М. 2017. Кинетические характеристики ацетилхолинэстеразы и структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов крыс при умеренной гипотермии. *Биол. мембраны*. **34** (3), 201–214.
29. van den Boom M.A., Wassink M.G., Westerman J., de Fouw N.J., Roelofsen B., Op den Kamp J.A., van Deenen L.L. 1994. *In vivo* turnover of phospholipids in rabbit erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta. Lipids and Lipid Metabolism*. **1215** (3), 314–320.
30. van den Berg J.J., Op den Kamp J.A., Lubin B.H., Kuypers F.A. 1993. Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A2: A monolayer study. *Biochemistry*. **32**, 4962–4967.
31. Soupene E., Fyrst H., Kuypers F. A. 2008. Mammalian acyl-CoA: Lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes. *PNAS*. **105** (1), 88–93.
32. Fyrst H., Knudsen J., Schott M. A., Lubin B.H., Kuypers F.A. 1995. Detection of acyl-CoA-binding protein in human red blood cells and investigation of its role in membrane phospholipid renewal. *Biochem. J.* **306**, 793–799.
33. Raclot T. 2003. Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.* **42**, 257–288.
34. Manno S., Mohandas N., Takakuwa Y. 2010. ATP-dependent mechanism protects spectrin against glycation in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **285**, 33923–33929.
35. Bogdanova A., Makhro A., Wang J., Lipp P., Kaestner L. 2013. Calcium in red blood cells – a perilous balance. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 9848–9872.
36. Орлов Ю.Н. 2015. Фосфоинозитидзависимые при- мембранные механизмы регулирования клеточных процессов. *Биол. мембраны*. **32** (3), 151–167.
37. DeJong K., Kuypers F.A. 2004. Oxidative modifications to flippase and scramblase affect phosphatidylserine exposure in mouse sickle cells. *Blood*. **104**, 3752.
38. Pengpanichpakdee N., Thadtapong T., Auparakkitanon S., Wilairat P. 2012. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase sulfhydryl modifications: Implication for oxidized red cell. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. **43** (5), 1252–1257.
39. Sarkadi B., Szasz I., Gerloczy A., Gardos G. 1977. Transport parameters and stoichiometry of active calcium-ion extrusion in intact human red-cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **464**, 93–107.
40. Ломако В.В., Коваленко И.Ф., Шило А.В. 2012. Эритроциты периферической крови при разных вариантах гипотермии гомеотермного организма. *Криобиология*. **22** (4), 398–409.
41. Аль-Рабии М.А.М. 2016. Свободнорадикальный гомеостаз и структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов крыс при гипотермии. Дис. канд. биол. наук. Махачкала: Дагестанский гос. ун-т, 133 с.
42. Engelmann B., Bräutigam C., Kulschar R., Duham J., Prenner E., Hermetter A., Richter W.O., Thiery J., Seidl D. 1994. Reversible redaction of phospholipid bound arachidonic acid after low density lipoprotein apheresis. Evidence for rapid incorporation of plasmalogen-phosphatidylethanolamine into the red blood cell membrane. *Biochem. Biophys. Acta*. **1196**, 154–164.
43. Lessig J., Fuchs B. 2009. Plasmalogens in biological systems: Their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes-

- es and aging and plasmalogen analysis. *Cur. Med. Chem.* **16** (16), 2021–2041.
<https://doi.org/10.2174/092986709788682164>
44. Yang H.-C., Farooqui A.A., Horrocks L.A. 1996. Plasmalogenselective phospholipase A2 and its role in signal transduction. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **14**, 9–13.
 45. McLean L.R., Hagaman K.A., Davidson W.S. 1993. Role of lipid structure in the activation of phospholipase A2 by peroxidized phospholipids. *Lipids.* **28**, 505–509.
 46. Mouritsen O.G. 2011. Lipids, curvature, and nanomedicine. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1174–1187.
 47. Oishi K., Yokoi M., Maekawa S., Sodeyama C., Shiraiishi T., Kondo R., Kuriyama T., Machida K. 1999. Oxidative stress and haematological changes in immobilised rats. *Acta Physiol. Scand.* **165**, 65–69.
 48. Martini W.Z. 2007. The effects of hypothermia on fibrinogen metabolism and coagulation function in swine. *Metabolism.* **56**, 214–221.
 49. Луценко Д.Г., Марченко В.С., Слета И.В. 2008. Применение фрактального анализа для комплексной оценки структурно-функционального состояния микрогемодиализации у крыс после общей гипотермии. *Проблемы криобиологии.* **18** (3), 391–393.
 50. Мишук Н.Е. 2006. Холодовая болезнь (гипотермия). *Медицина неотложных состояний.* **4** (5), 42–47.
 51. Şekeroğlu M.R., Huyut Z., Him A. 2012. The susceptibility of erythrocytes to oxidation during storage of blood: Effects of melatonin and propofol. *Clin. Biochem.* **45**, 315–319.
 52. Hoehn R.S., Jernigan P.L., Chang A.L., Edwards M.J., Pritts T.A. 2015. Molecular mechanisms of erythrocyte aging. *Biol. Chem.* **396** (6–7), 621–631.
 53. Erken G., Erken H.A., Bor-Kucukatay M., Kucukatay V., Genc O. 2011. The effects of *in vivo* and *ex vivo* various degrees of cold exposure on erythrocyte deformability and aggregation. *Med. Sci. Monit.* **17** (8), BR210–215.
 54. Sambrano G.R., Parrhasarathe S., Steinbrg D. 1994. Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 3265–3269.
 55. Manda D., Moitra P. K., Saha S., Basu J. 2002. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Letters.* **513**, 184–188.
 56. Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M. 2005. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 971–988.
 57. Панин Л.Я., Мокрушников П.В., Куницын В.Г., Панин В.Е., Зайцев Б.Н. 2011. Основы многоуровневой мезомеханики наноструктурных переходов в мембранах эритроцитов и их разрушения при взаимодействии с гормонами стресса. *Физическая мезомеханика.* **14** (1), 5–17.

The Effect of Moderate Hypothermia on Phospholipid and Fatty Acid Composition of Rat Erythrocyte Membranes

Z. G. Radzhabova², S. A. Zabelinskii¹*, M. A. Chebotareva¹,
 E. P. Shukolyukova¹, N. K. Klichkhanov², A. I. Krivchenko¹

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg, 194223 Russia

²Dagestan State University, Makhachkala, 367000 Russia

*e-mail: stas@iephb.ru

The effect of moderate hypothermia (30°C) of different duration on the phospholipid (PL) and fatty acid (FA) composition of the erythrocyte membranes of rats was studied. It was established that the content of phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (SPM) is virtually independent of the duration of hypothermia, although the PL composition of the inner layer of the membrane does change, especially the content of phosphatidylserine (PS) and monophosphoinositide (MPI). In total PL of erythrocytes, short-term hypothermia does not lead to significant changes in the content of saturated (SFA), monoenic (MFA), and polyunsaturated (PUFA) fatty acids and in the unsaturation index (UI), while upon a prolonged hypothermia an increase in SFA and MFA and a decrease in PUFA and UI are observed. The duration of hypothermia does not affect the total characteristics of the PC fatty acids; in other phospholipids – PS, phosphatidylethanolamine (PEA), plasmalogen-PEA, and MPI – the deviations observed during short-term hypothermia almost return to the normal level after a long-term exposure to hypothermia. The normalization of the membrane lipid composition after a prolonged hypothermia is partly related with the extravascular hemolysis of damaged erythrocytes, as is evidenced by a decrease in the number of red blood cells and an increase in the level of bilirubin in the blood. The obtained data are discussed in connection with their significance for understanding the mechanisms of lipid adaptation of erythrocyte membranes to low temperatures.

Keywords: erythrocytes, rat, hypothermia, phospholipids, fatty acids

УДК 576.311.5;577.352.3+577.23

ТЕТРАНИТРОЗИЛЬНЫЙ БИЯДЕРНЫЙ КОМПЛЕКС ЖЕЛЕЗА ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА И КЛЕТОК *E. coli* К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

© 2020 г. И. В. Жигачева^{а, *}, С. В. Васильева^а, И. П. Генерозова^б, М. М. Расулов^с

^аИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

^бИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276 Россия

^сГосударственный научно-исследовательский институт химии

и технологии элементоорганических соединений, Москва, 105118 Россия

*e-mail: zhigacheva@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2019 г.

После доработки 27.05.2019 г.

Принята к публикации 28.06.2019 г.

В настоящей работе исследовали влияние донора оксида азота — железо-серанитрозильного комплекса с тиосульфатом $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ТНКЖтио) на перекисное окисление липидов (ПОЛ) в мембранах митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) в модельной системе “старения” митохондрий и в условиях дефицита воды. Кроме того, изучали влияние ТНКЖтио на экспрессию гена *sfiA* ДНК-репарационного SOS-ответа в клетках *E. coli* PQ37. ТНКЖтио в концентрационном интервале 10^{-5} – 10^{-9} М снижал интенсивность ПОЛ до контрольных значений в модельной системе “старения” митохондрий, что, возможно, указывало на наличие антистрессовых свойств у препарата. В условиях дефицита воды в 2 раза повышалась интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах этих органелл. При этом обработка семян гороха 3×10^{-5} или 3×10^{-6} М ТНКЖтио предотвращала активацию ПОЛ в условиях дефицита воды. Кроме того, обработка клеток *E. coli* этим препаратом в 2.7 раза усиливала экспрессию гена *sfiA* SOS-регулона в условиях теплового стресса, что также указывало на адаптогенные свойства препарата. Протекторные свойства ТНКЖтио отразились и на физиологических показателях, а именно на росте проростков. Обработка семян и проростков гороха исследуемым препаратом предотвращала торможение роста корней и побегов в условиях дефицита воды. Предполагается, что защитные свойства ТНКЖтио обусловлены его способностью предотвращать ПОЛ.

Ключевые слова: оксид азота, митохондрии, ПОЛ, дисфункция митохондрий, *E. coli*, стресс

DOI: 10.31857/S0233475520020139

ВВЕДЕНИЕ

В конце 1980-х годов впервые появились сведения о действии NO как вторичного внутриклеточного регулятора сердечнососудистой, нервной и иммунной систем млекопитающих [1]. И только в 1998 г. сформировались первые представления о возможной сигнальной роли NO у растений [2]. NO — внутриклеточная сигнальная молекула, с помощью которой регулируются метаболизм и физиологические процессы на всех этапах онтогенеза растений. Монооксид азота принимает участие в регуляции клеточного цикла, процессах дифференциации и морфогенеза у растений [3, 4]. Он участвует в трансдукции сигналов, стимулирующих у растений синтез ряда фитогормонов, в частности, этилена [3], абсцизовой кислоты (АБК) [5] и ауксина [6]. NO регулирует прорастание семян, рост боковых корней, цветение и со-

зревание плодов, а также участвует в формировании защиты от стрессовых факторов. Молекула оксида азота имеет неспаренный электрон на внешней π -орбитали, обладает свойствами свободного радикала, что обеспечивает высокую химическую реактивность и короткий полупериод жизни. Среднее время жизни NO *in vivo* составляет от 5 до 30 с [7]. За это время происходит его взаимодействие с мишенями (тиолами и переходными металлами). Причем для молекулы NO кластеры железо-серных белков [Fe–S] являются наиболее предпочтительными мишенями в клетке. Отметим, что митохондрии растений являются источниками и мишенью для оксида азота [8]. При этом почти все комплексы электрон-транспортной цепи митохондрий могут быть мишенью для NO и участвовать в его метаболизме. Комплекс I и нечувствительные к ротенону NADPH-дегидрогеназы регулируют образование NO в условиях

гипоксии. С помощью комплекса III и комплекса IV в отсутствие кислорода образуется NO за счет анаэробного восстановления нитрита. Генерируемый NO участвует в цикле фитоглобин–NO, что приводит к поддержанию уровня окислительно-восстановительного потенциала клетки при гипоксии. Отметим, что комплекс IV является основным сайтом генерации NO и способствует поддержанию уровня АТФ в условиях глубокой гипоксии в цикле фитоглобин–NO. Установлено, что в условиях нормоксии восстановление нитрита до NO нарушается под действием ингибиторов альтернативной оксидазы, а также ингибиторов комплексов III и IV электрон-транспортной цепи митохондрий. Эти данные указывают на участие в синтезе NO альтернативной оксидазы (АОХ), III и IV комплексов дыхательной цепи митохондрий [9, 10]. Экспрессия генов альтернативной оксидазы индуцируется NO при гипоксии. Индукция АОХ может происходить посредством ингибирования аконитазы с последующим накоплением цитрата [11], являющегося специфическим индуктором АОХ.

Молекулярной мишенью действия NO являются также железо-серные центры в белках. При этом образуются связанные с белком динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), что продлевает время жизни монооксида азота и сохраняет его биологическую активность [12]. Когда такая трансформация обратима, реакцию $[2Fe-2S]$ -кластеров с низкомолекулярными ДНКЖ можно рассматривать как один из способов регуляции активности железо-серных белков. Включение SH-групп в ДНКЖ снижает их химическую активность, при распаде комплексов SH-группы высвобождаются в виде тиолят-анионов ($R-S^-$), которые на порядок реакционноспособнее SH-групп. Получается, что ДНКЖ могут быть блокаторами и сенсibilизаторами (усилителями) активности SH-групп.

Возможно, в клетках растений, подобно клеткам животных и бактерий, одним из механизмов антиоксидантного действия NO является связывание свободных ионов железа в составе нитрозильных комплексов [13, 14]. В этом случае могут ингибироваться реакции свободно-радикального окисления, катализируемые редокс-активными ионами железа. В пользу этого предположения свидетельствуют данные об антиоксидантных свойствах NO, благодаря которым он предотвращает окислительные повреждения, вызванные различными стрессовыми факторами [15, 16].

Стрессовые воздействия вызывают смещение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в сторону увеличения содержания активных форм кислорода в клетке. При этом одним из основных источников АФК являются митохондрии и хлоропласты [17]. В этих условиях NO может функ-

ционировать как антиоксидант, непосредственно поглощая АФК, в частности $O_2^{\cdot-}$, с образованием пероксинитрита ($ONOO^-$) [15]. Перекисное окисление липидов ингибируется также благодаря взаимодействию NO с алкилпероксильными и алкоксильными радикалами [18]. При этом NO в условиях стресса регулирует антиоксидантные ферменты на уровне активности и экспрессии генов, которые могут вызывать либо усиление, либо снижение окислительно-восстановительного статуса клеток. Например, активация образования NO во время солевого или водного стресса индуцировало антиоксидантную систему: увеличивалась активность таких ферментов как супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза и глутатионредуктаза, что приводило к повышению устойчивости различных растений к дефициту воды или к засолению [16, 19]. Однако в других случаях быстрое накопление NO в ответ на сильные стрессовые стимулы вызывало ингибирование антиоксидантных ферментов и последующее повышение уровня перекиси водорода [20].

С другой стороны быстрая реакция между $O_2^{\cdot-}$ и NO с образованием мощного окислителя пероксинитрита ($ONOO^-$), окисляющего ДНК, липиды, тиоловые группы белков и кластеры железа, приводящая к нарушению ферментативной активности, часто рассматривается как повреждающий клетки фактор, т.е. стрессор [21].

Таким образом, оксид азота находится в центре многих адаптивных и патологических процессов [22]. Адаптогенное или стрессовое действие NO, вероятно, определяется его концентрацией, возрастом растения, и видом стресса (дефицит воды, низкотемпературный стресс, тепловой шок и т.д.).

Изучение протекторных свойств оксида азота часто проводят с применением экзогенных доноров NO. Наиболее перспективными экзогенными донорами NO являются нитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами. Они обладают рядом преимуществ перед другими NO-донорами, такими как органические нитраты и нитриты, требующие участия ферментов для донирования NO. Нитрозильные комплексы железа донируют монооксид азота при физиологических значениях pH без какой-либо (термо-, редокси- или фото-) активации, и при разложении этих комплексов не образуется токсичных или канцерогенных веществ. Эти комплексы являются структурными и спектроскопическими аналогами активных центров негеминовых $[2Fe-2S]$ -белков, найденных во всех живых организмах от бактерий до млекопитающих [23].

В нашей работе мы использовали натрий μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат (комплекс железа с тиосульфатом) –

$\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (кристаллический ТНКЖтио) [23]. Этот комплекс относительно устойчив при хранении на свету в отсутствии влаги. При хранении комплекса в условиях повышенной влажности наблюдается его заметное разложение, сопровождаемое изменением окраски и кристалличности и появлением характерного запаха. В протонных растворителях наблюдается темное разложение биядерного комплекса, сопровождающееся появлением характерных пиков моноядерного динитрозильного комплекса железа при 343 ($\epsilon = 3.889 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 455 ($\epsilon = 1.180 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и 501 ($\epsilon = 1.014 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Генерация NO и образование мононитрозильного интермедиата и частицы $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]^-$ из ДНКЖтио начинается только спустя 40 мин после растворения комплекса [24].

Целью работы было исследование антистрессовых свойств ТНКЖтио. Изучали функциональное состояние митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды и обработки ТНКЖтио. Кроме того, изучали влияние теплового стресса и обработки клеток *Escherichia coli* ТНКЖтио на экспрессию гена *sfiA* ДНК-репарационного SOS-ответа. Одна из SOS-функций, контролируемая геном *sfiA*, выражается в ингибировании клеточного деления и нитевидном росте. В *E. coli* оксид азота избирательно активирует ДНК-репарационную систему SoxRS и транскрипцию SoxR фактора, контролирующего в том числе рост уровня антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы [25].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях 5-дневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Флора 2. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01% раствором KMnO_4 . Контрольную группу семян в течение 1 ч замачивали в воде, а опытную группу – в 3×10^{-5} или 3×10^{-6} М ТСКЖтио. Затем семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. Затем половину проростков контрольной группы (ДВ) и проростки, обработанные ТНКЖтио, на 2 сут переносили на сухую фильтровальную бумагу. Через 2 сут проростки обеих групп переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение последующих 2 сут. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 сут. На 5-е сут выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Выделение митохондрий из 5-дневных эпикотилей проростков гороха (*Pisum sativum* L) проводили методом дифференциального центрифугирования [26]. Эпикотили гороха длиной 3–6 см (20–

25 г) гомогенизировали со 100 мл среды выделения, содержащей: 0.4 М сахарозу, 5 мМ EDTA, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 8.0), 10 мМ KCl, 2 мМ дитиоэритрита и 0.1% БСА (свободный от жирных кислот). Гомогенат центрифугировали при 25000 g в течение 5 мин. Второе центрифугирование – в течение 3 мин при 3000 g. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2–3 мл среды, содержащей: 0.4 М сахарозу, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), 0.1% БСА, (свободный от жирных кислот), и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [27]. Липиды экстрагировали из митохондрий, содержащих 3–5 мг белка, смесью хлороформ : метанол = 2 : 1 (по объему). Соотношение митохондрии : смесь хлороформ–метанол = 1 : 10. Регистрацию флуоресценции проводили в десяти миллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax (Horiba Scientific, Германия). Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420–470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции пересчитанных на мг белка.

Содержание NO в эпикотилиях 5-дневных этиолированных проростков анализировали по методу, описанному в [28]. В основе данного метода лежит превращение содержащегося в растениях NO в нитрит, которое можно определять спектрофотометрически. Определение его концентрации проводили по реакции Грисса. Навеску 60 г эпикотилей гомогенизировали на льду в 50 мМ ацетатном буфере (pH 3.6) с добавлением 4% ацетата цинка. Гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин, затем к 10 мл супернатанта добавляли 150 мг древесного угля. Смесь фильтровали через бумажный фильтр, после чего смешивали 2 мл фильтрата с 1 мл 1% реактива Грисса в 12% уксусной кислоте и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 540$ нм. В качестве стандарта использовали растворы нитрита натрия.

Культура бактерий. В работе исследовали клетки штамма *E. coli* PQ37, содержащие в геноме слитый оперон [*sfiA::lacZ*]. В этом штамме структурный ген β -галактозидазы *lacZ* находится под контролем промотора гена *sfiA* (SOS-регулона), либо промотора *sosS* (SoxRS-регулона), а в геноме присутствует делеция хромосомного *lac*-оперона. Таким образом, о величине экспрессии генов *sfiA* и *sosS* судят опосредованно, измеряя активность *lacZ* β -галактозидазы в колориметрическом тесте [29]. Хромоген для β -галактозидазы – *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG, Sigma, США). В качестве позитивного контроля экспрессии гена *sfiA* SOS-регулона использовали 2.63 нМ водный раствор 4-нитрохинолина оксида (4НХО).

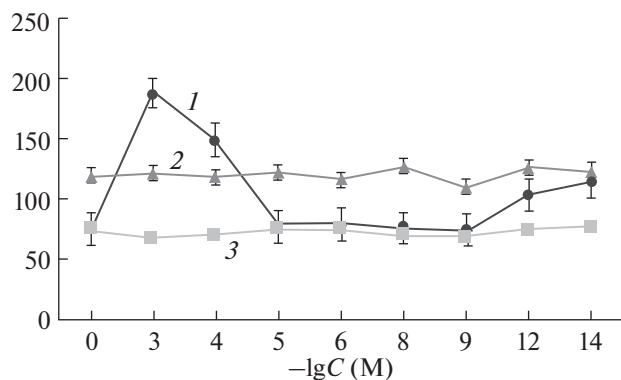


Рис. 1. Влияние “старения” железо-серанитрозильного комплекса с тиосульфатом (ТНКЖтио) на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий 5-дневных проростков гороха. По оси ординат — интенсивность флуоресценции (усл. ед./мг белка), по оси абсцисс — концентрация ТНКЖтио, логарифмическая шкала. 1 — “старение” + ТНКЖтио; 2 — “старение”; 3 — контрольная группа проростков, которая находилась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 сут.

Активность β -галактозидазы рассчитывали по формуле $A = (1000 \times OD_{420} \times V / (OD_{600} \times t))$, где OD_{420} и OD_{600} — значения оптической плотности при 420 и 600 нм, V — разведение, t — время инкубации с хромогеном в мин.

Тепловой стресс. Суспензию бактериальных клеток нагревали на водяной бане в течение 15 мин при 43°C .

Тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатом. Кристаллический водорастворимый донор оксида азота μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат (комплекс железа с тиосульфатом) $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ТНКЖтио) синтезирован в Институте проблем химической физики РАН (Черноголовка). В водном растворе ТНКЖтио образует тиосульфат дианиона $\text{Fe}_2[(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]^{2-}$. Отметим, что в кристаллическом состоянии $[\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ также очень стабилен. В медицине ТНКЖтио является перспективным препаратом для лечения онкологических заболеваний [30].

Использовали реактивы следующих фирм: сахароза, БСА (V-фракция) (Sigma-Aldrich, США), KCl, 1,4-дигидро-DL-треитол (Fluka, Германия), НЕРЕС (Biochemica Ultra, для молекулярной биологии), трис (Fluka, Германия), хлороформ, метанол (Merck, Германия), нитрохиолин-1-оксид (Sigma, США), 5-галактозидаза (Boehringer Mannheim, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск концентраций комплекса железа с тиосульфатом (ТНКЖтио), эффективно снижающих

генерацию АФК в условиях стресса, проводили на модели “старения” митохондрий (инкубация митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха в гипотонической среде, содержащей $1 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4$) [31]. Инкубация митохондрий в гипотонической среде вызывала слабое набухание митохондрий и, возможно, рост генерации АФК, что, вероятно, привело к увеличению интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в мембранах митохондрий проростков гороха в 1.6 раза (рис. 1). Введение ТНКЖтио в среду инкубации митохондрий снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ; этот эффект зависел от дозы ТНКЖтио. Препарат в концентрационном интервале 10^{-5} – 10^{-9} М снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольных значений, что, возможно, свидетельствует о наличии у препарата антистрессовых свойств. Отметим, что в концентрации 10^{-3} – 10^{-4} М препарат проявлял прооксидантный эффект, повышая интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в 2–3 раза. Это указывает на необходимость четко придерживаться концентраций, в которых препарат проявляет антиоксидантный эффект.

Наличие протекторных свойств у ТНКЖтио мы проверили на модели дефицита воды. Поскольку на модельной системе ТНКЖтио в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха, то в исследованиях его антистрессовых свойств *in vivo* использовали его в концентрациях 3×10^{-5} или 3×10^{-6} М. Дефицит воды приводил к активации ПОЛ в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха, о чем свидетельствует почти 2-кратное увеличение интенсивности флуоресценции конечных продуктов перекисного окисления липидов (рис. 2). Отметим, что обработка семян гороха 3×10^{-5} или 3×10^{-6} М ТНКЖтио приводила к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольного уровня.

При обработке клеток *E. coli* комплексом железа с тиосульфатом происходит усиление экспрессии гена *sfiA* SOS-регулона в 2.7 раза. При этом в положительном контроле с 4НХО этот показатель усиливался в 5.7 раз (рис. 3). Внесение 0.1–1.0 мМ *n*-аминобензойной кислоты (ПАБК) в клеточную суспензию способствовало снижению экспрессии гена *sfiA* SOS-регулона на 37–47% в сравнении с обработкой ТНКЖтио. Это согласуется с установленным нами феноменом ингибирования ПАБК всего комплекса индуцибельных генетических функций, составляющих глобальный ДНК-репарационный SOS-ответ в *E. coli*, поскольку изучаемый ген *sfiA* входит в состав SOS-регулона. Мы можем также предполо-

жить, что в этом случае имеет место снижение донирования NO раствором ПАБК + NO и последующее подавление внутриклеточного формирования на его основе новых сигнальных молекул динитрозильного комплекса железа. Известно, что у *E. coli* при тепловом шоке ингибируется экспрессия генов *katG*, *katE* и *sodA*, контролирующих синтез компонентов главных антиоксидантных систем, а также активности каталазы и глутатионредуктазы. Таким образом, тепловой стресс сопровождается явлениями, характерными для окислительного стресса [32]. Экспрессия гена *sfiA* SOS-регулона является адаптивным ответом клетки на окислительный стресс, в частности на увеличение концентрации супероксида. Усиление экспрессии гена *sfiA* SOS-регулона комплексом железа с тиосульфатом, возможно, свидетельствует о протекторных свойствах ТНКЖтио.

Подтверждением предположения об антистрессовых свойствах препарата является изменение физиологических показателей проростков гороха (рост) в условиях дефицита воды и обработки семян водными растворами ТНКЖтио. Известно, что проростки гороха очень чувствительны к дефициту воды, особенно на ранних стадиях роста. В наших экспериментах мы использовали наиболее чувствительные к данному стрессу 2-дневные проростки. Дефицит воды тормозил процессы роста (рис. 4), что согласуется с данными литературы [33]. Обработка семян гороха исследуемым препаратом предотвращала торможение роста корней и побегов проростков в этих условиях. Протекторное действие препарата, вероятно, было обусловлено увеличением содержания NO в тканях растений. Так, содержание оксида азота в тканях эпикотилей 5-дневных проростков гороха, выращенных из семян, обработанных ТНКЖтио и находящихся в условиях дефицита воды, было в 1.86 раз выше (75 нмоль/г сырого веса), чем у необработанных проростков, находящихся в тех же условиях (40 нмоль/г сырого веса). Таким образом, ТСНЖтио в концентрациях 3×10^{-5} и 3×10^{-6} М проявляет антистрессовые свойства.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что влияние NO на метаболические процессы в клетке имеет концентрационную зависимость: в низких концентрациях NO ингибирует свободно-радикальные процессы и, следовательно, перекисное окисление липидов; в высоких концентрациях – активирует. Протекторный эффект донора оксида азота ТНКЖтио, вероятно, обусловлен активацией антиоксидантных ферментов [34] вследствие увеличения экспрессии генов, кодирующих данные ферменты [35]. Кроме того, протекторный эффект препарата, возможно, определяется как активацией альтернативного пути транспорта электронов в дыха-

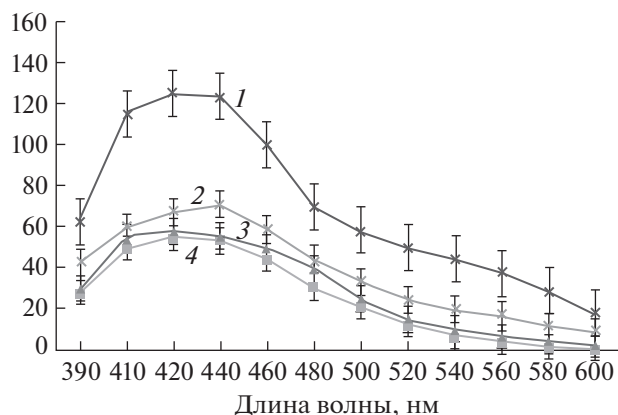


Рис. 2. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ) и при обработке семян ТНКЖтио. По оси ординат – интенсивность флуоресценции (усл. ед./мг белка), по оси абсцисс – длина волны в нм. 1 – ДВ; 2 – ДВ + 3×10^{-5} М ТНКЖтио; 3 – ДВ + 3×10^{-6} М ТНКЖтио; 4 – контрольная группа проростков, которая находилась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 сут.

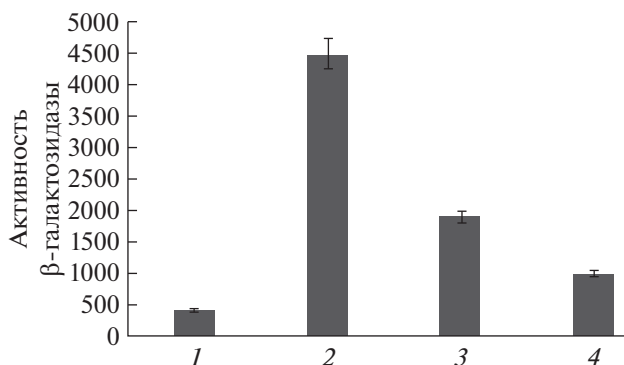


Рис. 3. Влияние теплового шока и ТНКЖ на экспрессию гена *sfiA* в клетках *E. coli* PQ37. 1 – тепловой шок (ТШ); 2 – ТШ + НХО (4-нитрохинолина оксид); 3 – ТШ + ТНКЖтио; 4 – ТШ + ТНКЖтио + ПАБК (парааминобензойная кислота). По оси ординат – активность β -галактозидазы в единицах Миллера.

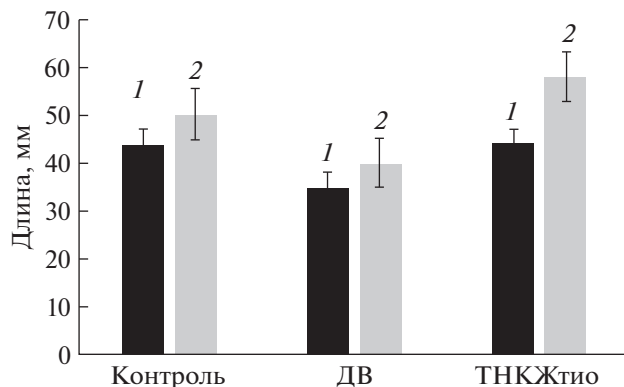


Рис. 4. Влияние дефицита воды (ДВ) и обработки семян гороха ТНКЖтио на длину побегов и корней 5-дневных проростков. 1 – корни; 2 – побеги.

тельной цепи митохондрий с участием альтернативной оксидазы [36], так и увеличением экспрессии генов альтернативной оксидазы [37].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. **327**, 524–526.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. **394**, 585–588.
- Wilson I.D., Neill S.J., Hancock J.T. 2008. Nitric and signaling in plants. *Plant Cell Environ.* **31**, 622–631.
- Емец А.И., Красиленко Ю.А., Шеремет Я.А., Блюм Я.Б. 2009. Реорганизация микротрубочек, как ответ на реализацию сигнальных каскадов оксида азота (II) в растительной клетке. *Цитология и генетика*. **43** (2), 3–12.
- Xing H., Tan L., An L., Zhao Z., Wang S., Zhang C. 2004. Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: Inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regul.* **42**, 61–68.
- Tewari R.K., Kim S.Y., Hahn E.J., Paek K.Y. 2008. Involvement of nitric oxide-induced NADPH oxidase in adventitious root growth and antioxidant defense in *Panax ginseng*. *Plant Biotechnol. Rep.* **2**, 113–122.
- Соловьева А.Г., Кузнецова, В.Л., Перетягин С.П., Диденко Н.В., Дударь А.И. 2016. Роль оксида азота в процессах свободно-радикального окисления. *Вестник Рос. военно-мед. академии*. **1** (53), 228–233.
- Gupta K. J., Kumari A., Florez-Saras I., Fernie A.R., Igamberdiev A.U. 2018. Interaction of nitric oxide with the components of the plant mitochondrial electron transport chain. *J. Exp. Botany*. **69** (14), 3413–3424. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery119>
- Gupta K.J., Kaiser W.M. 2010. Production and scavenging of nitric oxide by barley root mitochondria. *Plant Cell Physiol.* **51**, 576–584.
- Stoimenova M., Igamberdiev A.U., Gupta K.J., Hill R.D. 2007. Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. *Planta*. **226**, 465–474.
- Gupta K.J., Shah J.K., Brotman Y., Jahnke K., Willmitzer L., Kaiser W.M., Bauwe H., Igamberdiev A.U. 2012. Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. *J. Exp. Botany*. **63**, 1773–1784.
- Санина Н.А., Алдошин С.М. 2011. Структура и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами. *Изв. АН. Сер. хим.* **7**, 1199–1227.
- Yalowich J.C., Garbunov N.V., Kozlov A.V., Allan V., Kagan V.E. 1999. Mechanisms of nitric oxide protection against tert-butyl hydroperoxide-induced cytotoxicity in iNOS transduced human erythroleukemia cells. *Biochemistry*. **38** (33), 10691–10698.
- Ванин А.Ф. 1998. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиола — две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах. *Биохимия*. **63** (7), 924–938.
- Laspina, N.V., Groppa M.D., Tomaro M.L., Benavides M.P. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science*. **169**, 323–330.
- Sang J., Jiang M., Lin F., Xu S., Zhang A, Tan M. 2008. Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. *J. Integr. Plant Biol.* **50**, 231–243. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00594.x>
- Taylor N.L., Day D.A., Millar A.H. 2003. Tagrets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* **55** (394), 1–10.
- Kanner J., Harel S., Granit R. 1991. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* **289** (1), 130–136.
- Leshem Y.Y. 1996. Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regulation*. **18** (3), 155–159.
- Groß F., Durner J., Gaupels F. 2013. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front Plant Sci.* **4**, 419–429. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00419>
- Van Breusegem F., Vranová E., Dat J.F., Inze D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. **161**, 405–414.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* **5**, 1237–1247.
- Aldoshin S.M., Sanina N.A., Rakova O.A., Shilov G.V., Kulikov A.V., Shulga Yu.M., Ovanesyan N.S. 2003. New class of neutral paramagnetic binuclear sulfur-containing iron nitrosyl complexes. *Russ. Chem. Bulletin*. **52** (8), 1702–1708.
- Руднева Т.Н. 2007. Синтез, исследование строения и NO-донорной активности нитрозильных комплексов железа с 2-меркаптоимидазолами. Автореф. дис. канд. хим. наук. Черногловка: Ин-т проблем химической физики РАН. 26 с.
- Безматерных К.В. 2018. Влияние биологически активных соединений на индукцию стрессовых регулонов и толерантность к антибиотикам у бактерий *Escherichia coli*. Автореф. дис. канд. биол. наук. Пермь: ИЭГМ УрО РАН. 24 с.
- Попов В.Н., Руге Э.К., Старков А.А. 2003. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха. *Биохимия*. **68** (7), 910–916.
- Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. 1973. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* **52**, 1–9.
- Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B. 2005. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J. Exp. Bot.* **56**, 3223–3228.
- Quillardet P., Huisman O., D'ari R., Hofnung N. 1982. The SOS chromotest. A direct assay of induction of an

- SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79** (19), 5971–5975.
30. Санина Н.А., Руднева Т.Н., Сулименков И.В., Коновалова Н.П., Сашенкова Т.Е., Алдошин С.М. 2009. Противоопухолевающая активность нитрозильных комплексов железа – новых доноров монооксида азота. *Рос. хим. журн.* **53** (1), 164–171.
 31. Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Генерозова И.П., Шугаев А.Г. 2013. Роль адаптогенов в регуляции биоэнергетических функций митохондрий в условиях стресса. *Биол. мембраны.* **30** (4), 313–321.
 32. Закирова О.Н. 2001. *Роль антиоксидантных систем в отклике бактерий Escherichia coli на температурные стрессы.* Дис. канд. биол. наук. Пермь: Ин-т экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 135 с.
 33. Koster K.L., Reisdorph N., Ramsau J.L. 2003. Changing desiccation tolerance of pea embryo protoplasts during germination. *J. Exp. Bot.* **54**, 1607–1614.
 34. Колупаев Ю.Е. 2009. Роль основных сигнальных интермедиатов в формировании адаптивных реакций растений к действию абиотических стрессов. В кн: *Физиология растений: проблемы и перспективы развития.* Киев: Логос, **2**, с. 166–194.
 35. Zhang T., Che F., Zhang H., Pan Y., Xu M.Q., Ban Q., Han Y., Rao J. 2017. Effect of nitric oxide treatment on chilling injury, antioxidant enzymes and expression of the CmCBF1 and CmCBF3 genes in cold-stored Hami melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Postharvest biology and technology.* **127**, 88–98.
 36. Royo B., Moran J.F., Ratcliffe R.G., Gupta K.J. 2015. Nitric oxide induces the alternative oxidase pathway in Arabidopsis seedlings deprived of inorganic phosphate. *J. Exp. Bot.* **66** (20), 6273–6280. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv338>
 37. Huang X., von Rad U., Durner J. 2002. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in Arabidopsis suspension cells. *Planta.* **215** (6), 914–923.

Tetranitrosyl Binuclear Complex of Iron Increases the Resistance of Pea Seedlings and *E. coli* Cells to Stress

I. V. Zhigacheva^{1,*}, S. V. Vasilieva¹, I. P. Generozova², M. M. Rasulov³

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

³State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, Moscow, 105118 Russia

*e-mail: zhigacheva@mail.ru

The influence of nitric oxide donor – iron-sulfur-nitrosyl complex with thiosulfate $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (TNIC-thio) – on lipid peroxidation (LPO) in mitochondrial membranes of 5-day etiolated pea seedlings (*Pisum sativum* L.) in the model system of “aging” of mitochondria and in the conditions of water deficiency was investigated. In addition, the effect of TNIC-thio on the expression of the *sofA* gene of the DNA repair SOS response in *E. coli* PQ37 cells was studied. TNIC-thio in the concentration range of 10^{-5} – 10^{-9} M reduced the intensity of LPO to control values in the model system of “aging” mitochondria, which may indicate the presence of anti-stress properties of the drug. In the conditions of water deficiency the fluorescence intensity of LPO products in the membranes of the mitochondria increased twofold. At the same time, the treatment of pea seeds with 3×10^{-5} or 3×10^{-6} M TNIC-thio prevented activation of LPO under conditions of water deficiency. In addition, the treatment of *E. coli* cells with this drug increased 2.7-fold the expression of gene *sofA* of SOS-regulon under heat stress, which also pointed to the adaptogenic properties of the drug. Protective properties of TNIC-thio were also exhibited with respect of physiological indicators, namely, growth of seedlings. The treatment of pea seeds and seedlings with TNIC-thio prevented the inhibition of root and shoot growth under conditions of water deficiency. It is proposed that protective properties of TNIC-thio are related with its ability to prevent LPO.

Keywords: nitric oxide, mitochondria, lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, *E. coli*, stress

УДК 577.352.465

ИЗОФОРМЫ PI_3 -КИНАЗЫ В ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© 2020 г. П. Д. Котова^а, *, М. Ф. Быстрова^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: polinakotova88@gmail.com

Поступила в редакцию 28.03.2019 г.

После доработки 28.04.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2019 г.

Методами транскриптомного анализа в популяции мезенхимных стромальных клеток (МСК) жировой ткани человека выявлены транскрипты генов, кодирующих α , β и δ изоформы PI_3 -киназы класса I; изоформа $PI_3K\gamma$ в МСК не экспрессируется. Участие различных изоформ PI_3 -киназы в пуринаргической трансдукции в МСК анализировали, используя флуоресцентную микроскопию и Ca^{2+} -индикатор Fluo-4. Показано, что Ca^{2+} -ответы МСК на АТФ подавляются в присутствии ингибиторов $PI_3K\alpha$ и $PI_3K\beta$ (GSK 1059615 и AZD 6482 соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что в большинстве (69%) пуринаргических МСК для полноценной генерации Ca^{2+} -ответов на АТФ требуется активная $PI_3K\alpha$. При этом в небольшой (15%) субпопуляции этих клеток изоформа $PI_3K\beta$ также вовлечена в пуринаргическую трансдукцию.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, Ca^{2+} -сигнализация, пуринаргическая трансдукция, PI_3 -киназа

DOI: 10.31857/S0233475520020073

ВВЕДЕНИЕ

Семейство PI_3 -киназ представляет собой группу киназ, способных фосфолилировать некоторые белковые, но преимущественно липидные субстраты, а именно фосфатидилинозитолы (phosphatidylinositols, PtdIns). У млекопитающих идентифицировано 8 изоформ PI_3 -киназ, и на основе их функциональных и структурных свойств выделено 3 класса [1]. PI_3 -киназы класса I (PI_3KI) катализируют фосфорилирование сигнального липида фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PtdIns(4,5)P₂), продуцируя PtdIns(3,4,5)P₃, также известный как PIP_3 . PI_3 -киназы класса II генерируют PtdIns(3,4)P₂ и PtdIns3P из PtdIns. PI_3 -киназы класса III синтезируют PtdIns3P из PtdIns. Связываясь с РН-доменами различных эффекторных белков, PIP_3 модулирует их локализацию и активность, регулируя широкий ряд биологических процессов, включая клеточный цикл, миграцию клеток и ряд других. Таким образом, PI_3KI действуют как классический посредник передачи сигнала от рецепторов плазматической мембраны внутрь клетки, они вовлечены в передачу сигналов от тирозинкиназных рецепторов, G-белок-связанных рецепторов и малых GTPаз. Представители II и III классов PI_3 -киназ в основном регулируют мембранный

транспорт и лишь косвенно влияют на сигнальные процессы [2].

У млекопитающих подсемейство PI_3KI представлено четырьмя членами: $PI_3K\alpha$, $PI_3K\beta$, $PI_3K\gamma$ и $PI_3K\delta$ в соответствии с их каталитическими субъединицами p110 α , β , γ , и δ [1]. Уровни экспрессии изоформ PI_3KI варьируют в различных тканях, p110 α и p110 β присутствуют в клетках многих тканей, тогда как p110 γ и p110 δ на высоком уровне экспрессируются в лейкоцитах, а в других тканях присутствуют в меньших количествах. Функции изоформ PI_3KI также различны, например, ключевую роль в инсулиновой сигнализации играет $PI_3K\alpha$ [3], но не $PI_3K\beta$ [4], в ангиогенезе – $PI_3K\alpha$, сперматогенезе – $PI_3K\beta$ [5], в иммунных процессах – $PI_3K\gamma$ и $PI_3K\delta$ [6].

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию, которая содержит стволовые клетки, способные дифференцироваться и давать начало костной, хрящевой и жировой тканям. МСК присутствуют практически во всех тканях взрослого организма, однако наиболее доступными для их выделения источниками являются костный мозг и жировая ткань. МСК обладают высоким потенциалом для использования в регенеративной и клеточной медицине, и изучение их рецепторных и сигнальных систем является важной задачей на пути к более

глубокому пониманию физиологии этих клеток. Роль различных изоформ PI_3 -киназ в физиологии МСК на сегодняшний день в целом не очерчена, и в литературе имеются лишь разрозненные сведения об их вкладе в функционирование МСК. Так, например, показано, что уровень экспрессии белков PI_3K/Akt каскада повышается в процессе адипогенной дифференцировки, а ингибиторы PI_3 -киназ понижают ее эффективность, что свидетельствует о важной роли PI_3 -киназного пути для адипогенеза [7, 8]. При этом PI_3K/Akt -путь также вовлечен и в остеогенную дифференцировку МСК [9].

Ранее нами было показано, что в МСК, выделенных из жировой ткани человека, присутствует субпопуляция клеток, в которых аппликации экстраклеточного АТР вызывают мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} . Ответы на АТР генерируются по принципу “все или ничего”, и механизм их генерации включает две стадии. На первой – активированный АТР $P2Y$ -рецептор посредством G-белка стимулирует фосфолипазу C, которая гидролизует фосфолипид PIP_2 и продуцирует два вторичных медиатора – IP_3 и DAG. В свою очередь, IP_3 стимулирует IP_3 -рецепторы, функционирующие в Ca^{2+} -депо, что приводит к выбросу депонированного Ca^{2+} , зависящему от концентрации агониста. Вторая стадия наблюдается, только если внешний стимул достигает некоторой пороговой величины, при которой первоначальный локальный внутриклеточный Ca^{2+} -сигнал достигает определенного уровня, достаточного, чтобы инициировать Ca^{2+} -индуцированный выброс депонированного Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR), развивающийся за счет стимуляции ионами Ca^{2+} IP_3 -рецепторов [10]. Механизм CICR продуцирует глобальный Ca^{2+} -ответ, не зависящий от концентрации агониста [11].

Одним из существенных вопросов, возникающих при изучении этой системы, является вопрос о том, какие внутриклеточные регуляторные системы определяют порог возникновения CICR как ключевого механизма усиления в каскаде трансдукции агонистов в МСК. Как было показано нами ранее, Ca^{2+} -ответы пуринергических МСК на нуклеотиды модулируются и подавляются в присутствии LY294002, являющегося ингибитором PI_3 -киназы (phosphoinositide 3-kinase) [12]. Хотя это свидетельствовало о том, что PI_3 -киназа контролирует пуринергическую трансдукцию в МСК, механизмы этого явления остались невыясненными. Описанные ниже эксперименты представляют собой попытку очертить роль различных изоформ PI_3 -киназы в этом процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение клеток. В данной работе исследовали МСК из жировой ткани человека, выделение и

поддержание первичной культуры которых подробно описано ранее [13]. Выделенные МСК культивировали в 12-луночной планшете в среде Advance Stem (HyClone) с 10% Advance Stem Supplement (HyClone). При достижении 80% монослоя клетки пассировали. Клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma) и HyQTase Cell Detachment Solution (HyClone), а затем рассаживали. В экспериментах использовали МСК 2–4 пассажей.

Микрофотометрия. Клетки прикрепляли с помощью адгезивного материала Cell Tak на дно фотометрической камеры и инкубировали при комнатной температуре ($23-25^\circ C$) в присутствии проникающего через мембрану препарата Fluo-4AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes, США) в течение 20 мин, что обеспечивало загрузку клеток Ca^{2+} -зондом Fluo-4. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором, в котором их выдерживали 40 мин при $4^\circ C$. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 110, KCl – 5.5, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 0.8, HEPES – 10, глюкозу – 10. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss, Германия), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0.75 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology, США). Флуоресценцию клеток, нагруженных Fluo-4, возбуждали при длине волны 480 ± 5 нм, а эмиссию регистрировали в области 535 ± 20 нм. Изменение концентрации цитозольного Ca^{2+} в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции целой клетки ($\Delta F/F_0$), где $\Delta F = F_0 - F$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии Fluo-4 и его эмиссия в начале регистрации соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществлялся с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США). Используемые в экспериментах соли, HEPES, глюкозу и АТР приобретали у Sigma–Aldrich (США); специфические ингибиторы $PI_3K\alpha$ – GSK 1059615, $PI_3K\beta$ – AZD 6482, $PI_3K\gamma$ – AS 605240 были получены от Tocris (Великобритания), $PI_3K\delta$ – IC 87114 – Calbiochem (США).

Молекулярная биология. ОТ-ПЦР. Тотальная РНК выделялась из суспензии МСК, содержащей до 10^6 клеток, с использованием набора GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma). Удаление остатков геномной ДНК из образцов РНК и реакция обратной транскрипции проводились с использованием набора SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNAse enzyme в присутствии случайных, гексамерных праймеров по протоколу производителя (Invitrogene). Для ПЦР использовалась готовая смесь ScreenMix-HS (Евроген) и следующие ген-специфические праймеры, комплементарные всем возможным тран-

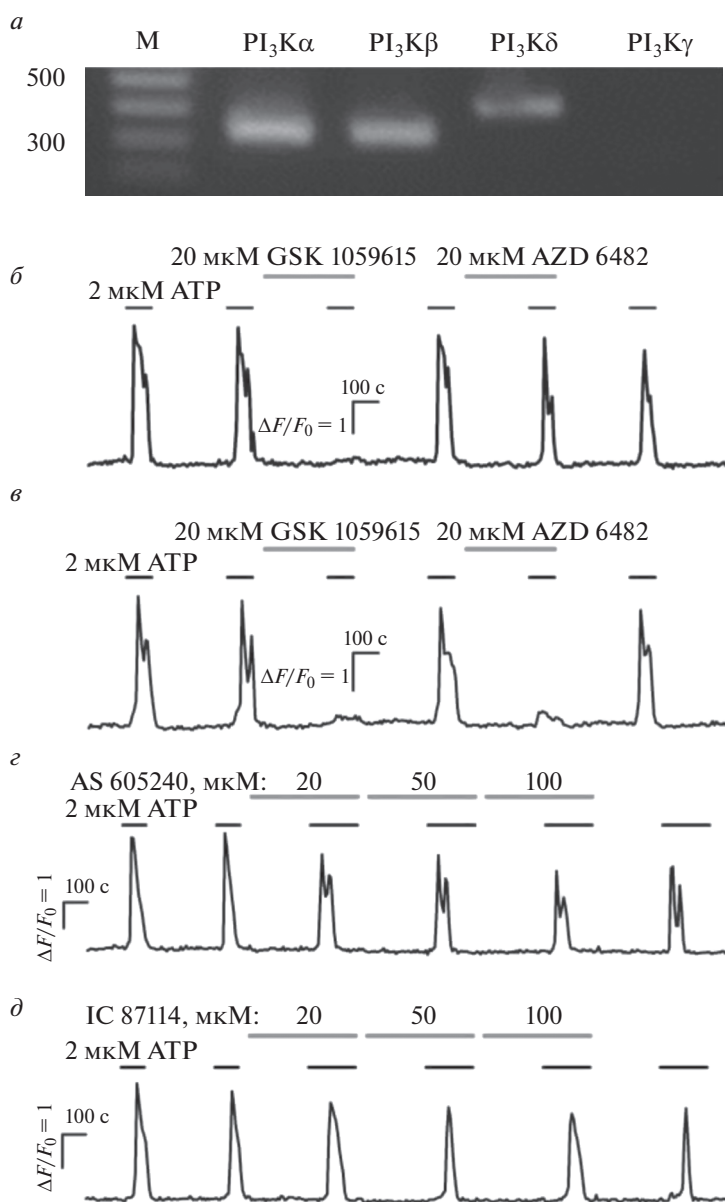


Рис. 1. Функциональная экспрессия изоформ PI₃-киназы в МСК.

a – Транскрипты генов PI₃Kα, PI₃Kβ и PI₃Kδ, идентифицированные в препаратах МСК (*n* = 3). Ампликоны ожидаемого размера 306, 316 и 407 п.н. соответствуют PI₃Kα, PI₃Kβ и PI₃Kδ. Транскрипты гена PI₃Kγ (309 п.н.) не детектировались. В качестве маркеров молекулярных весов (М) использовался GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Агарозный гель (1.3%) окрашивался бромидом этидия.

б, в – Репрезентативные регистрации Ca²⁺-ответов клетки на 2 мкМ АТФ в контроле и в присутствии ингибиторов PI₃Kα GSK 1059615 (20 мкМ) и PI₃Kβ AZD 6482 (20 мкМ) (*б*, *n* = 52; *в*, *n* = 11). Моменты аппликации АТФ и ингибиторов обозначены горизонтальными отрезками выше экспериментальной кривой.

г – Репрезентативный (*n* = 27) ответ клетки на 2 мкМ АТФ в контроле и в присутствии ингибитора PI₃Kγ AS 605240 в концентрациях 20–100 мкМ.

д – Репрезентативный (*n* = 33) ответ клетки на 2 мкМ АТФ в контроле и присутствии ингибитора PI₃Kδ IC87114 в концентрациях 20–100 мкМ. Во всех случаях изменение внутриклеточного Ca²⁺ характеризовали относительной флуоресценцией Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, *F* – текущая интенсивность флуоресценции, *F*₀ – средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации.

скрипт-вариантам генов, кодирующих каталитические субъединицы PI3K, включая p110α (5'-GACAAGAACAAGGAGAAATATATG-3', 5'-AACACATCTCCTGAAACCTC-3'),

(5'-GTCAAAAAAAGCTGGCCAGCTC-3', 5'-TTC-CCTAATGCAAGAGAGTCC-3'), P110δ (5'-ATCT-TTAAGAACGGGGATGAC-3', 5'-AAAATCAAT-GTGGAACAGCTG-3'), P110γ (5'-AATCCCCTA-

CTGAAGAAAAGTTTC-3', 5'-TAAGCCTTAACA-CAGATGTCC-3'). Ожидаемый размер продуктов был 306, 316, 407 и 309 п.н. соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе проводились эксперименты с применением транскриптомного анализа и микрорфотометрии, чтобы выявить изоформы PI₃KI, функционирующие в МСК. С этой целью в препаратах РНК, выделенной из суспензии МСК, осуществляли поиск транскриптов генов, кодирующих каталитические субъединицы PI₃KI, включая PI₃K α , PI₃K β , PI₃K δ и PI₃K γ . Для этого использовали метод ОТ-ПЦР и ген-специфичные праймеры, которые были сконструированы на основе имеющихся в базе данных последовательностей человеческих генов PI₃KI и были комплементарны всем возможным транскрипт-вариантам этих генов. Оказалось, что все три образца РНК, полученные независимо из трех препаратов МСК, содержали транскрипты генов PI₃K α , PI₃K β , PI₃K δ , в то время как транскрипты гена PI₃K γ не были обнаружены (рис. 1а).

В дополнение к транскриптомному анализу проводили функциональные тесты. МСК нагружали Ca²⁺-зондом Fluo-4, и их чувствительность к АТР оценивали по Ca²⁺-сигналам, инициируемым этим нуклеотидом в цитоплазме клеток. В общей сложности в нами было проанализировано 398 МСК, из которых 124 (31%) были идентифицированы как пуринаргические, поскольку в этих клетках регистрировалось повышение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ в ответ на аппликацию АТР (1–5 мкМ) (рис. 1б–1д). Как оказалось, ингибитор PI₃K α (GSK 1059615) блокировал ответы МСК на АТР в 52 (69%) из 75 протестированных в данном типе эксперимента пуринаргических МСК (рис. 1б), при этом в 11 клетках (15%) ингибитор PI₃K β (AZD 6482) также подавлял ответы на АТР (рис. 1в). В то же время ингибитор PI₃K γ (AS 605240) не влиял на способность МСК генерировать Ca²⁺-ответы на АТР в широком диапазоне концентраций (20–100 мкМ) ($n = 27$) (рис. 1з). Этот факт вполне согласуется с данными экспрессионного анализа об отсутствии транскриптов PI₃K γ в препаратах РНК, выделенных из популяции МСК ($n = 3$) (рис. 1а). Хотя транскрипты гена PI₃K δ детектировались (рис. 1а), роль этой изоформы PI₃K в генерации ответов на АТР выявлена не была – в присутствии ингибитора PI₃K δ (IC 87114, 20–100 мкМ) ($n = 33$) МСК генерировали полноценные Ca²⁺-ответы на АТР (рис. 1д). Вероятно, PI₃K δ проявляет свою регуляторную активность в других внутриклеточных процессах, не связанных с генерацией агонист-индуцированных Ca²⁺-ответов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в большинстве пуринаргических МСК для полноценной генерации Ca²⁺-ответов на АТР требуется активная PI₃K α . При этом в небольшой субпопуляции этих клеток PI₃K β -изоформа также вовлечена в пуринаргическую трансдукцию.

Хотя приведенные данные не позволяют в деталях определить роль выявленных изоформ PI₃K класса I, интересным является тот факт, что PI₃K α , PI₃K β , PI₃K δ принадлежат к подклассу А, представители которого, как правило, сопряжены с тирозинкиназными рецепторами. Изоформа PI₃K γ , которая не была обнаружена нами в МСК, является единственным представителем PI₃K класса IB, который преимущественно активируется $\beta\gamma$ -субъединицей GPCR-рецепторов [1]. Эти факты указывают на потенциальную возможность того, что сигнальные процессы, инициируемые в МСК агонистами GPCR-рецепторов, могут модулироваться при участии тирозинкиназных рецепторов.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 17-75-10127).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jean S., Kiger A.A. 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J. Cell Sci.* **127**, 923–928.
2. Bilanges B., Posor Y., Vanhaesebroeck B. 2019. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20** (9), 515–534.
3. Knight Z.A., Gonzalez B., Feldman M.E., Zunder E.R., Goldenberg D.D., Williams O., Loewith R., Stokoe D., Balla A., Toth B., Balla T., Weiss W.A., Williams R.L., Shokat K.M. 2006. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling. *Cell.* **125** (4), 733–747.
4. Nylander S., Kull B., Bjorkman J.A., Ulvinge J.C., Oakes N., Emanuelsson B.M., Andersson M., Skarby T., Inghardt T., Fjellstrom O., Gustafsson D. 2012. Human target validation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) β : Effects on platelets and insulin sensitivity, using AZD6482 a novel PI3K β inhibitor. *J. Thromb. Haemost.* **10** (10), 2127–2136.
5. Guillermet-Guibert J., Smith L.B., Halet G., Whitehead M.A., Pearce W., Rebourcet D., Leon K., Crepieux P., Nock G., Stromstedt M., Enerback M., Chelala C., Graupera M., Carroll J., Cosulich S., Saunders P.T., Huhtaniemi I., Vanhaesebroeck B. 2015. Novel role for p110 β PI3-kinase in male fertility through regulation of androgen receptor activity in Sertoli cells. *PLoS Genet.* **11** (7), e1005304.
6. So L., Fruman D.A. 2012. PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: New developments and therapeutic advances. *Biochem. J.* **442** (3), 465–481.
7. Yu W., Chen Z., Zhang J., Zhang L., Ke H., Huang L., Peng Y., Zhang X., Li S., Lahn B.T., Xiang A.P. 2008. Critical role of phosphoinositide 3-kinase cascade in adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol. Cell. Biochem.* **310** (1–2), 11–18.

8. Cervelli V., Scioli M.G., Gentile P., Doldo E., Bonanno E., Spagnoli L.G., Orlandi A. 2012. Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance. *Stem Cells Transl. Med.* **1** (3), 206–220.
9. Wu R., Ruan J., Sun Y., Liu M., Sha Z., Fan C., Wu Q. 2018. Long non-coding RNA HIF1A-AS2 facilitates adipose-derived stem cells (ASCs) osteogenic differentiation through miR-665/IL6 axis via PI3K/Akt signaling pathway. *Stem Cell Res. Ther.* **9** (1), 348.
10. Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and function of IP₃ receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11** (4), a035063.
11. Kotova P.D., Bystrova M.F., Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Sysoeva V.Yu., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. 2018. Coupling of P2Y receptors to Ca²⁺ mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. *Cell Calcium.* **71**, 1–14.
12. Котова П.Д. 2017. Модуляция Ca²⁺-ответов на АТФ PI₃-киназой в мезенхимных стромальных клетках. *Биол. мембраны.* **34** (1), 70–73.
13. Котова П.Д., Фадеева Ю.И., Рогачевская О.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Колесников С.С. 2015. Пуринергическая сигнализация в мезенхимных стромальных клетках. *Биол. мембраны.* **32**(4), 265–273.

PI₃ Kinase Isoforms in Purinergic Mesenchymal Stromal Cells

P. D. Kotova^{1, *}, M. F. Bystrova¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*
*e-mail: polinakotova88@gmail.com

By using the transcriptom analysis it was demonstrated that mesenchymal stromal cells (MSCs) from the human adipose tissue express α -, β -, and δ -isoforms of PI₃ kinase (PI₃K) from class I, while the PI₃K γ isoform is not expressed. The contribution of PI₃K isoforms to purinergic transduction in MSCs was evaluated with the Ca²⁺-imaging approach and Ca²⁺ dye Fluo-4. As was shown, Ca²⁺ transients elicited by ATP in MSCs could be canceled by the PI₃K α and PI₃K β inhibitors, GSK 1059615 and AZD 6482, respectively. The overall data indicated that most (69%) of MSCs were capable of generating robust ATP responses provided that PI₃K α was sufficiently active. Yet, a small (15%) subpopulation of purinergic MSCs additionally employed the PI₃K β isoform to transduce extracellular ATP.

Keywords: mesenchymal stromal cells, Ca²⁺ signaling, purinergic transduction, PI₃ kinase