

СОДЕРЖАНИЕ

Том 38, номер 3, 2021

| | |
|---|-----|
| Взаимодействие упорядоченных липидных доменов в присутствии амфипатических пептидов <i>К. В. Пинигин, Т. Р. Галимзянов, С. А. Акимов</i> | 163 |
| Влияние ионной силы на адсорбцию полипептидов на липидных мембранах. Теоретический анализ <i>Р. Ю. Молотковский, Т. Р. Галимзянов, Ю. А. Ермаков</i> | 176 |
| Индукционные изменения флуоресценции клеток <i>Chara</i> , связанные с обменом метаболитов между хлоропластами и потоком цитоплазмы <i>А. А. Бульчев</i> | 187 |
| Роль экстраклеточного Ca^{2+} в регуляции распределения и конформации гемоглобина в эритроцитах <i>О. В. Слатинская, Н. А. Браже, С. Н. Орлов, Г. В. Максимов</i> | 199 |
| Малоновый диальдегид, но не метилглиоксаль, нарушает инсулиновый каскад, синтез NO и эндотелиальный барьер <i>М. В. Самсонов, Н. В. Подкуйченко, В. З. Ланкин, А. В. Воротников, В. П. Ширинский</i> | 209 |
| Влияние газотрансмиттера монооксида углерода на микрореологию и эластичность мембран эритроцитов <i>А. В. Муравьев, И. А. Тихомирова, С. В. Булаева, Е. П. Петроченко, Ю. В. Малышева</i> | 217 |

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

| | |
|--|-----|
| <i>Ex vivo</i> мониторинг стимул-зависимой секреции АТР вкусовыми клетками <i>А. А. Хохлов, О. А. Рогачевская</i> | 225 |
| Правила для авторов | 230 |

Contents

Vol. 38, No. 3, 2021

| | |
|--|-----|
| Interaction of Ordered Lipid Domains in the Presence of Amphipatic Peptides <i>K. V. Pinigin, T. R. Galimzyanov, S. A. Akimov</i> | 163 |
| Influence of Ionic Strength on Adsorption of Polypeptides on Lipid Membranes: Theoretical Analysis <i>R. Yu. Molotkovsky, T. R. Galimzyanov, Yu. A. Ermakov</i> | 176 |
| Induction Changes of Chlorophyll Fluorescence in <i>Chara</i> Cells Related to Metabolite Exchange between Chloroplasts and Cytoplasmic Flow <i>A. A. Bulychev</i> | 187 |
| The Role of Extracellular Ca ²⁺ in Regulating the Distribution and Conformation of Hemoglobin in Erythrocytes <i>O. V. Slatinskaya, N. A. Brazhe, S. N. Orlov, G. V. Maksimov</i> | 199 |
| Malondialdehyde but Not Methylglyoxal Impairs Insulin Signaling, NO Production, and Endothelial Barrier <i>M. V. Samsonov, N. V. Podkuychenko, V. Z. Lankin, A. V. Vorotnikov, V. P. Shirinsky</i> | 209 |
| Effects of Carbon Monoxide on Microrheology and Elasticity of Erythrocyte Membranes <i>A. V. Muravyov, I. A. Tikhomirova, S. V. Bulaeva, E. P. Petrochenko, Yu. V. Malysheva</i> | 217 |

SHORT COMMUNICATIONS

| | |
|---|-----|
| <i>Ex Vivo</i> Monitoring of Stimulus-Dependent ATP Secretion by Taste Cells <i>A. A. Khokhlov and O. A. Rogachevskaja</i> | 225 |
| Instructions for authors | 230 |

УДК 577.352

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УПОРЯДОЧЕННЫХ ЛИПИДНЫХ ДОМЕНОВ В ПРИСУТСТВИИ АМФИПАТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

© 2021 г. К. В. Пинигин^а, Т. Р. Галимзянов^а, С. А. Акимов^{а, *}

^аИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: akimov_sergey@mail.ru

Поступила в редакцию 16.11.2020 г.

После доработки 11.12.2020 г.

Принята к публикации 12.12.2020 г.

В плазматических мембранах эукариотических клеток возможно образование относительно упорядоченных липид-белковых доменов. Домены, обогащенные сфингомиелином и холестерином, называются рафтами. Характер взаимодействия доменов может оказывать существенное влияние на процессы, для протекания которых необходима колокализация нескольких мембранных белков. Толщина упорядоченного липидного бислоя превышает толщину окружающей неупорядоченной мембраны, поэтому предполагается, что на границе упорядоченных доменов возникают упругие деформации, направленные на сглаживание скачка толщины бислоя. Характерная длина деформаций составляет несколько нанометров, и при сближении двух доменов деформации, индуцируемые их границами, начинают перекрываться, что приводит к эффективному латеральному взаимодействию. В настоящей работе мы теоретически рассмотрели, каким образом изменяется профиль энергии взаимодействия упорядоченных доменов при адсорбции на мембрану амфипатических пептидов. Амфипатические пептиды способны частично встраиваться в мембрану, вызывая в ней упругие деформации. Для анализа энергии деформаций различных конфигураций упорядоченных доменов и амфипатических пептидов использовалась теория упругости липидных мембран. В мембране без пептидов приведение в контакт двух параллельных границ упорядоченных доменов требует преодоления некоторого энергетического барьера. Согласно результатам наших расчетов, при наличии в мембране амфипатических пептидов высота этого энергетического барьера возрастает в несколько раз. Таким образом, амфипатические пептиды должны существенно затруднять слияние упорядоченных доменов и способствовать стабилизации ансамбля нанодоменов.

Ключевые слова: амфипатический пептид, рафт, теория упругости мембран, взаимодействие доменов

DOI: 10.31857/S0233475521030075

ВВЕДЕНИЕ

Плазматические мембраны клеток млекопитающих латерально неоднородны. Считается, что мембранные белки и липиды образуют домены [1, 2], причем специфическое липидное окружение необходимо для правильного функционирования белков [3, 4]. Домены, обогащенные сфингомиелином и холестерином, называются рафтами [5]. Типичный латеральный размер клеточных рафтов составляет 10–200 нм в зависимости от метода его определения [1, 6]. Малый размер рафтов существенно затрудняет их экспериментальное исследование *in vivo*.

В модельных мембранах, которые не содержат белков и состав которых близок к липидному составу наружных монослоев плазматических клеточных мембран, при понижении температуры (например, до комнатной) происходит фазовое разделение [7] и образуются домены микронных размеров, обогащенные сфингомиелином и холестерином [8]. Такие домены используются в каче-

стве модели клеточных рафтов. Для их исследования могут применяться различные, в том числе и оптические, экспериментальные методы. В модельных мембранах было установлено, что липиды в доменах находятся в жидкоупорядоченном (L_0) состоянии, в то время как окружающая мембрана — жидконеупорядоченная (L_d) [9]. Толщина бислоя рафтов на 0.5–1 нм превосходит толщину окружающей мембраны [10, 11]. Кроме того, упорядоченные домены практически всегда бислойны: если в одном монослое мембраны находится упорядоченный домен, то в противоположном монослое в том же месте также будет находиться упорядоченный домен [12, 13].

Физические причины сохранения малого размера доменов в клеточных мембранах до сих пор не установлены. Классическая теория кинетики фазового разделения в жидкой системе предсказывает образование единой упорядоченной макроскопической фазы [14], хотя характерное время

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

ее формирования может составлять несколько часов [15]. При этом для некоторых мембранных процессов, сопровождающихся колокализацией нескольких мембранных белков, показано, что до запуска процесса белки были надежно разделены пространственно и заведомо не взаимодействовали друг с другом [16, 17]. Предполагается, что исходно белки располагались в различных мембранных доменах, причем случайное слияние доменов было исключено. В работе [2] из плазматических мембран было выделено четыре вида доменов, характеризующихся различным липидным и белковым составом. Однако в модельных мембранах, сформированных из трех основных липидных компонентов плазматических клеточных мембран, упорядоченные домены, как правило, сливаются практически при каждом столкновении [18]. Мы полагаем, что за стабилизацию малых доменов в клеточных мембранах могут быть ответственны минорные мембранные компоненты, мольные доли которых составляют доли или единицы мольных процентов. В частности, в модельной системе было показано, что при добавлении ганглиозида GM1 в концентрации < 1 мол. % средний размер доменов уменьшается в несколько раз [11, 19]. Согласно теоретической модели работы [11], ганглиозид GM1 накапливается в узкой полосе на границе доменов и значительно понижает энергию межфазной L_o/L_d -границы. Данная модель предсказывает аналогичный эффект для любых мембранных компонентов с ненулевой спонтанной кривизной; спонтанная кривизна ганглиозида GM1 положительна и равна $\sim 0.25 \text{ нм}^{-1}$ [20]. В частности, было теоретически показано, что на границе упорядоченных доменов должны накапливаться амфипатические пептиды, также обладающие положительной спонтанной кривизной [21, 22].

В настоящей работе мы рассмотрели взаимодействие параллельных границ двух упорядоченных доменов, разделенных полосой окружающей мембраны. Предполагалось, что взаимодействие опосредовано упругими деформациями мембраны. Профили энергии взаимодействия были рассчитаны для случаев чисто липидной мембраны и мембраны, на которую адсорбированы и в которую частично встроены амфипатические пептиды. Показано, что в чисто липидной мембране для приведения границ доменов в плотный контакт необходимо преодолеть энергетический барьер. При оптимальном расположении адсорбированных пептидов относительно границ упорядоченных доменов высота этого энергетического барьера резко возрастает. Таким образом, минорные мембранные компоненты с ненулевой спонтанной кривизной, помимо понижения энергии межфазной L_o/L_d -границы, должны также затруднять слияние доменов.

Функционал упругой энергии. Для расчета энергии деформаций мы рассматриваем мембрану как непрерывную упругую среду. В латеральном направлении мембрана предполагается жидкой в том смысле, что работа по квазиравновесному латеральному сдвигу равна нулю. Экспериментально было установлено, что толщина бислоя L_o -фазы превышает толщину окружающей L_d -мембраны на 0.5–1 нм [10, 11]. Предполагается, что на границе L_o -доменов мембрана деформируется таким образом, чтобы сгладить этот скачок толщины. Ранее было показано, что энергия деформаций минимальна, когда границы L_o -доменов в противоположных монослоях мембраны сдвинуты друг относительно друга на 2–4 нм [23]. Таким образом, в окрестности границы домена можно выделить три зоны: L_o -бислоем, L_d -бислоем и “гибридный” бислоем между ними шириной 2–4 нм, в котором один монослой находится в L_o -состоянии, а другой – в L_d .

Малые деформации, характерный пространственный масштаб которых значительно превышает толщину мембраны, как правило, хорошо описываются с помощью классического функционала упругой энергии, полученного Хельффрихом [24]. В рамках подхода Хельффриха мембрана рассматривается как двумерная бесконечно тонкая пленка, не имеющая какой-либо внутренней структуры. Упругая энергия мембраны полностью определяется формой поверхности и пропорциональна квадрату ее геометрической кривизны. В настоящей работе исследуются деформации мембраны, возникающие на характерных масштабах порядка нескольких нанометров. В связи с этим необходимо учитывать деформацию наклона липидных молекул относительно нормали к поверхности липидного монослоя, характерный масштаб которой сравним с толщиной мембраны, т.е. составляет несколько нанометров [23, 24]. В рамках линейной теории упругости липидных мембран функционал энергии, учитывающий деформацию наклона, был впервые получен Хаммом и Козловым [25]. В дальнейшем вывод Хамма–Козлова был пересмотрен в работах [26–28], в которых было показано, что необходимый учет изменения толщины монослоев мембраны при деформациях приводит к дополнительным квадратичным слагаемым, не учтенным в функционале Хамма–Козлова. В данной работе для функционала упругой энергии липидного монослоя мы используем следующее наиболее полное квадратичное выражение [28]:

$$w = \int \left\{ \frac{B}{2} (\nabla \mathbf{n} + J_0)^2 + \frac{B}{2} J_0^2 + \frac{k_t}{2} \mathbf{T}^2 + k_c \mathbf{T} (\nabla \nabla \mathbf{n}) + \frac{k_{gr}}{2} (\nabla \nabla \mathbf{n})^2 + \sigma_0 \right\} dS - \sigma_0 S_0. \quad (1)$$

В данном функционале векторное поле единичных векторов \mathbf{n} , называемых директорами, характеризует среднюю ориентацию гидрофобных цепей липидов. Директор считается направленным от гидрофильной части липидных молекул к гидрофобной. Поле векторов наклона $\mathbf{T} \equiv \frac{\mathbf{n}}{\mathbf{N} \cdot \mathbf{n}} - \mathbf{N}$ характеризует отклонение директора от нормали \mathbf{N} к так называемой разделяющей поверхности, которая проходит внутри липидного монослоя в области сочленения гидрофильной и гидрофобной частей липидных молекул. Векторные поля \mathbf{n} и \mathbf{T} определены на разделяющей поверхности. В функционале (1) выражение $\frac{1}{2} B(\nabla \cdot \mathbf{n} + J_0)^2 - \frac{1}{2} B J_0^2$ описывает поверхностную плотность деформации изгиба, а последние три слагаемых, $\frac{1}{2} k_t \mathbf{T}^2 + k_c \mathbf{T} \cdot (\nabla \nabla \cdot \mathbf{n}) + \frac{k_{gr}}{2} (\nabla \nabla \cdot \mathbf{n})^2$, — поверхностную плотность энергии деформации наклона [27, 28]. Кроме того, мы учитываем приложенное к мембране латеральное натяжение σ_0 , однако пренебрегаем вкладом деформации латерального растяжения–сжатия. Таким образом, формально расчеты проводятся в приближении $k_A \rightarrow \infty$, где k_A — модуль латерального растяжения–сжатия. Допустимость данного приближения подтверждается экспериментальными данными, согласно которым в мембранах, содержащих холестерин, модуль латерального растяжения–сжатия значительно превосходит модуль наклона ($k_A \gg k_t$), и, таким образом, энергия деформации латерального растяжения–сжатия должна быть значительно меньше энергии деформации наклона. При этом мы рассматриваем взаимодействие доменов L_o -фазы, которая образуется только в мембранах с высоким содержанием холестерина (~20–50 мол. %) [29, 30].

Упругие параметры мембраны. Для получения количественных результатов, использовали следующие параметры мембраны: модуль изгиба B полагался равным $20 k_B T$ и $10 k_B T$ ($T = 300$ К) для монослоев L_o -домена и окружающей L_d -мембраны, соответственно [29–32]; спонтанные кривизны монослоев обеих фаз считались равными нулю; модуль наклона $k_t = 50$ мН/м $\approx 12 k_B T/\text{нм}^2$, исходя из теоретической оценки работы [25], одинаковый для обеих фаз; модуль $k_c = -5 k_B T$ и модуль $k_{gr} = 3 k_B T/\text{нм}^2$, согласно оценке, приведенной в работе [28], одинаковые для обеих фаз. Латеральное натяжение полагалось равным 0.6 мН/м $\approx 0.125 k_B T/\text{нм}^2$ в каждом монослое и одинаковым в обеих фазах. Гидрофобная толщина монослоев L_o -домена и окружающей L_d -мембраны полагалась равной $h_d = 1.8$ нм и $h_s = 1.3$ нм соответственно [10, 33, 34].

Параметризация системы. Будем считать, что диаметр L_o -домена значительно превышает характерную длину изменения деформаций мембраны. Это позволяет пренебречь локальной кривизной границы домена и считать ее прямой линией, вдоль которой система обладает трансляционной симметрией. Для определенности рассмотрим горизонтальную мембрану. Введем декартову систему координат $Oxuz$. Пусть в недеформированном состоянии мембрана параллельна плоскости Oxu , ось Ox направлена перпендикулярно границе L_o -домена; ось Oy направлена вдоль границы L_o -домена, ось Oz перпендикулярна плоскости мембраны; начало координат расположено на границе L_o -домена в нижнем монослое мембраны. Величины, относящиеся к верхнему и нижнему монослоям, будем обозначать индексами “ u ” и “ l ” соответственно. Обозначим форму разделяющих поверхностей H , а форму межмонослойной поверхности — M . Вследствие трансляционной симметрии системы вдоль границы домена, энергию деформаций можно относить к единице длины вдоль границы домена, а векторные величины, входящие в функционал упругой энергии, заменить их проекциями на ось Ox : $\mathbf{n} \rightarrow n_x = n$, $\mathbf{N} \rightarrow N_x = N$, $\mathbf{t} \rightarrow t_x = t$.

Граничные условия. Для описания системы мембрана разделяется на зоны, соответствующие бислою L_o -домену, бислоем окружающей мембране и переходному участку между ними, в котором один монослой находится в L_o -состоянии, а другой — в L_d . На границах зон налагаются условия непрерывности директоров и разделяющих поверхностей. Помимо этого, считается, что деформации ограничены и затухают (обращаются в нуль) вдали от границы домена.

Амфипатический пептид будем располагать в верхнем монослое мембраны параллельно границе упорядоченного домена. В области монослоя, занятой пептидом, разделяющая поверхность не существует. Соответственно, участок нижнего монослоя напротив пептида находится в условиях, отличных от условий, в которых находится монослой в составе бислоя. Для учета этого различия явно вводится дополнительная зона мембраны — монослой напротив встроенного амфипатического пептида. На границах этого монослойного участка директор и разделяющая поверхность также считаются непрерывными.

При частичном встраивании в мембрану амфипатического пептида должны раздвигаться в стороны полярные головки липидов. Это приводит к скачку проекции директора на правой и левой границах пептида (рис. 1).

Для оценки величины скачка проекций директора мы предполагаем, что директора, характеризующие ориентацию гидрофобных цепей липидных молекул, ближайших к пептиду, направлены в центр масс гидрофобной части участка

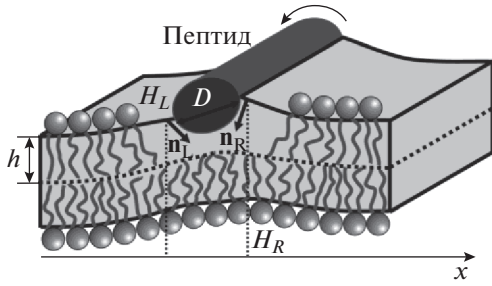


Рис. 1. Частичное встраивание амфипатического пептида в липидный монослой приводит к скачку директора на правой (n_R) и левой (n_L) границах пептида. При повороте пептида вокруг его продольной оси изменяются z -координаты разделяющей поверхности монослоя на правой (H_R) и левой (H_L) границах пептида. D – диаметр пептида; h – толщина гидрофобной части монослоя.

монослоя, расположенного непосредственно под пептидом: $|n_R - n_L| = \Delta n = D / \sqrt{(h/2)^2 + (D/2)^2}$, где h – гидрофобная толщина монослоя в недеформированном состоянии; D – диаметр пептида, который мы оцениваем приблизительно как диаметр α -спирали пептида, $D = 1.3$ нм; n_L и n_R – значения проекций директора на правой и левой границах пептида, соответственно. При этом, если пептид находится частично и в L_o -домене, и в окружающей мембране, то мы полагаем $\Delta n = \delta D / \sqrt{(h_d/2)^2 + (D/2)^2} + (1 - \delta) D / \sqrt{(h_s/2)^2 + (D/2)^2}$, где δ является долей диаметра пептида, находящейся в L_o -домене, h_s и h_d – гидрофобные толщины монослоев окружающей L_d -мембраны и L_o -домена, соответственно [22]. Помимо этого граничного условия, мы учитываем возможность вращения пептида как целого вокруг его продольной оси, что налагает условие на z -координаты разделяющей поверхности монослоя на правой и левой границах пептида: $H_R - H_L = (1/2)D(n_L + n_R)$, где H_R и

H_L – z -координаты разделяющих поверхностей на правой и левой границах пептида, соответственно (рис. 1) [22].

РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Уравнения Эйлера–Лагранжа для переходной зоны между L_o -доменом и окружающей L_d -мембраной. Выражение для функционала упругой энергии (1) выводится в предположении локальной объемной несжимаемости гидрофобной части липидного монослоя [28]. Это предположение оправдано большой величиной модуля объемного сжатия мембран, сравнимого с модулем объемного сжатия воды [35–37]. Условие локальной объемной несжимаемости имеет вид: $H_u - M =$

$= h_u - \frac{h^2}{2} \frac{d}{dx} n_u$ и $M - H_l = h_l - \frac{h^2}{2} \frac{d}{dx} n_l$ для верхнего и нижнего монослоя, соответственно [25]. Работа против латерального натяжения при деформации мембраны может быть записана в виде:

$$\sigma_0 \left(\sqrt{1 + \left(\frac{dH}{dx} \right)^2} - 1 \right) \approx \frac{\sigma_0}{2} \left(\frac{dH}{dx} \right)^2.$$

Кроме того, с требуемой точностью $N_u = dH_u/dx$, $N_l = -dH_l/dx$ и, соответственно, выражения для проекций векторов наклона можно записать в следующем виде: $T_u = n_u - \frac{d}{dx} H_u$, $T_l = n_l + \frac{d}{dx} H_l$. Подставим H_u и H_l из условий объемной несжимаемости в выражения для проекций векторов наклона, а затем все эти выражения подставим в функционал упругой энергии бислоя (1). Получающийся функционал зависит от трех неизвестных функций: n_u , n_l и M . Варьируя функционал по этим функциям, мы получаем следующую систему линейных дифференциальных уравнений Эйлера–Лагранжа:

$$\begin{cases} 0 = -\frac{d}{dx} M + (h_u^2 - l_u^2 + 2l_c) \frac{d^2}{dx^2} n_u + \left(-\frac{1}{2} h_u^2 - l_c - \frac{1}{2} s h_u^2 \right) \frac{d^3}{dx^3} M + \\ + \left(\frac{1}{4} h_u^4 + l_c h_u^4 + l_{gr} + \frac{1}{4} s h_u^4 \right) \frac{d^4}{dx^4} n_u + n_u, \\ 0 = -\frac{d}{dx} n_l + \frac{d}{dx} n_u + (-2 - 2s) \frac{d^2}{dx^2} M + \left(-\frac{1}{2} h_l^2 - l_c - \frac{1}{2} s h_l^2 \right) \frac{d^3}{dx^3} n_l + \\ + \left(\frac{1}{2} h_u^2 + l_c + \frac{1}{2} s h_u^2 \right) \frac{d^3}{dx^3} n_u, \\ 0 = \frac{d}{dx} M + (h_l^2 - l_l^2 + 2l_c) \frac{d^2}{dx^2} n_l + \left(\frac{1}{2} h_l^2 + l_c + \frac{1}{2} s h_l^2 \right) \frac{d^3}{dx^3} M + \\ + \left(\frac{1}{4} h_l^4 + l_c h_l^4 + l_{gr} + \frac{1}{4} s h_l^4 \right) \frac{d^4}{dx^4} n_l + n_l, \end{cases} \quad (2)$$

где $l_u = \sqrt{B_u/k_t}$, $l_l = \sqrt{B_l/k_t}$, $l_c = k_c/k_t$, $l_{gr} = k_{gr}/k_t$, $s = \sigma_0/k_t$. С помощью линейных преобразований можно получить изолированное уравнение для n_u вида:

$$\sum_{k=1}^5 A_k \frac{d^{2k-1} n_u}{dx^{2k-1}} = 0, \quad (3)$$

где A_k – известные коэффициенты, зависящие от упругих параметров мембраны, которые, однако, слишком громоздки для их записи в явном виде. Уравнение (3) является линейным дифференци-

альным уравнением. Находя его решение в явном виде, можно определить оставшиеся неизвестные функции n_l и M , подставив решение для n_u в систему уравнений (2).

Уравнения Эйлера–Лагранжа для зон L_0 -домена и окружающей L_d -мембраны. Для зон мембраны, соответствующих бислою L_0 -домену и бислою окружающей L_d -мембраны, можно записать: $h_u = h_l \equiv h$ и $l_u = l_l \equiv l$. Поэтому система уравнений (2) значительно упрощается:

$$\begin{cases} (h^2 - l^2 + 2l_c) \frac{d^2}{dx^2} n_+ + \left(\frac{1}{4} h^2 + l_c h^2 + l_{gr} + \frac{1}{4} s h^4 \right) \frac{d^4}{dx^4} n_+ + n_+ = 0, \\ -2 \frac{d}{dx} M + (h^2 - l^2 + 2l_c) \frac{d^2}{dx^2} n_- + (-h^2 s - h^2 - 2l_c) \frac{d^3}{dx^3} M + \\ + \left(\frac{1}{4} h^4 + l_c h^2 + l_{gr} + \frac{1}{4} s h_u^2 \right) \frac{d^4}{dx^4} n_- + n_- = 0, \\ \frac{d}{dx} n_- + (-2 - 2s) \frac{d^2}{dx^2} M + \left(\frac{1}{2} h^2 + l_c + \frac{1}{2} s h^2 \right) \frac{d^3}{dx^3} n_- = 0, \end{cases} \quad (4)$$

где $n_+ = n_u + n_l$, $n_- = n_u - n_l$. Решение первого уравнения легко находится, но является слишком объемным для его записи здесь в явном виде. С помощью линейных преобразований оставшихся двух уравнений мы получаем следующее изолированное уравнение для M :

$$\begin{aligned} \frac{d^6}{dx^6} M - \frac{-l^2 s + 2l_c s - l_u^2}{l_c^2 - l_{gr} s - l_{gr}} \frac{d^4}{dx^4} M - \\ - \frac{s}{l_c^2 - l_{gr} s - l_{gr}} \frac{d^2}{dx^2} M = 0. \end{aligned} \quad (5)$$

Явное решение данного уравнения также является слишком объемным для того, чтобы быть представленным здесь. После подстановки этого решения в систему (4) находится решение для n_- , и затем выражаются n_u и n_l .

Уравнения Эйлера–Лагранжа для участка монослоя под пептидом. Зона под пептидом представляет собой участок нижнего липидного монослоя, уравнения Эйлера–Лагранжа для которого имеют следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{dn_l}{dx} + (1 + s) \frac{d^2 M}{dx^2} + \left(\frac{h^2}{2} + l_c + \frac{s h^2}{2} \right) \frac{d^3 n_l}{dx^3} = 0, \\ \frac{dM}{dx} + (h^2 - l^2 + 2l_c) \frac{d^2 n_l}{dx^2} + \left(\frac{h^2}{2} + l_c + \frac{s h^2}{2} \right) \frac{d^3 M}{dx^3} + \\ + \left(\frac{h^4}{4} + l_c h^2 + l_{gr} + \frac{s h^2}{4} \right) \frac{d^4 n_l}{dx^4} + n_l = 0. \end{cases} \quad (6)$$

С помощью линейных преобразований можно получить изолированное линейное дифференциальное уравнение для функции M , которое совпадает с уравнением (5). Подставляя соответствующее решение в систему (6), мы находим решение для n_l .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Деформации мембраны в переходной зоне между L_0 - и L_d -фазами. Рассмотрим структуру переходной зоны между L_0 -доменом и окружающей L_d -мембраной в отсутствие пептида. Глобальному минимуму упругой энергии системы соответствует относительный сдвиг границ упорядоченных монослойных доменов, расположенных в противоположных монослоях мембраны, на расстояние $L_0 = 2$ нм (рис. 2а); при этом из-за симметрии системы энергия не зависит от знака L_0 . При дальнейших расчетах это расстояние фиксировалось и полагалось равным либо $L_0 = 2$ нм, либо $L_0 = -2$ нм. Вблизи границы домена происходит изменение гидрофобной толщины бислоя от $2h_d$ в области L_0 -домена до $2h_s$ в области L_d -мембраны вдали от границы. Кроме того, локальная эффективная кривизна разделяющих поверхностей липидных монослоев, характеризующаяся величиной $\text{div}(\mathbf{n})$, отлична от нуля только в узкой области вблизи границы домена (рис. 2б). Отметим, что характерная длина затухания деформаций, возникающих на границе домена, составляет несколько нанометров (рис. 2б).

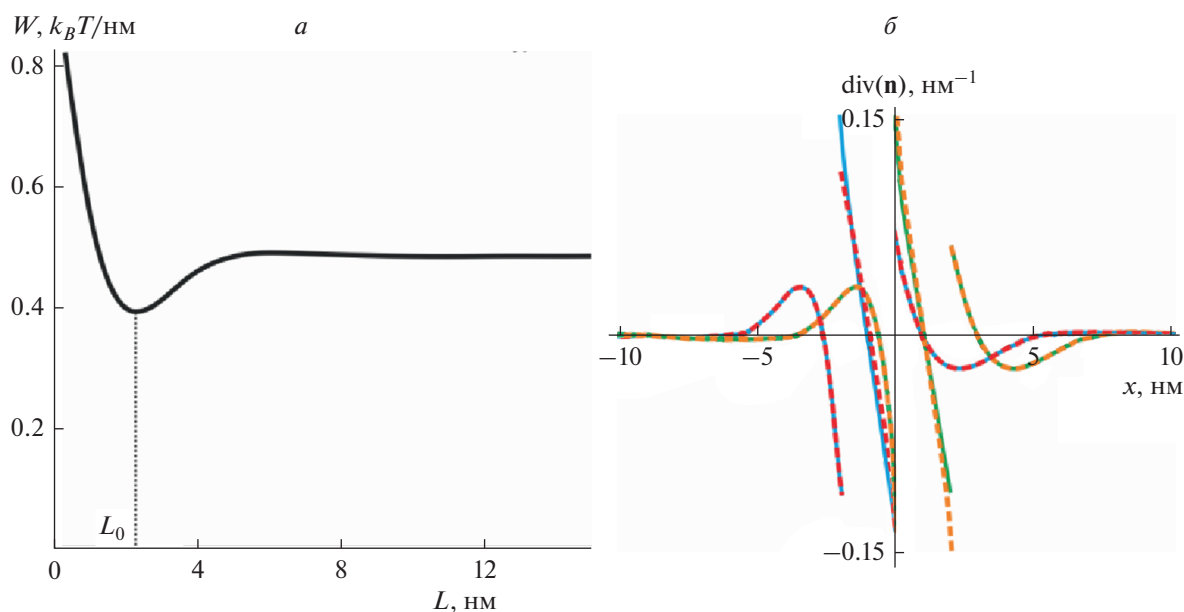


Рис. 2. Энергия и распределение деформаций вблизи границы упорядоченного домена. *a* – Зависимость энергии упругих деформаций мембраны, возникающих на границе L_o -домена с окружающей L_d -мембраной, от относительного сдвига L границ монослойных упорядоченных доменов, расположенных в противоположных монослоях. Минимум энергии достигается при $L = L_0 \approx 2$ нм. *б* – Латеральное распределение эффективной кривизны монослоев, $\text{div}(\mathbf{n})$ (зависимость от координаты x): сплошные зеленая и синяя кривые – в нижнем монослое; штриховые красная и оранжевая кривые – в верхнем монослое; зеленая и оранжевая кривые – конфигурация $L_0 = 2$ нм; синяя и красная кривые – конфигурация $L_0 = -2$ нм. Точка $x = 0$ соответствует положению границы L_o -домена в нижнем монослое.

Оптимальное положение амфипатического пептида относительно границы L_o -домена. Частично встроенный в мембрану амфипатический пептид деформирует мембрану вследствие ненулевого скачка проекции директора на его правой и левой границах. Характерные длины затухания деформаций, индуцированных амфипатическим пептидом, составляют несколько нанометров. Перекрывание деформаций, возникающих вблизи границы L_o -домена и деформаций, индуцированных амфипатическим пептидом, приводит к эффективному латеральному взаимодействию границы и пептида. Согласно расчетам, энергия упругих деформаций оказывается минимальна, когда пептид располагается в L_o -фазе вблизи границы [21, 22]. На рис. 3*a* показаны зависимости упругой энергии системы, отнесенной к единице длины вдоль границы домена, от координаты X_0 правой границы пептида для случаев $L_0 = 2$ нм и $L_0 = -2$ нм; точке $x = 0$ соответствует положение границы L_o -домена в нижнем монослое. Чтобы найти абсолютную упругую энергию, необходимо отнесенную к единице длины вдоль границы домена энергию умножить на эффективную длину пептида в направлении границы домена [38]. Эффективная длина классических антимикробных пептидов типа мелиттина и магаинина составляет 4–6 нм. Таким образом, глубина минимума упругой энергии при оп-

тимальном расположении пептида относительно границы домена составляет $(0.8 - 0.9 k_B T/\text{нм}) \times (4 - 6 \text{ нм}) \approx 3 - 5.5 k_B T$, что в несколько раз превосходит среднюю энергию, приходящуюся на одну поступательную степень свободы пептида, т.е. $0.5 k_B T$. Из этого можно заключить, что частично встроенные в мембрану амфипатические пептиды должны выстраиваться вдоль границы L_o -доменов. Форма мембраны, рассчитанная для оптимальных положений пептида, показана на рис. 3*б*.

Взаимодействие L_o -доменов без пептидов. Ранее [18, 39] в мембране без пептидов было рассмотрено латеральное взаимодействие границ двух L_o -доменов, разделенных полосой L_d -бислоя, и было показано, что для приведения границ в контакт и последующего слияния доменов необходимо преодолеть энергетический барьер высотой $\sim 0.1 - 0.2 k_B T/\text{нм}$. Поскольку амфипатические пептиды, как правило, отталкиваются друг от друга при сильном сближении [28, 38], можно предположить, что для слияния L_o -доменов, вдоль границ которых выстроены амфипатические пептиды в оптимальных положениях, высота энергетического барьера должна увеличиваться по сравнению со случаем слияния доменов в мембране без пептидов.

На рис. 4*a* показана зависимость упругой энергии системы от минимального расстояния A

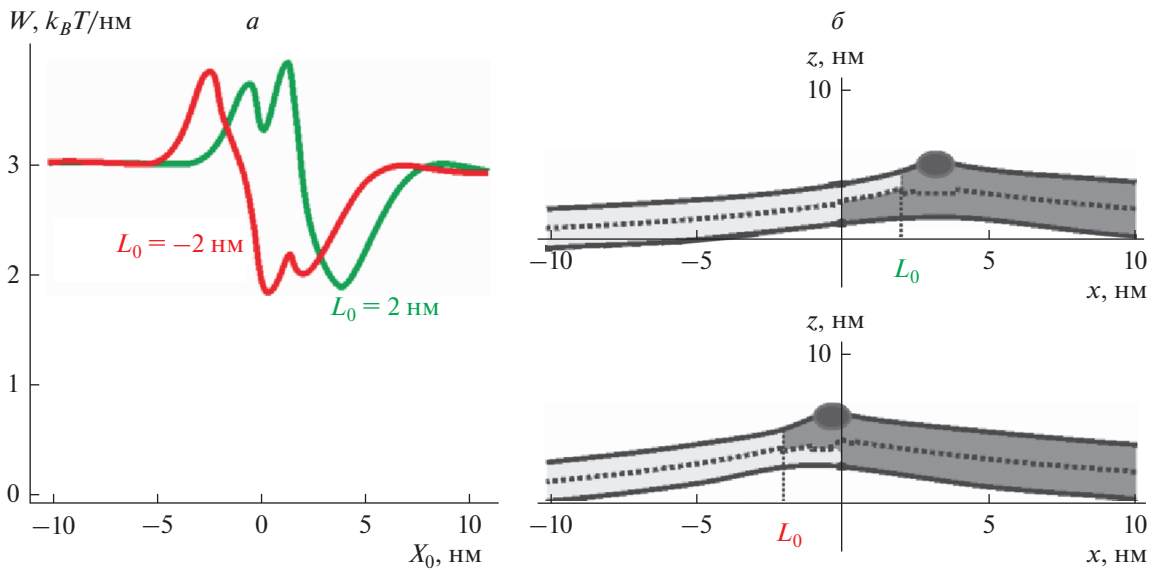


Рис. 3. Оптимальное положение амфипатического пептида относительно границы L_0 -домена. *a* – Зависимости упругой энергии системы от координаты X_0 правой границы пептида для случаев $L_0 = 2$ нм (зеленая кривая) и $L_0 = -2$ нм (красная кривая). *б* – Форма мембраны при оптимальных положениях амфипатического пептида, соответствующих глобальным минимумам упругой энергии системы, для случаев $L_0 = 2$ нм (вверху) и $L_0 = -2$ нм (внизу). Пептид показан темно-серым эллипсом; упорядоченные домены показаны серым цветом; окружающая мембрана показана светло-серым цветом; пунктирной линией показана межмонослойная поверхность $M(x)$.

между L_0 -доменами за вычетом энергии при бесконечном расстоянии между L_0 -доменами ($A = \infty$). Из данного графика следует, что для приведения границ в плотный контакт и последующего слияния доменов необходимо преодолеть энергетический барьер, высота которого составляет $\sim 0.14 k_B T/\text{нм}$. При сближении L_0 -доменов упругая энергия сначала уменьшается и достигает минимума при расстоянии $A = 4.5$ нм. При дальнейшем сближении упругая энергия возрастает, достигая максимума при расстоянии между доменами $A = 1.5$ нм. На рис. 4б показана форма мембраны при $A = 10$ нм. Рисунок 4 иллюстрирует только случай $L_0 = -2$ нм, поскольку вследствие симметрии системы зависимость упругой энергии от расстояния между L_0 -доменами и форма мембраны совпадают для случаев $L_0 = 2$ нм и $L_0 = -2$ нм.

Взаимодействие L_0 -доменов в случае наличия амфипатических пептидов на их границах. Рассмотрим взаимодействие L_0 -доменов в мембране, в которую частично встроены амфипатические пептиды. Как следует из рис. 3а, глобальному минимуму упругой энергии соответствует положение амфипатического пептида вблизи границы L_0 -домена. Зафиксируем амфипатические пептиды в оптимальных положениях относительно границ L_0 -доменов в соответствии с рис. 3. Рассмотрим латеральное взаимодействие двух L_0 -доменов, границы которых полностью заполнены линией амфипатических пептидов. Зависимость упругой

энергии системы от минимального расстояния A между L_0 -доменами показана на рис. 5а, 5б для случаев $L_0 = 2$ нм и $L_0 = -2$ нм, соответственно, за вычетом упругой энергии системы при бесконечном расстоянии между L_0 -доменами ($A = \infty$).

Из рис. 5 следует, что высота энергетического барьера, который необходимо преодолеть для приведения границ доменов в плотный контакт, значительно повышается в случае, когда вдоль границ доменов расположены амфипатические пептиды. В конфигурации $L_0 = 2$ нм высота барьера составляет $0.56 k_B T/\text{нм}$, а в конфигурации $L_0 = -2$ нм – приблизительно $4.8 k_B T/\text{нм}$. В случае взаимодействия доменов без пептидов, высота соответствующего энергетического барьера составляла $0.14 k_B T/\text{нм}$.

Приведенная расчетная величина высоты энергетического барьера слияния доменов в присутствии пептидов на их границах может быть несколько завышена, поскольку при расчетах положение пептидов относительно границ доменов считалось фиксированным. Однако может оказаться, что при сближении доменов пептидам будет энергетически выгодно сдвинуться относительно положения, соответствующего глобальному минимуму энергии на рис. 3а. Тем не менее, величину этого барьера возможно оценить снизу. Рассмотрим зависимость упругой энергии системы от расстояния между пептидами, когда расстояние между доменами равно нулю, $A = 0$,

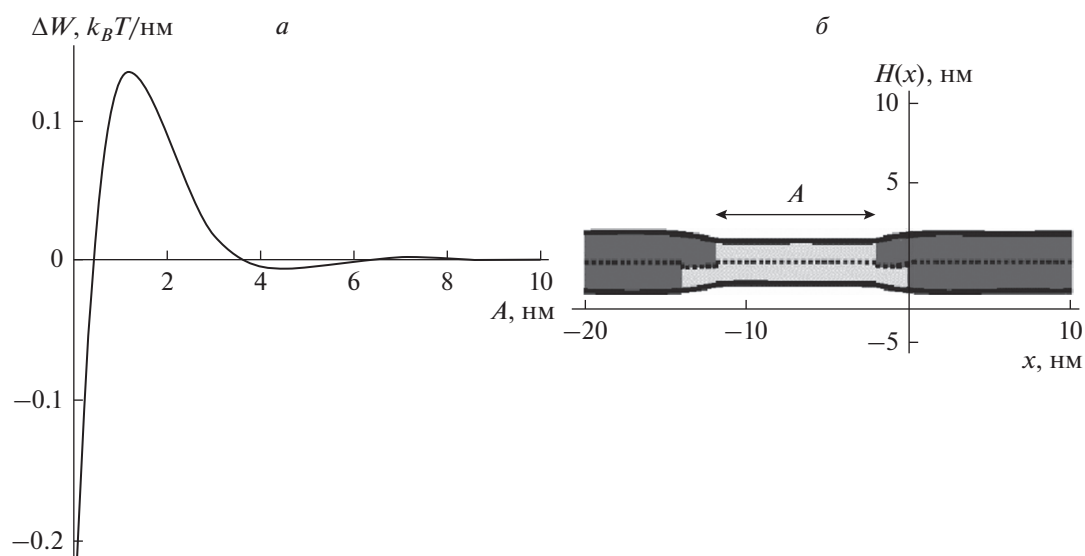


Рис. 4. Латеральное взаимодействие двух L_0 -доменов в мембране без амфипатических пептидов. *а* – Зависимость полной упругой энергии системы от расстояния A между L_0 -доменами за вычетом энергии при бесконечном расстоянии между L_0 -доменами ($A = \infty$). *б* – Форма мембраны при $A = 10$ нм. Упорядоченные домены показаны серым цветом; окружающая мембрана показана светло-серым цветом; пунктирной линией показана межмонослойная поверхность $M(x)$.

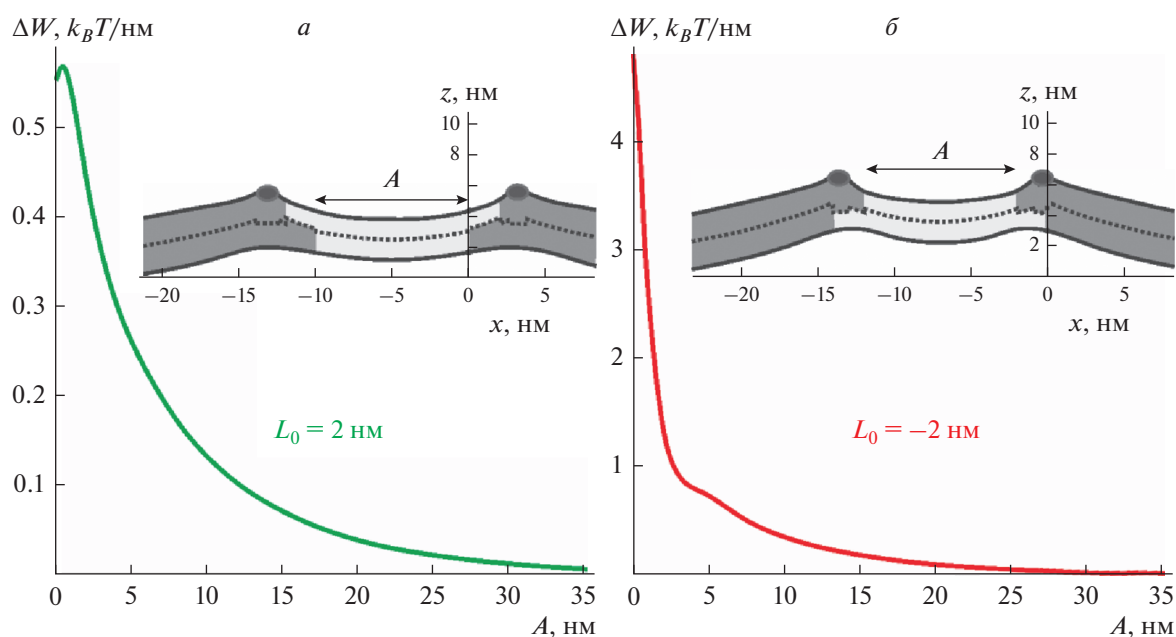


Рис. 5. Взаимодействие двух L_0 -доменов, вдоль границ которых расположены амфипатические пептиды. Амфипатические пептиды зафиксированы в оптимальных положениях относительно границ L_0 -доменов в соответствии с рис. 3. Зависимость упругой энергии системы от минимального расстояния A между L_0 -доменами за вычетом энергии при $A = \infty$ для случаев: *а* – $L_0 = 2$ нм; *б* – $L_0 = -2$ нм. На вставках на графиках показана форма мембраны при $A = 10$ нм. Пептид показан темно-серым эллипсом; упорядоченные домены показаны серым цветом; окружающая мембрана показана светло-серым цветом; пунктирной линией показана межмонослойная поверхность $M(x)$.

т.е. в случае, когда произошло слияние двух из четырех монослойных доменов. Вычтем из этой зависимости величину энергии в глобальном минимуме в случае, когда домены находятся далеко

друг от друга ($A = \infty$), т.е. вычтем удвоенную минимальную энергию на кривых $W(X_0)$ рис. 3а. Получающиеся зависимости энергии от расстояния между пептидами приведены на рис. 6; при неко-

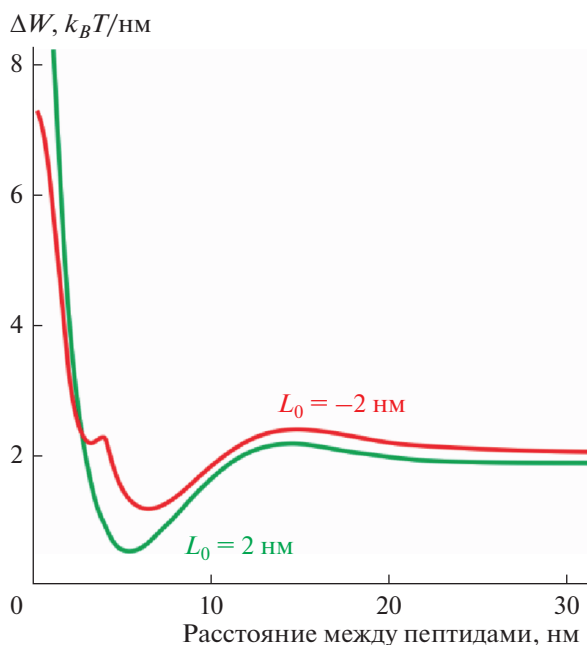


Рис. 6. Зависимость упругой энергии системы от расстояния между пептидами при $A = 0$, за вычетом упругой энергии системы при $A = \infty$ для случаев $L_0 = 2 \text{ нм}$ (зеленая кривая) и $L_0 = -2 \text{ нм}$ (красная кривая).

тором расстоянии между пептидами энергия имеет глобальный минимум. Высота энергетического барьера слияния доменов в присутствии пептидов на их границах не может быть ниже, чем величина энергии в этом глобальном минимуме. Это связано с тем, что высота энергетического барьера на траектории между начальным ($A = \infty$) и конечным ($A = 0$) состояниями системы, каждое из которых характеризуется локальным минимумом упругой энергии по положению пептидов, не может быть меньше, чем разница энергий конечного и начального состояний. Эта разница и соответствует минимумам энергии на графиках рис. 6.

Из рис. 6 следует, что для случая $L_0 = 2 \text{ нм}$ высота энергетического барьера слияния доменов должна быть не менее $\sim 0.53 k_B T / \text{нм}$, а для $L_0 = -2 \text{ нм}$ — не менее $\sim 1.16 k_B T / \text{нм}$. Данные оценки высоты барьера превосходят в ~ 3.8 раза и в ~ 8.3 раза высоту энергетического барьера слияния доменов в мембране без пептидов для конфигураций $L_0 = 2 \text{ нм}$ и $L_0 = -2 \text{ нм}$ соответственно (рис. 4). Таким образом, можно заключить, что высота энергетического барьера слияния L_0 -доменов повышается в несколько раз в случае, если на мембрану адсорбированы амфипатические пептиды.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы рассмотрели латеральное взаимодействие липидных упорядоченных доменов, опосредованное упругими деформациями мембраны, в случае, когда в мембрану частично встроены

амфипатические пептиды. Ранее было показано [21, 22], что с точки зрения минимизации энергии деформаций мембраны амфипатическим пептидам выгодно расположиться вблизи границы доменов. Это связано с тем, что при частичном встраивании в мембрану амфипатического пептида раздвигаются в стороны полярные головки липидов и индуцируется положительная кривизна мембраны, т.е. мембрана становится локально выпуклой для наблюдателя, расположенного со стороны амфипатического пептида. Иными словами, амфипатические пептиды обладают положительной спонтанной кривизной. Упругая энергия минимальна, когда локальная геометрическая кривизна липидного монослоя совпадает со спонтанной кривизной, индуцируемой мембранными компонентами. Однако геометрическая кривизна мембраны, в которой сосуществуют L_0 - и L_d -фазы, отлична от нуля лишь в узкой области вблизи межфазной L_0/L_d -границы (рис. 2б); остальная часть мембраны — плоская, и кривизна ее поверхности равна нулю. Таким образом, упругая энергия мембраны минимальна, когда амфипатические пептиды располагаются вблизи межфазной L_0/L_d -границы в областях, в которых разделяющие поверхности липидных монослоев локально выпуклые.

Ранее было показано [18, 39], что в мембране без пептидов для приведения границ двух L_0 -доменов в контакт и их последующего слияния необходимо преодолеть энергетический барьер. Кроме того, в работах [28, 38] было показано, что два амфипа-

тических пептида, встроенные в один и тот же монослой мембраны, отталкиваются на расстояниях порядка нескольких нанометров. В связи с этим можно ожидать, что наличие пептидов на границе L_o -доменов должно приводить к увеличению высоты энергетического барьера процесса слияния доменов. Действительно, как показывают наши расчеты, высота барьера увеличивается: в случае конфигурации $L_o = 2$ нм высота увеличивается как минимум в ~ 3.8 раза, а в случае $L_o = -2$ нм — в ~ 8.3 раза. Отметим, что конфигурация границ доменов $L_o = -2$ нм наиболее вероятно реализуется в плазматических мембранах клеток млекопитающих. Плазматические мембраны асимметричны по липидному составу монослоев. Их наружный монослой относительно обогащен насыщенными липидами [40], которые преимущественно и формируют упорядоченные домены [9]. Таким образом, суммарная площадь упорядоченных доменов в наружном монослое плазматической мембраны должна быть больше, чем во внутреннем монослое. В среднем, в каждом бислойном рафте в плазматической мембране площадь монослойного упорядоченного домена, расположенного в наружном монослое, должна превышать площадь домена во внутреннем монослое. Амфипатические пептиды, как правило, находятся или добавляются снаружи клеток и встраиваются в наружный монослой плазматической мембраны. Это соответствует конфигурации $L_o = -2$ нм, если считать наружный монослой верхним, а внутренний — нижним в наших обозначениях.

Увеличение высоты энергетического барьера слияния доменов может препятствовать образованию макроскопических доменов в мембране. Экспериментально было показано [41, 42], что в результате фазового разделения с образованием упорядоченной L_o - и неупорядоченной L_d -фаз могут образовываться либо макроскопические домены характерного размера порядка нескольких микронетров, либо нанодомены характерного размера порядка десятков нанометров. В работе [42] было продемонстрировано, что средний размер доменов определяется величиной линейного натяжения их границы: макроскопические домены образуются, только когда линейное натяжение превосходит приблизительно 0.3 пН $\approx 0.075k_B T/\text{нм}$. Амфипатические пептиды повышают энергию межфазной L_o/L_d -границы (ср. рис. 2а и 3а); однако пептиды могут стабилизировать нанодомены за счет затруднения их слияния (рис. 5), поскольку увеличение размера доменов на поздних стадиях фазового разделения происходит преимущественно за счет их слияния [15].

Амфипатические пептиды в настоящее время рассматриваются как перспективные антимикробные препараты [43, 44]. Показано, что некоторые амфипатические пептиды способны адсор-

бироваваться на мембранах бактериальных клеток и вызывать в них образование сквозных пор [44]. Избирательное связывание пептидов с бактериальными мембранами обеспечивается, в основном, различием электрического заряда наружных монослоев плазматических мембран эукариотических и бактериальных клеток: наружные монослои бактериальных мембран имеют отрицательный заряд, в то время как наружные монослои мембран эукариотических клеток электрически нейтральны. В связи с этим, перспективные антимикробные пептиды, как правило, несут большой положительный заряд [43, 44]. Степень избирательности антимикробного пептида характеризуется его антибактериальным и гемолитическим действием, т.е. соотношением эффективностей образования пор в мембранах бактериальных и эукариотических клеток. Низкая гемолитическая активность подразумевает, что концентрация адсорбирующегося пептида на мембранах эукариотических клеток недостаточна для эффективного образования сквозных пор. Однако из результатов нашей работы следует, что, даже если амфипатический пептид не разрушает мембрану эукариотической клетки, он может существенно изменять характеристики взаимодействия рафтов. В работе [45] было показано, что при замене в рафтообразующей смеси холестерина на его метаболический предшественник, 7-дегидрохолестерин, рафты при столкновениях начинают “слипаться”: они не сливаются и не расходятся на большие расстояния, образуя протяженные агрегаты круглых доменов. У человека недостаток холестерина и накопление 7-дегидрохолестерина вызывает синдром Смита—Лемли—Опитца [46]. Таким образом, вариация характера взаимодействия рафтов может иметь серьезные последствия как на уровне отдельных клеток, так и на уровне организма в целом. Насколько нам известно, подобный побочный эффект, потенциально вызываемый антимикробными пептидами, ранее систематически не исследовался.

В работах [11, 21] было показано, что липиды, обладающие положительной спонтанной кривизной, например ганглиозид GM1, также должны накапливаться в узкой полосе вблизи межфазной L_o/L_d -границы. Аналогично полосе амфипатических пептидов, полоса таких липидов должна индуцировать скачок проекции директора на своей правой и левой границах, что, в свою очередь, должно приводить к повышению высоты энергетического барьера, который необходимо преодолеть для приведения границ L_o -доменов в плотный контакт. Этот вывод согласуется с экспериментальными данными: в работах [11, 19, 41], было показано, что наличие ганглиозида GM1 в мембране стабилизирует нанодомены, по-видимому, за счет понижения вероятности их слияния при столкновениях. Ганглиозиды находятся пре-

имущественно во внешних монослоях плазматических мембран клеток, что соответствует конфигурации $L = -2$ нм в наших обозначениях.

Таким образом, из результатов наших расчетов можно заключить, что амфипатические пептиды, встроенные в монослой липидной мембраны, в которой сосуществуют домены жидкоупорядоченной и жидконеупорядоченной фаз, должны существенно затруднять слияние доменов и, тем самым, стабилизировать ансамбль нанодоменов.

Работа выполнена при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lillemeier B.F., Pfeiffer J.R., Surviladze Z., Wilson B.S., Davis M.M. 2006. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 18992–18997.
- Ayuyan A.G., Cohen F.S. 2008. Raft composition at physiological temperature and pH in the absence of detergents. *Biophys. J.* **94**, 2654–2666.
- Yang S.T., Kiessling V., Simmons J.A., White J.M., Tamm L.K. 2015. HIV gp41-mediated membrane fusion occurs at edges of cholesterol-rich lipid domains. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 424–431.
- Allen J.A., Halverson-Tamboli R.A., Rasenick M.M. 2007. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 128–140.
- Pike L.J. 2006. Rafts defined: A report on the Keystone Symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lip. Res.* **47**, 1597–1598.
- Pralle A., Keller P., Florin E.L., Simons K., Hörber J.H. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* **148**, 997–1008.
- Samsonov A.V., Mihalyov I., Cohen F.S. 2001. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys. J.* **81**, 1486–1500.
- Petruzielo R.S., Heberle F.A., Drazba P., Katsaras J., Feigenson G.W. 2013. Phase behavior and domain size in sphingomyelin-containing lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1828**, 1302–1313.
- Veatch S.L., Polozov I.V., Gawrisch K., Keller S.L. 2004. Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **86**, 2910–2922.
- Rinia H.A., Snel M.M., van der Eerden J.P., de Kruijff B. 2001. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **501**, 92–96.
- Galimzyanov T.R., Lyushnyak A.S., Aleksandrova V.V., Shilova L.A., Mikhalyov I.I., Molotkovskaya I.M., Akimov S.A., Batishchev O.V. 2017. Line activity of ganglioside GM1 regulates raft size distribution in a cholesterol-dependent manner. *Langmuir.* **33**, 3517–3524.
- Baumgart T., Hess S.T., Webb W.W. 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature.* **425**, 821–824.
- Saitov A., Akimov S.A., Galimzyanov T.R., Glasnov T., Pohl P. 2020. Ordered lipid domains assemble via concerted recruitment of constituents from both membrane leaflets. *Phys. Rev. Lett.* **124**, 108102.
- Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М., Питаевский Л.П. 2002. *Теоретическая физика*. Т. X. Физическая кинетика. М.: Физматлит. 470 с.
- Frolov V.A.J., Chizmadzhev Y.A., Cohen F.S., Zimmerberg J. 2006. “Entropic traps” in the kinetics of phase separation in multicomponent membranes stabilize nanodomains. *Biophys. J.* **91**, 189–205.
- Ayuyan A.G., Forsyth C.B., Zhang L., Keshavarzian A., Cohen F.S. 2009. Protein movement between membrane domains: The epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling cascade. *Biophys. J.* **96**, 676a.
- Молотковская И.М., Свирщевская Е.В., Литвинов И.С., Михалев И., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г., Бергельсон Л.Д. 1992. Исследование иммуносупрессорных свойств гликофинголипидов. Изучение взаимодействия интерлейкина-2 с ганглиозидами на клетках и в модельных системах. *Биол. мембраны.* **9**, 143–151.
- Staneva G., Osipenko D.S., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Akimov S.A. 2016. Metabolic precursor of cholesterol causes formation of chained aggregates of liquid-ordered domains. *Langmuir.* **32**, 1591–1600.
- Bao R., Li L., Qiu F., Yang Y. 2011. Atomic force microscopy study of ganglioside GM1 concentration effect on lateral phase separation of sphingomyelin/dioleoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *J. Phys. Chem. B.* **115**, 5923–5929.
- Dimova R., Dasgupta R., Fricke N., Liu Y., Agudo-Canalejo J., Grafmuller A., Lipowsky R. 2016. Spontaneous tubulation in giant vesicles induced by GM1 or PEG adsorption. *Biophys. J.* **110**, 244a.
- Pinigin K.V., Kondrashov O.V., Jiménez-Munigua I., Alexandrova V.V., Batishchev O.V., Galimzyanov T.R., Akimov S.A. 2020. Elastic deformations mediate interaction of the raft boundary with membrane inclusions leading to their effective lateral sorting. *Sci. Rep.* **10**, 4087.
- Пинигин К.В., Воловик М.В., Батищев О.В., Акимов С.А. 2020. Взаимодействие границ упорядоченных липидных доменов и амфипатических пептидов регулирует вероятность образования пор в мембранах. *Биол. мембраны.* **37**, 337–349.
- Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И., Акимов С.А. 2011. Стабилизация бислойной структуры рафтов за счет упругих деформаций мембраны. *Биол. мембраны.* **28**, 307–314.
- Helfrich W. 1973. Elastic properties of lipid bilayers: Theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. C.* **28**, 693–703.

25. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
26. Terzi M.M., Deserno M. 2017. Novel tilt-curvature coupling in lipid membranes. *J. Chem. Phys.* **147**, 084702.
27. Terzi M.M., Ergüder M.F., Deserno M. 2019. A consistent quadratic curvature-tilt theory for fluid lipid membranes. *J. Chem. Phys.* **151**, 164108.
28. Pinigin K.V., Kuzmin P.I., Akimov S.A., Galimzyanov T.R. 2020. Additional contributions to elastic energy of lipid membranes: Tilt-curvature coupling and curvature gradient. *Phys. Rev. E* **102**, 042406.
29. Evans E., Rawicz W. 1990. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2094.
30. Pan J., Tristram-Nagle S., Nagle J.F. 2009. Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. *Phys. Rev. E* **80**, 021931.
31. Baumgart T., Das S., Webb W.W., Jenkins J.T. 2005. Membrane elasticity in giant vesicles with fluid phase coexistence. *Biophys. J.* **89**, 1067–1080.
32. Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E.A. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339.
33. Risselada H.J., Marrink S.J. 2008. The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 17367–17372.
34. Perlmutter J.D., Sachs J.N. 2011. Interleaflet interaction and asymmetry in phase separated lipid bilayers: Molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 6563–6577.
35. Braganza L.F., Worcester D.L. 1986. Structural changes in lipid bilayers and biological membranes caused by hydrostatic pressure. *Biochemistry.* **25**, 7484–7488.
36. Scarlata S.F. 1991. Compression of lipid membranes as observed at varying membrane positions. *Biophys. J.* **60**, 334–340.
37. Terzi M.M., Deserno M., Nagle J.F. 2019. Mechanical properties of lipid bilayers: A note on the Poisson ratio. *Soft Matter.* **15**, 9085–9092.
38. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Jiménez-Munuguá 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.
39. 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.
40. Ingólfsson H.I., Melo M.N., van Eerden F.J., Arnarez C., Lopez C.A., Wassenaar T.A., Periolo X., de Vries A.H., Tieleman D.P., Marrink S.J. 2014. Lipid organization of the plasma membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14554–14559.
41. Puff N., Watanabe C., Seigneuret M., Angelova M.I., Staneva G. 2014. L_o/L_d phase coexistence modulation induced by GM1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838**, 2105–2114.
42. Feigenson G.W. 2009. Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 47–52.
43. Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. 2015. Structure and biological functions of β -hairpin antimicrobial peptides. *Acta Naturae.* **7**, 37–47.
44. Pérez-Peinado C., Dias S.A., Domingues M.M., Benfield A.H., Freire J.M., Rádis-Baptista G., Gaspar D., Castanho M.A.R.B., Craik D.J., Henriques S.T., Veiga A.S., Andreu D. 2018. Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalidicin (Ctn) and its fragment Ctn (15–34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom. *J. Biol. Chem.* **293**, 1536–1549.
45. Staneva G., Chachatay C., Wolf C., Quinn P.J. 2010. Comparison of the liquid-ordered bilayer phases containing cholesterol or 7-dehydrocholesterol in modeling Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Lip. Res.* **51**, 1810–1822.
46. Smith D.W., Lemli L., Opitz J.M. 1964. A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J. Pediatr.* **64**, 210–217.

Interaction of Ordered Lipid Domains in the Presence of Amphipathic Peptides

K. V. Pinigin¹, T. R. Galimzyanov¹, and S. A. Akimov^{1, *}

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

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

In the plasma membranes of eukaryotic cells, relatively ordered lipid–protein domains can be formed. The characteristics of the interaction of domains can have a significant effect on the processes that require the colocalization of several membrane proteins. The ordered lipid bilayer is thicker than the surrounding disordered membrane. Therefore, it is expected that elastic deformations arise at the boundary of ordered domains, aiming at smoothing the jump in bilayer thickness. The typical length of the deformations equals several nanometers, and, as two domains approach each other, the deformations induced by their boundaries begin to overlap, thereby leading to the effective lateral interaction. In this work, we theoretically considered the influence of amphipathic peptides, adsorbed on the membrane, on the interaction energy of ordered domains. Amphipathic

pathic peptides can partially incorporate into the membrane, inducing elastic deformations therein. We used the theory of lipid membrane elasticity to analyze the deformation energy of various configurations of ordered domains and amphipathic peptides. In a membrane without peptides, it is necessary to overcome some energy barrier to bring two parallel boundaries of ordered domains into contact with each other. According to the results of our calculations, the presence of amphipathic peptides in a membrane leads to a severalfold increase in the height of this energy barrier. Thus, amphipathic peptides should significantly hinder the fusion of ordered domains and thereby contribute to the stabilization of the ensemble of nano-domains.

Keywords: amphipathic peptide, raft, theory of membrane elasticity, domain interaction

УДК 577.352.27

ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ НА АДСОРБЦИЮ ПОЛИПЕПТИДОВ НА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

© 2021 г. Р. Ю. Молотковский^{а, *}, Т. Р. Галимзянов^{а, б}, Ю. А. Ермаков^а

^аИнститут физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

^бНациональный исследовательский технологический университет “МИСиС”, Москва, 119049 Россия

*e-mail: rodion.molotkovskiy@gmail.com

Поступила в редакцию 06.11.2019 г.

После доработки 13.01.2020 г.

Принята к публикации 14.01.2021 г.

Проведен теоретический анализ поверхностного (дзета) потенциала липосом из анионного фосфолипидов, кардиолипина, измеренного ранее электрокинетическим методом в присутствии молекул полилизина разной молекулярной массы и фонового электролита, KCl, в концентрации 10, 40 и 100 мМ. Для аппроксимации экспериментальных зависимостей потенциала от количества полилизина в суспензии использована теоретическая модель с параметрами, среди которых наиболее физически значимыми являются толщина полимерного слоя, константа адсорбции и доля занятой полипептидом поверхности липидных мембран в области насыщения. Найденные значения параметров модели показывают влияние длины молекул полипептида на структуру полимерного слоя от однородного до неравномерно распределенного по поверхности. Заметное снижение эффективности адсорбции при увеличении ионной силы среды объяснено конформационными перестройками макромолекул на поверхности и понижением площади, доступной для их адсорбции при насыщении поверхности.

Ключевые слова: липидные мембраны, кардиолипин, адсорбция полилизина, электрофоретическая подвижность

DOI: 10.31857/S0233475521030051

ВВЕДЕНИЕ

В многочисленных биомедицинских приложениях все большую роль играют коллоидные суспензии липосом, покрытых полимерным слоем натуральных и синтетических полиэлектролитов [1, 2]. В составе липосом, имитирующих поверхность клеточных мембран, обычно присутствуют анионные фосфолипиды, которые создают отрицательный заряд поверхности, характерный для липидного матрикса биомембран. По этой причине большое значение для решения биотехнологических задач приобретают положительно заряженные полимеры, поликатионы, и, в частности, линейные полимеры на основе лизина. Синтетические поликатионы и полилизины разной длины и молекулярной массы находят применение при создании комплексных систем доставки генов и лекарственных препаратов, антибактериальных средств и антисептиков разного типа [3–5]. Ключевую роль в этих разработках играют сведения о характере адсорбции поликатионов на поверхности, прежде всего об их электростатических взаимодействиях с заряженной поверхностью клеток и их липидных аналогах [6–8]. Не менее важным фактором является и изменение энтропии системы, сопро-

вождающее конформационную перестройку молекул поликатиона при их связывании с поверхностью [9]. Одним из возможных способов экспериментального изучения таких взаимодействий являются электрокинетические измерения [10–12]. Количественное описание результатов таких измерений осуществляется в рамках теоретических моделей различной сложности, развитие которых можно проследить в течение нескольких десятилетий [11, 13, 14].

Ранее мы сформулировали модель, включающую минимальный набор параметров, достаточных для описания электрокинетических данных с учетом основных экспериментальных фактов. Согласно опубликованным в литературе сведениям, при адсорбции полилизинов может происходить изменение знака заряда липидных мембран [15, 16], причем отрицательно заряженные липиды кластеризуются под молекулами адсорбирующегося полимера [17, 18]. В работах [6, 16] исследована обратимость адсорбции для полимеров с различной степенью полимеризации, которая становится практически необратимой при повышении молекулярной массы полимера [16, 19]. Молекулярно-динамические методы в целом подтверждают эти

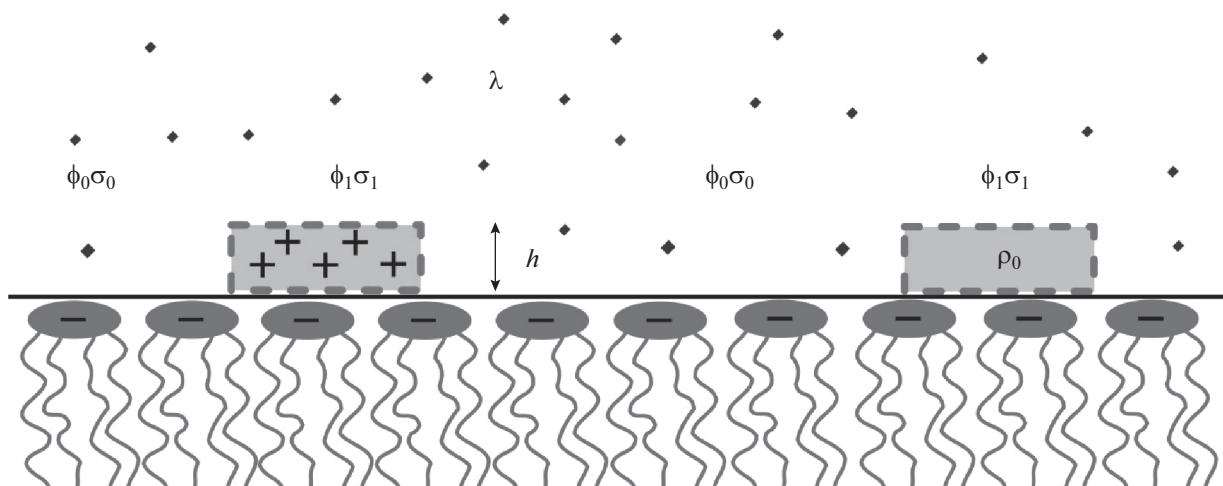


Рис. 1. Схематическое изображение рассматриваемой системы полимер–липид в растворе электролита с дебаевской длиной экранирования, равной λ . Потенциал вблизи поверхности над участком мембраны, занятым полимером, обозначается ϕ_1 , с плотностью заряда σ_1 . Потенциал над свободным участком мембраны обозначается ϕ_0 , с поверхностной плотностью заряда σ_0 . Заряд адсорбированных молекул полимера полагается равномерно распределенным по толщине слоя h . Объемная плотность заряда обозначается как ρ_0 .

наблюдения [20, 21] и обнаруживают изменение конформации цепей поликатиона большой длины, экспонированных в раствор [22]. Электростатическое взаимодействие поликатионов с поверхностью, безусловно, должно зависеть от состава окружающей среды и, прежде всего, от ионной силы раствора. В частности, исследования, проведенные методом Монте-Карло, предсказывают понижение адсорбционной способности поликатионов при высокой ионной силе раствора [23]. Очевидно, что все перечисленные факты и их связь с ионным составом водного окружения должны найти отражение в изменении параметров теоретической модели. В данной работе мы демонстрируем эту связь на примере предложенной нами ранее модели, в которой участвуют физически значимые характеристики системы: константа связывания K , толщина слоя адсорбированного полимера h и доля площади β_0 , занятой полимером в насыщении [24]. Следует отметить, что все параметры модели имеют ясный физический смысл и их значения могут быть верифицированы другими методами, например методом атомно-силовой микроскопии [16].

ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ

Нами были использованы экспериментальные данные по адсорбции полилизина различной длины на липосомах из отрицательно заряженного липида кардиолипина (КЛ), частично опубликованные в [15]. В этой работе электрофоретическую подвижность мультислойных липосом размером около 0.5 мкм при типичном содержании липида в суспензии 1 мг/мл фонового раствора

(10, 40 и 100 мМ KCl, pH около 6.5 при температуре 22°C) измеряли методом динамического светорассеяния на оборудовании Zetasizer II (Malvern Inst., Великобритания) с применением коррелятора PhotoCor-SP (США). Дзета-потенциал липосом определялся по результатам измерения электрокинетической подвижности в предположении, что выполняется соотношение Смолуховского. Постановка эксперимента и методов анализа данных приведена в цитированной работе и обзоре [25].

Для аппроксимации электрокинетических данных нами была разработана теоретическая модель, учитывающая особенности адсорбции полиэлектролитов [24]. Не вдаваясь в детали вывода формул, используемых в модели, приведем здесь основные ее положения. Во-первых, мы считаем, что величина дзета-потенциала совпадает с электрическим потенциалом на поверхности мембраны ϕ . Мы считаем, что последний представляет собой сумму двух различных вкладов – потенциала ϕ_1 в области над адсорбированным полимером и потенциала ϕ_0 в области, свободной от полимера (см. рис. 1).

Величина электрокинетического потенциала везикулы ϕ принимается равной средневзвешенному по площади покрытия поверхности полимером значению потенциалов ϕ_1 и ϕ_0 :

$$\phi(c) = \beta(c)\phi_1 + (1 - \beta(c))\phi_0, \quad (1)$$

где c – концентрация полилизина, выраженная в молярных единицах одиночных звеньев полимера, а β обозначает долю занятой им площади. Чтобы исследовать свойства адсорбированного полимера, необходимо связать потенциалы ϕ_1 и ϕ_0 с поверх-

ностной плотностью заряда σ_i в данной области. Для этого используется модель Гуи–Чепмена:

$$\phi_i = 2 \frac{kT}{e} \operatorname{arsh} \left(\frac{\sigma_i}{4\epsilon c_0 \lambda} \right), \quad i = 0, 1, \quad (2)$$

где e – заряд электрона, c_0 – концентрация электролита, σ_i – плотность заряда на разных участках поверхности. Предполагается, что заряд липида равномерно распределен по области адсорбции на мембране с поверхностной плотностью σ_0 , а полимер равномерно заряжен с объемной плотностью заряда ρ_0 и адсорбируется в виде областей со средней высотой h (рис. 1). В этом случае плотность заряда на поверхности в области с адсорбированным полимером вычисляется по формуле:

$$\sigma_1 = \sigma_0 + \rho_0 h. \quad (3)$$

Мы учитываем, что в адсорбированном состоянии толщина полимера не может быть ниже определенного порогового значения h_0 , например, соответствующему размерам мономера лизина. Мы принимаем это значение равным примерно 0.5 нм в соответствии с данными [22]. Для удобства мы нормируем толщину h на значение h_0 и оперируем в дальнейшем безразмерной величиной $d = h/h_0$.

При построении изотермы адсорбции мы учитываем, что в обычном эксперименте количество адсорбируемого вещества в растворе фиксировано. Это приводит к понижению концентрации полимера в экспериментальной ячейке на некоторую величину Δc поскольку заметная часть вещества адсорбируется на достаточно большой поверхности липосом (десятки см^2 при количестве липида около 1 мг в 1 мл суспензии), величина Δc пропорциональна доле площади мембран β , занятой адсорбированным полимером; параметр G отражает уменьшение концентрации полимера, пропорциональное величине β . Подобное предположение было успешно использовано ранее в работах [25, 26] при анализе адсорбции высокоафинных неорганических многовалентных катионов. Коэффициент G может быть записан в следующем виде [24]:

$$G = d \frac{C_{\text{lip}}}{M_{\text{cl}}}, \quad (4)$$

где C_{lip} – суммарное количество липида, образующего липосомы (в мг/мл раствора); M_{cl} – молярная масса КЛ.

Мы предполагаем, опираясь на полученные ранее экспериментальные данные, что доля площади β в области насыщения не может быть больше некоторого фиксированного значения β_0 , которое должно зависеть от доли КЛ в составе мембраны, как это обнаруживается в эксперименте [16]. Однако адсорбция полимерных молекул в общем

случае обратима, а степень обратимости можно характеризовать константой связывания K , зависящей от размеров полимерной цепи. Таким образом, кинетическое уравнение адсорбции полипептидов может быть записано в следующем виде:

$$\frac{d\beta}{dt} = K(c - G\beta)(\beta_0 - \beta) - \beta. \quad (5)$$

В стационарных условиях левая часть формулы (5) равна нулю. Решая уравнение относительно β , можно получить явный вид изотермы адсорбции $\beta(c)$. В итоге после подстановки всех формул в исходное выражение (1), мы получаем зависимость потенциала ϕ от концентрации c мономеров полилизина в ячейке и от параметров K , d и β_0 . Аппроксимируя экспериментальные данные полученной функцией $\phi = \phi(c, K, d, \beta_0)$ мы находим зависимость этих параметров от исследуемой характеристики системы – ионной силы.

Для вычисления ошибки в процессе аппроксимации экспериментальных данных был использован метод наименьших квадратов. Для оценки доверительного интервала мы используем метод, применявшийся ранее в работе [27]. Предположим, что имеется N_{ex} экспериментальных точек вида (c_i, ϕ_i) , $i = 1, \dots, N_{\text{ex}}$. Функция ошибок E , зависящая от параметров минимизации p_j , $j = 1, \dots, M$, определяется по формуле:

$$E(p_1, \dots, p_M) = \sum_{i=1}^{N_{\text{ex}}} \{F(c_i) - \phi_i\}^2. \quad (6)$$

Функция E минимизируется по параметрам p_j , что дает искомые значения параметров модели p_j^* . Доверительный интервал для параметров p_j^* находится следующим образом: для каждого из параметров p_j фиксируются все остальные параметры, отвечающие минимуму функции ошибки, и строится зависимость функции ошибки $E(p_1^*, \dots, p_{j-1}^*, p_j, p_j^*, p_{j+1}^*, \dots, p_M^*)$ от рассматриваемого параметра в окрестности оптимальных значений p_j^* . Доверительным интервалом параметра является интервал, в котором ошибка изменяется не более чем на 5% от своего минимального значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ

Нами получены экспериментальные данные по адсорбции полилизининов различной молекулярной массы на липосомы, составленные из КЛ при различных значениях ионной силы раствора (рис. 2). Данные приведены для полилизининов, длина которых оценивалась по среднему значению молекулярной массы полилизининов. Эта масса определялась вискозиметрически согласно паспортным данным препаратов, таблица которых

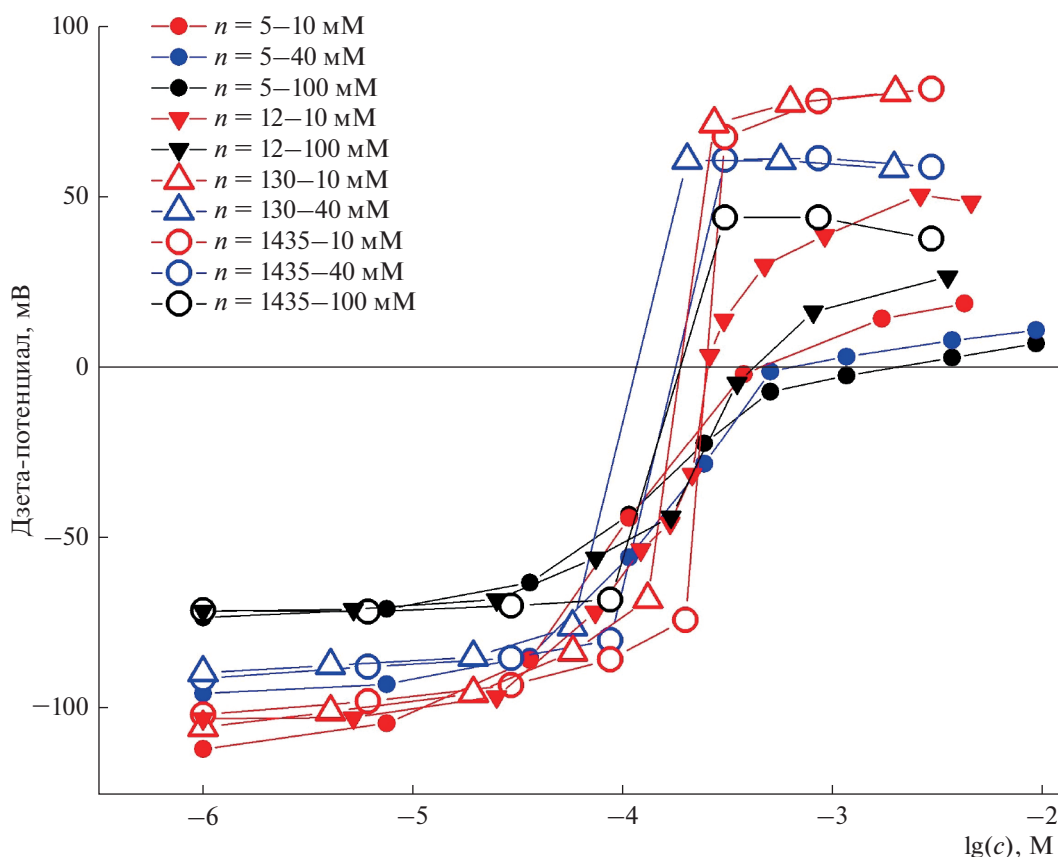


Рис. 2. Зависимости дзета-потенциала липосом, сформированных из кардиолипина, от концентрации полилизина с различным средним количеством мономеров в полимерной цепи, измеренные при трех значениях ионной силы фонового раствора. Данные были получены и использованы ранее в работе [15].

приведена ранее при публикации оригинальных экспериментальных данных в [15, 28]. Средняя степень полимеризации препаратов $n = 5, 12, 130$ и 1435 указана на рисунке. Измерения были проведены при трех значениях ионной силы растворов KCl — $I = 10$ мМ; $I = 40$ мМ; $I = 100$ мМ.

Как видно из рис. 2, экспериментальные точки для лизина со средней степенью полимеризации 1400 и 130 практически совпадают вне зависимости от ионной силы. В силу этого целесообразно объединить полилизин с $n \approx 130$ и с $n \approx 1400$ в одну группу, условно называемую длинными полимерами. Полилизин с $n = 12$ и с $n = 5$ будут называться, соответственно, полимерами средней длины и короткими. Ранее нами было показано, что ключевые характеристики полимеров — d , β_0 и K — существенно различаются для полимеров различной длины [24]. Следуя обозначениям, принятым в данной работе, характеристики, относящиеся к длинным полимерам, мы будем обозначать нижним индексом L , к полимерам средней длины — индексом M , к коротким полимерам — индексом S . В данной работе мы исследуем изменение данных параметров при варьировании ионной силы

I . В дальнейшем параметры, относящиеся к фиксированным значениям ионной силы, будем обозначать верхним индексом: 10, 40 и 100 для значений $I = 10, 40$ и 100 мМ соответственно. В перенесенных растворах ионная сила определяет длину экранирования Дебая, равную 3, 1.9 и 1 нм соответственно. Поскольку размеры липосом существенно превышают дебаевскую длину экранирования, мы в дальнейшем не делаем различия между значениями дзета и поверхностного потенциалов, как это оказывается необходимым в рамках модели электрического двойного слоя Гуи—Чепмена—Штерна во многих других случаях [25].

Теоретическая модель, используемая для аппроксимации данных рис. 2, предлагает три варьируемых параметра — безразмерную толщину d , константу связывания K и долю поверхности, занятую полимером в насыщении β_0 . Каждый из них в общем случае может зависеть как от ионной силы, так и от размера полимерной молекулы. Таким образом, имеется восемь значений для каждого из них: $(\beta_0)_L^{10}, (\beta_0)_L^{40}, (\beta_0)_L^{100}, (\beta_0)_M^{10}, (\beta_0)_M^{40}, (\beta_0)_M^{100}, (\beta_0)_S^{10}, (\beta_0)_S^{40}, (\beta_0)_S^{100}$ и аналогичный набор для d и K .

Таблица 1. Равновесные значения параметров минимизации – константы связывания K (M^{-1}) и безразмерной толщины d – для полимеров с разной длиной цепи

| Параметр | Полилизин | | |
|-------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
| | длинный | средний | короткий |
| K, M^{-1} | $>2 \times 10^5$ | $(1.6-6.3) \times 10^4$ | $(0.4-1.6) \times 10^4$ |
| d | 8 ± 1 | 7.5 ± 1.8 | 1.05 ± 0.03 |

Введение ряда упрощающих предположений позволяет существенно сократить число параметров. Во-первых, нас интересует изменение при варьировании ионной силы конформационных характеристик полимеров, определяемых значениями d и β_0 , тогда как константа связывания K в большей степени влияет на кинетику адсорбции и при достижении равновесных условий оказывается менее существенной. Кроме того, имеющиеся в литературе экспериментальные данные указывают на полиномиальный характер зависимости константы связывания от ионной силы [18, 29]. По этим причинам мы считаем возможным в первом приближении пренебречь изменением величины K при вариации ионной силы. Следовательно, количество искомым значений константы связывания сводится к трем параметрам для полимеров разного размера: K_L , K_M и K_S . Далее согласно результатам работы [23] ортогональный компонент радиуса гирации, отражающий среднее удаление молекулы полимера от поверхности, практически не меняется при изменении ионной силы. В это же время латеральный компонент радиуса гирации, описывающий проекционную площадь молекулы, меняется значительно сильнее. Это позволяет предполагать независимость от ионной силы толщины d полимера. Таким образом, мы сокращаем число независимых параметров до трех значений толщины адсорбированного слоя d_L , d_M и d_S .

В итоге мы имеем 14 параметров, используемых для аппроксимации экспериментальных данных: толщины d_L , d_M и d_S ; константы связывания K_L , K_M и K_S ; доли поверхности, занятые полимером в насыщении $(\beta_0)_L^{10}$, $(\beta_0)_L^{40}$, $(\beta_0)_L^{100}$, $(\beta_0)_M^{10}$, $(\beta_0)_M^{100}$, $(\beta_0)_S^{10}$, $(\beta_0)_S^{40}$, $(\beta_0)_S^{100}$. Кроме того, количество и условная концентрация липидов, формирующих экспонированную в раствор поверхность липосом, принимается также неизвестным параметром C_{lip} . Эта концентрация может отличаться от полного количества липида в суспензии (1 мг/мл), поскольку некоторая часть липида может участвовать в образовании небислойных структур, либо оставаться недоступной при адсорбции полимера на внешней поверхности мультислойных липосом. В процессе минимизации мы накладываем на парамет-

ры аппроксимации определенные ограничения, обусловленные общефизическими соображениями. Так, мы полагаем, что толщина адсорбционного слоя превышает величину h_0 вне зависимости от ионной силы I и степени полимеризации n . Это означает, что величина d всегда больше единицы. Учитывая приведенные выше условия, мы провели аппроксимацию экспериментальных данных, представленных на рис. 2. Результаты аппроксимации показаны на рис. 3 для значений поверхностного (дзета) потенциала, измеренного при варьировании концентрации полилизинированного, среднего и большого размеров.

Полученные параметры позволяют вычислить условную “емкость” мембран C_p к полимеру данного типа, т.е. предельное отношение числа зарядов полимера к числу зарядов на мембране, когда следующий полимер уже не может адсорбироваться. Этот параметр вычисляется по формуле $C_p = \beta_0 d$. Равновесные значения доли поверхности β_0 и произведения $\beta_0 d$ в зависимости от длины Дебая λ представлены на рис. 4.

Данные по константе связывания K и безразмерной толщине d в зависимости от размера полимерной цепи приведены в табл. 1. Равновесное значение параметра C_{lip} равно $C_{lip} = 0.16 \pm 0.02$ мг/мл, что указывает на то, что лишь 16% используемого липида формирует поверхность везикул, экспонированную в основной раствор.

ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство моделей, описывающих электрокинетические эксперименты, оперируют усредненными характеристиками, такими как количество адсорбированного вещества или средний поверхностный заряд [11, 30]. В ряде случаев это приводит к искаженным результатам, особенно при изучении адсорбции поликатионов [31] – использование модели Гуи–Чепмена приводит к заниженным изменениям дзета-потенциала при добавлении поликатионов в раствор. Возникает необходимость определить минимальный набор физических параметров, наиболее подходящий для анализа таких систем. Исходя из результатов, полученных нами ранее методом атомно-силовой микроскопии [16], мы предложили вместо количества адсорбированного веще-

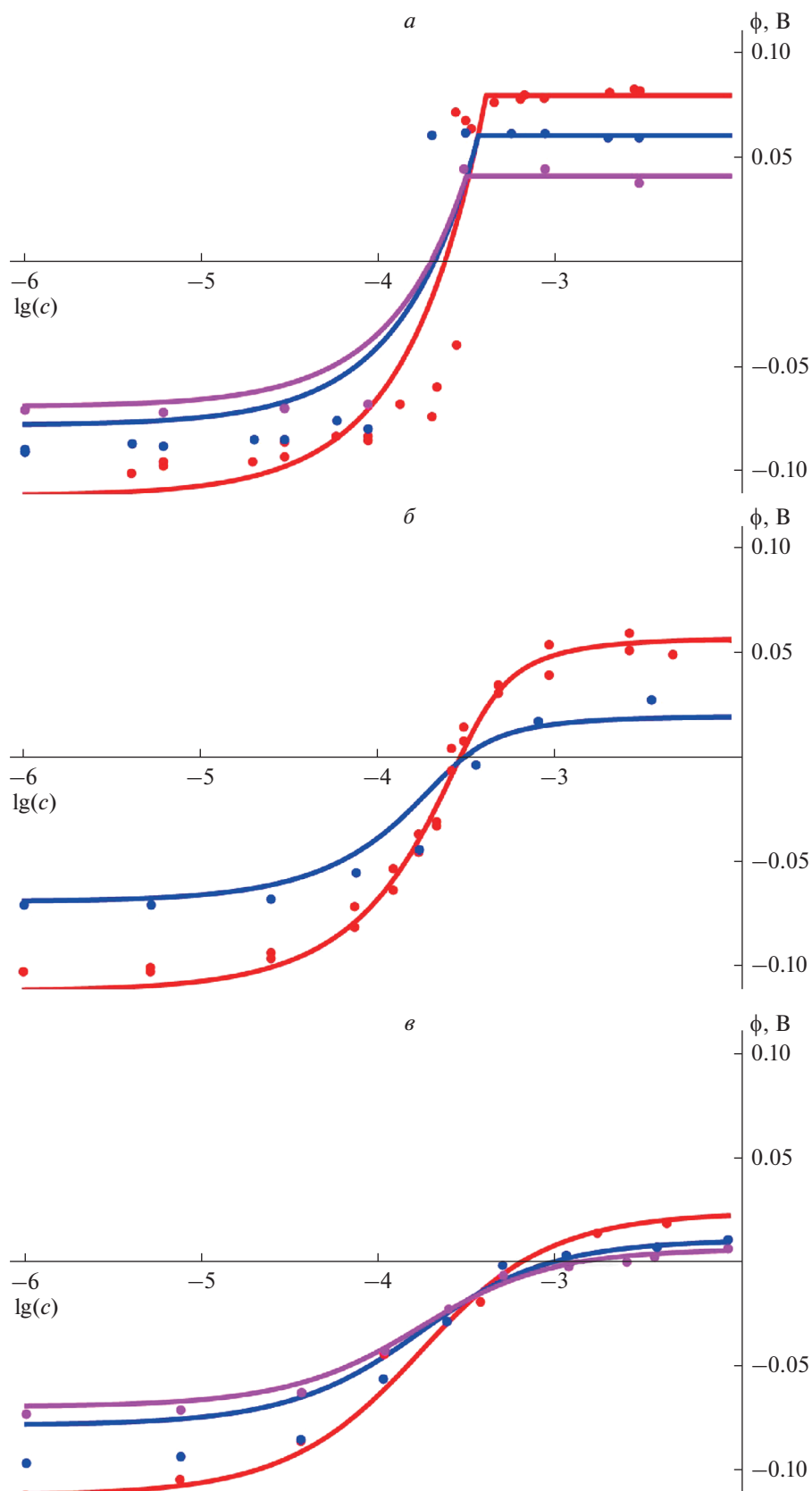


Рис. 3. Зависимости потенциала ϕ на мембране от концентрации мономеров лизина в растворе c для случаев длинного (*a*), среднего (*b*) и короткого (*v*) полимеров. Кривые и экспериментальные точки, соответствующие ионной силе 10 мМ, выделены красным, ионной силе 40 мМ – синим, ионной силе 100 мМ – фиолетовым цветом.

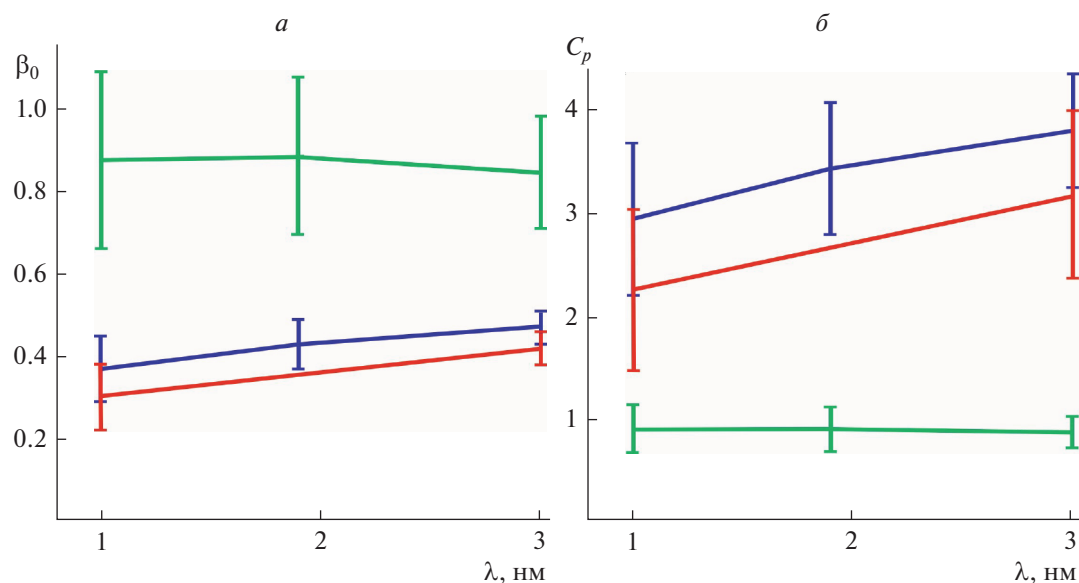


Рис. 4. Зависимость равновесной доли поверхности β_0 (а) и емкости C_p (б) от длины Дебая в фоновом растворе для полимеров с разной длиной цепи. Синим цветом показаны результаты для длинных полимеров; красным — для полимеров средней длины; зеленым — для коротких полимеров.

ства ввести две независимые характеристики — долю поверхности β_0 , занятую полимером в насыщении, и толщину полимерного слоя h . Эти параметры позволяют провести более полный анализ электрокинетических экспериментов.

В данной работе нами проведена аппроксимация экспериментальных данных, измеренных при различных значениях ионной силы раствора. Полученные результаты позволяют сделать ряд важных выводов о поведении системы в этих условиях. Во-первых, мы видим существенное различие в поведении пентализина (самый короткий полимер) и полимеров с большей степенью полимеризации (средний и длинный полимеры). Как следует из рис. 4, степень заполнения поверхности полимером, т.е. доля поверхности β_0 , занятая коротким полимером в насыщении, в 2 раза превосходит аналогичный показатель для среднего и длинного полимеров и мало отличается от 100%. При этом толщина слоя пентализина совпадает с минимальной толщиной h_0 равной 0.5 нм и соответствующей полностью расправленной полимерной цепочке. Толщина же слоя для средних и длинных полимеров в несколько раз превосходит h_0 , что вкупе с малым значением β_0 (порядка 0.3–0.4) говорит об отличии конформации крупных полимеров от конформации олигомеров. В то время как пентализин занимает практически всю доступную поверхность однородным слоем, крупные полимеры образуют на поверхности многослойные кластеры. На это указывает сходство поведения пентализина при адсорбции со случаем моно- и двухвалентных ионов, в отли-

чие от крупных полимеров. Наиболее наглядно такое различие демонстрируется при анализе “емкостей” мембраны по различным полимерам, представленным на рис. 4б. Видно, что “емкость” по пентализину мало отличается от единицы, что указывает на его адсорбцию в один слой. В то же время значение “емкости” для среднего и крупного полимера составляет от 2.5 до 3.5 в зависимости от длины полимерной цепи и ионной силы. Этот факт согласуется с экспериментальным наблюдением за перезарядкой поверхности липосом. Полученные нами значения соответствуют экспериментальным данным, опубликованным в работе [32] для поливинилпиридина. Для длинного полимера при ионной силе $I = 10$ мМ значение емкости составляет около $C_p \approx 2$. Таким образом, при количественном анализе адсорбции коротких полимеров, в том числе при варьировании ионной силы раствора, допустимо использовать модель адсорбции малых ионов, основанную на теории электрического двойного слоя Гуи-Чепмена-Штерна [26]. В то же время можно считать доказанным, что в случае длинных полимеров необходимо учитывать образование кластеров полимер-липид с физическими характеристиками, зависящими от длины макромолекулы. Следует отметить различие в константах связывания в описанных случаях, которое указывает на появление признаков необратимой адсорбции полимеров с большой степенью полимеризации n . Эти закономерности находятся в согласии с полученными нами ранее результатами [15, 16, 24].

Проведенный нами количественный анализ указывает на некоторое понижение “емкости” мембраны C_p к среднему и длинному полимерам (рис. 4б) с ростом ионной силы раствора I , обусловленное уменьшением доли поверхности β_0 , занятой в насыщении (рис. 4а). Это говорит о понижении эффективности адсорбции крупных поликатионов и в целом подтверждается как экспериментальными данными [15], так и результатами молекулярно-динамических расчетов [23]. Наши расчеты показывают, что в случае больших полимеров понижение эффективности адсорбции является следствием не только изменения в окружающем растворе электролита (длины Дебая), но также обусловлено локальными затруднениями при связывании молекул полимера с поверхностью. Такой же вывод был сформулирован в работе [23] в контексте изменения конформации адсорбирующейся молекулы. Авторы с применением методов молекулярной динамики (Монте Карло) показали, что, начиная с некоторого значения ионной силы, электростатические взаимодействия между молекулами полимера и поверхностными зарядами заметно экранируются ионами раствора, в результате чего конформационная перестройка, сопровождающая связывание молекул с поверхностью, становится энергетически невыгодной. Такая закономерность становится более выраженной с увеличением степени полимеризации n , т.е. с увеличением длины полимерной цепи. Полученные нами результаты полностью согласуются с этим выводом.

Резюмируя вышесказанное, мы приходим к двум важным выводам.

1. Конформация и расположение адсорбированных на поверхности мембран крупных полимеров и олигомеров существенно различаются. Так, пентализин занимает практически всю доступную поверхность однородным тонким слоем, а крупные полимеры образуют на поверхности неоднородные локальные структуры. Можно считать доказанным, что в случае длинных полимеров необходимо учитывать образование кластеров полимер–липид с физическими характеристиками, зависящими от длины макромолекулы.

2. Увеличение ионной силы приводит к понижению удельной “емкости” мембраны, особенно ярко выраженному в случае крупных полимеров. Понижение “емкости” отражает необходимость дополнительных энергетических затрат для конформационной перестройки больших полимерных молекул при связывании их с поверхностью мембраны. У коротких полимеров такие перестройки весьма незначительны в силу их малых размеров, и потому вызванные ими эффекты становятся менее заметными.

Следует отметить, что в нашем анализе мы использовали ряд упрощающих предположений и игнорировали некоторые важные свойства системы. Не учтена возможная зависимость константы связывания и толщины адсорбционного слоя от ионной силы. Степень ионизации полимера f (т.е. доля заряженных мономеров в составе полимера) полагалась близкой к единице и не зависящей от состава раствора (ионной силы). Если в растворах с ионной силой в 10 мМ это можно считать доказанным [20], то повышение ионной силы должно приводить к некоторому изменению степени ионизации полимера, определяющего привносимый им заряд на поверхность. Заметим также, что все использованные здесь экспериментальные данные были получены на чистом кардиолипине. Это обстоятельство не позволяет оценить эффект кластеризации заряженного липида в мембранах смешанного состава под адсорбирующимся полимером, описанный в работе [9], а также вероятное изменение конформации адсорбирующихся полимерных молекул при уменьшении доли отрицательно заряженной компоненты в составе мембраны. При анализе экспериментальных данных мы считали, что значения поверхностного и дзета-потенциалов практически совпадают. При высоких ионных силах это условие может не выполняться. Более того, при дальнейшем развитии модели мы планируем оценить возможное смещение плоскости скольжения по мере заполнения поверхности полимерными молекулами и то влияние, которое оно оказывает на величину равновесных параметров при изменении ионной силы.

На интерпретацию экспериментальных данных может также оказывать влияние флокуляция липосом под действием адсорбирующихся поликатионов, т.е. формирование поликомплексов поликатионов и липосом, приводящее к образованию соответствующих агрегатов различной величины и формы. Однако эффект флокуляции может быть заметным только в области малых поверхностных потенциалов, когда заряд поверхности также мал (см., например, обзоры [33, 34]). Это можно наблюдать по зависимости размера частиц от концентрации полимера, описанной в работе [35]. Из приведенных в данной работе результатов можно заключить, что флокуляция, во-первых, обратима, а во-вторых, существенна только вблизи точки нулевого заряда. В наших экспериментах подобные потенциалы в основном наблюдаются только в случае пентализина, добавленного в максимальной концентрации. Поскольку аппроксимация данных проводится совместно по всем наборам данных, мы считаем, что вносимая в результате неучтенного эффекта флокуляции ошибка не должна оказывать существенного влияния на полученные результаты.

Безусловно, основные выводы, сделанные при теоретическом анализе электрокинетических кривых, следует сопоставить не только с данными молекулярно-динамических симуляций липид-пептидных систем, но подтвердить их структурными методами, например, с применением малоуглового рентгеновского рассеяния. Определенный успех в этом отношении оказался возможен в последние годы с применением высокоэффективных источников синхротронного излучения [36]. Существенное развитие и проверку корректности использованного нами теоретического подхода мы ожидаем, в первую очередь, при анализе электрокинетических данных, полученных в суспензии липосом варьируемого состава.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №АААА-А19-119010990119-9), а также проекта РФФИ № 19-04-00242-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Meier W. 2000. Polymer nanocapsules. *Chem. Soc. Rev.* **25**, 295–303. <https://pubs.rsc.org/en/content/article.html/2000/cs/a809106d>.
- Xu T., Zhang N., Nichols H.L., Shi D., Wen X. 2007. Modification of nanostructured materials for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **27**, 579–594. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.029>
- Cho Y.W., Kim J.-D., Park K. 2003. Polycation gene delivery systems: Escape from endosomes to cytosol. *J. Pharm. Pharmacol.* **55**, 721–734. <https://doi.org/10.1211/002235703765951311>
- Hong S., Leroueil P.R., Janus E.K., Peters J.L., Kober M.M., Islam M.T., Orr B.G. 2006. Baker J.R., Banaszak Holl M.M. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: Nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug. Chem.* **17**, 728–734. <https://doi.org/10.1021/bc060077y>
- Illergård J., Römling U., Wågberg L., Ek M. 2012. Bio-interactive antibacterial fibres using polyelectrolyte multilayer modification. *Cellulose* **19**, 1731–1741. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9742-0>
- McGeachy A.C., Dalchand N., Caudill E.R., Li T., Doğangün M., Olenick L.L., Chang H., Pedersen J.A., Geiger F.M. 2018. Interfacial electrostatics of poly(vinylamine hydrochloride), poly(diallyldimethylammonium chloride), poly-L-lysine, and poly-L-arginine interacting with lipid bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 10846–10856. <https://doi.org/10.1039/c7cp07353d>
- May S., Harries D., Ben-Shaul A. 2000. Lipid demixing and protein-protein interactions in the adsorption of charged proteins on mixed membranes. *Biophys. J.* **79**, 1747–1760. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76427-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76427-7)
- Schwieger C., Blume A. 2007. Interaction of poly(L-lysines) with negatively charged membranes: An FT-IR and DSC study. *Eur. Biophys. J.* **36**, 437–450. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0080-8>
- Mbamala E.C., Ben-Shaul A., May S. 2005. Domain formation induced by the adsorption of charged proteins on mixed lipid membranes. *Biophys. J.* **88**, 1702–1714. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048132>
- Hurwitz G., Guillen G.R., Hoek E.M.V. 2010. Probing polyamide membrane surface charge, zeta potential, wettability, and hydrophilicity with contact angle measurements. *J. Memb. Sci.* **349**, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.11.063>
- Freire J.M., Domingues M.M., Matos J., Melo M.N., Veiga A.S., Santos N.C., Castanho M.A.R.B. 2011. Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. *Eur. Biophys. J.* **40**, 481–487. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0661-4>
- Alvares D.S., dos Santos Cabrera M.P., Ruggiero Neto J. 2016. Strategies for exploring electrostatic and non-electrostatic contributions to the interaction of helical antimicrobial peptides with model membranes. *Adv. Biomembr. Lipid Self-Assembly* **24**, 43–73. <https://doi.org/10.1016/bs.abl.2016.05.001>
- Dobrynin A.V., Rubinstein M. 2005. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Prog. Polym. Sci.* **30**, 1049–1118. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.07.006>
- Ohshima H. 1995. Electrophoresis of soft particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **62**, 189–235. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(95\)00279-Y](https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00279-Y)
- Finogenova O.A., Filinsky D.V., Ermakov Yu.A. 2008. Electrostatic effects upon adsorption and desorption of polylysines on the surface of lipid membranes of different composition. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **2**, 181–188. <https://doi.org/10.1134/s1990747808020128>
- Marukovich N., McMurray M., Finogenova O., Nesterenko A., Batishchev O., Ermakov Yu. 2013. Interaction of polylysines with the surface of lipid membranes. *Adv. Planar Lipid* **17**, 139–166. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-411516-3.00006-1>
- Ярославов А. А., Ефимова А. А., Лобышев В. И., Ермаков Ю. А., Кабанов В. А. 1996. Обратимость изменения структуры липидных мембран, индуцированных адсорбцией поликатиона. *Биол. мембраны* **13** (6), 628–633.
- Heimburg T., Angerstein B., Marsh D. 1999. Binding of peripheral proteins to mixed lipid membranes: Effect of lipid demixing upon binding. *Biophys. J.* **76**, 2575–2586. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77410-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77410-2)
- Marukovich N.I., Nesterenko A.M., Ermakov Yu.A. 2015. Structural factors of lysine and polylysine interaction with lipid membranes. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **9**, 40–47. <https://doi.org/10.1134/S1990747814060038>

20. Kostritskii A.Y., Kondinskaia D.A., Nesterenko A.M., Gurtovenko A.A. 2016. Adsorption of synthetic cationic polymers on model phospholipid membranes: Insight from atomic-scale molecular dynamics simulations. *Langmuir*. **32**, 10402–10414. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b02593>
21. Khomich D.A., Nesterenko A.M., Kostritskii A.Y., Kondinskaia D.A., Ermakov Yu.A., Gurtovenko A.A. 2017. Independent adsorption of monovalent cations and cationic polymers at PE/PG lipid membranes. *J. Phys. Conf. Ser.* **794**, 012010. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/794/1/012010>
22. McGeachy A.C., Caudill E.R., Liang D., Cui Q., Pedersen J.A., Geiger F.M. 2018. Counting charges on membrane-bound peptides. *Chem. Sci.* **9**, 4285–4298. <https://doi.org/10.1039/c8sc00804c>
23. Duan X., Zhang R., Li Y., Shi T., An L., Huang Q. 2013. Monte Carlo study of polyelectrolyte adsorption on mixed lipid membrane. *J. Phys. Chem. B*. **117**, 989–1002. <https://doi.org/10.1021/jp310017j>
24. Molotkovsky R.J., Galimzyanov T.R., Ermakov Yu.A. 2019. Polypeptides on the surface of lipid membranes. Theoretical analysis of electrokinetic data. *Colloid J.* **81**, 125–135. <https://doi.org/10.1134/S1061933X19020108>
25. Ermakov Yu.A. 2000. Ion equilibrium near lipid membranes: Empirical analysis of the simplest model, *Colloid J.* **62**, 389–400.
26. Ermakov Yu. 1990. The determination of binding site density and association constants for monovalent cation adsorption onto liposomes made from mixtures of zwitterionic and charged lipids. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1023**, 91–97.
27. Sokolov V.S., Batishchev O.V., Akimov S.A., Galimzyanov T.R., Konstantinova A.N., Malingriaux E., Gorbunova Y.G., Knyazev D.G., Pohl P. 2018. Residence time of singlet oxygen in membranes. *Sci. Rep.* **8**, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31901-9>
28. Finogenova O.A., Batischev O.V., Indenbom A.V., Zolotarevsky V.I., Ermakov Yu.A. 2009. Molecular distribution and charge of polylysine layers at the surface of lipid membranes and mica. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **3**, 496–503. <https://doi.org/10.1134/S1990747809040187>
29. Porcar I., Garcia R., Gómez C., Campos A., Abad C. 1997. Macromolecules in ordered media: 7. Influence of ionic strength and bilayer composition on the association of polyelectrolytes to mixed liposomes. *Polymer (Guildf)*. **38**, 5107–5113. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)00061-X](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)00061-X)
30. Shin Y., Roberts J.E., Santore M.M. 2002. The relationship between polymer/substrate charge density and charge overcompensation by adsorbed polyelectrolyte layers. *J. Colloid Interface Sci.* **247**, 220–230. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.8100>
31. Murray D., Arbuzova A., Hangyás-Mihályiné G., Gambhir A., Ben-Talvvs N., Honig B., McLaughlin S. 1999. Electrostatic properties of membranes containing acidic lipids and adsorbed basic peptides: Theory and experiment. *Biophys. J.* **77**, 3176–3188. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77148-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77148-1)
32. Ivashkov O.V., Sybachin A.V., Efimova A.A., Pergushov D.V., Orlov V.N., Schmalz H., Yaroslavov A.A. 2015. The influence of the chain length of polycations on their complexation with anionic liposomes. *ChemPhysChem*. **16**, 2849–2853. <https://doi.org/10.1002/cphc.201500474>
33. Gregory J., Barany S. 2011. Adsorption and flocculation by polymers and polymer mixtures. *Adv. Coll. Int. Sci.* **169**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.06.004>
34. Feng L., Stuart M. C., Adachi Y. 2015. Dynamics of polyelectrolyte adsorption and colloidal flocculation upon mixing studied using mono-dispersed polystyrene latex particles. *Adv. Coll. Int. Sci.* **226**, 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.09.004>
35. Yaroslavov A.A., Efimova A.A., Lobyshev V.I., Kabanov V.A. 2002. Reversibility of structural rearrangements in the negative vesicular membrane upon electrostatic adsorption/desorption of the polycation. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1560**, 14–24. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00453-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00453-9)
36. Ermakov Yu.A., Asadchikov V.E., Volkov Y.O., Nuzhdin A.D., Roshchin B.S., Honkimaki V., Tikhonov A.M. 2019. Electrostatic and structural effects at the adsorption of polylysine on the surface of the DMPS monolayer. *JETP Lett.* **109**, 334–339. <https://doi.org/10.1134/S0021364019050060>

Influence of Ionic Strength on Adsorption of Polypeptides on Lipid Membranes: Theoretical Analysis

R. Yu. Molotkovsky^{1,*}, T. R. Galimzyanov^{1,2}, and Yu. A. Ermakov¹

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

²*National Research Technological University MISiS, Moscow, 119049 Russia*

*e-mail: rodion.molotkovskiy@gmail.com

A theoretical analysis of the effect of the ionic strength of a solution on the surface (zeta) potential of liposomes formed by an anionic phospholipid (cardiolipin) with adsorbed polycations has been carried out. Experimental data were previously obtained by the electrokinetic method in the presence of polylysine mole-

cules of different molecular weights and a supporting electrolyte KCl at concentrations of 10, 40, and 100 mM. To approximate the experimental dependencies of the potential on the amount of polylysine in the suspension, we used a theoretical model with parameters, among which the most physically significant are the thickness of the polymer layer, the adsorption constant, and the fraction of the surface of lipid membranes occupied by the polypeptide at the saturation. The obtained values of the model parameters demonstrate the effect of the length of the polypeptide molecules on the structure of the polymer layer varying from homogeneous to clustered distribution over the surface. A noticeable decrease in the efficiency of adsorption with an increase in the ionic strength of the solution is explained by the conformational rearrangements of the macromolecules on the surface and a decrease in the area of the surface available for their adsorption upon the saturation.

Keywords: lipid membranes, cardiolipin, polylysine, adsorption, electrophoretic mobility

УДК 577.352.4

ИНДУКЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК *Chara*, СВЯЗАННЫЕ С ОБМЕНОМ МЕТАБОЛИТОВ МЕЖДУ ХЛОРОПЛАСТАМИ И ПОТОКОМ ЦИТОПЛАЗМЫ

© 2021 г. А. А. Булычев*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 26.01.2021 г.

После доработки 02.02.2021 г.

Принята к публикации 03.02.2021 г.

Индукционные изменения флуоресценции (Фл) хлорофилла в растениях связаны с фотосинтетическим переносом электронов, генерацией градиента протонов и образованием углеводов в цикле фиксации CO_2 . Реакции фотосинтеза сопровождаются также выведением фотопродуктов из освещенных хлоропластов и их переносом на дальние расстояния. Обмен метаболитов через оболочку хлоропластов осуществляют переносчики, которые активны на свету и теряют активность в темноте. Инактивация светозависимых транспортеров оболочки прерывает дальнюю передачу сигналов в клетках харовой водоросли, выявляемую по изменениям Фл в ответ на освещение удаленного участка клетки. Показано, что темновая адаптация нарушает поступление метаболитов из потока цитоплазмы в затененные хлоропласты, но оказывает сравнительно слабое влияние на экспорт метаболитов из освещенных пластид. Установлено, что индукционные кривые Фл существенно различаются при освещении или затемнении препарата за пределами фотометрируемой области. Амплитуда медленных изменений Фл при низкоинтенсивном освещении всего междоузлия *Chara* была значительно больше, чем при узкопольном освещении зоны измерения Фл. Результаты говорят о том, что медленное нарастание Фл в индукционный период в клетках харовых водорослей определяется не только фотосинтетической активностью исследуемого участка, но и взаимодействиями между анализируемой областью и соседними частями клетки. При остановке движения цитоплазмы под действием цитохалазина D локальное и общее освещение вызывали примерно равные индукционные изменения Фл, что говорит о разобщении дальних взаимодействий. Результаты показывают, что поток жидкости не только переносит метаболиты от освещенных к затененным частям клетки, но и облегчает экспорт фотометаболитов из хлоропластов в цитоплазму.

Ключевые слова: Characeae, флуоресценция хлорофилла, течение цитоплазмы, цитохалазин D, транспортеры оболочки хлоропластов, дальний транспорт

DOI: 10.31857/S0233475521030038

ВВЕДЕНИЕ

Индукционные кривые флуоресценции (Фл) хлорофилла (Хл) у фотосинтезирующих объектов (O-J-I-P-S-M-T переходы) обычно рассматривают в связи с переносом электронов, образованием электрохимического градиента протонов на тилакоидных мембранах и активностью цикла фиксации CO_2 [1, 2]. Кроме того, фотосинтез включает перенос субстратов и метаболитов через мембраны оболочки хлоропластов, а также дальний транспорт ассимилятов, однако сведения о влиянии этих про-

цессов на Фл Хл единичны [3–5]. В листьях растений быстрые стадии индукционной кривой Фл (O-J-I-P-S) малочувствительны к трансмембранному обмену метаболитов и их латеральному перемещению, поскольку оболочка пластид и межклеточные барьеры затрудняют эти процессы. Вместе с тем обмен метаболитов и их дальний перенос могут сказываться на параметрах Фл при длительном освещении (S-M-T переходы). Эти переходы развиваются в течение минут после начала освещения и регулируются как редокс состоянием хинонного акцептора Q_A , так и процессами нефотохимического тушения, которые включают изменения баланса энергии возбуждения, поглощаемой фотосистемами I и II [2]. В основе S-M-T переходов у высших растений, водорослей и цианобактерий, по-

Сокращения: ЛСИ – локальный световой импульс, ЛФО – локальное фоновое освещение, ОИФ – область измерения флуоресценции, ОФО – общее фоновое освещение, Т – темновая экспозиция, Фл – флуоресценция, Хл – хлорофилл.

видимому, лежат разные процессы, которые остаются недостаточно охарактеризованными.

Стадия возрастания флуоресценции S-M у цианобактерий и водорослей *Chlamydomonas* в интервале от нескольких секунд до 100 с обусловлена переходами фотосинтетического аппарата из состояния 2 в состояние 1, при котором преимущественное возбуждение фотосистемы I сменяется преобладающим возбуждением фотосистемы II (ослабление тушения q_T), а последующее снижение M-T в диапазоне до 1000 с отражает усиление нефотохимического тушения [6–8]. В зеленых растениях переходы S-M-T в значительной степени определяются изменениями фотохимического тушения [2].

Особый интерес в плане изучения природы медленных стадий индукционных кривых Фл представляют изолированные гигантские (размером 5–10 см) междоузлия харовых водорослей, в которых отсутствуют межклеточные барьеры, а дальние коммуникации облегчены благодаря интенсивному (со скоростью до 100 мкм с^{-1}) круговому течению цитоплазмы. Активность хлоропластов у этих водорослей при неравномерном ступенчатом освещении может зависеть от таких процессов, как экспорт фотопродуктов в цитоплазму, их удаление из прилегающих к органеллам слоев и извлечение метаболитов из цитоплазмы в строму после их доставки от соседних частей клетки.

О наличии дальних взаимодействий и латерального переноса фотометаболитов между хлоропластами можно судить по флуоресценции Хл на ограниченных участках препарата при варьировании световых условий за пределами анализируемой площади. Например, квантовая эффективность фотосистемы II на микроучастках междоузлия *Chara* была существенно выше при локальном освещении анализируемой зоны, чем при общем освещении всей клетки светом той же интенсивности и того же спектрального состава [9, 10]. При этом величина нефотохимического тушения (NPQ) была ниже при освещении объекта узким световым лучом, чем при широкопольном освещении. Эти различия объясняли большей доступностью субстрата (CO_2) при отсутствии существенной конкуренции между хлоропластами в узкой зоне освещения и облегченным удалением продуктов метаболизма. Дальний перенос метаболитов в междоузлиях *Chara* лежит в основе изменений фактического и максимального выхода Фл (F' и F'_m , соответственно) при освещении участков клетки, расположенных вдали (на расстояниях до 6–10 мм) от зоны измерения [11–13]. При отсутствии дальних взаимодействий параметры Фл Хл на измеряемом участке не зависят от условий освещения окружающих областей [5, 14]. Сравнение индукционных кривых Фл Хл при локальном и общем освещении представляет еще один способ оценки

роли дальнего транспорта в регуляции фотосинтеза [15].

Участие потока цитоплазмы в дальних взаимодействиях можно выявить с помощью ингибиторов актина, которые замедляют и полностью останавливают течение цитоплазмы без нарушения механизма фотосинтеза [16]. В клетках Characeae тяжи актина прикреплены к внутренней поверхности одиночного слоя неподвижных хлоропластов, расположенных в периферическом слое цитоплазмы [17]. На границе между хлоропластами и эндоплазмой скорость течения достигает наибольших значений [18]. Тесный контакт хлоропластов с наиболее быстрыми струями потока обеспечивает распространение веществ из освещенных областей в затененные участки в условиях неравномерного освещения. Другим, не менее важным фактором является быстрый обмен метаболитов между стромой пластид и цитоплазмой. Такой трансмембранный обмен осуществляют светозависимые транслокаторы оболочки, главными из которых являются “малатный клапан” и переносчик триозофосфатов [19–21]. Оба переносчика отвечают за выведение избытка NADPH из стромы, поскольку при линейном потоке электронов образование NADPH превышает потребности, лимитируемые синтезом АТФ. Эти транслокаторы активны на свету и постепенно (за время от десятков секунд до нескольких минут) теряют активность после перехода к темноте [22, 23]. Используя различные варианты инкубации объекта на свету и в темноте, можно оценить роль светозависимых транспортеров оболочки в дальней передаче метаболического сигнала.

Дистанционная передача восстановленных соединений (NAD(P)H, триозофосфаты) включает стадию их экспорта в зоне образования, латеральный перенос вдоль неподвижного слоя хлоропластов, поступление метаболитов из цитоплазмы в строму затененных пластид и последующие биохимические и физико-химические реакции, приводящие к восстановлению пластохинона и возрастанию флуоресценции Хл [24, 25]. В этой цепи событий транслокаторы оболочки осуществляют как экспорт метаболитов в цитоплазму (на начальном этапе), так и их перенос в обратном направлении (на конечных участках). В настоящее время отсутствуют сведения о том, совпадают или различаются стадии экспорта и импорта метаболитов по чувствительности к действию света. Для ответа на этот вопрос важно использовать локальное подведение лучей к начальному и терминальному участку цепи передачи сигнала.

В данной работе показано, что индукционные кривые Фл в клетках харовых водорослей включают медленные (в минутном диапазоне) стадии, которые чувствительны к транспорту фотометаболитов через мембраны оболочки хлоропластов

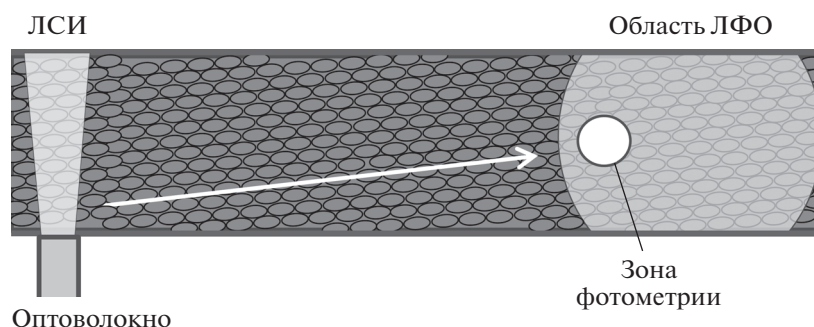


Рис. 1. Схема приложения локального светового импульса (ЛСИ) относительно зоны локального фонового освещения (ЛФО) и области измерения флуоресценции. Луч от оптоволоконна направлен в горизонтальной плоскости, а локальное фоновое освещение — вертикально. Стрелкой показано направление течения цитоплазмы параллельно рядам неподвижных хлоропластов в плоскости измерения флуоресценции.

и к распространению метаболитов с потоком цитоплазмы. Установлено, что выведение фотопродуктов из хлоропластов начинается сравнительно быстро после включения света, тогда как для их поступления из цитоплазмы в строму пластид необходимо длительное (>40 с) фоновое освещение. Результаты указывают на то, что стадии медленного нарастания и последующего спада (S-M-T переходы) в индукционной кривой Фл интернодальных клеток *Chara* сопровождаются изменениями состава цитоплазмы в связи с обменом метаболитов через мембраны оболочки хлоропластов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуру *Chara australis*, полученную из лаборатории профессора Ilse Foissner (Salzburg University), выращивали в стеклянных сосудах при рассеянном комнатном освещении. Изолированные междоузлия главной оси (диаметр ~ 0.9 мм, длина 3–6 см) и боковых побегов (диаметр 0.6–0.7 мм, длина 1–1.5 см) помещали в искусственную прудовую воду, содержащую 0.1 мМ KCl, 1.0 мМ NaCl и 0.1 мМ CaCl₂. В среду добавляли NaHCO₃ до pH 7.

Опыты проводили при температуре 19–23°C. Скорость течения цитоплазмы измеряли с помощью секундомера, наблюдая в микроскоп за движением отдельных частиц. Время пробега фиксированного расстояния (950 мкм) определяли последовательно для пяти частиц и находили среднее значение скорости движения. В зависимости от температуры скорость варьировала на разных клетках от 65 до 100 мкм с⁻¹ при стандартной ошибке среднего ≤ 1.5 мкм с⁻¹.

Выход флуоресценции Хл измеряли на микроучастках клеток (диаметр ~ 100 мкм) с помощью инвертированного микроскопа Axiovert-25 CFL (Zeiss, Германия) в сочетании со специализированным флуориметром Microscopy-PAM (Walz, Effeltrich, Германия). Установка для измерений описана ранее [15, 25]. Слабый модулированный

измерительный свет от синего светодиода флуориметра Microscopy-PAM проходил по оптическому пути микроскопа и возбуждал Фл Хл (F'), которую регистрировали при низкоинтенсивном фоновом освещении. Сигнал от фотоумножителя обрабатывали в программе WinControl-3 (Walz), оцифровывали с интервалом ~ 51 мс аналого-цифровым преобразователем PCI-6024E (National Instruments, США) и записывали на компьютер.

В начале опытов интернодальную клетку выдерживали при общем фоновом освещении (ОФО). Свет от верхнего осветителя микроскопа проходил через стеклянный фильтр (СЗС-22, $\lambda < 580$ нм) и нейтральный стеклянный фильтр, который ослаблял плотность потока фотонов до ~ 10 мкмоль м⁻² с⁻¹. Низкая интенсивность ОФО достаточна для поддержания активности светозависимых ферментов и дальнейшей передачи сигнала, но исключает образование энергозависимого нефотохимического тушения.

Способность клеток к дальнейшей передаче метаболического сигнала и поступление фотометаболитов в хлоропласты-акцепторы оценивали по изменениям F' в области измерения флуоресценции (ОИФ) после воздействия локального светового импульса (ЛСИ) на участок, отстоящий от ОИФ вверх по течению цитоплазмы на 1.5–3 мм (рис. 1). После лаг-периода, достаточного для опосредованной циклозом доставки метаболитов в ОИФ, наблюдали переходное возрастание F'. Для подведения ЛСИ использовали кварцевое оптоволоконно (диаметр 400 мкм) и контролируемый компьютером светодиодный источник белого света (плотность потока фотонов ~ 500 мкмоль м⁻² с⁻¹).

Локальное фоновое освещение (ЛФО) области измерения F' и окрестных участков осуществляли с помощью гибкого многоволоконного световода длиной 10 см и диаметром оптического пучка 2 мм [15]. Один конец оптического кабеля проходил через светозащитный экран; на него падал свет от верхнего осветителя микроскопа. Другой конец

кабеля был направлен на клетку сверху. Положение торца оптического кабеля относительно ОИФ в горизонтальной плоскости и по вертикальной оси регулировали с помощью микроманипулятора при наблюдении в микроскоп. Интенсивности лучей, падающих на исследуемую область клетки при двух конфигурациях освещения, — ЛФО и ОФО — отличались незначительно, о чем говорят близкие измеряемые значения F' для этих экспериментальных условий.

На рис. 1 схематично показаны область подведения локального светового импульса, область измерения флуоресценции, зона воздействия ЛФО, а также направление течения цитоплазмы. Индукционные изменения флуоресценции измеряли после предварительной адаптации клетки к темноте (Т) в течение 5 мин. В различных вариантах опытов записывали индукционные изменения F' при следующих изменениях световых условий: Т → ОФО, Т → ЛФО, а также ЛФО → ОФО.

На рисунках представлены усредненные кинетические кривые изменений F' , полученные при 3–6-кратном воспроизведении в репрезентативных опытах на отдельных клетках. В каждой серии опытов использовали не менее четырех клеток. Количество измерений (n) указано в подписях к рисункам. Отклонения от средних значений обозначают стандартные ошибки измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Лимитирующая светозависимая стадия в дальней передаче сигнала

На рис. 2 показаны изменения флуоресценции Хл, вызываемые приложением локального светового импульса к отдаленному участку клетки, в зависимости от предварительных световых условий. Кривая 1 отражает стандартную ответную реакцию F' в условиях стационарной фоновой подсветки всей клетки. Переходное возрастание F' обусловлено доставкой в строму восстановителей, распространяемых с потоком цитоплазмы [11]. Поступление в строму NADPH и триозофосфатов замедляет отток электронов из электрон-транспортной цепи фотосинтеза и вызывает помимо этого нефотохимическое восстановление пластохинона [25]. Оба фактора приводят к восстановлению хинонного акцептора Q_A и к временному возрастанию флуоресценции F' .

Как видно из записи 2, дистанционная передача сигнала между хлоропластами временно исчезает после предварительного выдерживания всей клетки в темноте в течение 5 мин. Об этом говорит отсутствие пика F' в интервале времени до 100 с. Хотя клетка находилась на фоновом свете в течение 40 с от момента завершения темновой адаптации до приложения локального светового импульса, ответная реакция F' на ЛСИ полностью

отсутствовала. Изменения F' , развивающиеся в более поздний период и достигающие пика при $t \approx 150$ с от начала записи ($t \approx 190$ с от момента возобновления фонового освещения), отражают задержанную стадию индукционной кривой, вызванную общим освещением. Начало этой стадии совпадает с восстановлением дальней передачи сигналов. Долгая задержка S-M-T изменений F' связана с низкой интенсивностью фонового света (12.5 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$). Точно такой же индукционный переход можно наблюдать при включении фонового освещения без воздействия ЛСИ. Эти опыты говорят о том, что дальняя сигнализация нарушается при темновой инактивации ферментов, входящих в транспортеры оболочки. Однако из этих данных нельзя решить, нарушается ли экспорт метаболитов в зоне яркого освещения или же их поступление из цитозоля в строму в слабо освещенных участках клетки. Для ответа на этот вопрос применяли комбинированную предобработку, помещая в темноту всю клетку, за исключением небольшого участка в области измерения F' . На область измерения F' и окрестные участки направляли узкий луч (локальное фоновое освещение), который по интенсивности и спектральному составу не отличался от общего фонового освещения.

Из записи 3 видно, что после темновой инкубации всей клетки, за исключением области измерения F' , одновременное включение локального светового импульса и общего фонового освещения вызывало ответную реакцию с двумя пиками F' . Первый пик представлял собой реакцию на ЛСИ, а второй — реакцию на ОФО. В отличие от опыта, представленного записью 2, в котором локальный импульс не вызывал сдвигов F' даже после 40 с экспозиции всей клетки на фоновом свете, в записи 3 ответная реакция F' возникала даже при одновременном включении локального импульса и ОФО. Амплитуда ответной реакции на ЛСИ после предобработки, поддерживающей активность светозависимых ферментов в зоне измерения, зачастую была больше, чем в контрольных условиях при стационарном ОФО. Результаты показывают, что экспорт фотометаболитов из хлоропластов-доноров при переходе темнота—свет начинается намного раньше, чем их поступление в хлоропласты-акцепторы. Длительность латентного периода на конечных участках сигнальной цепи при экспозиции хлоропластов на фоновом свете составляла не менее 40–50 с.

Латентный период фотоактивации импорта метаболитов

Различия в лаг-периодах выведения фотометаболитов из хлоропластов-доноров и их поступления в хлоропласты-акцепторы могут потенциально определяться высокой интенсивностью ЛСИ и,

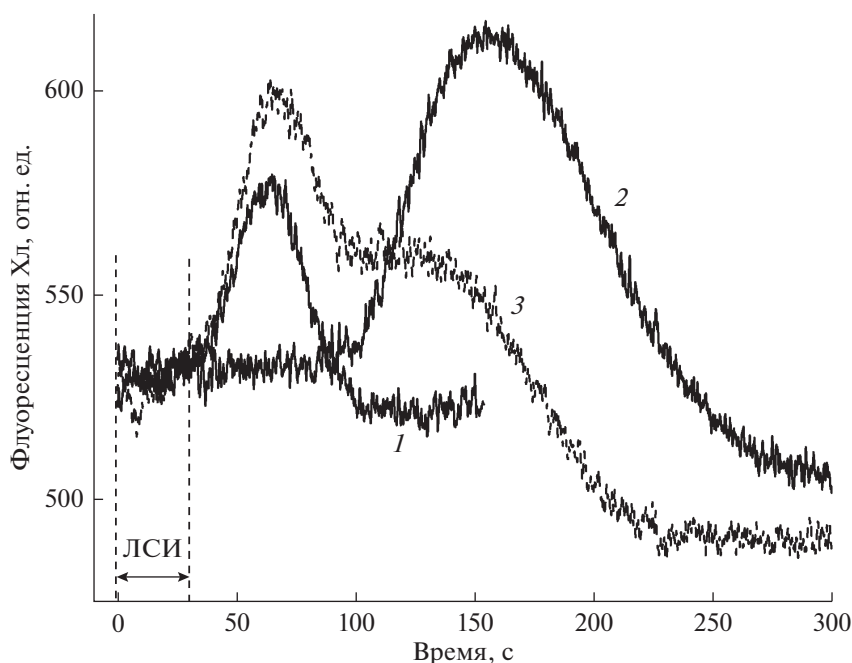


Рис. 2. Изменения флуоресценции F' в ответ на локальное приложение 30-с импульса белого света (ЛСИ; $500 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) на расстоянии 1.5 мм от зоны измерения F' при разной предыстории освещения междуузлия. 1 – Стандартная ответная реакция F' при стационарном фоновом освещении всей клетки ($12.5 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$); штриховые линии отмечают начало и конец ЛСИ. 2 – Отсутствие ответной реакции F' на ЛСИ при общем фоновом освещении (ОФО) после 5-мин инкубации в темноте; регистрация F' включена через 40 с после начала ОФО; пик F' при $t \approx 150$ с от начала записи ($t \approx 190$ с от момента включения ОФО) отражает задержанный индукционный переход S-M-T, вызванный ОФО. 3 – Ответная реакция F' на удаленное локальное освещение после 5 мин затемнения всей клетки, за исключением области измерения F' , которая оставалась на фоновом свете; начало регистрации F' совмещено с моментом помещения клетки на фоновый свет; вторая волна изменений F' отражает индукционный переход, вызванный общим освещением. Представлены усредненные записи для $n = 6$, полученные в типичном опыте на одной клетке.

соответственно, низкой интенсивностью фоновое освещение в зонах расположения этих органов. В связи с этим были проведены опыты без приложения ЛСИ, в которых измеряли индукционные изменения Фл после переноса адаптированной к темноте клетки на слабый фоновый свет. Перед каждой записью хлоропласты-акцепторы переводили в состояние либо с неактивными транспортерами оболочки (после выдерживания всей клетки в темноте в течение 5 мин), либо в активное состояние (выдерживание в темноте всей клетки, за исключением области измерения Фл, которая оставалась экспонированной локально на фоновом свете). Соответствующие условия опыта обозначали для краткости Т → ОФО (переход от темноты к общему фоновому освещению) и ЛФО → ОФО (переход от локального фонового освещения зоны измерения флуоресценции к общему фоновому освещению).

На рис. 3а показаны изменения Фл Хл, вызванные переходом от темноты к ОФО после двух вариантов предварительной обработки. В первом случае (кривая 1) все междуузлие было преадаптировано к темноте в течение 5 мин. Во втором случае (кривая 2) в темноту помещали всю клетку,

за исключением зоны измерения Фл, которая оставалась в зоне ЛФО. Предполагали, что первый вариант предобработки инактивировал светозависимые ферменты, ассоциированные с транслокаторами оболочки, а второй поддерживал светозависимые системы в области измерения Фл в активном функциональном состоянии.

Индукционная кривая 1 на рис. 3а получена при переходе Т → ОФО; она аналогична кривой 2 на рис. 2, за исключением того, что в данных опытах отсутствовало удаленное воздействие локального импульса света. При помещении клетки на слабый фоновый свет наблюдали пик F' при $t \sim 200$ с. Кривая 2 на рис. 3а, наблюдаемая при переходе ЛФО → ОФО, имеет аналогичную форму, что может показаться неожиданным, поскольку анализируемая область при таком переходе оставалась на свету того же спектрального состава и неизменной интенсивности. Это означает, что основная часть изменений F' при переходе ЛФО → ОФО обусловлена влиянием метаболитов, продуцируемых за пределами зоны измерения. Как видно из рис. 3б, локальное фоновое освещение области измерения после предварительной адаптации к темноте всего междуузлия (переход Т → ЛФО)

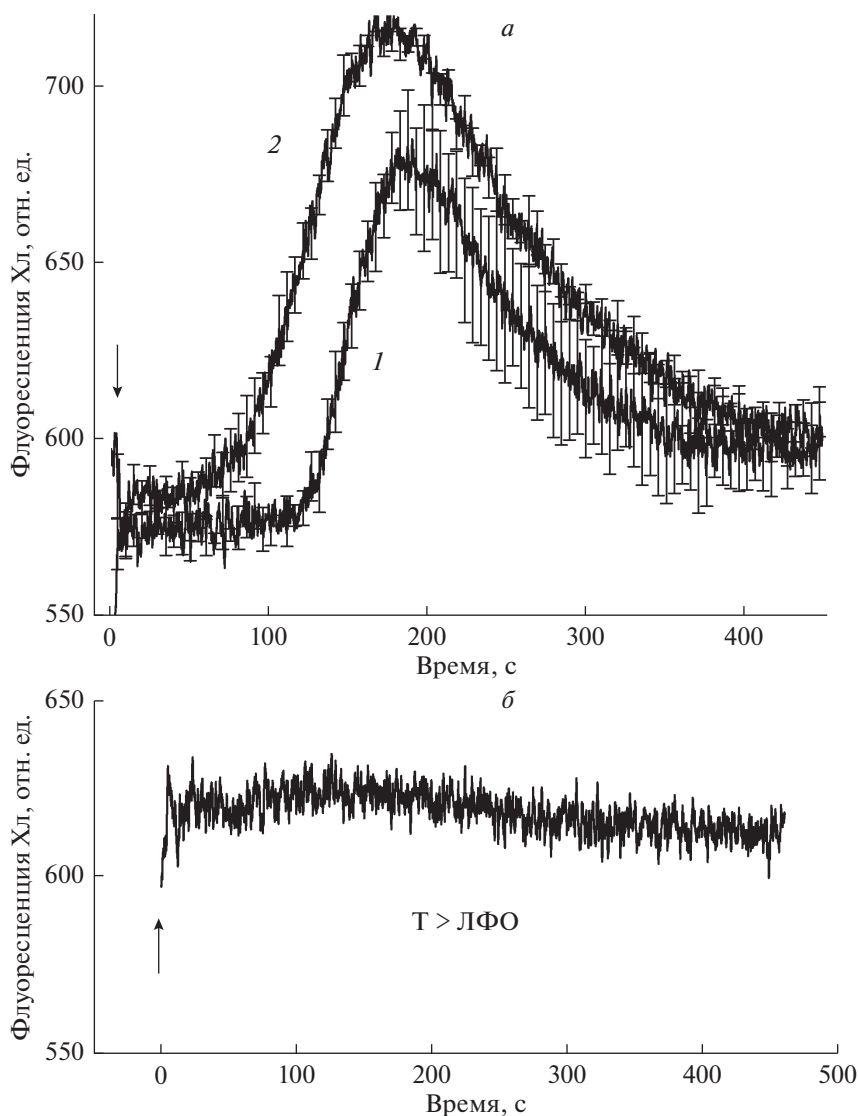


Рис. 3. Медленные индукционные изменения флуоресценции при неактивном и активном функциональном состоянии светозависимых ферментов в области измерения. *a* – Индукционные кривые флуоресценции при переходах: 1 – от темноты к общему фоновому освещению (Т → ОФО); 2 – от локального фонового освещения зоны измерения к общему фоновому освещению (ЛФО → ОФО). Момент времени $t = 0$ соответствует включению ОФО. Представлены усредненные кривые и стандартные ошибки для $n = 4$. *б* – Индукционные изменения Фл при локальном освещении области измерения фоновым светом (переход Т → ЛФО), $n = 3$.

вызывало лишь незначительные сдвиги флуоресценции Хл в исследуемом диапазоне.

Сходная форма кривых 1 и 2 (рис. 3а) и незначительный сдвиг Фл при локальном освещении фотометрируемого участка (рис. 3б) указывают на то, что переходные изменения F' хлоропластов-акцепторов в области измерения Фл вызваны влиянием фотопродуктов, доставляемых с потоком жидкости от хлоропластов-доноров после перехода от темноты к общему фоновому освещению.

Пик на индукционной кривой F' в предварительно освещенных хлоропластах (кривая 2) до-

стигался раньше, чем в неактивных, адаптированных к темноте хлоропластах (кривая 1). Более короткий латентный период на кривой 2 и сдвиг (~ 50 с) между фронтами нарастания F' на кривых 1 и 2, вероятно, обусловлены разным функциональным состоянием светозависимых переносчиков в зоне наблюдения после темновой адаптации и предварительного освещения. В случае, когда светозависимые транспортеры оболочки были активны (кривая 2), они обеспечивали быструю доставку восстановителей из потока цитоплазмы в строму пластид. Если же транслокаторы оболочки были исходно неактивны вследствие темновой адаптации, то доставка восстано-

вителей из потока цитоплазмы начиналась позднее, после периода фотоактивации транспорта.

Слабые изменения F' при локальном освещении области измерения флуоресценции (рис. 3б) указывают на то, что восстановительные эквиваленты не накапливаются в хлоропластах в данных условиях опыта. Их эффективное удаление из стромы обусловлено двумя факторами. С одной стороны, экспорт метаболитов не требует долгой световой экспозиции (см. описание в тексте к рис. 2), а с другой – поток цитоплазмы быстро удаляет выводимые продукты из окружения хлоропластов. Данные, представленные на рис. 3, указывают на участие светозависимых транспортеров оболочки и микрофлюидных потоков в развитии медленных изменений флуоресценции (S-M-T переходы) у харовой водоросли.

Изменения индукционной кривой флуоресценции при остановке цикла

На рис. 4 показаны изменения Фл Хл на микроучастках междуузлия *Chara*, вызванные световыми воздействиями двух типов. Одно из них (кривые 1) состояло в локальном приложении 30-секундного импульса белого света на расстоянии 1.5 мм от области измерения флуоресценции в условиях постоянного фонового освещения всей клетки. Это воздействие позволяло визуализировать передачу сигналов от хлоропластов-доноров к хлоропластам-акцепторам, находящимся на слабом фоновом свете. В параллельных опытах всю клетку освещали слабым фоновым светом после предварительной 5-минутной адаптации междуузлия к темноте и наблюдали медленные (S-M-T) индукционные изменения Фл (кривые 2). Измерения обоих типов выполняли в контрольных условиях при активном течении цитоплазмы (а), после остановки потока под действием цитохалазина D (б) и после восстановления потока, спустя 1 ч после начала отмывания клетки от цитохалазина D (в).

Скорость течения цитоплазмы в нативной клетке составляла 92 мкм с^{-1} . Как видно из рис. 4а (кривая 1), приложение локального светового импульса в момент времени $t = 0$ вызывало переходное увеличение F' при постоянных световых условиях в области измерения. Эти переходные изменения F' отражают передачу метаболического сигнала и его доставку к рецепторным хлоропластам. Добавление цитохалазина D в концентрации 25 мкМ приводило в течение 5 мин к остановке течения цитоплазмы и устранило переходные изменения F' , вызванные локальным импульсом света (рис. 4б, кривая 1). Действие цитохалазина D обратимо снималось после промывания клетки свежей средой.

Кривые 2 на рис. 4 изображают изменения Фл Хл, вызванные общим фоновым освещением адаптированного к темноте междуузлия в отсутствие и в присутствии цитохалазина D. В необработанной клетке задержанная волна F' появлялась после периода задержки $\sim 130 \text{ с}$, достигала пика при $t \geq 200 \text{ с}$ и затем снижалась до исходного уровня F' . При остановленном течении цитоплазмы в присутствии цитохалазина D задержанная волна F' , индуцированная слабым фоновым освещением, развивалась после более короткого периода задержки; пик F' и возврат к исходному уровню достигались раньше, чем в необработанной клетке. Амплитуда волны F' была, как правило, меньше, чем в контроле.

После отмывания клетки искусственной прудовой водой в течение $\geq 1 \text{ ч}$ латеральная передача метаболитов восстанавливалась (рис. 4в, кривая 1). Скорость течения возрастала до исходного значения 92 мкм с^{-1} , а пик волны F' , вызванной слабым фоновым освещением всей клетки, смещался к исходной позиции (при $t \approx 210 \text{ с}$). Обратимое действие цитохалазина D на сигналы F' двух типов говорит о том, что задержанный пик Фл Хл в период индукции фотосинтеза чувствителен к латеральной передаче фотометаболитов. При быстром течении цитоплазмы в интактной клетке поток постоянно омывает хлоропласты, что ускоряет удаление восстановительных эквивалентов из стромы пластид и замедляет развитие пика флуоресценции F' . Прекращение оттока метаболитов с поверхности пластид после остановки течения цитоплазмы замедляет экспорт восстановительных эквивалентов из хлоропластов, способствуя более быстрому накоплению восстановителей в строме за счет внутренних процессов, что отражается в ускоренном подъеме F' в индукционный период.

Влияние локального и общего освещения на F' при остановке цикла

Остановка движения цитоплазмы кардинально меняла ответную реакцию F' на локальное освещение анализируемой области (переход Т \rightarrow ЛФО). Как видно из рис. 5а (кривая 1) и как показано также на рис. 3б, переход Т \rightarrow ЛФО вызывал слабые изменения F' при активном течении цитоплазмы. Вместе с тем после остановки цикла такое же локальное освещение вызывало переходное возрастание F' (рис. 5а, кривая 2). По-видимому, остановка течения затрудняет отток восстановительных эквивалентов из освещенных хлоропластов, приводя к их накоплению в строме и восстановлению пластохинона и хинонного акцептора Q_A .

На рис. 5б показаны изменения F' , вызываемые в отсутствие цикла при смене локального освещения анализируемого участка на общее фоно-

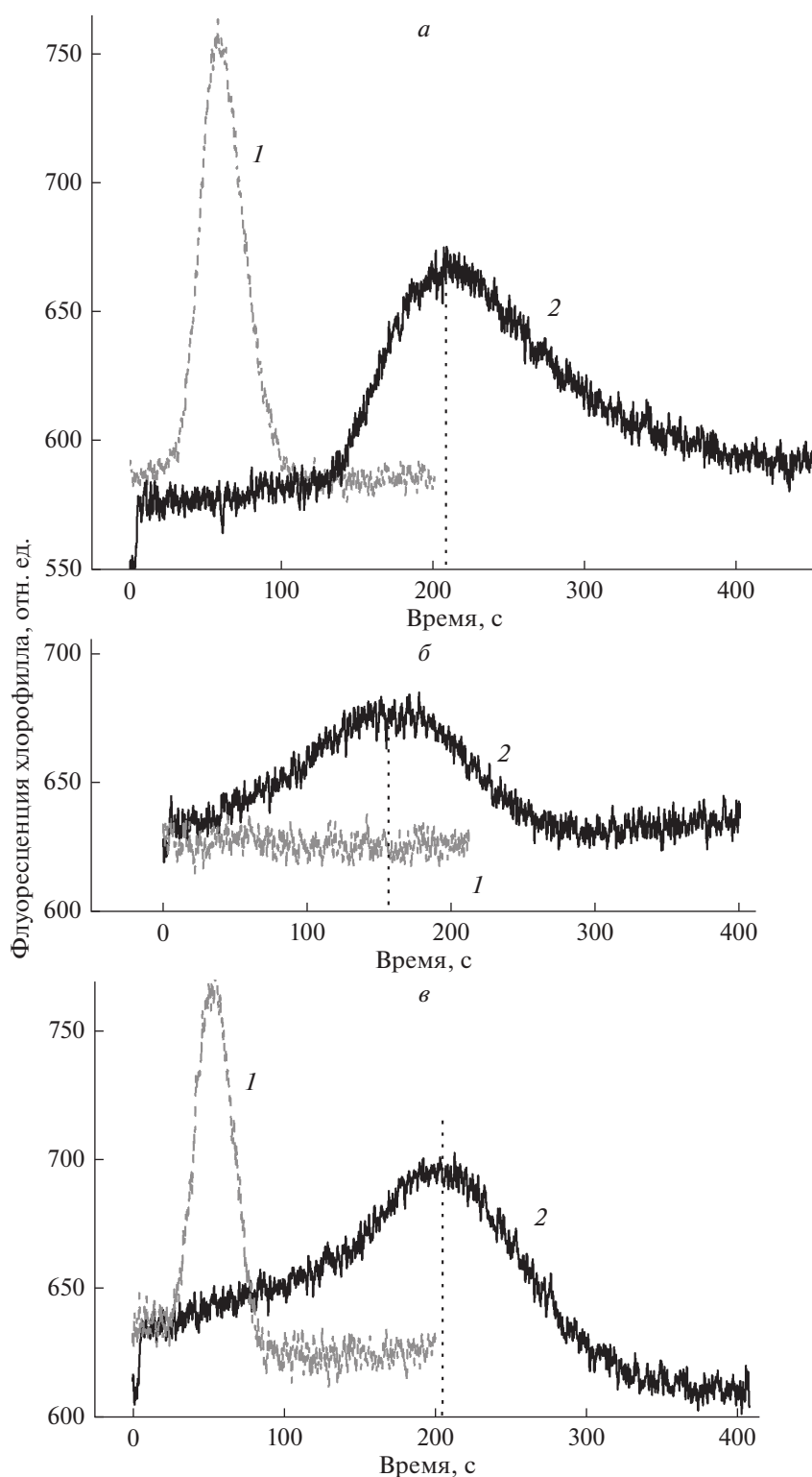


Рис. 4. Цитохалазин D прерывает дальнюю передачу сигнала между пространственно удаленными хлоропластами (1) и ускоряет S-M-T переход на индукционной кривой флуоресценции (2). Кривые 1 представляют изменения F^v на слабом фоновом свете в ответ на приложение локального импульса белого света (30 с, $500 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) на расстоянии 1.5 мм от зоны измерения F^v ; кривые 2 изображают индукционные изменения F^v , вызванные переносом клетки на фоновый свет после 5 мин темновой адаптации. *a* – Контроль в отсутствие ингибиторов; *б* – при остановке течения цитоплазмы в присутствии 25 мкМ цитохалазина D; *в* – после восстановления циклоза в той же клетке, отмытой от ингибитора. Усредненные кинетические кривые рассчитаны для $n = 3-5$.

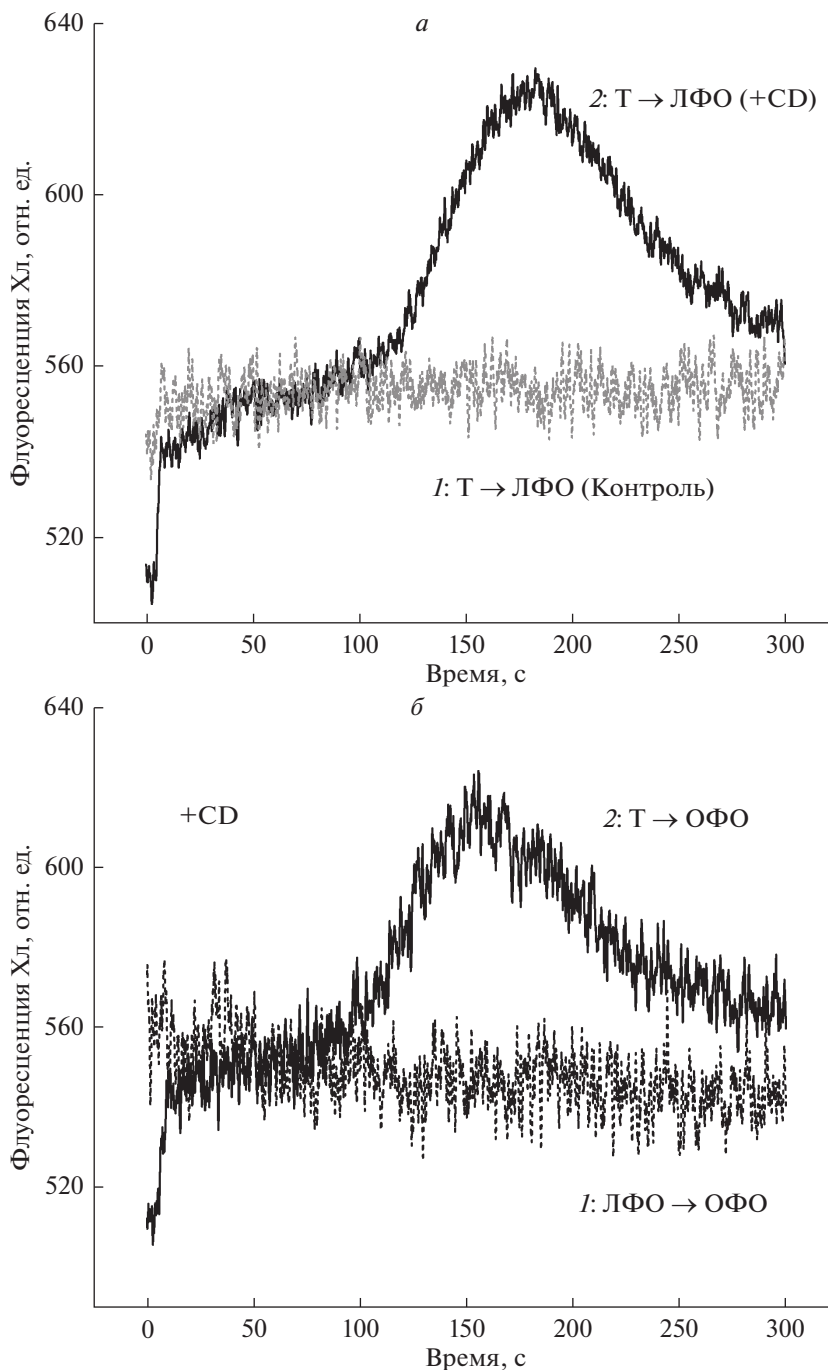


Рис. 5. Медленные индукционные изменения флуоресценции клеток *Chara*, вызванные локальным и общим освещением до и после остановки течения цитоплазмы под действием 25 мкМ цитохалазина D (CD). *а* – Индукционные изменения F' при локальном освещении анализируемого участка после 5-мин темновой адаптации в контрольных условиях и при подавлении циклоза цитохалазином D. 1 – при переходе от темноты к локальному фоновому освещению (Т → ЛФО) в условиях быстрого течения цитоплазмы (90 мкм с^{-1} , контроль); 2 – то же после прекращения потока в присутствии цитохалазина D. *б* – Изменения F' в клетках с неподвижной цитоплазмой (в присутствии 25 мкМ цитохалазина D) при переходе от темноты к общему фоновому освещению (Т → ОФО) и при переходе от локального фонового освещения области регистрации F' к общему освещению (ЛФО → ОФО). Усредненные кинетические кривые рассчитаны для $n = 2-6$.

вое освещение (ЛФО → ОФО, кривая 1), а также при общем освещении клетки (переход Т → ОФО, кривая 2). Из сравнения кривых 2 на рис. 5а и 5б

видно, что при отсутствии движения цитоплазмы локальное и общее освещение вызывают примерно равные ответные реакции F' с положением пи-

ка при $t \approx 160-170$ с. В условиях подавления циклоза переход от локального к общему фоновому освещению (ЛФО \rightarrow ОФО) не оказывал влияния на F' (рис. 5б, кривая 1) в отличие от сильной ответной реакции F' на аналогичное воздействие при нормальном течении цитоплазмы (рис. 3а, кривая 2). Полученные результаты существенно дополняют представления о роли движения цитоплазмы в изменениях Фл Хл при локальном и общем освещении клетки.

ОБСУЖДЕНИЕ

В индукционной кривой флуоресценции зеленых растений и водорослей выделяют быстрые и медленные стадии, причем о природе задержанного нарастания флуоресценции (S-M) известно гораздо меньше, чем о мультифазном нарастании O-J-I-P [2]. У харовых водорослей наблюдаемый пик F' обусловлен ослаблением фотохимического тушения qP [8], а используемая низкая интенсивность света исключает развитие существенного нефотохимического тушения. Эти особенности говорят о том, что индукционные изменения Фл в минутном диапазоне у харовых водорослей возникают иначе, чем в цианобактериях и у *Chlamydomonas* [6–8]. Результаты данной работы показывают, что нарастание флуоресценции S-M у харовых водорослей происходит при участии дальних взаимодействий, опосредованных течением цитоплазмы. Об участии дальнего транспорта говорят сильные отличия индукционных кривых F' при освещении клеток междуузлий узким лучом и широким световым потоком (ср. рис. 3а и 3б). Дальние взаимодействия включают перенос фотометаболитов через мембраны оболочки хлоропластов при участии активируемых светом транспортеров (рис. 3) и латеральный перенос этих метаболитов с потоком цитоплазмы (рис. 4, 5а).

Полученные результаты показывают, что переходное возрастание выхода флуоресценции F' в минутном интервале при низкоинтенсивном освещении связано с дальним переносом фотометаболитов (восстановительные эквиваленты, триозофосфаты). Перенос метаболитов из ярко освещенной области в зону слабой фоновой подсветки проявляется в переходном возрастании F' в связи с поступлением восстановителей в строму, которое стимулирует фотохимическое и нефотохимическое восстановление хинонного акцептора Q_A [25]. В случае, когда размер донорной области ограничен диаметром оптоволоконка (400 мкм в данной работе), ответные изменения F' проявляются в виде узкой полосы (рис. 4, кривые 1). В случае общего освещения клетки размер донорной области расширяется; поэтому ответная реакция F' проявляется в виде широкой и, как правило, асимметричной полосы (рис. 3а). Форма индукционной кривой F' должна зависеть от динамики обмена метаболитами

между хлоропластами и цитозолем в период после включения света, а также от размера освещаемой площади и от расстояния, на которое перемещаются вещества в потоке цитоплазмы. Следует отметить, что латеральный перенос можно индуцировать не только интенсивным лучом, но и светом низкой интенсивности [11].

При подавлении латерального переноса веществ цитохалазином D индукционные изменения S-M-T претерпевают изменения, но не исчезали (рис. 4). В этих условиях переходы от темноты к общему и локальному фоновому освещению (Т \rightarrow ОФО и Т \rightarrow ЛФО) вызывали примерно равные ответные реакции F' (рис. 5), тогда как при быстром течении цитоплазмы ответные реакции на эти воздействия существенно различались (рис. 3). Эти и другие полученные в работе данные говорят о том, что после остановки циклоза индукционные изменения S-M-T зависят от динамики содержания восстановителей (NADPH) в строме, определяемой только внутренними процессами в хлоропластах, и не включают стадии дальнего транспорта и поглощения фотометаболитов из цитоплазмы. В отличие от этого, нормальное течение цитоплазмы обеспечивает свободный отток метаболитов, препятствуя накоплению избытка NADPH в строме, что проявляется в слабых изменениях F' при локальном освещении области измерения (рис. 3б). Можно предполагать, что в нормальных условиях переход S-M в минутном интервале в значительной степени зависит от содержания восстановителей в текущей цитоплазме.

Результаты работы выявили, что экспорт метаболитов из освещенных хлоропластов начинается сравнительно быстро, тогда как поступление фотометаболитов из цитоплазмы в строму пластид развивается лишь после долгого (~ 50 с) латентного периода. Представляется вероятным, что оба процесса – экспорт и импорт метаболитов – опосредованы общими транслокаторами оболочки, а различное время задержки определяется величиной и направлением градиента редокс-агентов или других участников цикла переноса. Высокое содержание NADPH в строме освещенных хлоропластов и низкое содержание восстановительных эквивалентов в цитозоле [26, 27] могут способствовать более раннему началу экспорта метаболитов. По данным [27], содержание NADPH в строме хлоропластов арабидопсиса достигает максимального уровня в течение 120–150 с освещения. Примерно такое же время характерно для достижения пика флуоресценции F' при нарушении цитохалазином D экспорта и оттока редокс-метаболитов из освещенных хлоропластов (рис. 5). Эти данные косвенно подтверждают предположение о том, что переход S-M флуоресценции при нарушении дальних внутриклеточных связей обусловлен изменением редокс-статуса стромы. В клетках с быстрым движением цитоплазмы редокс-состоя-

ние стромы хлоропластов в значительной степени контролируется обменом метаболитов между цитозолем и стромой. Таким образом, остановка течения цитоплазмы нарушает не только стадию латерального переноса метаболитов, но и стадию экспорта метаболитов из локально освещаемых хлоропластов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-12015).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Papageorgiou G.C., Govindjee. 2014. The non-photochemical quenching of the electronically excited state of chlorophyll *a* in plants: Definitions, timelines, viewpoints, open questions. In: *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria*. Eds Demmig-Adams B., Garab G., Adams III W., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 531–550.
- Stirbet A., Riznichenko G.Y., Rubin A.B., Govindjee. 2014. Modeling chlorophyll *a* fluorescence transient: Relation to photosynthesis, *Biochemistry (Moscow)*. **79**, 291–323.
- Siebke K., Weis E. 1995. Imaging of chlorophyll-*a*-fluorescence in leaves: Topography of photosynthetic oscillations in leaves of *Glechoma hederacea*. *Photosynth. Res.* **45**, 225–237.
- Pieruschka R., Schurr U., Jensen M., Wolff W.F., Jahnke S. 2006. Lateral diffusion of CO₂ from shaded to illuminated leaf parts affects photosynthesis inside homobaric leaves. *New Phytol.* **169**, 779–788.
- Pieruschka R., Chavarria-Krauser A., Schurr U., Jahnke S. 2010. Photosynthesis in lightfleck areas of homobaric and heterobaric leaves, *J. Exp. Bot.* **61**, 1031–1039.
- Kaňa R., Kotabová E., Komárek O., Šedivá B., Papageorgiou G.C., Govindjee, Prášil O. 2012. The slow S to M fluorescence rise in cyanobacteria is due to a state 2 to state 1 transition. *Biochim. Biophys. Acta.* **1817**, 1237–1247.
- Kodru S., Malavath T., Devadasu E., Nellaepalli S., Stirbet A., Subramanyam R., Govindjee. 2015. The slow S to M rise of chlorophyll *a* fluorescence reflects transition from state 2 to state 1 in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* **125**, 219–231
- Bernát G., Steinbach G., Kaňa R., Govindjee, Misra A.N., Prášil O. 2018. On the origin of the slow M–T chlorophyll *a* fluorescence decline in cyanobacteria: Interplay of short-term light-responses. *Photosynth. Res.* **136**, 183–198.
- Bulychev A., Vredenberg W. 2003. Spatio-temporal patterns of photosystem II activity and plasma-membrane proton flows in *Chara corallina* cells exposed to overall and local illumination. *Planta*. **218**, 143–151.
- Bulychev A.A., Dodonova S.O. 2011. Effects of cyclosis on chloroplast-cytoplasm interactions revealed with localized lighting in characean cells at rest and after electrical excitation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1807**, 1221–1230.
- Bulychev A.A., Komarova A.V. 2015. Photoinduction of cyclosis-mediated interactions between distant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1847**, 379–389.
- Komarova A.V., Sukhov V.S., Bulychev A.A. 2018. Cyclosis-mediated long distance communications of chloroplasts in giant cells of Characeae. *Funct. Plant Biol.* **45**, 236–246.
- Bulychev A.A., Foissner I. 2020. Inhibition of endosomal trafficking by brefeldin A interferes with long-distance interaction between chloroplasts and plasma membrane transporters. *Physiol. Plant.* **169**, 122–134.
- Tseng Y.C., Chu S.W. 2017. High spatio-temporal-resolution detection of chlorophyll fluorescence dynamics from a single chloroplast with confocal imaging fluorometer. *Plant Methods.* **13**, 1–11.
- Bulychev A.A. 2020. Transient depletion of transported metabolites in the streaming cytoplasm of *Chara* upon shading the long-distance transmission pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* **1861**, 148257.
- Bulychev A.A., Foissner I. 2017. Pathways for external alkalization in intact and in microwounded *Chara* cells are differentially sensitive to wortmannin. *Plant Signal. Behav.* **12**, e1362518.
- Foissner I., Wasteneys G.O. 2012. The characean internodal cell as a model system for studying wound healing. *J. Microsc.* **247**, 10–22.
- Goldstein R.E., Van de Meent J.W. 2015. A physical perspective on cytoplasmic streaming. *Interface Focus.* **5**, 20150030.
- Scheibe R. 2004. Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.* **120**, 21–26.
- Taniguchi M., Miyake H. 2012. Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: Integration of intrachloroplast and extra-chloroplast metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 252–260.
- Selinski J., Scheibe R. 2019. Malate valves: Old shuttles with new perspectives. *Plant Biol.* **21**, 21–30.
- Vaseghi M.J., Chibani K., Telman W., Liebthal M.F., Gerken M., Schnitzer H., Mueller S.M., Dietz K.J. 2018. The chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin functions as thioredoxin oxidase in redox regulation of chloroplast metabolism. *Elife.* **7**, e38194.
- Howard T.P., Metodiev M., Lloyd J.C., Raines C.A. 2008. Thioredoxin-mediated reversible dissociation of a stromal multiprotein complex in response to changes in light availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 4056–4061.
- Bulychev A.A., Komarova A.V. 2017. Photoregulation of photosystem II activity mediated by cytoplasmic streaming in *Chara* and its relation to pH bands. *Biochim. Biophys. Acta.* **1858**, 386–395.
- Bulychev A.A., Rybina A.A. 2018. Long-range interactions of *Chara* chloroplasts are sensitive to plasma-membrane H⁺ flows and comprise separate photo- and dark-operated pathways. *Protoplasma.* **255**, 1621–1634.
- Heineke D., Riens B., Grosse H., Hoferichter P., Peter U., Flügge U.I., Heldt H.W. 1991. Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiol.* **95**, 1131–1137.
- Lim S.L., Voon C.P., Guan X., Yang Y., Gardeström P., Lim B.L. 2020. In planta study of photosynthesis and photorespiration using NADPH and NADH/NAD⁺ fluorescent protein sensors. *Nat. Commun.* **11**, 3238.

Induction Changes of Chlorophyll Fluorescence in *Chara* Cells Related to Metabolite Exchange between Chloroplasts and Cytoplasmic Flow

A. A. Bulychev*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: bulychev@biophys.msu.ru*

Induction changes in chlorophyll fluorescence (FI) are associated with photosynthetic electron transfer, generation of a proton gradient, and carbon metabolism in the CO₂ fixation cycle. The reactions of photosynthesis are also accompanied by the outflow of photoproducts from illuminated chloroplasts and their long-distance transport. The exchange of metabolites across the chloroplast envelope membranes is carried out by transporters that are active in the light and cease to operate in darkness. Inactivation of light-dependent envelope transporters in *Chara* cells interrupts spatial signaling manifested as a transient FI rise in response to illumination of a distant cell area. The dark adaptation was found to down-regulate the entry of metabolites from the streaming cytoplasm into shaded chloroplasts, without substantial retardation of the metabolite export from illuminated plastids. Fluorescence induction curves were found sensitive to illumination or darkening of the sample area residing outside the analyzed photometric region. The overall low-intensity illumination of the *Chara* internode caused significantly larger FI changes than a similar narrow-field illumination of the FI detection area. The results indicate that a slow increase in FI during the induction period in characean cells results not only from photosynthetic activity of chloroplasts in the examined cell region but also from interactions between the analyzed and neighboring cell areas. When the cytoplasmic streaming was arrested by cytochalasin D, similar induction changes were induced by local and global illumination, indicating a disruption of long-range interactions. The results suggest that the liquid flow not only carries metabolites from illuminated to shaded cell parts but also facilitates the export of photometabolites from chloroplasts to the cytoplasm.

Keywords: Characeae, chlorophyll fluorescence, cytoplasmic streaming, cytochalasin D, chloroplast envelope transporters, long-distance transport

УДК 577.336

РОЛЬ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+} В РЕГУЛЯЦИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И КОНФОРМАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ

© 2021 г. О. В. Слатинская^а, Н. А. Браже^а, С. Н. Орлов^а, Г. В. Максимов^{а, б, *}

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119892 Россия

^бНациональный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, 119049 Россия

*e-mail: gmaksimov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2020 г.

После доработки 11.01.2021 г.

Принята к публикации 13.01.2021 г.

Установлено, что снижение концентрации экстраклеточного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$) увеличивает поверхностный заряд мембраны эритроцита, что сопровождается изменением конформации гема и глобина, а также перераспределением гемоглобина в клетке (снижение величины оптической разности хода луча (ОРХ) цитоплазмы и содержания примембранного гемоглобина). Установлено, что при варьировании $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М морфология эритроцита практически не меняется, ζ -потенциал возрастает с -15.4 ± 0.2 до -14.5 ± 0.3 мВ (при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ от 10^{-3} до 5×10^{-4} М), а величина ОРХ цитоплазмы клетки снижается. Уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ до 10^{-6} М меняет конформацию гема, а также распределение гемоглобина в эритроците: происходит снижение симметричных колебаний боковых СН-групп пиррольных полуколец и увеличение валентных колебаний винильных групп гемопорфина и сродство гема к лигандам. При этом не меняется вероятность нахождения гема в плоской конформации, но снижается жесткость его белкового окружения. При варьировании $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-4} М наблюдается изменение конформации глобина: снижение упорядоченности СН-групп аминокислот глобина, увеличение плотности упаковки глобина, а также полярности окружения глобина. При инкубации эритроцитов в среде, содержащей $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-6}$ М, максимальная величина интенсивности комбинационного рассеяния (КР) гемоглобина эритроцитов (полосы КР-спектра 1375 см^{-1} и 1580 см^{-1}) выявлена в центре клетки и в 2.6 раза меньше, чем у эритроцитов, инкубированных в среде, содержащей $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-3}$ М.

Ключевые слова: комбинационное рассеяние, гемоглобин, эритроцит, экстраклеточный Ca^{2+}

DOI: 10.31857/S0233475521030099

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что для плазматической мембраны эритроцита характерно наличие фиксированных поверхностных зарядов молекул липидов и белков, формирующих поверхностный потенциал и характер распределения ионов и молекул воды [1]. В основном поверхностный потенциал эритроцита обусловлен зарядом карбоксильных групп N-ацетилнейраминаовой кислоты сфинголипида и ионизируемых групп гликофорина и снижается при воздействии на клетку нейраминидазы. С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) установлено, что при варьировании экстраклеточного рН от 4.82 до 9.70 меняется константа диссоциации комплекса мономер/димер гемоглобина (Гб) в клетке. Предполагается, что при нейтральном экстраклеточном рН, молекулы Гб локализованы в примембранном пространстве клетки или связаны с мембра-

ной, в то время как при низком рН значительная часть Гб локализована в центральной области клетки [2].

Известно, что изменение поверхностного заряда цитоплазматической мембраны эритроцита связано с ОН-группами тирозина ряда белков мембраны, например, белка полосы 3 (БП3) [3]. Изменение поверхностного потенциала на цитоплазматической стороне мембраны сопровождается активацией внутриклеточных фосфолипаз, что меняет упорядоченность жирнокислотных хвостов мембранных липидов, снижая долю примембранного Гб [4–6]. Важную роль в регуляции изменений заряда на цитоплазматической поверхности мембраны эритроцита выполняет внутриклеточный Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$). Например, повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ активирует Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы и приводит к гиперполяризации мембра-

ны [7]. Отметим, что из всех ионов цитоплазмы клетки (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ и Cl^-) только Ca^{2+} специфически связывается с клеточными белками, поскольку K^+ , Na^+ и моновалентные анионы формируют слабые комплексы с протеинами вследствие большого радиуса и небольшого заряда.

В настоящее время активно обсуждается вопрос о роли структурных изменений цитоплазмы эритроцита (“краудинг”) в регуляции объема и гемодинамики эритроцитов в сосудах [8–13]. Известно, что морфология эритроцита зависит от Ca^{2+} -зависимых изменений молекул спектрина и актина цитоскелета, формирующих комплекс с мембраной эритроцита. Так, α - и β -цепи тримеров спектрина способны к самопроизвольной агрегации в тетрамеры и формированию комплексов с актином, которые связываются с белком полосы 4.1 и гликофоорином с БПЗ плазматической мембраны. Спектрин связывается с помощью анкирина, контролируя таким образом как долю примембранного Гб (Гбпм), так и механические свойства мембраны эритроцита [14, 15]. Отметим, что N-конец молекулы БПЗ содержит анионные центры для формирования комплексов с глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназой, альдолазой, каталазой Гбпм [15–18].

Возможно, что $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ -зависимые изменения поверхностного заряда на внутренней поверхности мембраны эритроцита регулируют формирование комплекса БПЗ и Гб и эффективность переноса кислорода, которое обусловлено деполяризацией мембраны [19]. Предполагается, что при изменении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ происходит формирование кластеров отрицательно заряженных остатков сиаловых кислот на поверхности мембраны эритроцита, что увеличивает количество свободных ОН-групп тирозина БПЗ [3, 20].

В связи с этим цель работы заключалась в исследовании изменения морфологии, поверхностного потенциала, а также распределения и конформации гема и глобина Гб в эритроцитах при варьировании экстраклеточного Ca^{2+} .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили отмытые от форменных элементов крови эритроциты, выделенные из крови здоровых доноров ($n = 10$, возраст 20–40 лет). Кровь отбирали из кубитальной вены в вакуумные пробирки (Vacuette, РФ) и хранили при 4°C в течение 3 ч после забора крови. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20–50 ед/мл крови). Выделение эритроцитов проводили центрифугированием крови при 1500 g в течение 5 мин при 4°C (Laborfuge 400R, Thermo Scientific, США). Полученный супернатант отделяли, а осадок отмывали в физиологическом растворе Аллена, содержащем 145 mM NaCl, 5 mM

KCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 5 mM глюкозы с добавлением CaCl_2 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} или 10^{-3} M (Sigma, США), pH 7.4. Выделенную суспензию эритроцитов (Ht = 40%) хранили при 4°C и использовали в эксперименте в течение 3 ч после выделения.

Выделение Гб из суспензии эритроцитов проводили следующим образом: к суспензии эритроцитов добавляли фосфатный буфер (4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 1 мкМ CaCl_2 , pH 7.4) в десятикратном объеме, после чего суспензию тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин при температуре 4°C . Супернатант отделяли и хранили при 4°C . Образец использовали в течение 3 ч после выделения.

Исследование конформации гема и глобина гемоглобина проводили методом спектроскопии комбинационного рассеяния. Сигнал КР цитоплазматического Гб регистрировали с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, РФ) в диапазоне $1000\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, с шагом измерения 0.8 см^{-1} , регистратор – CCD-детектор с Пельтье-охлаждением до -50°C (объектив $5\times$ с апертурой 0.15, решетка 600 штр/мм), мощность лазера на образце составила 3 мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15 с. Измерения проводили при комнатной температуре. Для регистрации спектров КР Гб и суспензии эритроцитов образец помещали в гематокритный капилляр (Агат-Мед, РФ) и регистрировали по три спектра в разных точках капилляра. Количество повторов измерений каждой тестируемой концентрации Ca^{2+} – не менее 12.

Распределение амплитуды КР в клетке проводили с одиночных клеток, размещенных на покровном стекле, при помощи конфокального микроскопа-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, РФ) в диапазоне $1000\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, с шагом измерения 0.8 см^{-1} (объектив $20\times$ с апертурой 0.45, решетка 600 штр/мм), длина волны возбуждения 532 нм, время получения одного изображения – 10 мин. Количество измеренных клеток – 12. Спектры КР обрабатывали в программе Origin2017 (OriginLab Corporation, США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектров.

Для анализа изменений конформации гема и глобина молекулы гемоглобина использовали величины соотношений интенсивностей полос спектра КР [21–24]:

I_{1172}/I_{1375} – групповые колебания связей полуколец пиррола в гемопорфирине, зависит от белкового окружения глобина возле гемопорфирина (характеризует выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных полуколец);

I_{1580}/I_{1375} — вклад симметричных колебаний пиррольных колец к валентным колебаниям связей винильных групп, характеризует способность гемоглобина выделять лиганды (в том числе O_2);

I_{1640}/I_{1375} — вклад колебаний метиновых мостиков к симметричным колебаниям пиррольных колец, характеризует конформационные изменения гема;

I_{2850}/I_{2880} — вклад симметричных колебаний по отношению к несимметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот, характеризующий плотность упаковки белка;

I_{2930}/I_{2850} — вклад колебаний симметричных концевых метиновых групп к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот, характеризующий изменение полярности окружающей аминокислот глобина;

I_{2880}/I_{2930} — вклад колебаний водородных связей метиленовых групп аминокислот глобина, характеризующий конформационную подвижность белка. При увеличении параметра увеличивается упорядоченность аминокислот и плотность упаковки аминокислот.

КР-спектроскопия в поляризованном свете. Для выявления изменений упорядоченности молекулярных колебаний связей гема и глобина КР регистрировали в условиях с различными положениями плоскости поляризации лазера относительно образца [25, 26]. Для этого образцы размещали на прозрачном стекле и регистрировали сигнал от одиночных эритроцитов (для СЭ) или от раствора Гб. Регистрацию спектров КР в поляризованном свете проводили на КР-спектрометре WITec alpha 300 (Zeiss, Германия) в диапазоне $200\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ с шагом измерения 0.3 см^{-1} (объектив $20\times$ с апертурой 0.45 , решетка 1800 штр/мм), мощность лазера на образце — 7 мВт , длина волны возбуждения 532 нм , время регистрации сигнала — 5 с . Поляризацию осуществляли с помощью установки поляризатора (ThorLabs, США) под углом поляризации 0 и 90 градусов в специальное отверстие. Измерения проводили при комнатной температуре. Количество повторов измерений каждой тестируемой концентрации Ca^{2+} — не менее 12.

Регистрация изменений ζ -потенциала. Для регистрации изменений ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита суспензию эритроцитов ($\text{Ht} = 40\%$) разводили в 1000 раз в буфере Аллена с соответствующей концентрацией Ca^{2+} . Эксперимент проводили в термостатируемой кювете с золотыми электродами (Malvern, РФ) при 25°C , время адаптации образца к температуре — 100 с , количество измерений (100). Количество повторов измерений каждой тестируемой концентрации Ca^{2+} — не менее 12. Обработку результатов ζ -потенциала проводили с помощью программного обеспечения Malvern и MS Excel.

Изменения морфологии эритроцита и оптической разности хода (ОРХ) луча света цитоплазмы эритроцита регистрировали методом лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ). После 10-минутной инкубации суспензии эритроцитов (5 мкл) в 1 мл буфера с тестируемой концентрацией Ca^{2+} добавляли 20 мкл 25% глутарового альдегида и инкубировали в течение 60 мин при 25°C [27]. Далее пробы центрифугировали (при 5000 g в течение 3 мин), к осадку добавляли 2 мл дистиллированной воды, ресуспендировали (Vortex, BioSan, Латвия) и повторяли процедуру. Суспензию фиксированных эритроцитов наносили на предметное стекло с зеркальным покрытием и регистрировали топографию распределения величины ОРХ цитоплазмы клетки с помощью лазерного интерференционного микроскопа (ЛИМ, ВНИИОФИ, РФ) на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ЛОМО, РФ) с объективом $30\times$ ($\text{NA} = 0.65$), с мощностью лазера на объекте менее 2 мВт ($\lambda = 650\text{ нм}$). Размер регистрируемого кадра составлял $195 \times 145\text{ мкм}$. Для анализа полученных изображений использовали ПЗС видеокамеру VS-415U (NPK Videoscan, РФ) с размером матрицы $6.5 \times 4.83\text{ мм}$ и разрешением 782×582 точек. Общее время регистрации составляло 10 с . Количество измеренных клеток — не менее 180. Для восстановления фазового изображения использовали программу WinPhast (ВНИИОФИ, РФ), а для реконструкции изображений — программы FIJI (ImageJ, США) и Origin2017 (Microcal Inc., OriginLab Corporation, США) [28, 29]. Реконструкция позволяла анализировать изменения величины ОРХ цитоплазмы эритроцита (средняя фазовая высота эритроцита) и площади клетки [30–33].

Для оценки статистической значимости результатов использовали t -критерий. Результаты считали достоверно различающимися при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследовали изменения морфологии, состояние цитоплазмы эритроцита (ОРХ) и конформации внутриклеточного гемоглобина при варьировании экстраклеточного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$). Установлено, что при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М морфология эритроцита практически не меняется, но уменьшается величина ОРХ цитоплазмы эритроцита (рис. 1а, 1б, табл. 1). Исследуя характер распределения величины интенсивности КР гемоглобина в эритроците (рис. 1в, полосы КР-спектра 1375 и 1580 см^{-1}), установлено, что при инкубации эритроцитов в среде с 10^{-6} М $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ величина интенсивности КР гемоглобина эритроцитов в 2.6 раза ниже, чем у эритроцитов, инкубированных в среде с 10^{-3} М $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$, а максимальная величина интенсивности сигнала выявлена в области ближе к краю клетки при 10^{-3} М

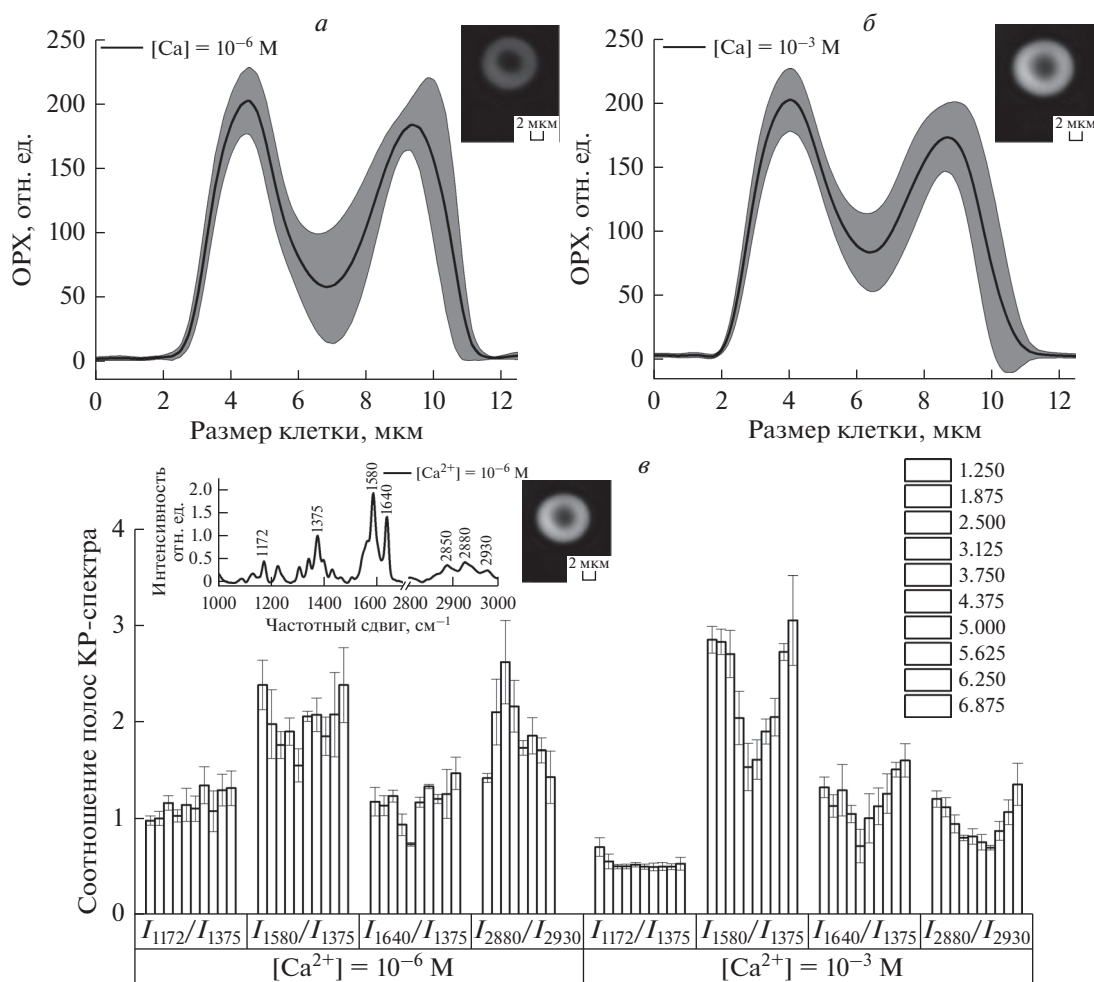


Рис. 1. 2D-распределение и фазовый профиль величины ОРХ эритроцитов при $10^{-6} M [Ca^{2+}]_{out}$ (а) и $10^{-3} M [Ca^{2+}]_{out}$ (б). На фотографии представлено изображение эритроцита, полученное методом ЛИМ. По оси абсцисс отложена длина скан-линии. Данные представлены как величина фазового профиля, усредненная по 180 клеткам (черная линия) \pm SE (SE – стандартная ошибка, серая линия). в – соотношение интенсивностей полос КР-спектра в эритроците при концентрациях при 10^{-6} и $10^{-3} M [Ca^{2+}]_{out}$. На фотографии указан срез, по которому проводили расчеты соотношений. Столбцы соответствуют величине скан-линии с шагом 0.625 нм.

$[Ca^{2+}]_{out}$ и в центре клетки при с $10^{-6} M [Ca^{2+}]_{out}$. Итак, при уменьшении $[Ca^{2+}]_{out}$, форма эритроцита практически не меняется, но наблюдается изменение локализации сигнала КР гемоглобина в клетке, что, вероятно, свидетельствует о перераспределении Гб в цитоплазме и десорбции мембраносвязанного Гб. Отметим, что при старении эритроцита также выявлено перераспределение Гб в цитоплазме: увеличение доли примембранного Гб и снижение поверхностного заряда мембраны [34]. В связи с этим исследовали изменения величины ζ -потенциала мембраны и конформации гема и глобина эритроцита при варьировании $[Ca^{2+}]_{out}$. Установлено, что при уменьшении $[Ca^{2+}]_{out}$ с 10^{-3} до $10^{-6} M$ ζ -потенциал возрастает с -15.4 ± 0.2 до -14.5 ± 0.3 мВ и при более низких концентрациях не меняется (рис. 2а). Отметим, что изменения

величин ζ -потенциала эритроцитов согласуются с данными литературы [35, 36].

В следующей серии экспериментов при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ с 10^{-3} до $10^{-6} M$ обнаружено, что изменения в КР-спектре внутриклеточного Гб наблюдаются в области $1355-1700$ cm^{-1} (рис. 2б). Установлено, что уменьшение $[Ca^{2+}]_{out}$ до $10^{-6} M$ приводит к изменению конформации гема и глобина: снижение симметричных колебаний боковых СН-групп пиррольных полуколец (I_{1375}/I_{1127}) и увеличение вклада валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1580}/I_{1550}) и сродства к лигандам (I_{1375}/I_{1580}). Отметим, что при этом не меняется вероятность нахождения гема в плоской конформации (I_{1640}/I_{1127}), но снижается жесткость его белкового окружения (I_{1170}/I_{1127}). При снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ с 10^{-3} до $10^{-4} M$ происходит увеличение

Таблица 1. Изменения площади клетки (S_{cp}) и распределения Гб (ОРХ) в эритроците при изменении $[\text{Ca}^{2+}]_{out}$

| $[\text{Ca}^{2+}]$, М | S_{cp} , μm^2 | ОРХ, нм | ОРХ/S | ОРХ _{центр} /ОРХ _{край} |
|------------------------|----------------------------|-------------------|-----------------|---|
| 10^{-6} | 45.50 ± 0.46 | 131.56 ± 0.65 | 2.92 ± 0.05 | 0.038 ± 0.016 |
| 10^{-5} | 44.52 ± 0.96 | 134.44 ± 0.57 | 3.30 ± 0.05 | 0.072 ± 0.027 |
| 10^{-4} | 44.62 ± 0.47 | 133.86 ± 0.69 | 3.12 ± 0.07 | 0.025 ± 0.026 |
| 10^{-3} | 44.86 ± 0.60 | 138.06 ± 0.80 | 3.13 ± 0.06 | 0.012 ± 0.007 |

плотности упаковки глобина (I_{2850}/I_{2880}) и полярности окружения глобина (I_{2930}/I_{2850}), а также снижение упорядоченности СН-групп аминокислот глобина, что может быть связано с изменением поверхностного заряда мембраны и присоединением молекул Гб к мембране (I_{2880}/I_{2930}) (рис. 3). Отметим, что изменения в спектре КР в области ва-

лентных колебаний аминокислот $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ КР-спектра характерны только для глобина Гб, так как при данном режиме регистрации КР (возбуждение с длиной волны 532 нм) в области $2800\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ КР от белков и липидов мембраны эритроцита не регистрируется [10, 22]. Отметим, что при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{out}$ изменения конформации

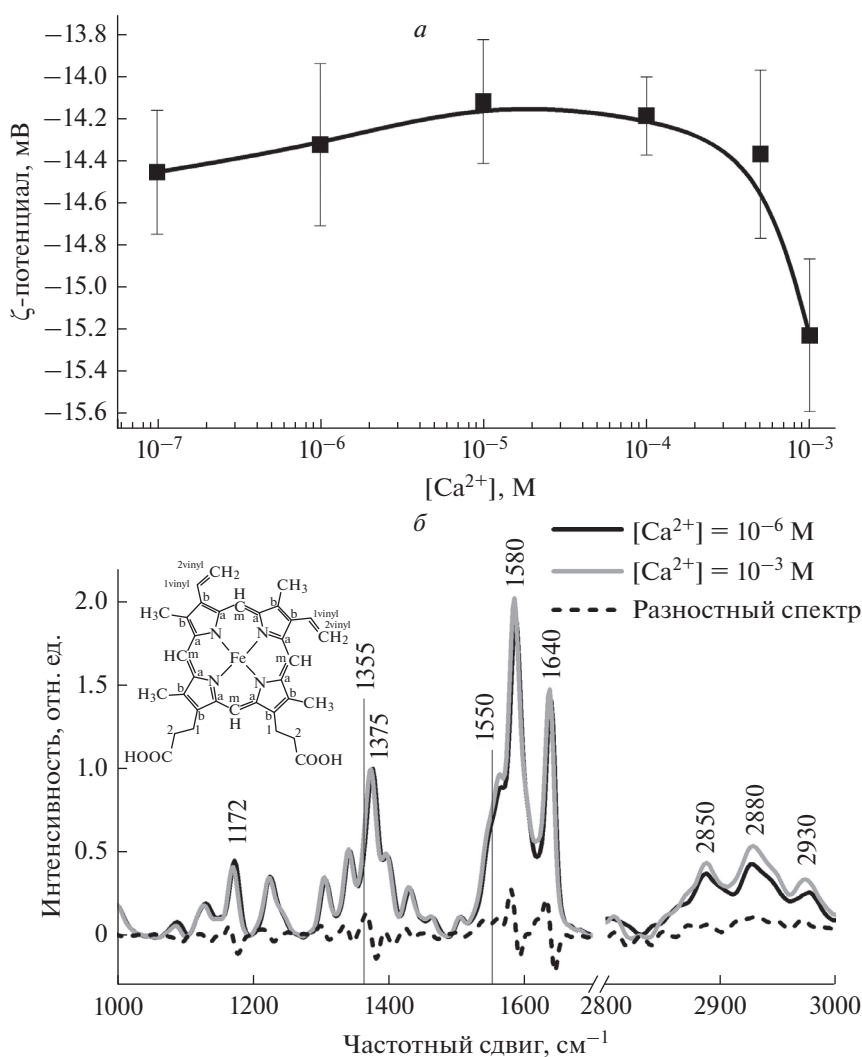


Рис. 2. *a* – Изменение величины ζ -потенциала мембраны эритроцита при изменении $[\text{Ca}^{2+}]_{out}$; *б* – спектры КР эритроцитов (нормированные на полосу 1280 см^{-1}) в области, характеризующей колебания в геме ($1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$) и глобине ($2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$).

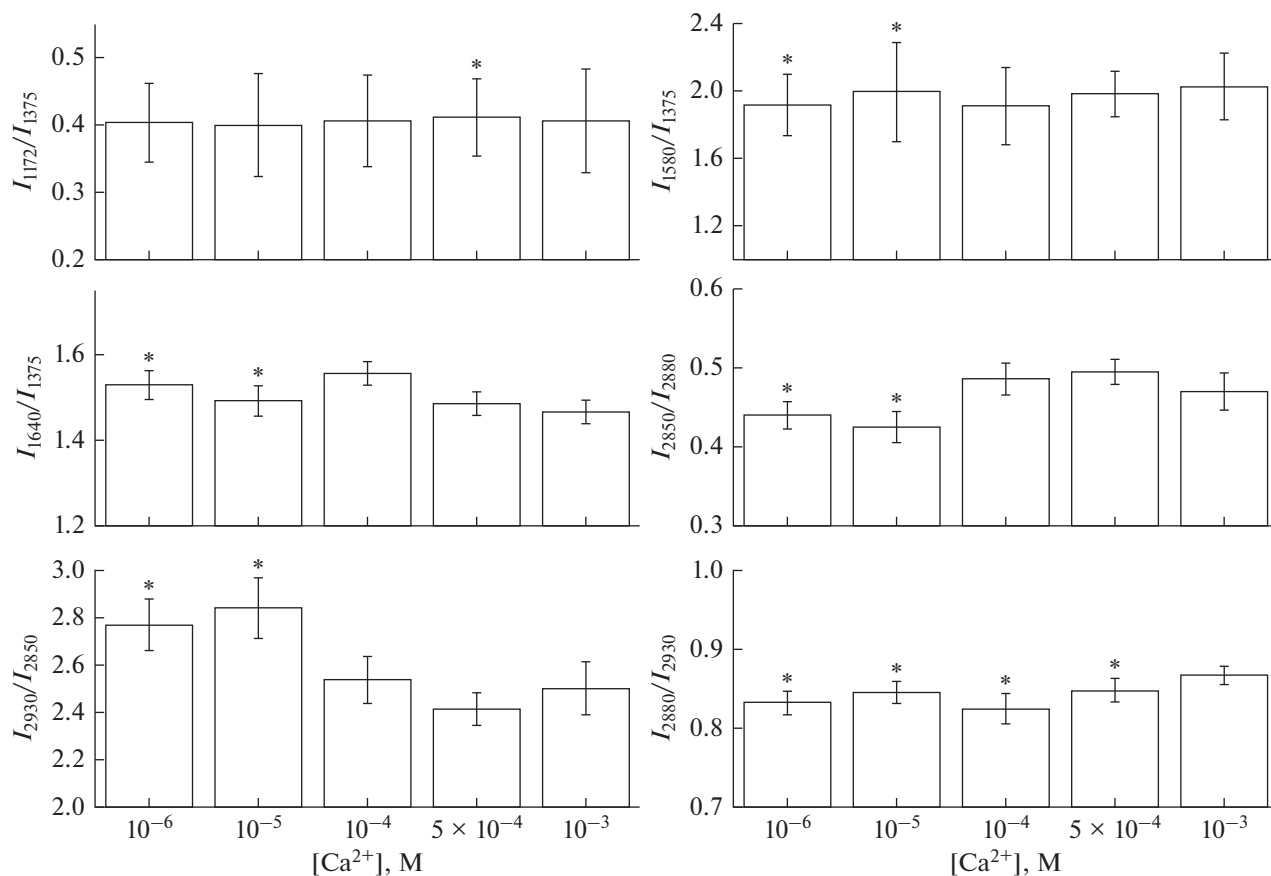


Рис. 3. Соотношения интенсивностей полос КР-спектра гема и глобина гемоглобина, измеренные от суспензии эритроцитов. Данные представлены как среднее \pm SE (* $p \leq 0.05$ относительно $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-3}$ М).

глобиновой части Гб в эритроците начинаются при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} 10^{-5}$ М, а изменения конформации гема – при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} 10^{-6}$ М (рис. 3). Вероятно, изменения конформации как гемовой, так и глобиновой части внутриклеточного Гб при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ до 10^{-4} М связаны частично с изменением поверхностного заряда (ζ -потенциал) мембраны (на 6%), но в большей степени с увеличением мембранного потенциала (на 25%).

В связи с выявленным различием в распределении Гб в клетке при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ (рис. 1) в следующей серии экспериментов с помощью КР-спектроскопии в поляризованном свете исследовали наличие упорядоченности в распределении Гб (гомогенное или негетогенное распределение Гб различных областях клетки) [37]. Установлено, что амплитуда характерных полос КР-спектра при перпендикулярной (I_{\perp}) и параллельной поляризации (I_{\parallel}) различна. При снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М изменения в спектре КР Гб в эритроците в поляризованном свете выявлены в области $1355\text{--}3000$ см⁻¹ (рис. 4). Установлено, что при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-3}$ М при регистра-

ции КР в плоско поляризованном свете вклад симметричных колебаний боковых СН-групп пиррольных полуколец (I_{1375}/I_{1127}) и способность Гб выделять лиганды (отношение симметричных валентных колебаний пирролов к валентным колебаниям винильных групп) (I_{1375}/I_{1580}) увеличивается, а вклад валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1580}/I_{1550}) и полярность окружения глобина (I_{2930}/I_{2850}) по сравнению с контролем уменьшается. При регистрации КР в перпендикулярно поляризованном свете уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М не влияло на вклад симметричных колебаний боковых СН-групп пиррольных полуколец (I_{1375}/I_{1127}) и полярность окружения глобина (I_{2930}/I_{2850}), хотя менялся вклад валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1580}/I_{1550}). Таким образом, с помощью поляризации КР, были выявлены изменения структуры молекулы (что отражается в ориентации/вкладе определенных групп) или ее олигомеризации при изменении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ (рис. 4).

Известно, что важнейшими компонентами внешнего монослоя мембраны эритроцитов являются незаряженный фосфотидилхолин (около

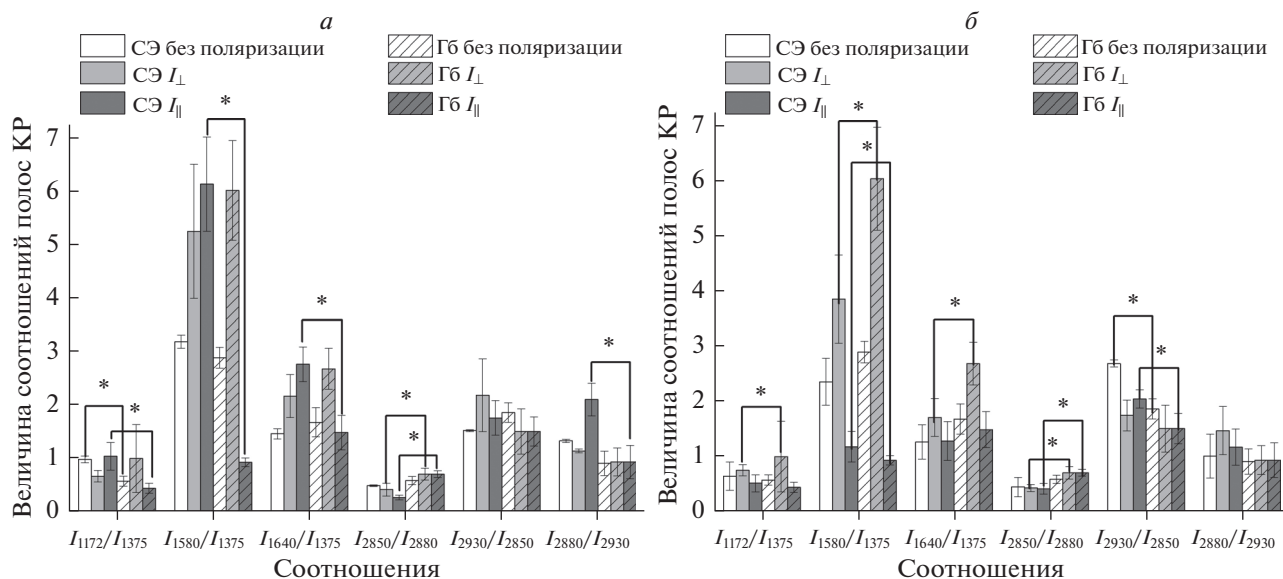


Рис. 4. Соотношение интенсивностей полос КР-спектра в поляризованном свете внутриклеточного Гб при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-6}$ М (а) и 10^{-3} М (б) и внеклеточного Гб при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-6}$ М. Данные представлены как среднее \pm SE (* $p \leq 0.05$ для СЭ относительно внеклеточного Гб). Скобками указаны группы сравнения.

28%) и отрицательно заряженные сфинголипиды (сфингомиелин, составляющий около 26% от всех липидов) с N-ацетилнейраминовой кислотой, а также гликопротеин (гликофорин). В мембране гликофорин распределен неравномерно (локализован как на внешней, так и на внутренней поверхности плазматической мембраны) и содержит большое количество отрицательно заряженных групп сиаловой кислоты. Известно, что при старении эритроцита величина поверхностного потенциала мембраны эритроцита снижается на 7 мВ (с -30.2 до -23.2 мВ) что соответствует 2.5×10^6 электронным зарядам или 4×10^{13} кулонов на поверхности мембраны эритроцита [1, 36]. Нами установлено, что снижение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ увеличивает поверхностный заряд, и это сопровождается изменением конформации гема и глобина, а также его олигомеризацией (за счет снижения упорядоченности цитоплазмы и десорбции примембранного Гб). Обратимое связывание Гб с мембранами может быть адаптивной реакцией, направленной на стабилизацию липидного бислоя мембран и/или регуляцию его упруго-механических свойств, и осуществляется за счет электростатических взаимодействий Гб с БПЗ [38, 39]. Известно, что NH_2 -терминальный участок БПЗ имеет гибкий анионный сегмент и может входить в катионную центральную полость дезоксигемоглобина (дГб), которая значительно сужается при связывании O_2 (это снижает сродство O_2 к Гб). Предполагается, что при связывании молекулы кислорода изменения конформации гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб (например, лизина)

увеличивают плотность отрицательного заряда в центральной полости дГб, способствуя смещению анионного сегмента в БПЗ [10].

Вероятно, снижение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ меняет конформацию гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб (например, лизина) и локализацию анионного сегмента БПЗ за счет увеличения мембранного потенциала и поверхностного заряда. Этот процесс сопровождается десорбцией мембраносвязанного оксигемоглобина (оГб), дГб и последующей олигомеризацией цитоплазматического оГб, что меняет кислородтранспортные свойства эритроцита.

Исследование выполнено при финансовой РФФИ (№ 20-34-90073, для С.О.В.) и РНФ (№ 19-79-30062, для М.Г.В. и Б.Н.А), а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета "Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atkins C.G., Buckley K., Blades M.W., Turner R.F. 2017. Raman spectroscopy of blood and blood components. *Appl. Spectrosc.* **71** (5), 767–793. <https://doi.org/10.1177/0003702816686593>
2. Wu Y., Huang Y.X., Kang L.L., Wu Z.J., Luo M. 2010. Effect of pH on molecular constitution and distribution of hemoglobin in living erythrocyte. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules.* **93** (4), 348–354. <https://doi.org/10.1002/bip.21348>
3. Minetti G., Piccinini G., Balduini C., Seppi C., Brovelli A. 1996. Tyrosine phosphorylation of band 3 pro-

- tein in Ca²⁺/A23187-treated human erythrocytes. *Biochem. J.* **320** (2), 445–450.
<https://doi.org/10.1042/bj3200445>
4. Friederichs E., Farley R.A., Meiselman H.J. 1992. Influence of calcium permeabilization and membrane-attached hemoglobin on erythrocyte deformability. *Amer. J. Hematol.* **41** (3), 170–177.
<https://doi.org/10.1002/ajh.2830410306>
 5. Peng, Z., Li X., Pivkin I.V., Dao M., Karniadakis G.E., Suresh S. 2013. Lipid bilayer and cytoskeletal interactions in a red blood cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110** (33), 13356–13361.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1311827110/-/DCSupplemental>
 6. Wiley J.S., McCulloch K.E. 1982. Calcium ions, drug action and the red cell membrane. *Pharmac. Therap.* **18** (2), 271–292.
[https://doi.org/10.1016/0163-7258\(82\)90070-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(82)90070-5)
 7. Орлов С.Н. 2014. Котранспортеры катионов и хлора: регуляция, физиологическое значение и роль в патогенезе артериальной гипертензии. *Усп. биол. химии.* **54**, 267–298.
 8. Luneva O.G., Sidorenko S.V., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N. 2015. Erythrocytes as regulators of blood vessel tone. *Biochem. (Moscow) Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology.* **9** (3), 161–171.
<https://doi.org/10.1134/S1990747815040078>
 9. Sidorenko S.V., Ziganshin R.H., Luneva O.G., Deev L.I., Alekseeva N.V., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N. 2018. Proteomics-based identification of hypoxia-sensitive membrane-bound proteins in rat erythrocytes. *J. Proteom.* **184**, 25–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.008>
 10. Slatinskaya O.V., Luneva O.G., Deev L.I., Orlov S.N., Maksimov G.V. 2020. Conformational changes that occur in heme and globin upon temperature variations and normobaric hypoxia. *Biophys.* **65** (2), 213–221.
<https://doi.org/10.1134/S0006350920020220>
 11. Parshina E.Y., Yusipovich A.I., Brazhe A.R., Silicheva M.A., Maksimov G.V. 2019. Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. *J. Biol. Phys.* **45** (4), 367–377.
<https://doi.org/10.1007/s10867-019-09533-5>
 12. Klimanova E.A., Sidorenko S.V., Tverskoi A.M., Shiyana A.A., Smolyaninova L.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Maksimov G.V., Lopina O.D., Orlov S.N. 2019. Search for intracellular sensors involved in the functioning of monovalent cations as secondary messengers. *Biochem. (Moscow).* **84** (11), 1280–1295.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919110063>
 13. Maksimov G.V., Slatinskaya O.V., Tkhor E.S., Anisimov N.A., Mamaeva S.N., Shutova V.V. 2019. The role of erythrocyte receptors in regulation of the conformation and distribution of hemoglobin. *Biophys.* **64** (1), 57–61.
<https://doi.org/10.1134/S0006350919010123>
 14. De Rosa M.C., Alinovi C.C., Galtieri A., Russo A., Giardina B. 2008. Allosteric properties of hemoglobin and the plasma membrane of the erythrocyte: New insights in gas transport and metabolic modulation. *IUBMB life.* **60** (2), 87–93.
<https://doi.org/10.1002/iub.15>
 15. Sidorenko S.V., Luneva O.G., Novozhilova T.S., Alekseeva N.V., Rodnenkov O.V., Deev L.I., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N. 2018. Hemolysis and ATP release from human and rat erythrocytes under conditions of hypoxia: A comparative study. *Biochem. (Moscow), Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology.* **12** (2), 114–120.
<https://doi.org/10.1134/S1990747818020125>
 16. Mawatari S., Murakami K. 2004. Different types of glutathionylation of hemoglobin can exist in intact erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **421** (1), 108–114.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.10.012>
 17. Kovalenko S.S., Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Maksimov G.V. 2015. Role of purinergic receptors of erythrocytes in the regulation of conformation and oxygen- and NO-transporting capacity of hemoglobin. *Bull. Exp. Biol. Med.* **159** (2), 213–216.
<https://doi.org/10.1007/s10517-015-2925-6>
 18. Brazhe N.A., Parshina E.Y., Khabatova V.V., Semenova A.A., Brazhe A.R., Yusipovich A.I., Sarycheva A.S., Churin A.A., Goodilin E.A., Maksimov G.V., Sosnovtseva O.V. 2013. Tuning SERS for living erythrocytes: Focus on nanoparticle size and plasmon resonance position. *J. Raman Spectrosc.* **44** (5), 686–694.
<https://doi.org/10.1002/jrs.4274>
 19. Cordero J.F., Romero P.J. 2002. Caffeine activates a mechanosensitive Ca²⁺ channel in human red cells. *Cell Calcium.* **31** (5), 189–200.
[https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(02\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(02)00032-5)
 20. Othmane A., Bitbol M., Snabre P., Mills P. 1990. Influence of altered phospholipid composition of the membrane outer layer on red blood cell aggregation: Relation to shape changes and glycocalyx structure. *Eur. Biophys. J.* **18** (2), 93–99.
<https://doi.org/10.1007/BF00183268>
 21. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. 2009. New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biophys. J.* **97** (12), 3206–3214.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.029>
 22. Goheen S.C., Lis L.J., Kucuk O., Westerman M.P., Kauffman J.W. 1993. Compositional dependence of spectral features in the Raman spectra of erythrocyte membranes. *J. Raman Spectrosc.* **24** (5), 275–279.
<https://doi.org/10.1002/jrs.1250240503>
 23. Tiba M.H., Draucke, G.T., Barbee R.W., Terner J., Torres Filho I., Romfh P., Vakhshoori D., Ward K.R. 2014. Tissue oxygenation monitoring using resonance Raman spectroscopy during hemorrhage. *J. Trauma and Acute Care Surgery.* **76** (2), 402–408.
<https://doi.org/10.1097/TA.000000000000088>
 24. Wood B.R., Hammer L., McNaughton D. 2005. Resonance Raman spectroscopy provides evidence of heme ordering within the functional erythrocyte. *Vibration. Spectrosc.* **38** (1–2), 71–78.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.02.016>

25. Kutuzov N.P., Brazhe A.R., Maksimov G.V., Dracheva O.E., Lyaskovskiy V.L., Bulygin F.V., Rubin A.B. 2014. Orientational ordering of carotenoids in myelin membranes resolved by polarized Raman microscopy. *Biophys. J.* **107** (4), 891–900. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.002>
26. Maksimov G.V., Kutuzov N.P., Shutova V.V., Orlov S.N. 2019. Microdomain organization of internodal myelin. *Biochem. (Moscow), Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology.* **13** (3), 260–267. <https://doi.org/10.1134/S1990747819030164>
27. Hofmann U.G., Rotsch C., Parak W.J., Radmacher M. 1997. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope. *J. Struct. Biol.* **119** (2), 84–91. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3868>
28. Bryzgalova N.Y., Brazhe N.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Rubin A.B. 2009. Role of the state of erythrocyte cytoplasm in the change of hemoglobin affinity for oxygen. *Biophys.* **54** (3), 308. <https://doi.org/10.1134/S0006350909030075>
29. Yusipovich A.I., Zagubizhenko M.V., Levin G.G., Platonova A., Parshina E.Y., Grygorczyk R., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N. 2011. Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: Impact of cell volume and refractive index. *J. Microscopy.* **244** (3), 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03516.x>
30. Левин Г.Г., Булыгин Ф.В., Вишняков Г.Н. 2005. Когерентные осцилляции состояния молекул белка в живых клетках. *Цитология*, **47** (4), 348–356.
31. Mazon P., Muller S., El Azouzi H. 1997. Deformation of erythrocytes under shear: A small-angle light scattering study. *Biorheol.* **34** (2), 99–110. <https://doi.org/10.3233/BIR-1997-34202>
32. Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O.V., Levin G.G., Maksimov G.V., Rubin A.B. 2008. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. *Bull. Experm. Biol. Med.* **145** (3), 382. <https://doi.org/10.1007/s10517-008-0097-3>
33. Yusipovich A.I., Novikov S.M., Kazakova T.A., Erokhova L.A., Brazhe N.A., Lazarev G.L., Maksimov G.V. 2006. Peculiarities of studying an isolated neuron by the method of laser interference microscopy. *Quant. Electron.* **36** (9), 874. <https://doi.org/10.1134/S000368381203012X>
34. Kang L.L., Huang Y.X., Liu W.J., Zheng X.J., Wu Z.J., Luo M. 2008. Confocal Raman microscopy on single living young and old erythrocytes. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules.* **89** (11), 951–959. <https://doi.org/10.1002/bip.21042>
35. Tikhomirova I.A., Murav'ev A.V., Mikhailichenko L.A., Golubkova E.V. 2006. Correlation between electrophoretic mobility and extent of aggregation of human red blood cells. *Hum. Physiol.* **32** (6), 748–749. <https://doi.org/10.1134/S0362119706060223>
36. Huang Y.X., Wu Z.J., Mehrishi J., Huang B.T., Chen X.Y., Zheng X.J., Lui W.J., Luo M. 2011. Human red blood cell aging: Correlative changes in surface charge and cell properties. *J. Cell. Mol. Medicine.* **15** (12), 2634–2642. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01310.x>
37. Spiro T.G., Strekas T.C. 1972. Resonance Raman spectra of hemoglobin and cytochrome c: Inverse polarization and vibronic scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69** (9), 2622–2626. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.9.2622>
38. Shaklai N., Sharma V.S., Ranney H.M. 1981. Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78** (1), 65–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.65>
39. Demehin A.A., Abugo, O.O., Jayakumar R., Lakowicz J.R., Rifkind J.M. 2002. Binding of hemoglobin to red cell membranes with eosin-5-maleimide-labeled band 3: Analysis of centrifugation and fluorescence lifetime data. *Biochem.* **41** (27), 8630–8637. <https://doi.org/10.1021/bi012007e>

The Role of Extracellular Ca²⁺ in Regulating the Distribution and Conformation of Hemoglobin in Erythrocytes

O. V. Slatinskaya¹, N. A. Brazhe¹, S. N. Orlov¹, and G. V. Maksimov^{1,2,*}

¹Lomonosov Moscow State University, Biological Department, Moscow, 119892 Russia

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

*e-mail: gmaksimov@mail.ru

It was found that a decrease in the concentration of extracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_{out}) leads to an increase in the surface charge of the membranes of human red blood cells (RBC), which is accompanied by a change in the conformation of heme and globin, as well as a decrease in the ordering of the cytoplasm and the content of membrane hemoglobin. It was found that in the range of [Ca²⁺]_{out} from 10⁻³ to 10⁻⁶ M, the morphology of RBC remains almost unchanged. With a decrease in [Ca²⁺]_{out} from 10⁻³ to 5 × 10⁻⁴ M ζ-potential increases from -15.4 ± 0.2 to -14.5 ± 0.3 mV and the value of the mean phase height (OPD) of the cell cytoplasm decreases. At [Ca²⁺]_{out} = 10⁻⁶ M, the maximum value of the Raman intensity of intracellular hemoglobin (Raman spectra bands of 1375 and 1580 cm⁻¹) is 2.6 times lower than that recorded at [Ca²⁺]_{out} = 10⁻³ M and is observed in the center of the cell. A decrease of [Ca²⁺]_{out} to 10⁻⁶ M leads to a change in the conformation of hemoglobin heme in RBC: a decrease in the symmetric vibrations of the side CH-groups of pyrrole rings and

an increase in the stretching vibrations of the vinyl groups of hemoporphyrin and the affinity of heme for ligands. At the same time, the probability of a flat conformation of heme does not change, but the rigidity of protein environment decreases. A decrease of $[Ca^{2+}]_{out}$ from 10^{-3} M to 10^{-6} M causes changes in the globin conformation: a decrease in the ordering of the CH-groups of globin amino acids, increase in the globin packing density, as well as the polarity of the globin environment is observed. On the basis of these observations we suggest that a decrease in $[Ca^{2+}]_{out}$ changes the conformation of the heme and the location of the amino acids dHb close to the heme (for example, lysine) and the localization of the protein band 3 anionic segment due to an increase in the membrane potential and surface charge that leaves the cationic central cavity of dHb. This process is accompanied by desorption of membrane-bound oxyHb and subsequent oligomerization of cytoplasmic oxyHb, which changes the oxygen transport properties of the erythrocyte.

Keyword: Raman spectroscopy, hemoglobin, conformation, erythrocyte, red blood cells, extracellular calcium

УДК 57.023

МАЛОНОВЫЙ ДИАЛЬДЕГИД, НО НЕ МЕТИЛГЛИОКСАЛЬ, НАРУШАЕТ ИНСУЛИНОВЫЙ КАСКАД, СИНТЕЗ NO И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ БАРЬЕР

© 2021 г. М. В. Самсонов^а, Н. В. Подкуйченко^а, В. З. Ланкин^б,
А. В. Воротников^{а, *}, В. П. Ширинский^{а, **}

^аНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии,
Институт экспериментальной кардиологии, Москва, 121552 Россия

^бНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии,
Институт клинической кардиологии, Москва, 121552 Россия

*e-mail: a.vorotnikov@icloud.com

**e-mail: shirinsky@gmail.com

Поступила в редакцию 12.12.2020 г.

После доработки 27.01.2021 г.

Принята к публикации 28.01.2021 г.

Дислипидемию и гипергликемию можно рассматривать как причину и следствие развития сахарного диабета 2 типа (СД2Т). Эти состояния связаны с образованием малонового диальдегида (МДА) и метилглиоксаля (МГО), которые представляют собой результат перекисного окисления липидов биологических мембран и окислительных превращений глюкозы. Сравнение эффектов МДА и МГО на эндотелиальные клетки пупочной вены человека, выполненное в данной работе, показало, что МДА, в отличие от МГО, нарушает барьерную функцию эндотелия, активацию инсулином PI3-киназного каскада и синтеза оксида азота (NO). МДА подавлял активацию протеинкиназы B (Akt) и эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), но не затрагивал активацию субстрата инсулинового рецептора (IRS). Полученные результаты свидетельствуют о том, что МДА может вносить вклад в дисфункцию эндотелия на ранних этапах развития СД2Т.

Ключевые слова: малоновый диальдегид, метилглиоксаль, инсулиновый каскад, NO, HUVEC, эндотелиальный барьер

DOI: 10.31857/S0233475521030087

ВВЕДЕНИЕ

Ожирение и дислипидемия выступают ведущими факторами риска развития инсулиновой резистентности и сахарного диабета 2 типа (СД2Т) [1, 2]. Предполагается, что дисфункция сосудистого эндотелия может связывать ожирение и ранние патологические процессы СД2Т с развитием сердечно-сосудистых осложнений [3, 4]. При ожирении и СД2Т уровень циркулирующих свободных жирных кислот (СЖК) значительно

повышен и сосудистый эндотелий первым испытывает контакт с СЖК. В результате развивается липотоксичность, окислительный стресс и возникают воспалительные реакции в эндотелии сосудов [5–7]. При этом нарушается активация инсулином рецепторного каскада, включающего субстрат инсулинового рецептора (IRS), PI3-киназу, протеинкиназу B (Akt) и эндотелиальную NO-синтазу (eNOS); падает синтез NO и усиливается вазоконстрикция [8–11].

Окислительный стресс и воспалительные реакции связаны с появлением в стенке сосуда активных форм кислорода (АФК), малонового диальдегида (МДА) и продуктов окислительного превращения глюкозы, таких как метилглиоксаль (МГО) [7, 12–14]. Повышенный уровень МДА характерен для пациентов с СД2Т [15–17] и сердечно-сосудистыми заболеваниями [18, 19]. МДА является продуктом перекисного окисления липидов, которое усиливается при окислительном стрессе и

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; МГО – метилглиоксаль; МДА – малоновый диальдегид; СД2Т – сахарный диабет 2 типа; СЖК – свободная жирная кислота; ТЭС – трансэндотелиальное электрическое сопротивление; DAF – 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлюоресцеин; EBM – базовая питательная среда культивирования эндотелиальных клеток; EGM – питательная среда культивирования эндотелиальных клеток; eNOS – эндотелиальная NO-синтаза; HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека (human umbilical vascular endothelial cells).

продукции избыточных АФК [20]. В отличие от МДА причиной накопления МГО, глиоксаля и 3-дезоксиглюкозона служит высокий уровень глюкозы и других углеводов в крови [21]. Несмотря на то, что для СД2Т характерны как гиперлипидемия, так и гипергликемия, повышение уровня СЖК характерно для первичного ожирения, как основного фактора риска развития СД2Т [22].

Ранее мы обнаружили, что МДА влияет на цитоскелет и целостность эндотелиального барьера, вызывая дисфункцию модельного эндотелия человека EA.hy926 [23]. Однако остался невыясненным вопрос, влияет ли МДА на активность инсулинового каскада, синтез NO и эндотелиальный барьер первичного сосудистого эндотелия человека. В данной работе мы провели сравнение прямых эффектов МДА и МГО на активность инсулинового каскада и синтез NO в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVES). Мы обнаружили, что, в отличие от МГО, МДА нарушает барьерную функцию покоящегося эндотелиального монослоя, активацию инсулином Akt, eNOS и синтеза NO. По-видимому, МДА не нарушает активацию инсулинового рецептора и его непосредственной мишени, белка IRS. Полученные результаты согласуются с гипотезой о том, что МДА может вносить вклад на ранних этапах развития дисфункции эндотелия при СД2Т и ожирении, в то время как действие МГО реализуется на его более поздних стадиях, связанных с хронической гипергликемией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Общелабораторные реактивы, желатин, 1,1,4,4-тетраэтоксипропан (для получения МДА путем кислотного гидролиза) и МГО приобретали у фирмы Sigma-Aldrich (США) и использовали, как описано ранее [23]. Стандартизированная базовая питательная среда для культивирования эндотелиальных клеток (EBM), стандартизированная питательная среда с факторами роста эндотелиальных клеток, содержащая 3.5 мМ глюкозы (EGM-2MV) и карнитин приобретали у фирмы Lonza (Швейцария). Пенициллин и стрептомицин – у фирмы Gibco (США). Для нормировки общего белка в образцах для иммуноблоттинга использовали набор реактивов BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США). В работе использовали следующие первичные антитела фирмы Cell Signaling (США): фосфо-IRS1 (Y612, #3203), фосфо-Akt (Thr308, #9275), фосфо-Akt (Ser473, #4060), Akt (#4691). Антитела против фосфо-eNOS (Ser1177, #612392) приобретали у фирмы BD Biosciences (США), антитела против винкулина

(#ab18058) у фирмы Abcam (США), антитела против белков, модифицированных МДА (клон 12E7) или МГО (клон 6D8) были описаны ранее [23]. Использовали вторичные, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела козы против антител кролика (Cell Signaling, #7074) и антитела кролика против антител мыши (Sigma, #A9044).

Культивирование HUVES. Эндотелий из вены пупочного канатика человека выделяли путем обработки ткани коллагеназой. Выделенные клетки высаживали на покрытые желатином чашки петри и культивировали в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 200 мкг/мл фактора роста эндотелия, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 5 ед/мл гепарина. При достижении конfluence клетки пересевали с использованием 0.05% раствора трипсина. В экспериментах использовали клетки 2–3 пассажа, особенности условий культивирования указаны в соответствующих разделах.

Проницаемость монослоя HUVES. Для оценки проницаемости измеряли трансэндотелиальное электрическое сопротивление монослоя HUVES (ТЭС). Клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в питательной среде EGM-2MV, дополнительно содержащей 2 мМ глутамина, 50 мкМ карнитина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки высаживали на покрытые 0.2–1.0% раствором желатина золотые электроды в 8-луночные планшеты 8W1E и измеряли ТЭС в режиме реального времени с помощью прибора ECIS-z (Applied Biophysics, США). Питательную среду ежедневно заменяли на свежую до формирования монослоя и последующей стабилизации в течение 24 ч. Перед внесением МДА или МГО питательную среду удаляли и инкубировали клетки в течение 2 ч при 37°C в растворе Хенкса.

Измерение NO. Клетки HUVES высаживали в 96-луночные планшеты с прозрачным дном и затемненными стенками (µclear black, F-bottom, Greiner Bio-One, Австрия), покрытые 0.2% желатином, и культивировали в среде EGM-2MV, как указано выше. Для измерения NO к клеткам вносили 2 мкМ DAF-FM диацетата в присутствии 1 мМ пробенецида (оба – Invitrogen, США) и 15 мМ NERES в базовой питательной среде EBM и стимулировали клетки 100 нМ инсулином (Novo Nordisk, Дания). Флуоресценцию DAF регистрировали с помощью микроскопа AxioVert 200M (Zeiss, Германия), оборудованного высокоскоростной камерой AxioCam H5m с CCD-матрицей с охлаждением. Перед внесением DAF-FM определяли фоновые

значения флуоресценции (F_b), после внесения — начальное значение (F_0), затем добавляли инсулин или растворитель и измеряли флуоресценцию (F) в тех же полях зрения, где и F_b и F_0 , с интервалом в 10 мин и минимальными временами экспозиции во избежание эффектов выгорания. Для каждой точки регистрировали 4 различных поля зрения. Накопление NO рассчитывали по изменению флуоресценции DAF, используя формулу $(F - F_b)/(F_0 - F_b)$, в линейном участке зависимости повышения флуоресценции от времени инкубации клеток с инсулином (как правило, 30 или 40 мин). Полученные значения нормализовали к средним значениям флуоресценции в контроле без добавок.

Иммуноблотинг. Монослой HUVES выращивали в покрытых 0.2% желатином 6-луночных планшетах как описано выше. Клетки стимулировали 100 нМ инсулина без предварительной депривации от сыворотки. Клетки промывали охлажденным на льду раствором Хенкса и лизировали в 2-кратном буфере для образцов по Лэммли, дополнительно содержащем коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (ThermoFisher Scientific, США). Клеточную ДНК разрушали механически, пропуская образец 5 раз через иглу 30G, образцы прогревали при 60°C в течение 25 мин, центрифугировали при 16000 *g* при 4°C в течение 10 мин. Иммуноблотинг и регистрацию хемилюминесценции проводили, как описано ранее [23], с использованием набора реагентов Clarity ECL reagents (Bio-Rad, США) и системы для визуализации Fusion-SL 3500WL (Vilber Lourmat, Франция). Мембраны блокировали 5% раствором обезжиренного молока (для анти-МДА антител) или 0.2% раствором казеина (I-Block™, Fisher Scientific, США) (для анти-МГО антител) в трис-солевом буфере с добавлением 0.1% Tween-20 (TBST) и окрашивали антителами, растворенными в 1% растворе обезжиренного молока в TBST.

Статистическая обработка данных. Данные анализировали с помощью критерия Стьюдента и представляли как средние \pm стандартное отклонение (SD). Различия считали статистически достоверными при значениях $p < 0.05$. Все эксперименты проводили не менее трех раз с 3–4 параллельными измерениями.

РЕЗУЛЬТАТЫ

МДА и МГО модифицируют разные белки в клетках HUVES. Чтобы подтвердить функциональность МДА и МГО и различие их белков-мишеней в клетках HUVES, мы использовали антитела 12E7 и 6D8, избирательно реагирующие с белками, модифицированными МДА или МГО, соответственно.

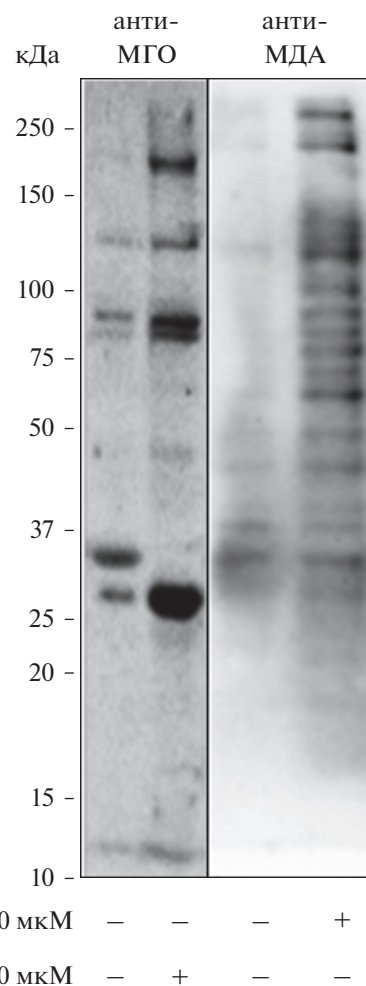


Рис. 1. МДА и МГО модифицируют различный набор белков в клетках HUVES. Клетки были обработаны 100 мкМ МДА или 100 мкМ МГО в течение 4 ч, как показано внизу, лизированы и проанализированы с помощью иммуноблотинга, как обозначено сверху. Показаны репрезентативные мембраны из трех независимых экспериментов.

Иммуноблотинг лизатов HUVES, обработанных 100 мкМ МДА или 100 мкМ МГО, выявил различные наборы модифицируемых белков (рис. 1). В контрольных клетках был обнаружен некий фоновый сигнал, который значительно усиливался после обработки клеток МДА или МГО. Перекрестного взаимодействия антител не наблюдалось. Эти результаты означают, что в клетках HUVES имеются разные мишени прямого действия МДА и МГО.

МДА, но не МГО, нарушает эндотелиальный барьер и стимулированный инсулином синтез NO в клетках HUVES. Измерение ТЭС показало, что прямое воздействие МДА (100 мкМ) ведет к быстрому повышению проницаемости монослоя HUVES, которое усиливалось с течением времени; в то же

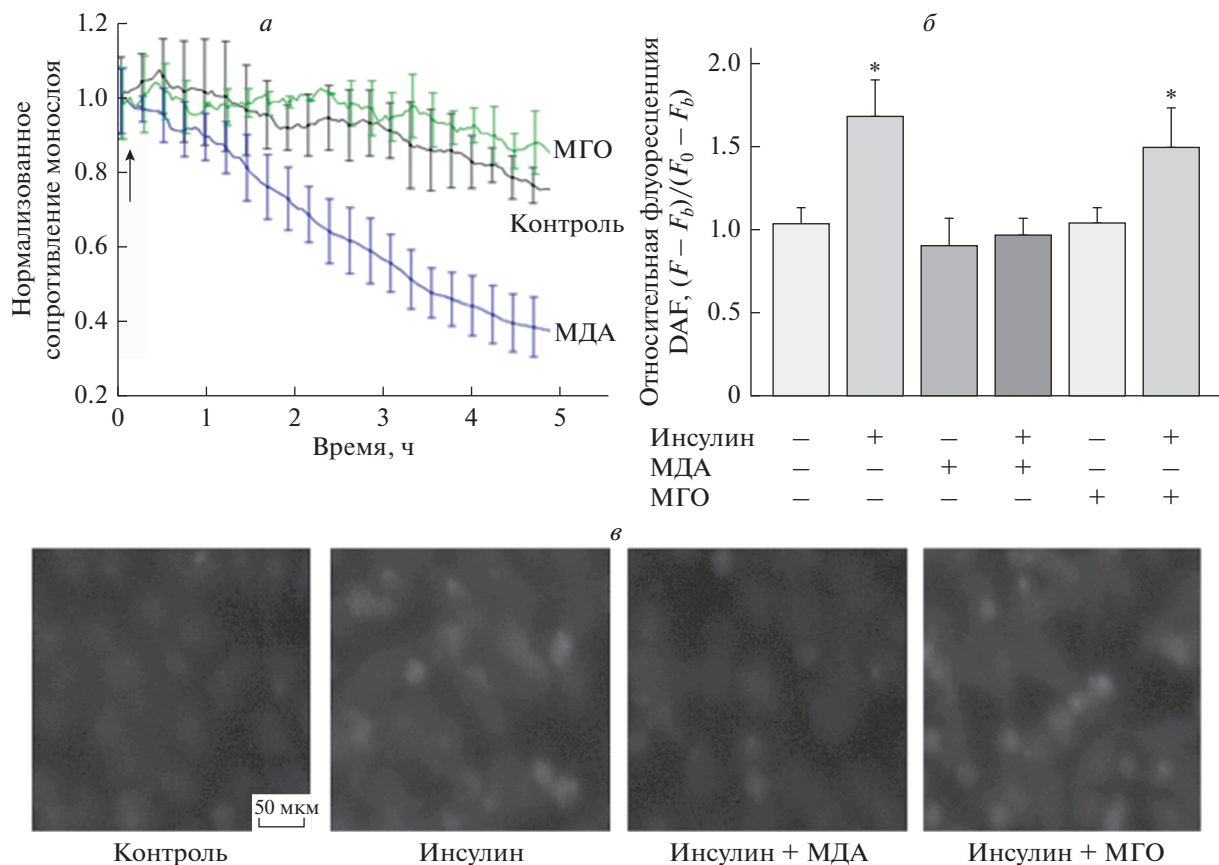


Рис. 2. Влияние МДА и МГО на проницаемость монослоя и синтез NO в клетках HUVEC. *а* – МДА (100 мкМ) снижает сопротивление эндотелиального барьера в отличие от МГО (100 мкМ). Значения ТЭС нормированы по базовым значениям ТЭС, которые составляли 12 кОм; стрелкой обозначено время добавления МДА / МГО. Показаны репрезентативные результаты из 5 независимых экспериментов, $p < 0,01$ для МДА против контроля. *б, в* – МДА (100 мкМ) в отличие от МГО (100 мкМ) блокирует синтез NO в ответ на стимуляцию клеток инсулином. *б* – Изменения флуоресценции DAF в клетках (средние значения \pm SD, $* p < 0,05$ в сравнении с контролем без обработки клеток, $n = 3$); условия обработки клеток указаны внизу. *в* – Репрезентативные изображения, иллюстрирующие изменения флуоресценции DAF в клетках после стимуляции и использованные для количественного анализа, приведенного на панели *б*.

время МГО (100 мкМ) такого действия не оказывал (рис. 2а). При этом использованная концентрация МДА соответствует максимальным значениям, а концентрация МГО в 40 раз превышает максимальные значения, достигаемые в сосудистой системе [23]. При измерении через 4 ч инкубации в присутствии 100 мкМ МДА или 100 мкМ МГО стимулированный инсулином синтез NO нарушался только под действием МДА (рис. 2б и 2в). Эти наблюдения согласуются с нашими ранее полученными данными о нарушении барьерной функции культивируемых эндотелиальных клеток EA.hy926 под действием МДА [23].

МДА, но не МГО, подавляет активацию eNOS инсулином. В клетках эндотелия ключевую роль в инсулиновом сигнальном каскаде в направлении синтеза оксида азота играют IRS, Akt и eNOS (рис. 3а). Чтобы выяснить влияние МДА и МГО

на активность инсулинового каскада мы оценили уровень активирующего фосфорилирования этих белков в клетках HUVEC. Как видно из рис. 3б и 3в инсулин вызывал фосфорилирование IRS по Tyr-612. Этот остаток распознается регуляторной субъединицей PI3-киназы, связывание которой активирует этот фермент. Аналогично инсулин повышал уровень фосфорилирования остатка Thr-308 в активационной петле Akt (рис. 3б и 3г), а также остатка Ser-473, расположенного в гидрофобной последовательности фермента и необходимого для максимальной активации Akt (рис. 3б и 3д). Инсулин также стимулировал фосфорилирование eNOS по остатку Ser-1177, участвующему в активации NO-синтазы (рис. 3б и 3е), и усиливал синтез NO (рис. 2б и 2в). МГО (100 мкМ) существенно не влиял на активацию инсулинового каскада. Следует отметить, что при инкубации

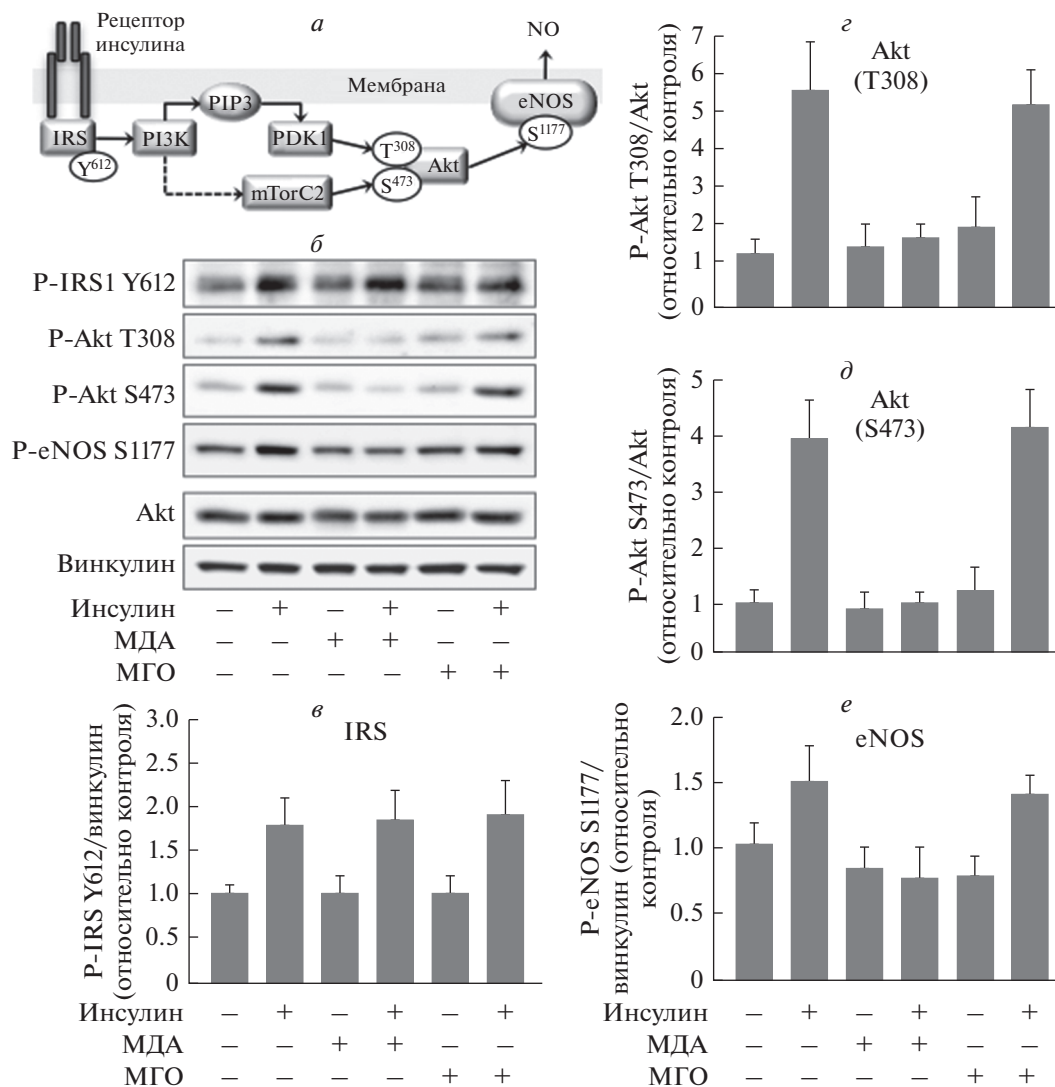


Рис. 3. Влияние МДА и МГО на фосфорилирование белков инсулинового сигнального каскада в клетках HUVEC. *а* – Схема активации синтеза оксида азота (NO) за счет передачи сигнала от рецептора инсулина (mTorC2 – второй комплекс mTOR, PIP3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат, PDK1 – фосфоинозитид-зависимая киназа-1). *б* – Репрезентативные мембраны лизатов клеток HUVEC, стимулированных 100 нМ инсулином после инкубации в присутствии 100 мкМ МДА или 100 мкМ МГО, после окраски антителами, специфичность которых указана слева. *в–е* – Статистический анализ результатов, представленных в *б*. Показаны средние значения ± SD из трех независимых экспериментов. Условия инкубации обозначены в нижней части панелей.

клеток с МДА (100 мкМ) активация IRS сохранялась (рис. 3*в*), но степень фосфорилирования Akt и eNOS не увеличивалась (рис. 3*б*). Это значит, что МДА, скорее всего, не влияет на активацию инсулиновых рецепторов, но прерывает передачу сигнала на последующих за IRS этапах, по-видимому, на участке PI3-киназа > PDK1 (см. рис. 3*а*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы показали, что МДА нарушает эндотелиальный барьер, инсулиновый сигнальный каскад и синтез NO в клетках сосудистого эн-

дотелия. В то же время МГО, накопление которого связывают с нарушениями углеводного обмена (гипергликемией) при СД2Т, не вызывает существенных изменений ни барьерной функции HUVEC, ни активности инсулинового каскада, ни синтеза NO. Учитывая, что максимальные концентрации МГО, обнаруженные *in vivo*, примерно в 40 раз ниже использованных [23], представляется маловероятным, что МГО может прямо влиять на эндотелиальный барьер и инсулиновый каскад при СД2Т. Обнаруженные нами различия по влиянию МДА и МГО на сосудистый эндотелий согласуются с точкой зрения о том, что дислипиде-

мия и/или ожирение могут быть более значимы для дисфункции эндотелия и нарушения инсулиновой сигнализации при развитии сердечно-сосудистых осложнений на начальных этапах развития СД2Т.

Считается, что МДА возникает в результате действия АФК на полиненасыщенные жирные кислоты в составе биологических мембран [20]. Однако есть данные о том, что и насыщенные СЖК также могут приводить к образованию МДА. В частности, мы обнаружили, что длительная инкубация первичного эндотелия HUVEC с пальмитатом, типичным представителем СЖК, приводит к индукции митохондриальных АФК и накоплению МДА (данные не представлены). Несмотря на отсутствие ясного понимания механизма, который связывает высокий уровень внешнего пальмитата с образованием МДА внутри клеток, сходные наблюдения были сделаны в работах с макрофагами [24], сосудистыми [25] и гладкомышечными клетками человека [26]. Кроме того, обнаружена выраженная корреляция между уровнем МДА в крови и весом тела у пациентов с СД2Т [27]. Совокупность этих данных свидетельствует о наличии связи между повышенным уровнем СЖК и уровнем МДА.

Конститутивная активность eNOS и генерация NO играют важную роль в поддержании барьерной функции микрососудов [27–32], а также базовой барьерной функции культивируемого эндотелия [33, 34]. Активность eNOS регулируется взаимодействием с различными белками, например, кавеолином-1 и Ca²⁺-кальмодулином, а также фосфорилированием и внутриклеточной локализацией eNOS [32]. Инсулин усиливал барьерные свойства эндотелия микрососудов, активируя PI3-киназу и синтез NO [35], и препятствовал их нарушению под действием окислительного стресса [36]. В связи с этим мы исследовали влияние МДА и МГО на активность инсулинового каскада и синтез NO в клетках HUVEC. МДА, но не МГО, подавлял активирующее фосфорилирование ключевых компонентов инсулинового каскада, в том числе eNOS по остатку Ser-1177 (рис. 3), и подавлял стимулируемый инсулином синтез NO (рис. 2). В то же время сохранялась стимуляция инсулином фосфорилирования IRS, что указывает на сохранение активности инсулинового рецептора. Кроме того, МДА подавлял только реакции на стимуляцию инсулином, но существенно не влиял на базовую активность инсулинового каскада и базовый синтез NO. Учитывая неспецифическое воздействие МДА на клеточные белки, можно предполагать, что его эффект не ограничивается подавлением активации eNOS, но может затрагивать активность и других белков-мишеней, в том чис-

ле белков межклеточных контактов. Для их идентификации нужны дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-15-00361) в части, касающейся экспериментов с измерениями проницаемости эндотелия, и РФФИ (проект № 18-315-00377) в остальной работе. Авторы выражают благодарность Т.Н. Власик и Е.Е. Ефремову за предоставление антител против белков, модифицированных МДА или МГО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boden G., Chen X., Ruiz J., White J.V., Rossetti L. 1994. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J. Clin. Invest.* **93**, 2438–2446.
2. Petersen M.C., Shulman G.I. 2018. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol. Rev.* **98**, 2133–2223.
3. Sena C.M., Pereira A.M., Seica R. 2013. Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1832**, 2216–2231.
4. Shi Y., Vanhoutte P.M. 2017. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J. Diabetes.* **9**, 434–449.
5. Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism.* **49**, 3–8.
6. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Rev.* **23**, 599–622.
7. Paneni F., Costantino S., Cosentino F. 2015. Role of oxidative stress in endothelial insulin resistance. *World J. Diab.* **6**, 326–332.
8. Bakker W., Eringa E.C., Sijkema P., van Hinsbergh V.W.M. 2009. Endothelial dysfunction and diabetes: Roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res.* **335**, 165–189.
9. Del Turco S., Gaggini M., Daniele G., Basta G., Folli F., Sicari R., Gastaldelli A. 2013. Insulin resistance and endothelial dysfunction: a mutual relationship in cardiometabolic risk. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 2420–2431.
10. Jansson P.A. 2007. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *J. Intern. Med.* **262**, 173–183.
11. Potenza M.A., Addabbo F., Montagnani M. 2009. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol.* **297**, E568–E577.
12. Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism.* **49**, 3–8.
13. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule

- and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **15**, 316–328.
14. Wang L., Chen Y., Li X., Zhang Y., Gulbins E., Zhang Y. 2016. Enhancement of endothelial permeability by free fatty acid through lysosomal cathepsin B-mediated Nlrp3 inflammasome activation. *Oncotarget.* **7**, 73229–73241.
 15. Dierckx N., Horvath G., Van Gils C., Vertommen J., Van de Vliet J., De Leeuw I., Manuel-y-Keenoy B. 2003. Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: Relationship to diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 999–1008.
 16. Gunawardena H.P., Silva K.D.R.R., Sivakanesan R., Katulanda P. 2019. Increased lipid peroxidation and erythrocyte glutathione peroxidase activity of patients with type 2 diabetes mellitus: Implications for obesity and central obesity. *Obes. Med.* **15**, 100118.
 17. Martin-Gallan P., Carrascosa A., Gussinye M., Dominguez C. 2003. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Rad. Biol. Med.* **34**, 1563–1574.
 18. Polidori M.C., Savino K., Alunni G., Freddio M., Senin U., Sies H., Stahl W., Mecocci P. 2002. Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: Relationship to disease severity. *Free Rad. Biol. Med.* **32**, 148–152.
 19. Tamer L., Sucu N., Polat G., Ercan B., Aytacoglu B., Yücebilgiç G., Ünlu A., Dikmengil M., Atik U. 2002. Decreased serum total antioxidant status and erythrocyte-reduced glutathione levels are associated with increased serum malondialdehyde in atherosclerotic patients. *Arch. Med. Res.* **33**, 257–260.
 20. Ayala A., Munoz M.F., Arguelles S. 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 360438.
 21. Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L. 2001. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia.* **44**, 129–146.
 22. Arner P., Ryden M. 2015. Fatty acids, obesity and insulin resistance. *Obes. Facts* **8**, 147–155.
 23. Samsonov M.V., Khapchaev A.Y., Vorotnikov A.V., Vlasik T.N., Yanushevskaya E.V., Sidorova M.V., Efremov E.E., Lankin V.Z., Shirinsky V.P. 2017. Impact of atherosclerosis- and diabetes-related dicarbonyls on vascular endothelial permeability: A comparative assessment. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, 1625130.
 24. Li H., Xiao Y., Tang L., Zhong F., Huang G., Xu J.-M., Xu A.-M., Dai R.-P., Zhou Z.-G. 2018. Adipocyte fatty acid-binding protein promotes palmitate-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in macrophages. *Front. Immunol.* **9**, 81.
 25. Girona J., Rosales R., Saavedra P., Masana L., Vallve J.-C. 2019. Palmitate decreases migration and proliferation and increases oxidative stress and inflammation in smooth muscle cells: Role of the Nrf2 signaling pathway. *Am. J. Physiol.* **316**, C888–C897.
 26. Oberbach A., Schlichting N., Heinrich M., Till H., Stolzenburg J.-U., Neuhaus J. 2012. Free fatty acid palmitate impairs the vitality and function of cultured human bladder smooth muscle cells. *PLoS One.* **7**, e41026.
 27. Volpe C.M.O., Abreu L.F.M., Gomes P.S., Gonzaga R.M., Veloso C.A., Nogueira-Machado J.A. 2014. The Production of nitric oxide, IL-6, and TNF-alpha in palmitate-stimulated PBMNCs is enhanced through hyperglycemia in diabetes. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2014**, 479587.
 28. Baldwin A.L., Thurston G., Al Naemi H. 1998. Inhibition of nitric oxide synthesis increases venular permeability and alters endothelial actin cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* **274**, H1776–1784.
 29. Kurose I., Kubes P., Wolf R., Anderson D.C., Paulson J., Miyasaka M., Granger D.N. 1993. Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ. Res.* **73**, 164–171.
 30. Predescu D., Predescu S., Shimizu J., Miyawaki-Shimizu K., Malik A.B. 2005. Constitutive eNOS-derived nitric oxide is a determinant of endothelial junctional integrity. *Am. J. Physiol.* **289**, L371–381.
 31. Mehta D., Malik A.B. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* **86**, 279–367.
 32. Duran W.N., Breslin J.W., Sanchez F.A. 2010. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc. Res.* **87**, 254–261.
 33. Cho M.M., Ziats N.P., Pal D., Utian W.H., Gorodeski G.I. 1999. Estrogen modulates paracellular permeability of human endothelial cells by eNOS- and iNOS-related mechanisms. *Am. J. Physiol.* **276**, C337–349.
 34. May J.M., Qu Z.-C. 2011. Nitric oxide mediates tightening of the endothelial barrier by ascorbic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 701–705.
 35. Gunduz D., Thom J., Hussain I., Lopez D., Hartel F.V., Erdogan A., Grebe M., Sedding D., Piper H.M., Tillmanns H., Noll T., Aslam M. 2010. Insulin stabilizes microvascular endothelial barrier function via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated Rac1 activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1237–1245.
 36. Rath S., Kalogeris T., Mai N., Zibari G., Alexander J.S., Lefter D., Turnage R.H. 2006. Insulin prevents oxidant-induced endothelial cell barrier dysfunction via nitric oxide-dependent pathway. *Surgery.* **139**, 82–91.

Malondialdehyde but Not Methylglyoxal Impairs Insulin Signaling, NO Production, and Endothelial Barrier

M. V. Samsonov¹, N. V. Podkuychenko¹, V. Z. Lankin², A. V. Vorotnikov^{1,*}, and V. P. Shirinsky^{1,**}

¹National Medical Research Center for Cardiology, Institute of Experimental Cardiology, Moscow, 121552 Russia

²National Medical Research Center for Cardiology, Institute of Clinical Cardiology, Moscow, 121552 Russia

*e-mail: a.vorotnikov@icloud.com

**e-mail: shirinsky@gmail.com

Dyslipidemia and hyperglycemia portray “cause-and-consequence” of type 2 diabetes mellitus (T2DM). They are linked to malondialdehyde (MDA) and methylglyoxal (MGO) generation that results from membrane lipid peroxidation and oxidative glucose conversions. We compared the effects of exogenous MDA and MGO on human umbilical vein endothelial cells and found that MDA, but not MGO, impairs insulin activation of PI3-kinase pathway, NO production, and endothelial barrier capacity. MDA abolished insulin activation of Akt and eNOS but not that of insulin receptor substrate (IRS). These results substantiate the hypothesis that MDA may be involved in endothelial dysfunction as the early event in the development of T2DM.

Keywords: malondialdehyde, methylglyoxal, insulin signaling, NO, human umbilical vein endothelial cells, HUVEC, endothelial barrier

УДК 612.1:591.11:577.353

ВЛИЯНИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРА МОНООКСИДА УГЛЕРОДА НА МИКРОРЕОЛОГИЮ И ЭЛАСТИЧНОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

© 2021 г. А. В. Муравьев^{а, *}, И. А. Тихомирова^а, С. В. Булаева^а,
Е. П. Петроченко^а, Ю. В. Малышева^а

^аЯрославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, Ярославль, 150000 Россия

*e-mail: alexei.47@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 05.10.2020 г.

Доставка кислорода в тканевые микрорайоны зависит не только от сосудистых факторов, но и от самих эритроцитов – транспортеров дыхательных газов. Хотя влияние газотрансмиттеров на микрореологию клеток крови сомнений не вызывает, имеющиеся данные касаются преимущественно эффектов оксида азота (NO) на эластичность мембраны эритроцитов. Существенно меньше информации об эффектах H₂S, и совсем отсутствуют данные о сигнальной роли монооксида углерода (CO) в микрореологии эритроцитов. Таким образом, целью данной работы было изучение микрореологических ответов эритроцитов на действие CO. Микрореологические характеристики эритроцитов исследовались в контроле и в присутствии донора CO CORM-3 в сочетании с рядом ингибиторов, включая ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ, ингибитор NO-синтазы L-NAME и блокатор Ca²⁺-зависимых калиевых (K_{Ca}) каналов TEA. Регистрировали индекс деформируемости эритроцитов (ИУЭ) и показатели их агрегации (ПАЭ) в контроле и после инкубации с препаратами. Кроме того, использовали восстановленные тени эритроцитов, для которых оценивали изменение деформируемости под действием указанных соединений. В присутствии CORM-3 эритроциты демонстрировали увеличение ИУЭ на 9% ($p < 0.01$). Прирост ИУЭ теней эритроцитов под влиянием донора CO составил 10% ($p < 0.01$). В этих условиях ПАЭ снижался на 41% ($p < 0.01$). Блокирование K_{Ca}-каналов с помощью TEA проявлялось в существенном подавлении CO-зависимого увеличения ИУЭ и полностью устраняло влияние CO на агрегацию эритроцитов. При ингибировании NO/cGMP сигнального пути с помощью ODQ и L-NAME микрореологические эффекты CORM-3 не проявлялись. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что CO способен положительно влиять на микрореологические характеристики эритроцитов, повышая их эластичность и деформируемость и угнетая их способность к агрегации. Регуляторные эффекты CO могут реализоваться при участии K_{Ca}-каналов и NO/cGMP сигнального каскада.

Ключевые слова: эритроциты, деформируемость, агрегация, газотрансмиттеры, монооксид углерода, растворимая гуанилатциклаза, Ca²⁺-зависимые K⁺-каналы

DOI: 10.31857/S0233475521030063

ВВЕДЕНИЕ

Наряду с оксидом азота и сульфидом водорода, монооксид углерода – еще один эндогенно генерируемый биологический газ [1]. Главный путь образования CO включает гемоксигеназу, которая вместе с NADPH-цитохром P450 – редукта-

зой, расщепляет гемовое кольцо в гемопroteинах на биливердин, CO и железо [2]. В последнюю декаду проведенные исследования выявили многие аспекты эндогенной продукции и физиологических функций монооксида углерода. Была показана важная роль CO в функциях иммунной, сердечно-сосудистой, дыхательной, репродуктивной, пищеварительной системах [1, 3]. В кровеносной системе эндогенно генерируемый CO может эффективно расслаблять гладкие мышцы сосудов [4–6]. Важно заметить, что для эффективной тканевой перфузии важен не только сосудистый компонент адаптации, но и оптимальная микрореология эритроцитов – транспортеров кислорода [7]. На уровне обменных капилляров, лишенных мышечных элементов и, следовательно, существен-

Сокращения: CO – монооксид углерода; CORM-3 – CO Releasing Molecule 3, трикарбонилхлор(глицинат) рутения (II); K_{Ca}-каналы – кальций-зависимые калиевые каналы; L-NAME – метиловый эфир N-нитроаргинаина; ODQ – 1H-[1, 2, 4]оксадиазоло[4,3-*a*]хиноксалин-1-он; TEA – тетраэтиламмоний; р-ГЦ – растворимая гуанилатциклаза; cGMP – циклический гуанозин-5'-монофосфат; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ИУтЭ – индекс удлинения теней эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

ного изменения диаметра [8], деформируемость эритроцитов является критической характеристикой потока и, следовательно, определяет эффективность доставки кислорода в ткани [7–9]. Одним из важнейших факторов изменения деформируемости эритроцитов является их мембранная эластичность [10]. Газотрансмиттеры по аутокринному или паракринному механизмам могут оказывать регуляторное влияние на эти микромеханические свойства эритроцитов. Так, например, донор NO нитропруссид натрия повышал деформируемость эритроцитов и уменьшал их агрегацию [11–13]. Таким же эффектом обладает и гидросульфид натрия, донор H₂S [14]. Как в случае NO, H₂S выражено ингибирует агрегацию тромбоцитов [15, 16]. Что касается CO, то практически нет данных о его влиянии на эластичность мембран эритроцитов и их микрореологию в целом. В свете вышесказанного целесообразно было исследовать влияние CO на микрореологические характеристики эритроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы цельной крови (9 мл) здоровых доноров ($n = 36$) получали венопункцией в вакуумные пробирки (вакутайнеры с EDTA). Проведение исследования одобрено местным этическим комитетом Ярославского государственного педагогического университета (протокол № 2 от 13.02.2020 г.). Получено информированное согласие всех субъектов в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации (Хельсинкская декларация WMA об этике. Принципы медицинских исследований с участием людей, с поправками, внесенными 64-й Генеральной Ассамблеей WMA, Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г.). Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин, 3000 об/мин), трижды отмывали в изотоническом растворе хлорида натрия и ресуспендировали в буферном растворе (138 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1 мМ K₂SO₄, 7.5 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ MgSO₄, 5 мМ глюкозы, pH 7.4). Поскольку эндотелиальная NO-синтаза является кальций-зависимым ферментом, то в среду инкубации эритроцитов добавляли CaCl₂ до его конечной концентрации 150 мкМ. Осмолярность составляла 300 мОсм/л (определяли на осмометре Fogel OM-801, Германия). При исследовании агрегации эритроцитов для ее стимулирования добавляли к буферному раствору декстран-200 (10% ХАЕС-стерил, компания Fresenius Kabi, Германия) в соотношении 7 : 3 по объему. При этом осмолярность полученной смеси не изменялась. Суспензию эритроцитов делили на несколько аликвот и клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин с каждым из соединений:

1) донором CO – CORM-3 (15, 50 и 100 мкМ);

2) с блокатором Ca²⁺-зависимых калиевых каналов TEA (50 мкМ);

3) с ингибитором растворимой гуанилатциклазы ODQ (0.5 мкМ);

4) с ингибитором NO-синтазы L-NAME (200 мкМ).

В каждом опыте в качестве контроля использовали суспензию эритроцитов, инкубируемых в течение 30 мин при 37°C в буферном растворе без добавления указанных выше препаратов. В опыте и в контроле проводилось по 20 параллельных измерений микрореологических характеристик эритроцитов и их теней. Все препараты и соединения получены от фирмы Sigma-Aldrich (США). Их растворяли согласно указаниям производителя либо в DMSO, либо в дистиллированной воде. Все эксперименты проводили в течение 4 ч после взятия крови. Тени эритроцитов готовили по методу Доджа [17]. Эритроциты разрушали осмотическим шоком. Для этого к 1 мл клеток добавляли 7 мл охлажденной дистиллированной воды (при температуре 4°C) с последующей отмывкой в фосфатном буфере. Затем концентрат теней инкубировали в фосфатном буфере с добавлением 30% декстрана-200 (соотношение буфера и декстрана 7 : 3 по объему). Суспензию восстановленных теней эритроцитов делили на несколько аликвот, добавляли соответствующие препараты и после инкубации в течение 30 мин при 37°C регистрировали их деформируемость в проточной микрокамере.

Исследование агрегации и деформируемости. Степень агрегации эритроцитов определяли с помощью агрегометра Mугеппе M1 (Германия), который дает возможность получить четыре индекса агрегации при низких (3 с^{-1}) и высоких (600 с^{-1}) скоростях сдвига (индексы агрегации: M₅, M₁₀, M₁₅ и M₁₀, соответственно). Кроме того, процесс агрегации и форму клеток контролировали с помощью прямой микроскопии. Поскольку все четыре индекса агрегации, которые регистрируются агрегометром Mугеппе M1, изменялись одинаково, то для анализа использовали только индекс M₅. В тексте, на рисунках и в таблицах они обозначены как показатели агрегации эритроцитов.

Для оценки мембранной вязкоэластичности эритроцитов определяли индекс удлинения эритроцитов и их восстановленных теней в проточной микрокамере, где создавали постоянное течение суспензии эритроцитов (Hct = 0.5%). В микрокамеру подавали давление, которое создавало напряжение сдвига 0.54 Н/м^2 и вытягивало клетки (или их восстановленные тени), прикрепленные ко дну камеры. Адгезия клеток происходила спонтанно. На основе измерения длины (L) и ширины (W) вытянутых потоком клеток рассчитывали показатель деформируемости эритроцитов: ИУЭ = L/W (отн. ед.) [18].

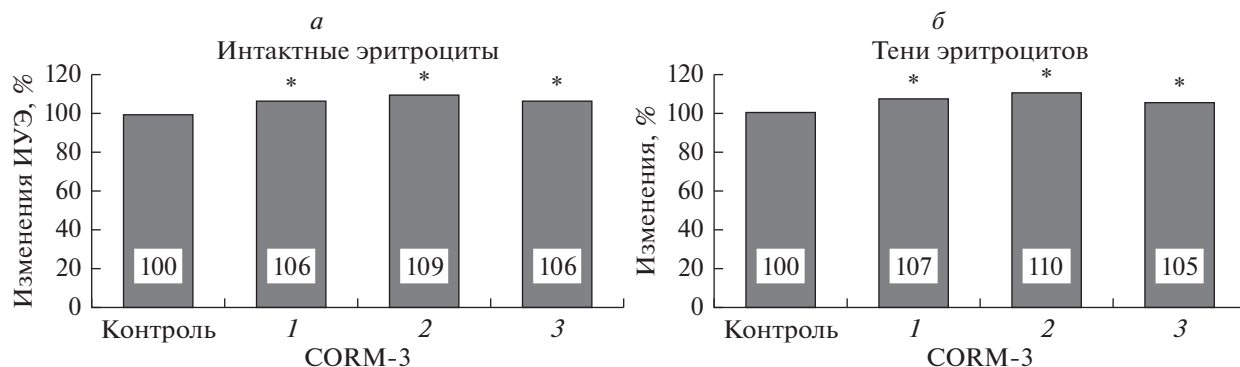


Рис. 1. Относительные изменения деформируемости интактных эритроцитов (а) и их восстановленных теней (б) после инкубации с CORM-3 в разных концентрациях: 1 – 15, 2 – 50, 3 – 100 мкМ. * – Отличие от контроля статистически значимо ($p < 0.01$).

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Проверку выборочного распределения проводили с помощью теста Шапиро–Уилка. Значимость различий определяли с помощью t -критерия Стьюдента. Гипотезу о взаимосвязи данных проверяли с помощью корреляции Спирмена. За уровень статистически значимых различий принимали изменения при $p < 0.05$ и $p < 0.01$. Данные в таблицах и тексте представлены как $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение микрореологии эритроцитов после их инкубации с донором СО CORM-3

После инкубации эритроцитов с CORM-3 прирост ИУЭ при разных концентрациях препарата составил 6–9% (с 1.94 ± 0.03 до 2.05 ± 0.03 отн. ед. при концентрациях донора СО 15 и 100 мкМ и до 2.11 ± 0.02 отн. ед. при концентрации 50 мкМ; $p < 0.01$). Таким образом, несколько более выраженные изменения ИУЭ были зарегистрированы при концентрации CORM-3 50 мкМ (с 1.94 ± 0.02 до 2.11 ± 0.03 отн. ед., $p < 0.01$; рис. 1а).

Это было подтверждено и на тенях эритроцитов (рис. 1б). При этом увеличение их деформируемости при концентрации донора СО 50 мкМ достигло 10% (с 1.84 ± 0.02 до 2.02 ± 0.03 отн. ед., $p < 0.01$). Важно заметить, что одним из основных факторов изменения деформируемости эритроцитов в целом является эластичность их мембран [10] (наряду с цитоплазматической вязкостью, величина которой в основном зависит от концентрации гемоглобина) [19]. Поскольку при приготовлении теней эритроцитов гемоглобин удалялся из клеток и заменялся изотоническим раствором с постоянной вязкостью, то, следовательно, изменение общей деформируемости теней зависело только

от микромеханических свойств мембраны, и измеряемые величины могут характеризовать мембранную эластичность эритроцитов.

Дозозависимые изменения агрегации эритроцитов при их инкубации с CORM-3 тоже свидетельствовали о большей эффективности донора СО при его концентрации 50 мкМ (рис. 2).

При этой концентрации снижение ПАЭ составило 41% (с 4.92 ± 0.38 отн. ед. в контроле до 2.51 ± 0.22 отн. ед. после инкубации с донором СО, $p < 0.01$).

Изменение микрореологии эритроцитов после их инкубации с CORM-3 и ТЕА

В качестве основной молекулярной мишени для действия СО в клетках рассматривают K_{Ca} -каналы, которые блокируются ТЕА [20]. В этой серии опытов было установлено, что CORM-3 повышал ИУЭ интактных клеток на 8% ($p < 0.01$), а снижение агрегации составило 37% (табл. 1, $p < 0.05$). ТЕА (50 мкМ) уменьшал влияние CORM-3 на дефор-

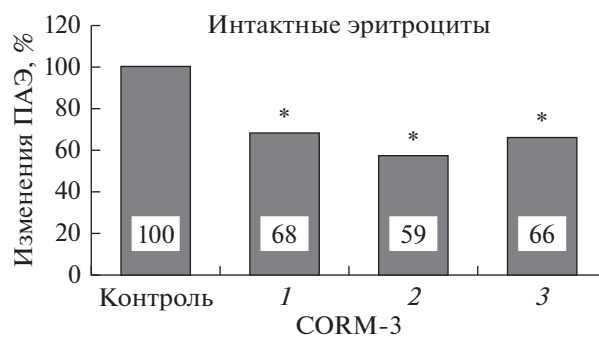


Рис. 2. Относительные (в % от контрольного значения) изменения агрегации эритроцитов после их инкубации с CORM-3 в концентрациях: 1 – 15, 2 – 50, 3 – 100 мкМ. * – Отличие от контроля статистически значимо ($p < 0.01$).

Таблица 1. Изменение микрореологических характеристик эритроцитов после их инкубации с CORM-3, блокатором кальций-зависимых калиевых каналов, TEA по отдельности и при их одновременном добавлении ($M \pm m$, $n = 20$)

| Показатель | Контроль | CORM-3 | TEA | TEA + CORM-3 |
|--------------|-------------|---------------|-------------|--------------|
| ИУЭ, отн.ед. | 1.93 ± 0.01 | 2.08 ± 0.02** | 1.96 ± 0.03 | 1.97 ± 0.03 |
| ПАЭ, отн.ед. | 4.56 ± 0.18 | 2.87 ± 0.16* | 4.88 ± 0.28 | 4.65 ± 0.32 |

* Отличия от значений в контроле статистически значимы ($p < 0.05$).

** Отличия от значений в контроле статистически значимы ($p < 0.01$).

Таблица 2. Изменение микрореологических характеристик эритроцитов после их инкубации с донором CO (CORM-3), ODQ по отдельности и при их одновременном добавлении ($M \pm m$, $n = 20$)

| Показатель | Контроль | CORM-3 | ODQ | ODQ + CORM-3 |
|---------------|-------------|---------------|-------------|--------------|
| ИУЭ, отн. ед. | 2.00 ± 0.01 | 2.10 ± 0.01** | 1.96 ± 0.01 | 2.00 ± 0.02 |
| ПАЭ, отн. ед. | 4.05 ± 0.22 | 2.83 ± 0.15* | 4.12 ± 0.28 | 4.08 ± 0.32 |

* Отличия от значений в контроле статистически значимы ($p < 0.05$).

** Отличия от значений в контроле статистически значимы ($p < 0.01$).

мируемость эритроцитов, но не устранял его полностью (табл. 1). Однако если сравнить ответы эритроцитов на CORM-3 и на сочетание TEA + CORM-3, то разница в изменениях ИУЭ в первом случае составила 8% и была достоверной ($p < 0.01$), а во втором – 2% ($p > 0.05$) и статистически незначима. Что касается второй микрореологической характеристики эритроцитов, их агрегации, то TEA полностью устранял снижение ПАЭ, происходящее под влиянием CORM-3 (табл. 1).

На микрореологической модели теней эритроцитов были получены данные, свидетельствующие о полном подавлении эффекта донора CO на деформируемость (рис. 3). Хотя после инкубации теней эритроцитов только с CORM-3 наблюдался достоверный, на 8% прирост деформируемости ($p < 0.01$). Однако если в среду инкубации теней был добавлен TEA, то донор CO практически не изменял мембранную эластичность и индекс деформируемости

отличался от уровня контроля менее чем на 1% (1.80 ± 0.03 отн. ед. – контроль; 1.95 ± 0.03 отн. ед. – CORM-3 и 1.81 ± 0.02 отн. ед. – TEA + CORM-3).

Изменение микрореологии эритроцитов после их инкубации с CORM-3, ингибиторами растворимой гуанилатциклазы ODQ и NO-синтазы L-NAME

Известно, что NO- и CO-индуцированные изменения клеточных функций в основном опосредуются растворимой гуанилатциклазой и cGMP-зависимыми сигнальными/регуляторными процессами [21]. Мы проверили предположение о том, что микрореологические ответы эритроцитов могут быть связаны сигнальной системой NO-cGMP. Было найдено, что при ингибировании р-ГЦ с помощью ODQ (0.5 мкМ) практически полностью устранял эффект донора CO. Это было подтверждено на двух моделях: в опытах с деформируемостью эритроцитов и при регистрации их агрегации (табл. 2).

Если ингибировать активность NO-синтазы с помощью L-NAME (200 мкМ), то, как и при воздействии на р-ГЦ, полностью устраняется микрореологический эффект CORM-3 (табл. 3). Более того, под влиянием отдельно L-NAME агрегация эритроцитов даже возрастала на 16%, и добавление CORM-3 не устраняло повышения ПАЭ (табл. 3).

Необходимо заметить, что замена цитоплазмы в эритроцитах на раствор Рингера в их восстановленных тенях должна привести к удалению р-ГЦ. Однако это не изменило микрореологические ответы на CORM-3 и на одновременное воздействие ODQ + CORM-3. Так, например, добавление в среду инкубации ингибитора р-ГЦ полно-

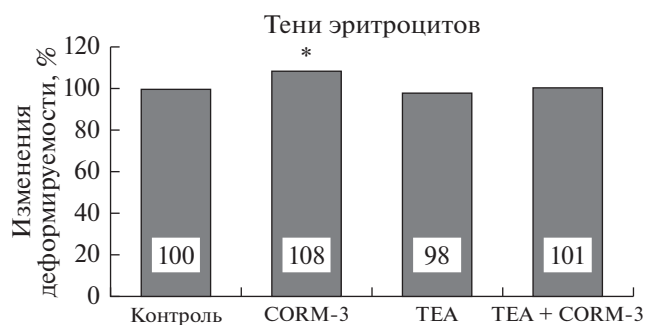


Рис. 3. Относительные (в % к контролю) изменения деформируемости восстановленных теней эритроцитов после их инкубации с CORM-3 и в сочетании с блокатором Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов TEA. * – Отличие от контроля статистически значимо ($p < 0.01$).

Таблица 3. Изменение микрореологических характеристик эритроцитов после их инкубации с донором СО (CORM-3), *L*-NAME по отдельности и при их одновременном добавлении ($M \pm m, n = 20$)

| Показатель | Контроль | CORM-3 | <i>L</i> -NAME | <i>L</i> -NAME + CORM-3 |
|---------------|-------------|---------------|----------------|-------------------------|
| ИУЭ, отн. ед. | 1.95 ± 0.03 | 2.09 ± 0.02** | 1.95 ± 0.03 | 1.96 ± 0.03 |
| ПАЭ, отн. ед. | 4.50 ± 0.34 | 3.85 ± 0.29** | 5.22 ± 0.42 | 4.91 ± 0.84 |

** Отличия от значений в контроле статистически значимы ($p < 0.01$).

стью устраняло прирост деформируемости теней эритроцитов (рис. 4а).

Сходный результат был получен при инкубации теней эритроцитов с *L*-NAME и при совместном воздействии *L*-NAME + CORM-3. Прирост деформируемости под влиянием CORM-3 на 9% ($p < 0.01$) устранялся добавлением ингибитора NOS (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Донор монооксида углерода, например CORM-3, высвобождает молекулы СО, что обеспечивает доставку контролируемых количеств СО для регуляции работы биологических систем [22]. Результаты данного исследования показали, что CORM-3 заметно повышает эластичность мембран эритроцитов и их деформируемость в целом. Вместе с выраженным снижением агрегации это может существенно сказываться на перфузии тканей [7, 8]. Изменение мембранной эластичности теней эритроцитов под влиянием донора СО было достоверно большим, и разница относительно контроля составила 0.143 ± 0.01 отн. ед., тогда как у интактных клеток прирост ИУЭ был равен $0.100 \pm \pm 0.01$ отн. ед. Это различие в 0.043 отн. ед. было статистически достоверным ($p < 0.05$). Разница в мембранной эластичности может быть обусловлена тем, что имеющийся в интактных эритроцитах ге-

моглобин связывает выделившийся из CORM-3 СО как сигнальную молекулу [23], чего не происходит в тенях клеток с удаленной цитоплазмой и гемоглобином.

В качестве одной из основных молекулярных мишеней для СО в клетках рассматривают K_{Ca} -каналы [4]. Когда СО взаимодействует с гемом, это приводит к увеличению связывания Ca^{2+} с каналом, причем и СО может напрямую воздействовать на активность K_{Ca} -каналов, связываясь в нескольких центрах [20]. При блокировании этих каналов с помощью ТЕА происходило существенное уменьшение эффективности действия СО на деформируемость эритроцитов и их теней и полное устранение его снижающего агрегацию влияния. Важно заметить, что СО активирует K_{Ca} -каналы не только на интактных клетках, а также в изолированных фрагментах плазматической мембраны. Это происходит в условиях, когда цитозольные сигнальные белки отсутствуют, а киназы неактивны, свидетельствуя о прямом действии СО на K_{Ca} -каналы [24]. Кроме того, СО, так же как и NO, способен стимулировать р-ГЦ, тем самым повышая уровень сGMP в клетках. Это ведет, например, к вазодилатации и угнетению агрегации тромбоцитов [1, 25, 26]. Вполне вероятно, что в эритроцитах используются оба этих сигнальных пути для реализации эффектов СО.

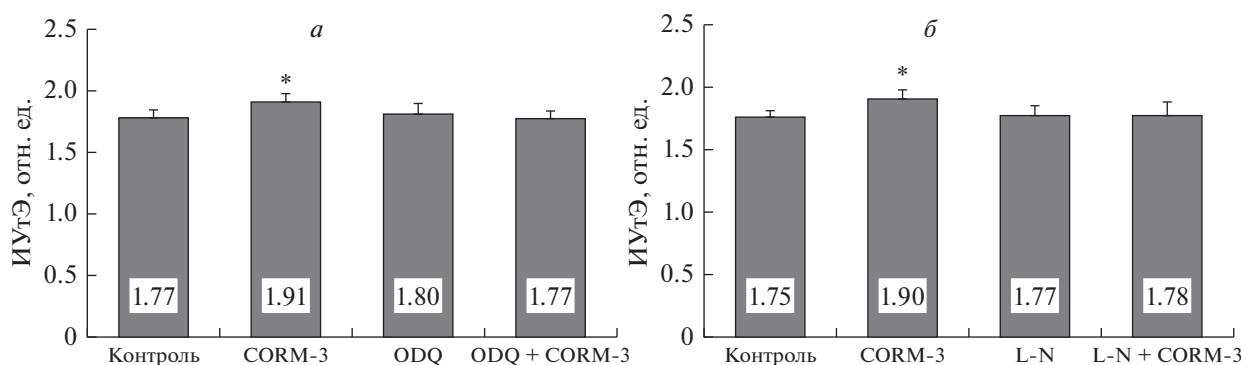


Рис. 4. Относительные (в % к контролю) изменения деформируемости восстановленных теней эритроцитов после их инкубации с CORM-3 и в сочетании с ODQ (а) и CORM-3 в сочетании *L*-NAME (*L*-N). * – Отличие от контроля статистически значимо ($p < 0.01$).

Наряду с вышеприведенными данными об эффекте блокирования K_{Ca} -каналов, ингибирование р-ГЦ с помощью ODQ сопровождалось практически полным устранением микрореологических ответов эритроцитов и их теней на CORM-3. Анализ выраженного снижения агрегации под влиянием донора СО позволяет предполагать, что изменение этой микрореологической характеристики эритроцитов реализуется через активацию р-ГЦ с последующим снижением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [1]. Известно, что поступление Ca^{2+} в эритроциты и/или тромбоциты сопровождается выраженным приростом агрегации этих клеток [15, 27]. Тогда как блокирование его входа или связывание во вне- или внутриклеточной среде хелаторами, напротив, ингибирует агрегацию эритроцитов [28].

Интересно заметить, что и при инкубации тень эритроцитов с CORM-3 на фоне ингибитора р-ГЦ также не было выявлено прироста деформируемости. Имеются данные о том, что СО может ингибировать образование NO в клетках, и эти газотрансмиттеры могут проявлять уникальные взаимодействия [29]. Действительно, при ингибировании ключевого фермента образования оксида азота NO-синтазы с помощью *L*-NAME устранялись положительные микрореологические эффекты донора СО. Более того, сам ингибитор (*L*-NAME) заметно повышал агрегацию эритроцитов. Известно, что активация NOS связана с системой кальций-кальмодулин [30], и нарушение их взаимодействия под влиянием *L*-NAME может способствовать повышению концентрации свободного Ca^{2+} в эритроцитах и, как следствие этого, — усилению агрегации [28, 31].

Таким образом, получены данные о положительном влиянии донора монооксида углерода на микрореологические свойства эритроцитов. Был выявлен умеренный, но статистически достоверный прирост мембранной эластичности, подтвержденный как в микрореологических ответах интактных эритроцитов, так и их восстановленных теней. Донор СО значительно снижал агрегацию эритроцитов. Что касается молекулярных мишеней, то результаты опытов позволяют заключить, что эффекты СО могут реализоваться как через активацию K_{Ca} -каналов, так и при участии NO/cGMP сигнального пути.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-515-00019 Бел_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Truss N.J., Warner T.D. 2011. Gasotransmitters and platelets. *Pharmacol. Ther.* **132**, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.07.001>
- Wang R. 1998. Resurgence of carbon monoxide: An endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**, 1–15. <https://doi.org/10.1139/cjpp-76-1-1>
- Wu L., Wang R. 2005. Carbon monoxide: Endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol. Rev.* **57** (4), 585–630. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.3>
- Wang R., Wu L. 1997. The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 8222–8226. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8222>
- Wang R., Wang Z.Z., Wu L. 1997. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 927–934. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701222>
- Durante W., Peyton K.J., Schafer A.I. 1999. Platelet-derived growth factor stimulates heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2666–2672. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.11.2666>
- Pries A.R., Secomb T.W. 2003. Rheology of the microcirculation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **29**, 143–148.
- Popel A.S., Johnson P.C. 2005. Microcirculation and hemorheology. *Annu. Rev. Fluid. Mech.* **37**, 43–69. <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.37.042604.133933>
- Guo Q., Duffy S.P., Matthews K. 2014. Microfluidic analysis of red blood cell deformability. *J. Biomech.* **47**, 1767–1776. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.03.038>
- Mohandas N., Gallagher P.G. 2008. Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood.* **112**, 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Uyuklu M., Meiselman H.J., Baskurt O.K. 2009. Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide. *Nitric Oxide.* **21**, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.03.004>
- Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. 2003. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, 1577–1584. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00665.2002>
- Mozar A., Connes P., Collins B., Hardy-Dessources M.D., Romana M., Lemonne N., Bloch W., Grau M. 2016. Red blood cell nitric oxide synthase modulates red blood cell deformability in sickle cell anemia. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **64**, 47–53. <https://doi.org/10.3233/CH-162042>
- Muravyov A.V., Antonova N., Tikhomirova I.A. 2019. Red blood cell micromechanical responses to hydrogen sulfide and nitric oxide donors: Analysis of crosstalk of two gasotransmitters (H_2S and NO). *Series on Biomechanics.* **33**, 34–40.
- Gao L., Cheng C., Sparatore A., Zhang H., Wang C. 2015. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggre-

- gation in vitro in part by interfering gap junction channels: Effects of ACS14, a hydrogen sulfide-releasing aspirin. *Heart Lung Circ.* **24**, 77–85.
<https://doi.org/10.1016/j.hlc.2014.05.019>
16. Irwin C., Roberts W., Naseem K.M. 2009. Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: The potential role for S-nitrosylation. *Platelets.* **20**, 478–486.
<https://doi.org/10.3109/09537100903159375>
 17. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. 1963. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 119–130.
 18. Artmann G.M. 1995. Microscopic photometric quantification of stiffness and relaxation time of red blood cells in a flow chamber. *Biorheology.* **32**, 553–570.
[https://doi.org/10.1016/0006-355X\(95\)00032-5](https://doi.org/10.1016/0006-355X(95)00032-5)
 19. Cokelet G.B., Meiselman H.J. 1968. Rheological comparison of hemoglobin solutions and erythrocyte suspensions. *Science.* **162**, 275–277.
 20. Jaggar J.H., Li A., Parfenova H., Liu J., Umstot E.S., Dopico A.M., Leffler C.W. 2005. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Circ Res.* **97**, 805–812.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000186180.47148.7b>
 21. Morita T., Perrella M.A., Lee M.E., Kourembanas S. 1995. Smooth muscle cell derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 1475–1479.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1475>
 22. Soboleva T., Berreau L.M. 2019. 3-Hydroxyflavones and 3-hydroxy-4-oxoquinolines as carbon monoxide-releasing molecules. *Molecules.* **24**, pii: E1252.
<https://doi.org/10.3390/molecules24071252>
 23. Furchgott R.F., Jothianandan D. 1991. Endothelium-dependent and -independent vasodilatation involving cyclic GMP: Relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels.* **28**, 52–61.
<https://doi.org/10.1159/000158843>
 24. Leffler Ch.W., Parfenova H., Jonathan H. Jaggar J.H. 2011. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H1–H11.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00230.2011>
 25. Durante W. 2002. Carbon monoxide and bile pigments: Surprising mediators of vascular function. *Vasc. Med.* **7**, 195–202.
<https://doi.org/10.1191/1358863x02vm424ra>
 26. Bełtowski J., Jamroz A., Borkowska E. 2004. Heme oxygenase and carbon monoxide in the physiology and pathology of the cardiovascular system. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).* **58**, 83–99.
 27. Oonishi T., Sakashita K., Uyesaka N. 1997. Regulation of red blood cell filterability by Ca^{2+} influx and cAMP-mediated signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **273**, 1828–1834
 28. Muravyov A.V., Tikhomirova I.A. 2012. Role Ca^{2+} in mechanisms of the red blood cells microrheological changes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **740**, 1017–1038.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_47
 29. Johnson F.K., Teran F.J., Prieto-Carrasquero M., Johnson R.A. 2002. Vascular effects of a heme oxygenase inhibitor are enhanced in the absence of nitric oxide. *Am. J. Hypertens.* **15**, 1074–1080.
[https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(02\)03062-5](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(02)03062-5)
 30. Kampoli A., Tousoulis D., Tentolouris C., Stefanadis Ch. 2012. Novel agents targeting nitric oxide. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **10**, 61–76.
<https://doi.org/10.2174/157016112798829805>
 31. Муравьев А.В., Михайлова С.Г., Тихомирова И.А. 2014. Роль внутриклеточных сигнальных систем в изменениях микрореологических свойств эритроцитов. *Биол. мембраны.* **31**, 270–277.
<https://doi.org/10.7868/S0233475514040069>

Effects of Carbon Monoxide on Microrheology and Elasticity of Erythrocyte Membranes

A. V. Muravyov^{1, *}, I. A. Tikhomirova¹, S. V. Bulaeva¹,
E. P. Petrochenko¹, and Yu. V. Malysheva¹

¹Ushinski State Pedagogical University, Yaroslavl, 150000 Russia

*e-mail: alexei.47@mail.ru

Oxygen delivery to tissue microregions depends not only on vascular factors, but also on the erythrocytes — transporters of respiratory gases. Although the influence of gas transmitters on the microrheology of blood cells is not in doubt, the available data mainly concern the effects of nitric oxide (NO) on the elasticity of the erythrocyte membrane. There is much less information on the effects of H_2S , and there are no data at all on the signaling role of carbon monoxide (CO) in erythrocyte microrheology. The aim of this work was to study microrheological responses of erythrocytes to CO. The microrheological characteristics of erythrocytes were studied in control conditions and in the presence of the CO donor CORM-3 in combination with a number of inhibitors, including the soluble guanylate cyclase inhibitor ODQ, the inhibitor of NO synthase L-NAME, and the blocker of Ca^{2+} -dependent potassium (K_{Ca}) channels TEA. Erythrocyte deformability index (EDI) and aggregation index of erythrocytes (AIE) were recorded in control conditions and after the incubation with these compounds. Besides, changes in microrheology induced by these preparations in recovered erythrocyte ghosts were evaluated. In the presence of CORM-3, erythrocytes showed an increase in EDI by 9% ($p < 0.01$).

The increase in EDI in erythrocyte ghosts caused by the CO donor was 10% ($p < 0.01$). Under these conditions, AIE decreased by 41% ($p < 0.01$). Blocking K_{Ca} channels by TEA resulted in a significant suppression of the CO-dependent increase in EDI and completely eliminated the effect of CO on erythrocyte aggregation. Inhibition of the NO-associated signaling pathway by ODQ and *L*-NAME eliminated the microrheological effects of CORM-3. The obtained results indicate that CO is able to positively influence the microrheological characteristics of erythrocytes by increasing their elasticity and deformability and inhibiting their ability to aggregate. The regulatory effects of CO can be realized with the participation of K_{Ca} channels and the NO/cGMP signaling cascade.

Keywords: erythrocytes, deformability, aggregation, gas transmitters, carbon monoxide, soluble guanylate cyclase, Ca^{2+} -activated K^+ channels

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352.465

**EX VIVO МОНИТОРИНГ СТИМУЛ-ЗАВИСИМОЙ
СЕКРЕЦИИ АТР ВКУСОВЫМИ КЛЕТКАМИ**

© 2021 г. А. А. Хохлов^а, О. А. Рогачевская^{а, *}

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Поступила в редакцию 02.12.2020 г.

После доработки 28.12.2020 г.

Принята к публикации 12.01.2021 г.

Распознавание вкусовых молекул обеспечивается специализированными рецепторами, функционирующими на рецептирующей апикальной мембране вкусовых клеток, обращенной во вкусовую пору. Вкусовая трансдукция завершается кодированием сенсорной информации в форме стимул-зависимого выброса афферентного нейротрансмиттера, стимулирующего вкусовую нерв. Основным нейромедиатором периферической вкусовой системы является АТР. Синаптическая передача во вкусовых клетках типа II основана не на каноническом Ca^{2+} -зависимом экзоцитозном механизме секреции, а обеспечивается Ca^{2+} -независимым выбросом АТР через АТР-проницаемые ионные каналы базолатеральной мембраны. Этот процесс изучался на уровне одиночных клеток типа II, и был выявлен ряд закономерностей секреции АТР. Между тем, при исследовании стимул-зависимости выброса АТР на уровне одиночных клеток или изолированных вкусовых почек практически невозможно стимулировать только апикальную мембрану клеток. Поэтому в таких экспериментах существует вероятность неспецифических эффектов вкусовых соединений. Для исследования секреции АТР вкусовыми клетками в условиях физиологически адекватной стимуляции нами разработан экспериментальный подход, основанный на использовании экспериментальной камеры, представляющей собой модификацию камеры Уссинга. Камера состояла из двух перфузируемых отсеков, между которыми зажимался и плотно изолировался фрагмент языкового эпителия, содержащий желобоватый вкусовой сосочек. Вкусовые стимулы подавались через верхний отсек, в который была обращена наружная часть эпителия. Базальная часть вкусовых почек была обращена в нижний отсек, заполняемый люциферин-люциферазной смесью для детекции выброса АТР. Данный подход впервые позволил в режиме реального времени наблюдать выброс АТР вкусовыми клетками в ответ на стимуляцию вкусовыми веществами, доступными только для апикальной мембраны.

Ключевые слова: вкусовой рецепторный эпителий, секреция АТР, люциферин-люциферазный метод

DOI: 10.31857/S023347552103004X

ВВЕДЕНИЕ

Вкусовые рецепторные клетки типа II являются основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, специализирующимися в распознавании горького, сладкого и аминокислот. Эти клетки экспрессируют гептаспиральные вкусовые рецепторы (G-protein coupled receptor, GPCR), формирующие два подсемейств T1R и T2R. Эти рецепторы и сопряженные сигнальные системы функционируют на апикальной мембране, которая экспонирована во вкусовую пору и выполняет функцию рецепции вкусового стимула. Согласно современным представлениям [1], трансдукция вкусового сигнала во вкусовых клетках типа II включает следующие основные внутриклеточные события. При связывании молекул вкусовых веществ вкусовые

GPCR сопрягаются G-белком с фосфолипазой PLC β 2, которая катализирует гидролиз фосфолипида PIP $_2$, производя два вторичных медиатора: растворимый IP $_3$ и липидный DAG. Далее IP $_3$ стимулирует выброс депонированного Ca^{2+} при участии IP $_3$ -рецептора (тип III). Стимул-зависимое повышение внутриклеточного Ca^{2+} обеспечивает активацию Ca^{2+} -зависимых катионных каналов TRPM5 базолатеральной мембраны и генерацию деполяризующего рецепторного потенциала. Последний стимулирует потенциал-зависимые Na $^+$ -каналы, инициируя генерацию серии потенциалов действия и выброс афферентного нейромедиатора АТР [1–4].

Внутриклеточный Ca^{2+} выступает в роли вторичного посредника при передаче сенсорного сиг-

нала и в других сенсорных клетках. Так, в нейронах вомероназального органа GPCR феромонов сопряжены с PLC β 2 (или PLC β 4), и в процессе трансдукции происходит IP $_3$ -зависимый выброс депонированного Ca $^{2+}$, ключевым является DAG-зависимый вход наружного Ca $^{2+}$ через DAG-активируемые катионные каналы TRPC2 [5]. Хотя в данном случае именно фосфоинозитидный каскад обеспечивает сопряжение рецепторов феромонов с клеточным ответом, как и во вкусовых клетках, считается, что во вкусовой трансдукции Ca $^{2+}$ -сигнализация обеспечивается за счет выброса депонированного Ca $^{2+}$ при пренебрежимо малом вкладе входа наружного Ca $^{2+}$ [1, 4]. Поскольку выделение индивидуальных вкусовых клеток сопряжено с достаточно жесткими ферментативными и механическими воздействиями, можно думать, что сохранение функциональности апикальной мембраны, включая функциональность Ca $^{2+}$ -проницаемых ионных каналов, не идентифицированных до настоящего времени, представляет собой одну из проблем физиологии вкусовых клеток. С этой точки зрения представляется целесообразным выполнять исследования вкусовой трансдукции с использованием не только препаратов диссоциированных вкусовых почек, но и более интегральных препаратов, в которых рецептирующая мембрана и ассоциированные молекулярные структуры более сохранены и функциональны.

Один из таких препаратов был описан в работе [2], в которой для исследования секреции АТР использовалась камера Уссинга [6] для анализа секреции АТР фрагментами языкового эпителия, содержащих либо желобоватый, либо листовидный вкусовой сосочек. Базолатеральная сторона эпителия располагалась в резервуаре с буферным раствором, который после стимуляции собирался, смешивался с люциферин-люциферазым реагентом и анализировался на люцинометре. Эта методика позволила статистически продемонстрировать рост выброса АТР фрагментами эпителия со вкусовыми почками в ответ на однократную стимуляцию смесью горьких веществ по сравнению с фрагментами без вкусовой ткани [2]. Тем не менее, такой подход фактически лишен внутреннего контроля по схеме контроль-воздействие-контроль. В данной работе мы модифицировали описанный выше подход и устранили указанный недостаток, обеспечив мониторинг секреции АТР в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение вкусового эпителия языка мыши, содержащего желобоватый вкусовой сосочек, про-

водилось по стандартной методике [3]. Смесь ферментов (1.1 мг/мл коллагеназы Б, 1.2 мг/мл диспазы II, 0.2 мг/мл эластазы (Worthington, США), 0.5 мг/мл ингибитора трипсина (Sigma–Aldrich, США) в растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 10 KCl, 1 CaCl $_2$, 1 MgCl $_2$, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7.8), инъецировалась под эпителий изолированного языка. Затем язык инкубировался 35 мин в бескальциевом растворе, содержащем (мМ): 120 NaCl, 20 KCl, 0.7 CaCl $_2$, 1.1 MgCl $_2$, 1 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7.4). После инкубации эпителий подрезался и отделялся от мышечной ткани. Участок эпителия языка с желобоватым сосочком помещался в физиологический раствор, содержащий (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl $_2$, 1 CaCl $_2$, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7.4), и затем крепился в камере Уссинга так, чтобы апикальная часть эпителия была обращена в верхний отсек камеры.

Мониторинг выброса АТР вкусовыми клетками осуществлялся в модифицированной камере Уссинга [6], которая состояла из двух перфузируемых отсеков, между которыми зажимался и плотно изолировался фрагмент языкового эпителия, содержащего желобоватый вкусовой сосочек. Раствор для перфузии апикальной стороны эпителия содержал (мМ): 50 NaCl, 20 KCl, 4 CaCl $_2$, 0.5 MgCl $_2$, 5 HEPES (pH 7.6) [8]. Нижняя ячейка заполнялась физиологическим раствором, содержащим 10 мкМ калиевой соли люциферина и 0.1 мкг/л рекомбинантной люциферазы (Sigma–Aldrich, США). Хемилюминесценция люциферин-люциферазной смеси регистрировалась микрофотометром Model 814 (PTI, США), работающим в режиме счета фотонов и подключенным к компьютеру через интерфейсный модуль BrightBox (PTI, США). Фотоотчеты регистрировались и анализировались с помощью программного обеспечения Felix32 (PTI, США). Полученные данные обрабатывались в программе SigmaPlot 11 (Systat Software, США).

Эксперименты проводились при комнатной температуре (23–25°C). Соли, HEPES и вкусовые стимулы приобретались у фирмы Sigma–Aldrich.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты проводились с использованием экспериментальной камеры, представляющей собой модификацию камеры Уссинга [6], которая широко использовалась, например, для измерения транспорта ионов, питательных веществ и лекарств через эпителиальные ткани [7], а также для анализа выброса гормонов тканями двенадцатиперстной кишки [8]. Разработанная нами камера монтировалась на микрофотометре и состояла из

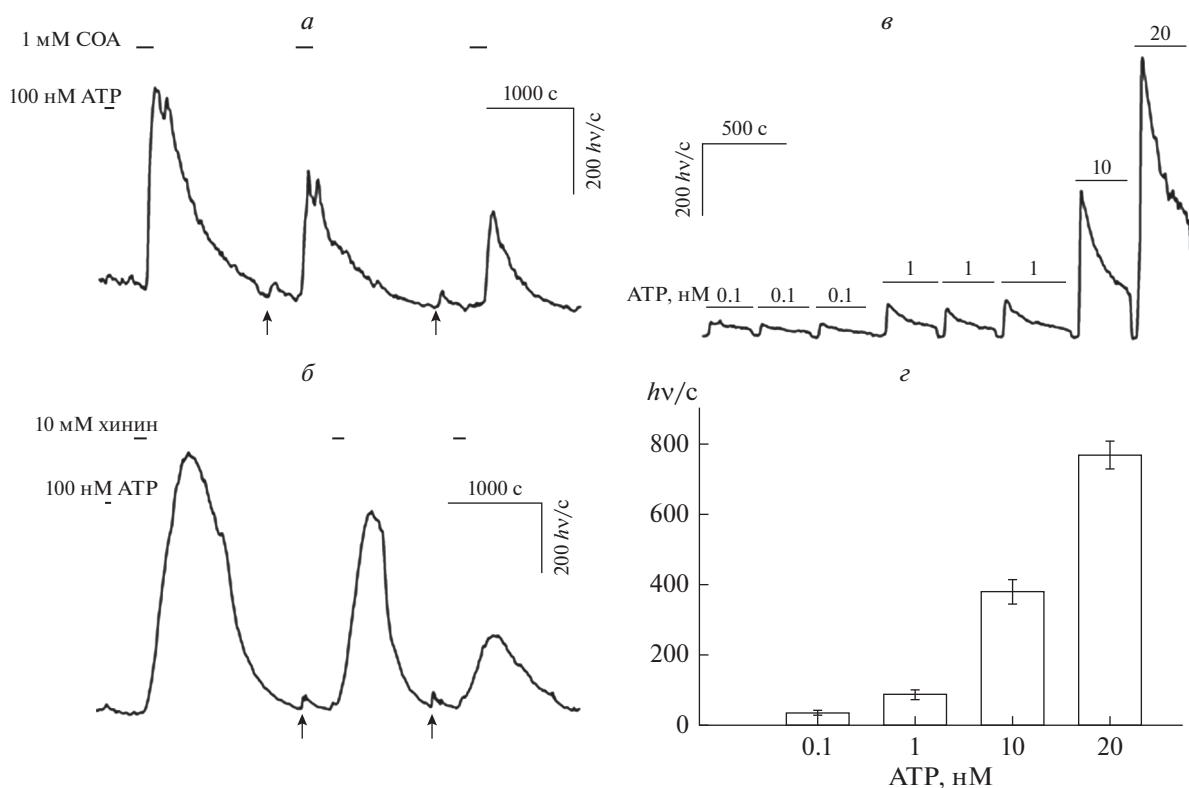


Рис. 1. Регистрация хемилюминесцентного сигнала люциферин-люциферазной смеси в нижнем отсеке камеры. *а, б* – On-line регистрация сигнала, обусловленного выбросом АТФ вкусовым эпителием при кратковременной аппликации на апикальную поверхность эпителия 1 мМ октаацетат сахарозы (СОА) (*а*) и 10 мМ гидрохлорида хинина (*б*). Время и продолжительность аппликаций указаны линиями над экспериментальной кривой, моменты замены смеси люциферин-люциферазы в нижнем отсеке камеры указаны стрелками под экспериментальной кривой. *в* – Регистрация хемилюминесцентного сигнала при подаче раствора люциферин-люциферазы с известными концентрациями АТФ; время и продолжительность подач раствора люциферин-люциферазы в нижний отсек камеры указаны линиями над экспериментальной кривой. *г* – Калибровочная диаграмма, отражающая средние пиковые значения уровня хемилюминесценции в нижнем отсеке.

двух независимо перфузируемых отсеков, между которыми плотно фиксировался эпителий. Наружная часть эпителия, а значит и апикальные участки мембран вкусовых клеток, была экспонирована в верхний отсек камеры. Перед началом регистрации в течение 30–40 мин производилась непрерывная перфузия обоих отсеков камеры апикальным и физиологическим растворами соответственно, для восстановления ткани после механических воздействий, связанных с закреплением ее между отсеками. После периода релаксации препарата, нижний отсек заполнялся люциферин-люциферазной смесью, что, как правило, позволяло наблюдать стабильную базальную хемилюминесценцию низкого уровня, видимо, вызванную спонтанным окислением люциферина. Конструкция камеры и система перфузии обеспечивала минимальное гидростатическое давление на эпителий и позволяла в процессе регистрации производить быструю, без гидравлического удара, смену раствора в верхнем отсеке над апикаль-

ной стороной эпителия. Это обеспечивало отсутствие артефактов, связанных с механическими возмущениями эпителия, которые могли вызывать выброс АТФ из эпителиальной ткани, и позволяло выполнять серию аппликаций на одном препарате. Для предотвращения паразитной засветки во время экспериментов камера с фотометром располагалась в светонепроницаемом боксе, установленном в затемненном помещении. В начале каждой регистрации герметичность камеры с закрепленным эпителием и целостность последнего проверялись краткой (15–20 с) подачей раствора 100 нМ АТФ в верхний отсек камеры. При наличии повреждений или неплотной фиксации эпителия в камере это приводило к быстрому проникновению АТФ в нижний отсек и вызывало большой по амплитуде хемилюминесцентный сигнал. В таких случаях эксперимент останавливался, и в камере монтировался новый вкусовой эпителий.

Поскольку в желобоватом вкусовом сосочке доминируют горько-чувствующие вкусовые клет-

ки, в описываемых экспериментах использовались вещества, вызывающие горький вкус, в частности – гидрохлорид хинина (10 мМ) и октаацетат сахарозы (1 мМ). Стимуляция эпителия проводилась путем кратковременной (30–50 с) смены контрольного раствора в верхнем отсеке камеры на раствор, содержащий горькое соединение в требуемой дозе. Аппликация вкусовых стимулов приводила к выбросу АТР эпителием и генерации хемилюминесцентного сигнала в нижнем отсеке камеры (рис. 1а, 1б). Интервал времени между подачей вкусового стимула и максимумом хемилюминесцентного ответа люциферин-люциферазной смеси составил 30–100 с. После восстановления базового уровня хемилюминесценции производилась смена смеси люциферин-люциферазы в нижнем отсеке камеры (стрелки на рис. 1а, 1б), чтобы при последующих регистрациях избежать падения амплитуды ответов вследствие снижения концентрации активных реагентов люциферин-люциферазной смеси.

Для количественной оценки эффективной концентрации АТР, выделенного эпителием при стимуляции, после завершения каждого эксперимента проводились калибровочные измерения. Для этого поочередно осуществлялась отмывка нижнего отсека физиологическим раствором с последующим заполнением раствором люциферин-люциферазы с известной концентрацией АТР (рис. 1в). По пиковым значениям уровня хемилюминесценции строилась калибровочная диаграмма как функция средней концентрации АТР в нижнем отсеке (рис. 1з). Согласно полученным при калибровочных измерениях результатам при данных условиях регистрации и составе люциферин-люциферазной смеси, минимальная регистрируемая средняя концентрация АТР составила приблизительно 0.1 нМ. Основываясь на калибровке (рис. 1з), эффективная концентрация АТР, достигавшаяся в нижнем отсеке камеры за счет секреции нуклеотида желобоватым сосочком в ответ на трехкратную вкусовую стимуляцию 10 мМ гидрохлорида хинина (рис. 1а) составила около 24, 14 и 3 нМ; и в случае 1 мМ октаацетата сахарозы (рис. 1б) – 15, 8, 3 нМ.

Разработанная нами методика мониторинга выброса АТР вкусовым эпителием путем регистрации хемилюминесценции в режиме реального времени с помощью модифицированной циркуляционной камеры Уссинга обеспечила достаточно высокую чувствительность регистрации, соответствующую эффективной концентрации АТР порядка 0.1 нМ (при соотношении сигнал/шум равном 1), и позволила регистрировать серию выбросов АТР одним препаратом, стимулируемым последовательной аппликацией кратковременных

горьких стимулов. Методика позволяла сохранять жизнеспособность вкусовой ткани и ее способность отвечать на горькие вещества в течение длительного (до 2 ч) эксперимента, хотя при этом наблюдалось постепенное снижение (рандаун) амплитуды ответов (рис. 1а, 1б), возможно, из-за истощения запаса АТР в клетках и/или снижения эффективности каскада трансдукции и механизма секреции. В дальнейшем данная методика может быть использована для анализа физиологических эффектов различных соединений, включая вкусовые вещества и модуляторы активности вкусовых GPCR.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-04-01035 (рук. О.А. Рогачевская).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taruno A., Nomura K., Kusakizako T., Ma Z., Nureki O., Foskett J.K. 2021. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **473**, 3–13.
2. Finger T.E., Danilova V., Barrows J., Bartel D.L., Vigers A.J., Stone L., Hellekant G., Kinnamon S.C. 2005. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*. **310** (5753), 1495–1499.
3. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jiang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. 2007. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* **26** (3), 657–667.
4. Romanov R.A., Lasher R.S., High B., Savidge L.E., Lawson A., Rogachevskaja O.A., Zhao H., Rogachevsky V.V., Bystrova M.F., Churbanov G.D., Adameyko I., Harkany T., Yang R., Grahame J.K., Marambaud P., Kinnamon J.C., Kolesnikov S.S., Finger T.E. 2018. Chemical synapses without synaptic vesicles: Purinergic neurotransmission through a CALHM1 channel-mitochondrial signaling complex. *Sci. Signal.* **11** (529), pii: eaao1815.
5. Zufall F., Ukhanov K., Lucas P., Leinders-Zufall T. 2005. Neurobiology of TRPC2: From gene to behavior. *Pflügers Archiv.* **451** (1), 61–71.
6. Ussing H.H., Zerahn K. 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta. Physiol. Scand.* **23**, 110–127.
7. He L., Yin Y., Li T., Huang R., Xie M., Wu Z., Wu G. 2013. Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. **18**, 1266–1274.
8. Geraedts M.C., Troost F.J., De Ridder R.J., Bodelier A.G., Masclee A.A., Saris W.H. 2012. Validation of Ussing chamber technology to study satiety hormone release from human duodenal specimens. *Obesity*. **20** (3), 678–682.
9. Shannon I.L., Suddick, R.P., Dowd Jr.F.J. 1974. Saliva: Composition and secretion. Monographs in oral science. Basel: Karger, **2**, p. 1–2.

***Ex Vivo* Monitoring of Stimulus-Dependent ATP Secretion by Taste Cells**

A. A. Khokhlov¹ and O. A. Rogachevskaja^{1, *}

¹*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com*

Recognition of taste molecules in the taste pore is performed by special receptors in the apical membrane of taste cells, which provide coding of sensory information in the form of a stimulus-dependent release of an afferent neurotransmitter that stimulates the taste nerve. The main neurotransmitter of the peripheral gustatory system is ATP. At the cellular level, it has been shown that stimulus-dependent ATP secretion by type II cells is a non-canonical Ca^{2+} -independent release through ATP-permeable ion channels located in the basolateral membrane. In single cell experiments it is practically impossible to stimulate only the apical membrane of cells; however, this is feasible when registering the activity of the taste epithelium due to the physical isolation of the apical and basolateral parts. We used a modernized Ussing chamber providing an opportunity to stimulate separately the apical part of taste cells exposed to the upper cell of the chamber and to detect ATP secreted from the basal part of the epithelium into the lower cell of the chamber filled with a mixture of luciferin luciferase. The developed experimental scheme allowed on-line recording of a series of ATP release by the taste epithelium in response to stimulation of the apical part of the epithelium with bitter taste substances.

Keywords: taste epithelium, ATP secretion, luciferin luciferase assay

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0233475519020087

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Журнал *Биологические мембраны* публикует статьи, обзоры и краткие сообщения, освещающие различные, прежде всего физико-химические и молекулярные аспекты функционирования клеток и клеточных систем. Приоритетными являются работы в области клеточной и молекулярной мембранологии и биофизики, а также работы, в которых представлены клеточные и молекулярные аспекты физиологии, фармакологии, иммунологии и медицины. Журнал принимает как экспериментальные, так и теоретические работы в указанных направлениях.

Приветствуются экспериментальные работы, в которых исследуются связь между структурой и функцией мембран, молекулярные механизмы мембранного транспорта, рецепторные системы и внутриклеточная сигнализация, клеточные функции и клеточные патологии, ассоциированные с плазматической мембраной клеток (рецепторы, ионные каналы, экзоцитоз, эндоцитоз, фагоцитоз, межклеточные контакты и др.) и с мембранами внутриклеточных структур (биоэнергетика, фотосинтез, ядерно-цитоплазматические отношения, апоптоз, Ca^{2+} -сигнализация и др.).

Предпочтение отдается теоретическим работам, в которых рассматриваются физико-химические свойства мембранных систем в рамках моделей различного уровня детализации, моделируются структура и динамика молекулярных систем, функционирующих в биологических мембранах и в клетке в целом, предлагаются математические модели сигнальных и регуляторных процессов, обеспечивающих жизнедеятельность клеток и клеточных систем.

Английская версия журнала называется “Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology” и распространяется издательством Springer (<http://www.springer.com>).

Типы публикаций. Основным типом публикаций является исследовательская статья, в которой представлены результаты оригинальных экспериментальных и теоретических работ. Рукопись должна преимущественно содержать новые, ранее не опубликованные данные. Допускается использование собственных, уже представленных материалов, если таковые были опубликованы в виде краткого сообщения или тезисов доклада. Ссылка на предварительное сообщение обязательна.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в кратком виде в разделе *Краткие сообщения*. Целесообразность такой внеочередной публикации долж-

на быть обоснована в письме, направляемом Главному редактору автором для корреспонденции. В случае принятия такая работа может быть опубликована в течение 3–4 месяцев.

Журнал публикует *обзоры* и *мини-обзоры*, отражающие существующие представления и важнейшие достижения в области мембранологии, биофизики и биологии клетки, молекулярной и клеточной физиологии, иммунологии и медицины.

Отправляя рукопись в журнал, автор гарантирует, что соответствующий материал (в оригинале или в переводе на другие языки или с других языков) ранее нигде не публиковался и не находится на рассмотрении для публикации в других журналах. Журнал поддерживает стандарты публикационной этики (<https://www.pleiades.online/ru/authors/publication-ethics/>) и просит авторов размещать в статье необходимую информацию, связанную с их соблюдением (<https://www.pleiades.online/ru/authors/guidlines/reference-information/>).

Рукописи необходимо отправлять через Издательский портал <https://publish.sciencejournals.ru/> или по электронной почте на адрес редакции: biomembranes2010@gmail.com.

ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Формат статей. Рукопись должна быть написана либо на русском, либо на английском языке. Текст печатается шрифтом Times New Roman (12 pt), через 1.5 интервала, с полями 3 см слева и 2.5 см сверху, справа и снизу. Объем исследовательской статьи (включая аннотацию, основной текст, таблицы, список литературы и подписи к рисункам) не должен превышать 8000 слов и 8 рисунков, обзора – 12000 слов и 8 рисунков, мини-обзора – 4000 слов и 3 рисунка, краткого сообщения – 2000 слов и 1 рисунок. Правила оформления рукописи размещены на сайте <https://www.pleiades.online/ru/authors/guidlines/prepare-electronic-version/>.

Рукопись надлежит представлять в электронном виде. Следует присылать единый прикрепленный файл, не превышающий 15 Мб, в формате MS Word (*.doc), содержащий текст, таблицы и рисунки (обычно черно-белые) в последовательности, изложенной ниже. При необходимости файлы рекомендуются сжимать в стандарте *WinZip* или *WinRAR*. Цветные иллюстрации принимаются по согласованию с редакцией.

Сопроводительные документы. Рукопись статьи должна сопровождаться: (а) письмом-направлением от автора для корреспонденции, в котором констати-

руется, что данная работа (название, авторы) направляется для опубликования в журнале *Биологические мембраны* и что все авторы согласны с направлением статьи в журнал; (б) заполненными бланками договоров о передаче авторского права на использование материалов для русской и английской версий журнала. Бланки договоров размещены на сайтах <https://www.sciencejournals.ru> и <https://www.pleiades.online>. В случае отклонения статьи договор в силу не вступает.

Сопроводительные документы принимаются в электронном виде. Письмо-направление от учреждения с подписью руководителя и печатью, заполненные и подписанные бланки договоров и титульная страница статьи (см. ниже) с подписями всех авторов сканируются и посылаются (biomembranes2010@gmail.com) в формате jpeg или pdf.

При наличии в авторском коллективе зарубежных соавторов их согласие индивидуально подтверждается письмом, посылаемым в редакцию по электронной почте (biomembranes2010@gmail.com) на имя Главного редактора.

Порядок представления материалов. При оформлении статьи необходимо придерживаться следующего порядка.

Титульная страница:

- индекс УДК (в левом верхнем углу);
- заглавие статьи (не более 150 знаков без пробелов);
- инициалы и фамилии авторов;
- полное название учреждения(ий), почтовый индекс, город, страна;
- инициалы и фамилия автора для корреспонденции с указанием почтового адреса, контактного телефона, факса, электронного адреса;

• ключевые слова (3–6);

• количество слов в основном тексте;

• количество таблиц;

• количество рисунков;

• подписи всех авторов.

Основной текст:

- индекс УДК (в левом верхнем углу);
- заглавие статьи (не более 150 знаков, не считая интервалы);

• инициалы и фамилии авторов;

• полное название учреждения(ий), почтовый индекс, город, страна;

• аннотация (до 300 слов)

• ключевые слова (3–6);

• введение

• материалы и методы;

• результаты;

• обсуждение (или результаты и обсуждение)

• благодарности (отдельный абзац без заголовка)

• таблицы (каждая на отдельной странице);

- подписи к рисункам (на отдельной странице);
- список цитированной литературы (на отдельной странице);

• резюме на английском языке или на русском, если основной текст представлен на английском (до 300 слов, на отдельной странице);

• рисунки (пронумерованные, каждый на отдельной странице).

Расположение основных материалов теоретической работы произвольно, хотя следует в целом придерживаться последовательности, изложенной выше. Уравнения должны быть напечатаны предпочтительно с помощью Microsoft Equation Editor. Не рекомендуется использование символов корней, вместо них должны использоваться дробные показатели степени. Двоеточие не должно использоваться как знак деления. Уравнения должны нумероваться с правой стороны в скобках. Символы должны быть определены при первом упоминании в тексте.

Математические модели должны быть представлены таким образом, чтобы для широкого круга читателей было понятно, какая система (молекулярная, клеточная и др.) или процесс моделируется, каковы исходные постулаты модели и целесообразность ее использования для описания процесса или системы, а также ограничения модели. Методы решения уравнений модели должны быть описаны в деталях, достаточных для их воспроизведения. Коммерческие программы и используемые в них алгоритмы должны быть упомянуты. Основополагающие детали вывода уравнений и/или их решения могут быть представлены в Приложении, помещаемом в конце работы.

Аннотация (не более 300 слов) обязательна для статьи (обзора) и должна давать ясное представление о сути работы, объектах и методах исследования, основных результатах и сделанных выводах.

Раздел **Материалы и методы** должен содержать информацию о методах исследования, достаточную для их ясного понимания и воспроизведения. Методы, описанные ранее, могут быть представлены в краткой форме и должны сопровождаться адекватными ссылками. Необходимо указывать квалификацию и источник основных реактивов; название (в оригинальной транскрипции) фирмы-изготовителя реактивов/оборудования и страна приводятся в скобках (Serva, Германия). Используемые статистические методы обработки данных, графические программы и т.п. также должны быть указаны.

Таблицы (и рисунки) нумеруются в порядке упоминания их в тексте. Каждая таблица должна иметь заголовок и, если необходимо, краткие пояснения к представленным данным (условия эксперимента, число экспериментов и т.п.).

Рисунки должны быть выполнены с разрешением не менее 300 dpi и в масштабе, допускающем их двукратное уменьшение без потери качества. В сложных рисунках со множественными

панелями каждую следует пометить курсивной буквой (*a, b, в ...*). На графиках следует использовать стандартные символы (▲ ▼ ● ○ ◆ □ ■). В нижней части рисунка необходимо указать его порядковый номер и фамилию первого автора.

Электронные версии штриховых рисунков и полутонных фотографий должны представляться в формате JPEG или TIFF.

Цитирование литературы. Ссылка на цитируемую работу дается в тексте цифрой в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Если ссылка на работу есть в таблице или в подписи к рисунку, ей присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Авторы несут полную ответственность за правильность цитирования работ. Последние должны быть либо опубликованными, либо принятыми в печать. Ссылки на тезисы докладов, диссертации, авторские свидетельства следует приводить только, если они являются единственным источником. Цитирования типа “неопубликованные данные” или “персональное сообщение” не должны включаться в список литературы, но допускаются в тексте (например, Прутков К.Ф., персональное сообщение). При этом предполагается, что авторы получили разрешение на цитирование в какой-либо форме.

Список цитированной литературы должен оформляться следующим образом:

Статья в журнале

Карпушев А.В., Павлов Т.С., Старушенко А.В. 2009. Регуляция эпителиальных натриевых каналов (ENaC) малыми G-белками и фосфатидилинозитидами. *Биол. мембраны*. **26** (4), 265–279.

Takeuchi H., Imanaka Y., Hirono H., Kurahashi T. 2003. Cross-adaptation between olfactory responses induced by two-subgroups of odorant molecules. *J. Gen. Physiol.* **122**, 255–264.

Книга

Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. 1980. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 320 с.

Hille B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 607 p.

Статья в книге

Леднев В.В. 1977. Исследование структуры актинсодержащих нитей методом дифракции рентгеновских лучей. В кн.: *Молекулярная и клеточная биофизика*. Ред. Франк Г.М. М.: Наука, с. 164–172.

Keating M.T. 1995. Molecular genetics of the long QT syndrome. In: *Ion channels and genetic diseases*. Eds Dawson D.C., Frizzell R.A. New York: The Rockefeller University Press, p. 53–60.

Статья, принятая в печать

Додонова С.О., Крупенина Н.А., Булычев А.А. 2010. Подавление H^+ -проводимости плазмалеммы на фоне высокой активности H^+ -насоса в клетках *Chara* под действием дитиотреитола. *Биол. мембраны* (в печати).

Во многих международных журналах статьи, принятые в печать, публикуются в электронном виде до выхода бумажной версии. При этом статьи идентифицируются с использованием DOI (digital object identifier), и их следует цитировать в оригинальном формате:

Komaki S., Abe T., Coutuer S., Inze D., Russinova E., Hashimoto T. 2010. Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in *Arabidopsis*. *J. Cell Sci.* doi 10.1242/jcs.062703

Если работы, которые цитировались как *в печати*, были опубликованы на момент получения корректуры, авторы должны внести необходимые исправления в список литературы.

Сокращения и аббревиатуры. Стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB (*Eur. J. Biochem.* 1977, **74** (1), 1–6), могут быть использованы непосредственно. Нестандартные сокращения химических соединений, сокращения общего характера разрешается вводить лишь в случае многократного употребления. Их следует ввести (в скобках) при первом же использовании сложного словосочетания в основном тексте статьи, например: активные формы кислорода (АФК).

Аббревиатуры или формулы химических соединений, употребляемые как прилагательные, пишутся через дефис: ИК-спектроскопия, ЖК-состояние, Na^+ -форма, ОН-группа, но группа ОН.

Размерности отделяются от цифры пробелом (100 кПА, 77 К), кроме градусов, процентов и промилле: 90°, 20°C (для градусов Цельсия 20°C, а не 20°), 45%, 10‰. Дробные размерности: 58 Дж/моль, 10 моль/л. Для более сложных размерностей допускается использование степеней, в том числе отрицательных; символы различных размерностей должны быть отделены пробелом: 9.8 м/с² или 9.8 м с⁻², 37 Дж моль⁻¹ град⁻¹. Единообразие написания размерностей в рукописи является обязательным.

При перечислении, а также в числовых интервалах размерность приводится лишь для последнего числа (10–30 Дж/моль, 22–25°C), за исключением угловых градусов (5°–10°, а не 5–10°). Размерности переменных пишутся через запятую (*E*, кДж/моль).

Специальные символы и цифры. Для печати специальных символов (греческие буквы, математические символы, графические символы и т.п.) следует использовать функцию *Insert Symbol* в редакторе *Microsoft Word*. Десятичные доли в числах отделяются точкой (3.14, а не 3,14).

Репринты. После выхода журнала издательство высылает авторам бесплатно PDF-файлы русской и английской версии статьи.

Адрес редакции: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии РАН, корп. 32, комн. 411, редакция журнала *Биологические мембраны*. Телефон редакции: 8(499)724-80-89. E-mail: biomembranes2010@gmail.com.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Сокращения часто употребляемых слов и терминов

| | | | |
|-------------------|--|--------------|------------------------------------|
| БЛМ | Бислойные (бимолекулярные) липидные мембраны | н. | Нормальный (раствор) |
| <i>втор-</i> | Вторичный | ОЕ | Оптическая единица |
| ВЭЖХ | Высокоэффективная жидкостная хроматография | ПААГ | Полиакриламидный гель |
| ГЖХ | Газожидкостная хроматография | п. о. | Пары оснований |
| ед. акт. | Единица активности | т. п. о. | Тысяча пар оснований |
| ИК | Инфракрасный | т. кип. | Температура кипения |
| КД | Круговой дихроизм | т. пл. | Температура плавления |
| КР | Комбинационное рассеяние | <i>трет-</i> | Третичный |
| КССВ | Константа спин-спинового взаимодействия | ТСХ | Хроматография в тонком слое |
| МЕ | Международная единица | УФ | Ультрафиолетовый |
| <i>м-, о-, п-</i> | <i>мета-, орто-, пара-</i> | ЭПР | Электронный парамагнитный резонанс |
| <i>н</i> | Нормальный (изомер) | ЯМР | Ядерный магнитный резонанс |

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

| | | | |
|----------------|---|---------------------------------|---|
| ДНК | Дезоксирибонуклеиновая кислота | FAD | Флавинадениндинуклеотид |
| ДНКаза | Дезоксирибонуклеаза | FCCP | Карбонилцианид-4-трифторметокси-фенилгидразон |
| РНК | Рибонуклеиновая кислота | FMN | Флавиномононуклеотид |
| РНКаза | Рибонуклеаза | GA | Грамицидин А |
| Трис | Трис(оксиметил)аминометан | Gpp(NH)p | Гуанозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат |
| ADP | Аденозин-5'-дифосфат | HEPES | 4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота |
| AMP | Аденозин-5'-фосфат | MES | 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота |
| сAMP | Аденозин-3',5'-циклофосфат | MOPS | 3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота |
| ANS | 1-Анилинафталин-8-сульфонат | NAD, NAD ⁺ , NADH | Никотинамидадениндинуклеотид и его окисленная и восстановленная формы |
| АТР | Аденозин-5'-трифосфат | NADP, NADP ⁺ , NADPH | Никотинамидадениндинуклеотид-фосфат и его окисленная и восстановленная формы |
| АТР-аза | Аденозинтрифосфатаза | P _i | Неорганический фосфат |
| СССР | Карбонилцианид- <i>м</i> -хлорфенилгидразон | PP _i | Неорганический пирофосфат |
| СМ-целлюлоза | Карбоксиметилцеллюлоза | poly(A) | (3'-5')Поли(адениловая кислота) |
| Con A | Конканавалин А | POPOP | 1,4-Бис[2-(5-фенил)оксазол]бензол |
| DCC | N,N'-дициклогексилкарбодимид | PPO | 2,5-Дифенилоксазол |
| DEAE-целлюлоза | Диэтиламиноэтилцеллюлоза | SDS | Додecilсульфат натрия |
| EDTA | Этилендиаминтетрауксусная кислота | TAPS | 3-{[2-Гидрокси-1,1-бис(гидрокси-метил)этил]амино}-1-пропансульфоновая кислота |
| EGTA | Этиленгликольбис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусная кислота | | |

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Символы для некоторых физических и химических величин и единицы их измерения

| Символ | Величина | Единица измерения |
|------------------------------------|--|--|
| m | Масса | г, мг, мкг и т.д. |
| M | Молекулярная масса | Да ^а (дальтон) |
| M_r | Относительная молекулярная масса | безразмерная |
| c_B или [B] | Концентрация вещества В | М (моль/л), mM и т.д. |
| n | Количество вещества | моль, нмоль, мкмоль и т.д. |
| s | Коэффициент седиментации | S (сведберг, 10^{-13} с) |
| T | Термодинамическая температура | К ^б (кельвин) |
| t | Температура по Цельсию | °C |
| E | Энергия | Дж или кал (4.1868 Дж) |
| P | Давление | Па (паскаль), или атм (101325 Па), или мм рт. ст. (133.2 Па) |
| I | Ионная сила | М, mM и т.д. |
| I | Интенсивность излучения | безразмерная |
| A | Поглощение ^в ($-\lg I/I_0$) | безразмерная |
| ϵ | Молярный коэффициент поглощения ^г | М ⁻¹ см ⁻¹ |
| λ | Длина волны | нм |
| Le | Радиоактивность (излучательная способность) | Бк (беккерель, с ⁻¹) или Ки (3.7×10^{10} Бк) |
| t | Время | с (не сек), мин, ч (не час), сут (не сутки) |
| V | Объем | дм ³ (л), см ³ (мл), мкл и т.д. |
| K | Константа равновесия | моль/л |
| K_m | Константа Михаэлиса | М, mM |
| K_s | Субстратная константа | То же |
| K_i | Константа ингибирования | » |
| k | Константа скорости | с ⁻¹ или М ⁻¹ с ⁻¹ |
| $k_{кат}$ | Каталитическая константа | с ⁻¹ |
| v | Скорость превращения | моль/с |
| V или V_{max} | Максимальная скорость | моль л ⁻¹ с ⁻¹ |
| h или n_H | Коэффициент Хилла | безразмерный |
| U | Напряжение | В (вольт) |
| I | Сила тока | А (ампер) |
| C | Емкость | Ф (фарада) |
| R | Сопротивление | Ом |
| G | Проводимость | См (сименс) |
| $\Delta\mu_{H^+}$ | Градиент электрохимического потенциала | В (вольт) |
| $\Delta\psi$ | Разность электрических потенциалов на мембране | В (вольт) |
| E , или V_m , или $\Delta\phi$ | Мембранный потенциал | В (вольт) |

^а 1/12 массы чистого изотопа ¹²C.^б Не °К.^в Англ. "absorbance" – поглощательная способность.^г Термин "экстинкция" употреблять не рекомендуется.