РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

РЕЦЕПЦИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

2-4 июня 2009 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 1

Под редакцией

В.П. Зинченко, С.С. Колесникова, А.В. Бережнова

Пущино
2009

УДК 577.532

Со 2 по 4 июня 2009 г. в Пущино проходила Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». В сборнике представлена 161 статья по материалам докладов участников конференции. В первый том вошли разделы:
– общие и частные вопросы сигнализации;
– внутриклеточная сигнализация в электровозбудимых клетках;
– внутриклеточная сигнализация в электроневозбудимых клетках;
– механизмы сигнализации в сенсорных клетках;
– кальциевая сигнализация;
– действие физиологически активных соединений. Фармакология в системе внутриклеточной сигнализации.

Второй том содержит разделы:
– сигнализация при апоптозе и в условиях стресса;
– активные формы кислорода в системе внутриклеточной сигнализации;
– сигнализация с участием митохондрий. Биоэнергетика;
– сигнализация в растительных клетках и у прокариот;
– новые подходы и методы клеточных исследований.

Организаторы

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК, ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИИ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ РАН
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ РАН

Состав научного оргкомитета

д.б.н., проф. *Зинченко В.П.* – председатель
чл.корр., проф. *Фесенко. Е.Е.*
чл.корр., проф. *Ткачук В.А.*
д.ф.-м.н., проф. *Колесников С.С.*

Локальный оргкомитет

Зинченко В.П., Долгачева Л.П., Бережнов А.В., Федотова Е.И., Кононов А.В., Туровский Е.А., Ляпина Л.Н., Агафонова Т.А.

ISBN 978-5-904385-09-5

© Учреждение Российской академии наук
Институт биофизики клетки РАН, 2009 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТОМ 1

ОБЩИЕ И ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ СИГНАЛИЗАЦИИ 5

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ
В ЭЛЕКТРОВОЗБУДИМЫХ КЛЕТКАХ

Сигнализация в мышечных клетках и нейронах 120

Сигнализация в синапсе 163

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ
В ЭЛЕКТРОНЕВОЗБУДИМЫХ КЛЕТКАХ 217

МЕХАНИЗМЫ СИГНАЛИЗАЦИИ В СЕНСОРНЫХ КЛЕТКАХ 238

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ 269

ДЕЙСТВИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ.
ФАРМАКОЛОГИЯ В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ
СИГНАЛИЗАЦИИ 317

ТОМ 2

СИГНАЛИЗАЦИЯ ПРИ АПОПТОЗЕ И В УСЛОВИЯХ СТРЕССА 411

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ
ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ 512

СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ МИТОХОНДРИЙ.
БИОЭНЕРГЕТИКА 565

СИГНАЛИЗАЦИЯ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ
И У ПРОКАРИОТ 644

НОВЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ КЛЕТОЧНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ 709

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ 758

АКТИВНОСТЬ ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ И ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Аксенова Г.Е., Логвинович О.С., Фиалковская Л.А., Афанасьев В.Н., Игнатьев Д.А., Коломийцева И.К.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Полиамины – обязательные компоненты живых клеток, участвующие в ключевых процессах жизнедеятельности (репликация, транскрипция, трансляция [1,2], стабилизация и регуляция проницаемости мембран, стабилизация цитоскелета [3] и др.). Однако до настоящего времени неизвестными остаются конкретные молекулярные механизмы действия полиаминов, хотя очевидно, что они основаны на электростатическом взаимодействии этих поликатионов с фосфатными группами нуклеиновых кислот, фосфолипидов и карбонильными группами белков. Отсутствие методов определения концентрации и внутриклеточной локализации полиаминов *in situ* существенно ограничивает наши знания о динамике этих параметров при ответе клеточных систем на воздействия внешней среды.

Начальный и скорость лимитирующий фермент синтеза полиаминов (путресцина, спермидина, спермина) – орнитиндекарбоксилаза (ОДК, КФ 4.1.1.17) – относится к числу самых короткоживущих и динамично регулируемых ферментов млекопитающих [4]. Его активность отражает скорость обмена полиаминов. Ряд сигнальных путей включает регуляцию активности ОДК, в их числе фосфатидилинозитольный [5], аденилатциклазный [4], *Ras*-зависимые сигнальные пути [6]. Регуляция ОДК осуществляется на уровне транскрипции, стабилизации мРНК, трансляции, деградации фермента, а также индукции специфичных белков-регуляторов [2,4]. Индукция ОДК – одно из самых ранних молекулярных проявлений активированного метаболизма клетки, готовящейся к росту и делению, дифференцировке или активному выполнению специализированной функции [2]. На уровне целого организма активность ОДК регулируется нейроэндокринной системой и является весьма чувствительным индикатором функционального состояния органов, уровня пролиферативной и метаболической активности тканей [7].

К настоящему времени возрос интерес исследователей к роли полиаминов и орнитиндекарбоксилазы в ответах клеточных систем на стрессовые воздействия [8-11]. В то же время полнота изучения

стрессовых, так же как и других приспособительных реакций, невозможна без системных исследований на уровне целого организма – создания эволюции, в процессе которой и была выработана целесообразность этих реакций. Целью нашей работы являлось исследование участия ОДК в системной реакции организма при входе незимоспящих млекопитающих в состояние гипотермии (холодовой наркоз).

Материалы и методы. Опыты проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 190-230г. Охлаждение животных происходило в условиях гипоксии-гиперкапнии [12]. Крыс выдерживали в герметичной камере объемом 5л при температуре среды 1-2°С в среднем в течение 3,5ч, что в условиях нарастающей в процессе дыхания гипоксии-гиперкапнии вводило животных в состояние холодового наркоза с понижением температуры тела до 14-18°С. После извлечения из камеры в нормальной газовой среде крысы в течение примерно 5ч самостоятельно возвращались в состояние нормотермии. Животных декапитировали согласно принятым в ИБК РАН правилам в состояниях: нормотермии (температура тела 37-38°С), гипотермии (14-18°С) и в различные сроки после окончания охлаждения. Тимус, селезенку, кору головного мозга, печень, почки, соскоб слизистой оболочки тонкого кишечника и костный мозг бедренной кости замораживали в жидком азоте. Активность орнитиндекарбоксилазы определяли радиоизотопным методом по освобождению $^{14}CO_2$ из меченого L-[1-^{14}C]-орнитина [13]. Пролиферативную активность клеток после воздействия гипотермии определяли по распределению тимоцитов по фазам клеточного цикла методом проточной цитофлуорометрии [14]. Достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В состоянии глубокой гипотермии (сразу после извлечения животных из камеры) наблюдается падение активности ОДК (измеренной при 37°С) всех исследуемых органов, кроме почек (рис.1). Наиболее выраженное падение активности фермента происходит в активно пролиферирующих тканях: в органах системы крови – костном мозге, тимусе, селезенке, а также слизистой оболочке тонкого кишечника. В коре головного мозга и печени снижение активности ОДК составляло около 50% от контроля. В почках активность ОДК у гипотермных животных имела тенденцию к возрастанию. Восстановление активности фермента в коре головного мозга, печени, селезенке, слизистой оболочке тонкого кишечника после окончания охлаждения происходит через 24ч, в тимусе - через 48ч. Исследование распределения тимоцитов по фазам клеточного цикла показало, что через 24ч после окончания охлаждения достоверно снижается процент клеток, находящихся в S фазе (табл.1), и увеличивается относительное содержание клеток в G_0/G_1 фазах клеточного цикла. Это соотношение

сохраняется и через 48ч. Восстановление характерного для контроля распределения клеток по фазам клеточного цикла происходит в тимусе через 72ч после окончания охлаждения.

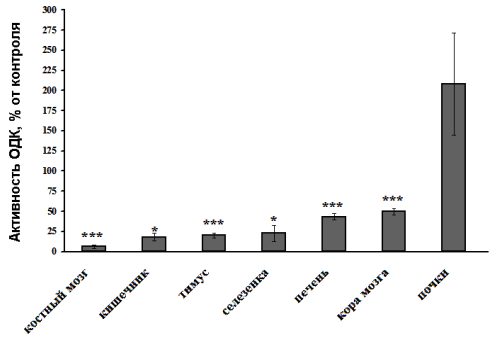


Рис.1. Активность ОДК в тканях крыс сразу после окончания охлаждения. (*-p<0,05; ***-p<0,001)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о задержке вступления тимоцитов в синтетическую (S) фазу клеточного цикла и, соответственно, о торможении пролиферации. Как известно, снижение внутриклеточного пула полиаминов, вызванное ингибированием активности ОДК, приводит к задержке роста и накоплению клеток преимущественно в фазе G_1 клеточного цикла [1]. Согласно нашим данным (табл.1), снижение и восстановление числа тимоцитов в S-фазе клеточного цикла на сутки отстает от соответствующих изменений активности ОДК тимуса. Можно полагать, что наблюдающееся в условиях гипотермии падение и последующее восстановление активности ОДК в костном мозге, селезенке и слизистой оболочке тонкого кишечника отражает динамику пролиферативных процессов в этих органах.

Как известно, стрессовые воздействия приводит к снижению числа клеток лимфоидных органов за счет апоптоза чувствительных к глюкокортикоидам лимфоидных клеток и усиления миграции лимфоцитов [15]. В то же время после воздействия гипотермии, индуцированной в условиях гипоксии/гиперкапнии, масса тимуса и селезенки по нашим данным достоверно не снижалась в исследованные сроки после окончания охлаждения (0, 24 и 48ч) (результаты не приводятся). Недавно было показано, что вызванное специфическим ингибитором ОДК дифлюорометилорнитином (ДФМО) уменьшение внутриклеточного пула полиаминов, наряду с задержкой клеточнгс роста, может вызывать индукцию антиапоптозных факторов и защищать клетки от апоптоза при стрессе [8,10,11].

На уровне организма при стрессовых воздействиях активируется симпато-адреналовая система и ось гипоталамус-гипофиз-надпочечники. Гормоны надпочечников – катехоламины и глюкокортикоиды,

выделяющиеся в кровь в течение первого часа экспозиции животных при низких температурах [16,17], влияют на активность ОДК различных органов. Глюкокортикоиды и их синтетические аналоги у активных нормотермных животных снижают активность ОДК в тимусе и селезенке и повышают в головном мозге, печени, почках [16-18]. Норадреналин вызывает рост активности ОДК в печени [21], агонисты β-адренорецепторов – в сердце [22]. Падение в условиях гипотермии/гипоксии/гиперкапнии активности ОДК в печени и коре головного мозга свидетельствует о перестройке нейроэндокринной регуляции при переходе организма в состояние холодового наркоза.

Табл.1. Активность ОДК и распределение клеток по фазам клеточного цикла в тимусе крыс в разные сроки после окончания охлаждения.

Время после окончания охлаждения, часы	Фазы клеточного цикла, %			Активность ОДК, пмоль CO_2 × (ч × мг белка)$^{-1}$
	G_0+G_1	S	G_2+M	
Контроль n=33	88,4±0,3	6,7±0,2	4,9±0,2	312±22
0ч n=9	88,1±0,4	7,2±0,2	4,7±0,2	63±10***
24ч n=8	90,9±0,6***	4,8±0,4***	4,3±0,3	137±50*
48ч n=10	90,0±0,5**	5,3±0,3***	4,7±0,4	431±64*
72ч n=5	88,2±0,4	7,2±0,3	4,6±0,2	

*-достоверность p<0,05; **-достоверность p<0,005; ***-достоверность p<0,001; n– количество животных.

Системные приспособительные реакции при охлаждении развиваются также на клеточном уровне. Исследования на культурах клеток млекопитающих показывают, что холодовой стресс, или холодовой шок, вызывает задержку роста преимущественно в фазе G_1, снижение уровня метаболизма, модификацию транскрипции, трансляции, разборку цитоскелета, индукцию синтеза специфических белков холодового шока [23]. Эти изменения имеют много общего со значительно лучше изученными реакциями на холодовой шок низших эукариот (дрожжевые клетки) и прокариот. Таким образом, клетки млекопитающих сохраняют эволюционно древние механизмы адаптации к низким температурам [23]. Представляет интерес исследование роли полиаминов и ферментов их обмена в клеточных ответах на холодовой стресс.

Можно полагать, что снижение активности ОДК в органах животных в условиях гипотермии связано с системными приспособительными реакциями на охлаждение и гипоксию-гиперкапнию, развивающимися на клеточном и организменном уровнях и

направленных на скоординированное снижение метаболизма с сохранением жизнеспособности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №09-05-00993-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wallace H.M., Fraser A.V., Hugnes A*. //Biochem. J. (2003) 376(1): 1-14;
2. *Бердинских Н.К., Залеток С.П*. //Полиамины и опухолевый рост. Киев (1987) 140с.;
3. *Schuber F*.//Biochem. J. (1989) 260(1): 1-10;
4. *Pegg A.E*. //J. Biol. Chem. (2006) 281(21): 14529-32;
5. *Mustelin T. et al.* //Scand. J. Immunol. (1987) 26(3): 287-94;
6. *Shantz L.M.* //Biochem. J. (2004) 377(1): 257-64;
7. *Gilad V.H. et al.* //Biochem. Pharmacol. (2001) 61(2): 207-13;
8. *Bhattacharya S., Ray R.M., Johnson L.R*. //Biochem. J. (2005) 392(2): 335-44;
9. *Svensson K.J.* //Cancer Res. (2008) 68(22): 9291-301;
10. *Kucharzewska P et al.* //Biochem. Biophys. Res. Commun. (2009) 380(2):413-8;
11. *Kutuzov M.A., Andreeva A.V., Voyno-Yasenetskaya T.A*. //J. Biol. Chem. (2005) 280(27): 125388-95;
12. *Игнатьев Д.А. и др.* //Радиац. Биол. Радиоэкол. (2006) 46(6): 705-12;
13. *Slozhenikina L.V., Fialkovskaya L.A., Kolomiytseva I.K.* //Int. J. Radiat. Biol. (1999) 75(2): 193-9;
14. *Afanasyev V.N.et al.* //Cytometry (1993) 14(6): 603-9;
15. *Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И*. Стресс и система крови. М. (1983) 240с.;
16. *Тимофеев Н.Н., Прокопьева Л.П.* //Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма. М. (1997) 208.с;
17. *Попова Н.К., Корякина Л.А., Колокольцев А.А*. //Генетика (1979) 15(4):715-9;
18. *Richards J.F.* //Life Sci. (1978) 23(15): 1619-24;
19. *Cousin M.A., Lando D., Moguilewsky M.* //J. Neurochem. (1982) 38(5): 1296-304;
20. *Zahner S.L., Prahiad K.V., Mitchell J.L.* //Cytobios. (1986) 45(180): 25-34;
21. *Михайловский В.О. и др.* //Биомед. Химия (1982) 6:71-5;
22. *Flamigni F.et al.* //Biochim. Biophys. Acta (1986) 882(3): 377-83;
23. *Al-Fageeh M.B., Smales C.M*. //Biochem. J. (2006) 397(2): 247-59.

ПАЛЬМИТАТ/Ca^{2+}-ЗАВИСИМАЯ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Белослудцев К.Н., Трудовишников А.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Непрерывный бимолекулярный слой фосфолипидов составляет основу всех клеточных мембран, определяя их барьерные и механические свойства. В процессе жизнедеятельности непрерывность бислоя может нарушаться с образованием структурных дефектов, таких как гидрофильные липидные поры. Это, в свою очередь, приводит к изменению всех функций мембраны, включая ее проницаемость и стабильность [1].

Недавно было показано, что пальмитиновая кислота и ионы Ca^{2+}, содержание которых в тканях может значительно увеличиваться при различных патологиях [2], способны индуцировать открытие во внутренней мембране митохондрий неспецифичекой поры [3]. В нашей лаборатории обнаружено, что открытие пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры приводит к выходу проапоптотических белков из митохондрий, что позволило нам предположить участие этой поры в запуске пальмитат-индуцированного апоптоза [4,5]. Установлено, что эта пора отличается от «классической» митохондриальной циклоспорин-чувствительной белковой поры (МРТ поры) как по своим свойствам, так и по механизму образования [2-9]. ПК/Ca^{2+}-активируемая пора нечувствительна к известным модуляторам МРТ поры (циклоспорин А, АДФ, P_i и др.) и способна самопроизвольно закрываться [2-6]. Открытие поры индуцировалось как в митохондриальной, так и в искусственных (БЛМ и липосомы) мембранах, что дало основание предположить липидную природу пальмитат/Ca^{2+}-индуцируемой поры [7-9]. Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что в основе механизма образования поры лежит способность ПК связывать Ca^{2+} со сродством, которое на 1-2 порядка выше, чем сродство к этому иону других жирных кислот и липидов. В экспериментах на липосомах было установлено, что образование поры происходит по механизму хемотропного фазового перехода, когда при связывании Ca^{2+} с ПК в липидной мембране происходит сегрегация жирной кислоты в отдельные мембранные домены [9]. Исходя из того, что механизм образования изучаемой липидной поры является универсальным, можно сделать предположение о том, что открытие этой поры будет происходить в различных мембранах (например, плазматической мембране клетки). Поэтому цель данной работы заключалась в исследовании возможности образования пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры в цитоплазматической мембране эритроцитов.

Молекулярная структура плазматической мембраны эритроцитов, её динамика, перестройки, индуцируемые изменением условий внешней среды и действием молекул-эффекторов, на сегодняшний день изучены достаточно детально. Известно, что высокие концентрации пальмитиновой кислоты проявляют литическое действие на эритроцитарную мембрану. При этом считается, что в мембране образуются неспецифические поры, природа которых окончательно не установлена [10]. В данном процессе может участвовать липидная пальмитат/Ca^{2+}-активируемая пора.

Измерение неспецифической проницаемости плазматической мембраны эритроцитов крысы оценивалось по выходу гидрофильного флуоресцентного красителя сульфородамина Б (СР) из клеток. Загрузку эритроцитов СР проводили методом гипотонического гемолиза. Как видно из рис.1, добавление 50мкМ ПК и 0.5мМ Ca^{2+} по отдельности не вызывали выхода СР из эритроцитов (~2-5×10^6клеток/мл), однако последовательное добавление сначала ПК, а потом Ca^{2+}, приводило к тому, что флуоресценция резко возрастала (сразу же после добавки Ca^{2+}) и, достигнув некоторого уровня, оставалась без изменений (рис.1А). Если же ПК и Ca^{2+} добавляли к эритроцитам в обратном порядке (сначала Ca^{2+}, а затем ПК), то увеличения флуоресценции СР практически не наблюдалось (рис.1Б). Связано это вероятно с тем, что добавление ПК в раствор, содержащий Ca^{2+}, приводит к образованию ее комплексов с ионом в растворе, что предотвращает встраивание ПК в липидный бислой. Стоит отметить, что подобную картину мы наблюдали ранее при изучении пальмитат/Ca^{2+}-индуцированной проницаемости липосомальной мембраны [8], что говорит о схожей природе этих процессов.

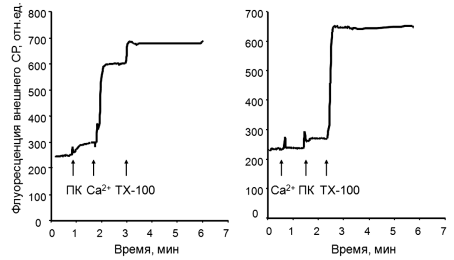


Рис.1. ПК/Ca^{2+}-индуцированный выход сульфородамина Б (СР) из эритроцитов. Выход СР регистрировали по изменению уровня флуоресценции. Состав среды: 138мМ NaCl, 2.7мМ KCl, 10мМ Na_2HPO_4, 5мМ глюкоза (pH 7.4), Добавки: 50мкМ ПК, 0.5мМ Ca^{2+}, ТХ-100 (0.1%).

Зависимость эффекта пермеабилизации эритроцитов от концентраций добавляемых ПК и Ca^{2+} представлена на рис.2. Как видно из рисунка, максимальный выход СР из эритроцитов наблюдался при

добавлении 50мкМ ПК и 60мкМ Ca^{2+} и составлял около 80% от общего уровня.

Все предыдущие эксперименты проводились при комнатной температуре (~22-23ºС). Увеличение температуры буфера до 37ºС приводило к тому, что максимальный прирост флуоресценции наблюдался уже при концентрации ПК 30мкМ, а выход СР при этом составлял ~90%. Связано это, вероятно, с тем, что при увеличении температуры повышается текучесть мембраны, что облегчает протекание процесса фазовой сепарации ПК в липидном бислое.

Как и в экспериментах на липосомах [8], Ca^{2+}-зависимую пермеабилизацию эритроцитов можно наблюдать и со стеариновой кислотой, в то время как насыщенная миристиновая кислота и ненасыщенные линолевая и олеиновая кислоты были практически неэффективны. Таким образом, эксперименты на эритроцитах подтвердили данные, полученные на липосомах, БЛМ и митохондриях: эффективны лишь те жирные кислоты, которые связывают Ca^{2+} с высоким сродством.

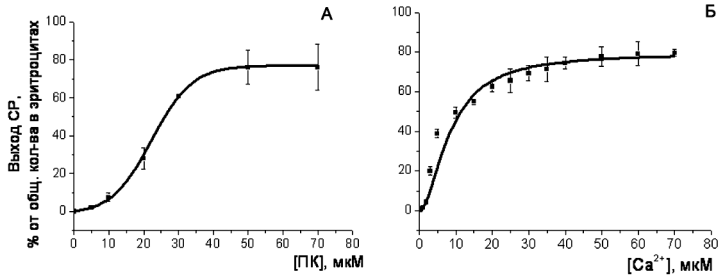


Рис.2. Концентрационные кривые эффекта ПК/Ca^{2+}-индуцируемой пермеабилизации эритроцитов. Состав среды: 138мМ NaCl, 2.7мМ KCl, 10мМ Na2HPO4, 5мМ глюкоза (pH 7.4), Добавки: 50мкМ ПК, 0.5мМ Ca^{2+}, TX-100 (0.1%). А – зависимость Ca^{2+}-индуцированного выхода СР из эритроцитов от концентрации добавленной к липосомам ПК. Выход СР индуцировался добавлением 0.5мМ Ca^{2+}. Б – зависимость выхода СР из эритроцитов от концентрации Ca^{2+} в присутствии 50мкМ ПК.

Говоря о пальмитат/Ca^{2+}-зависимом выходе сульфородамина из эритроцитов, мы до сих пор рассматривали его как явление пермеабилизации эритроцитарной мембраны. Но что фактически происходит с эритроцитами после добавления пальмитиновой кислоты и Ca^{2+}? Вполне возможно, что мы наблюдаем не просто пермеабилизацию эритроцитов, а лизис клеток. Ранее с помощью метода флуоресцентной корреляционной спектроскопии на азолектиновых липосомах, меченых родамин-фосфатидилэтаноламином, было показано, что после добавления в инкубационную среду пальмитиновой кислоты и Ca^{2+}

размер и количество липосомальных везикул практически не изменялся [8]. Таким образом, выход СР из везикул происходит не в результате разрушения липосом и мицеллизации липидов в инкубационной среде, а в результате образования быстрозатекающих липидных пор. Также было показано, что открытие пальмитат/Ca^{2+}-индуцируемой поры в митохондриях носит временный характер и после закрытия поры наблюдалось практически полное восстановление мембранного потенциала [2]. Все это говорит о том, что липосомы и митохондрии не разрушаются при индукции пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры. В то же время при пальмитат/Ca^{2+}-индуцированной пермеабилизации мембраны эритроцитов наблюдается иная картина (табл.). Добавление пальмитиновой кислоты и Ca^{2+} к суспензии эритроцитов, приводящее к образованию неспецифической поры, вызывает лизис клеток. В то же время, сами по себе ПК или Ca^{2+}, а также обратный порядок их добавления (сначала Ca^{2+}, а потом ПК), в значительно меньшей степени изменяли количество эритроцитов.

Табл. Количество клеток при добавлении пальмитиновой кислоты и Ca^{2+}*.

добавки	Кол-во клеток, шт*10^6/мл
Контроль	9.31±0.84
20мкМ ПК	6.82±1.73
20мкМ ПК+100мкМ Ca^{2+}	0.89±0.44
100мкМ Ca^{2+}	7.69±0.66
100мкМ Ca^{2+}+20мкМ ПК	5.39±1.05

*Состав среды: 138мМ NaCl, 2.7мМ KCl, 10мМ Na_2HPO_4, 5мМ глюкоза (pH 7.4).

Таким образом, можно предположить, что открытие пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры во внутренней митохондриальной, липосомальной и эритроцитарной мембранах происходит по одному механизму (хемотропный фазовый переход), однако, в отличие от митохондриальной и липосомальной мембран, целостность плазмитической мембраны эритроцитов не восстанавливается и наблюдается лизис клеток. Основной причиной этого отличия может являться разный размер пор, образующихся в изучаемых мембранах, что непосредственно связано с липидным составом мембран. Как известно из литературы, если радиус липидной поры не превышает некоего критического значения (для жидко-кристаллического бислоя это примерно 9нм), то липидная пора будет затекать, и целостность мембраны достаточно быстро (через доли секунды) восстановится [1]. Как было показано, размер пор в митохондриальной мембране, образующихся при ПК/Ca^{2+}-индуцируемом переходе проницаемости, составляет 2-3нм, что вполне достаточно для быстрого восстановления липидного бислоя. Вполне вероятно, что структура и состав плазматической мембраны эритроцитов таковы, что добавление

пальмитиновой кислоты и Ca^{2+} приводит к образованию поры большего радиуса, что, в свою очередь, приводит к разрыву мембраны и лизису клетки.

Исходя из полученных результатов, возникает вопрос, почему лизис эритроцитов не происходит при физиологических условиях в крови, где всегда присутствует свободный Ca^{2+} и пальмитиновая кислота. Во-первых, это может быть связано с тем, что в плазме всегда присутствуют липопротеины и альбумин, которые с высоким сродством связывают свободные жирные кислоты (СЖК). И во-вторых, как следует из полученных результатов, наиболее эффективно лизис эритроцитов происходит тогда, когда сначала в мембране появляется жирная кислота, а потом следует Ca^{2+}-удар, что в нормальных условиях, вероятно, наблюдается редко. В то же время, в ряде случаев данный процесс все-таки возможен. Во-первых, это патологические процессы, при которых наблюдается резкое увеличение содержания в плазме крови СЖК, например, острый инфаркт миокарда и ишемическая болезнь сердца на поздних стадиях [2]. Во-вторых, патологии печени, когда снижается синтез альбуминов и липопротеинов, что также ведет к повышенному содержанию ПК в плазме. В-третьих, различные воспалительные процессы, при которых наблюдается гипоальбуминемия, а также активируется секреторная фосфолипаза A_2 тромбоцитов, действие которой приводит к появлению в мембранах СЖК. Все эти нарушения в организме могут приводить к индукции ПК/Ca^{2+}-зависимой пермеабилизации мембраны эритроцитов и лизису клеток.

Работа поддержана грантами РФФИ (№09-04-01024-а и 07-04-00759-а), МНТЦ (№3301) и программой «Развитие научного потенциала высшей школы» (№3840).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В.* //Липидные мембраны при фазовых превращениях. М.: Наука, (1992);
2. *Mironova G.D. et al.* //J. Bioener. Biomembr. (2004) 36: 171-8;
3. *Sultan A., Sokolove P.* //Arch. Biochem. Biophys. (2001) 386: 31-51;
4. *Belosludtsev K.N. et al.* //J. Bioenerg. Biomembr. (2006) 38: 113-20;
5. *Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д.* //Биофизика (2008) 53: 967-71;
6. *Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д.* //Биохимия (2005) 70: 987-94;
7. *Mironova G. D. et al.* //J. Bioenerg. Biomembr. (2001) 33: 319-31;
8. *Agafonov A. et al.* //Biochim. Biophys. Acta (2003) 1609: 153-60;
9. *Agafonov A.V. et al.* //J. Membr. Biol. (2007) 215 (1): 57-68;
10. *Калер Г.В., Рачковский Л.И., Окунь И.М.* //Цитология (1986) 28: 954-63.

ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЖИРНЫХ КИСЛОТ. РОЛЬ ФОСФОЛИПАЗ

Бережнов А.В.[1], Федотова Е.И.[1,2], Ненов М.Н.[3], Зинченко В.П.[1], Дынник В.В.[3]

[1]Институт биофизики РАН, Пущино
[2]Пущинский государственный университет
[3]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Добавление патофизиологических доз активированных производных длинноцепочечных жирных кислот (ЖК) – пальмитоил- (РС) и миристоил-карнитина (МС) к клеткам различных типов приводит к дестабилизации кальциевого гомеостаза с последующей гибелью клеток по типу некроза [1-3]. Ключевую роль в этих условиях играет активация кальциевых каналов саркоэндоплазматического ретикулума (RyR и IP_3R) карнитиновыми и КоА производными ЖК [4,5]. При исследовании уровня цитозольного кальция $[Ca^{2+}]_i$ под влиянием 20-50мкМ РС или МС в кардиомиоцитах и нейронах показано наличие лаг-периода, продолжающегося 2-6 минут. В конце лаг-периода происходит быстрое высокоамплитудное увеличение $[Ca^{2+}]_i$. После этого наблюдается сокращение кардиомиоцитов и, через несколько секунд – нарушение проницаемости плазмалеммы, о котором свидетельствует выход флуоресцентного зонда во внеклеточный раствор. В невозбудимых клетках (НЕр-2, астроциты, АКЭ, тимоциты) длительность лаг-периода составляет обычно менее 1 минуты. Важно, что длительность лаг-периода зависит от кальций-буферной емкости митохондрий, а предотвращение транспорта Ca^{2+} в митохондрии приводит к полному исчезновению лаг-периода [2-3]. Таким образом, митохондрии играют роль буфера ионов кальция, освобождающегося из запасов саркоэндоплазматического ретикулума при действии РС или МС. Кальциевая перегрузка митохондрий и подавление энергетики митохондрий накапливающимися ацил-КоА [6,7] являются предпосылками образования неспецифических митохондриальных пор (преимущественно циклоспорин А-нечувствительных [3]).

Наблюдаемые эффекты слабо зависят от изменения проводимости потенциал-зависимых кальциевых каналов кардиомиоцитов (L-VDCC) или от реверсии Na^+/Ca^{2+}-обменника плазмалеммы. Запас-управляемые кальциевые каналы (SOCC) в невозбудимых клетках также вносят лишь небольшой вклад в увеличение уровня цитозольного кальция при действии РС и МС [2]. Тем не менее, рост $[Ca^{2+}]_i$, приводящий к гибели клеток в конце лаг-периода оказывается существенно меньшим при отсутствии кальция во внеклеточной среде (рис.1). Это указывает на то,

что наряду с выходом кальция из запасов саркоэндоплазматического ретикулума имеет место неспецифический вход ионов кальция и натрия снаружи клетки. В пользу этого предположения свидетельствует увеличение $[Na^+]_i$, измеренное по флуоресценции SodiumGreen (не показано), в период неконтролируемого роста $[Ca^{2+}]_i$ и последующий выброс флуоресцентного зонда во внеклеточный раствор (рис.2).

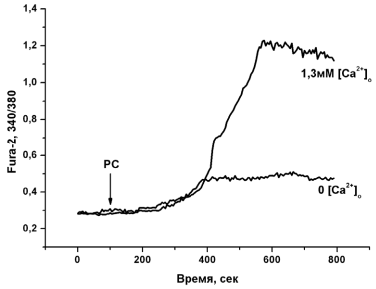


Рис.1. Влияние внеклеточночного Ca^{2+} на изменение $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах крысы при действии 20мкМ РС. Амплитуда увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в конце лаг-периода заметно уменьшается в среде, содержащей 0 $[Ca^{2+}]$ и 0,5мМ ЭГТА, по сравнению с контролем (1,3мМ $[Ca^{2+}]_o$).

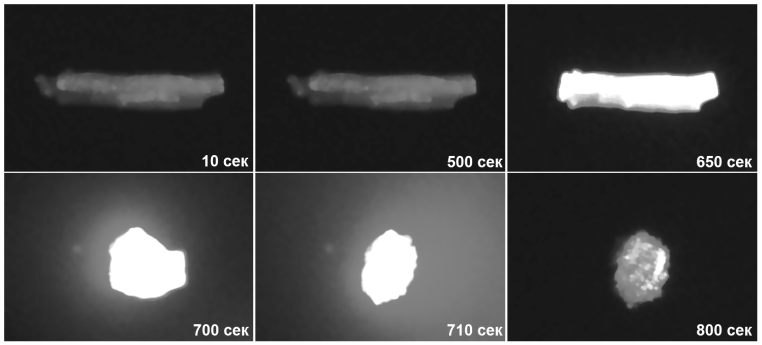


Рис.2. Последовательные изображения кардиомиоцита, окрашенного Fluo-4, до (10сек после начала эксперимента) и после (500, 650, 700, 710, 800сек) добавления 50мкМ МС (добавка на 100 сек). Видно, что после увеличения уровня цитозольного кальция происходит сокращение клетки. На изображениях 700 и 710сек от начала эксперимента видно, что флуоресцентный зонд диффундирует во внеклеточный раствор, что приводит к падению интенсивности флуоресценции.

Возможно допустить существование нескольких механизмов образования Ca^{2+}-проводящих неспецифических пор в плазмалемме:

1. Образование внутри клетки областей (доменов) с повышенным содрежанием Ca^{2+} в течение лаг-периода. Возможность образования таких доменов с высоким уровнем Ca^{2+} (до 1мМ) при активации нейронов в присутствии глутамата или NMDA ранее неоднократно обсуждалась [8-11]. Можно предположить, что образование таких

доменов происходит в клетках разных типов в местах отсутствия контактов Ca^{2+}-каналов, ретикулума и митохондрий (Ca^{2+}-буфера). Из рис.3 видно, что при добавлении 10мкМ РС в среду инкубации кардиомиоцитов возникают микрообласти с повышенным содержанием кальция, которые устойчиво сохраняются до момента выброса Ca^{2+} из митохондрий и гибели клеток. Следует отметить, что такие области обычно совпадают с зонами возникновения кальциевых спарков, частота которых заметно увеличивается в присутствии РС и МС (не показано).

2. Наличие областей повышенного содержания кальция (в которых устойчиво сохраняется градиент Ca^{2+}) может приводить к неспецифической активации Ca^{2+}-зависимых плазмалеммальных фосфолипаз $PLC_{\beta\gamma}$, $cPLA_2$, $PLD_{2(1)}$ (рис.4). Следствием этого может быть:

2.1. Образование неспецифических пор вследствии гидролиза фосфатидилхолина (PCh), который является субстратом и PLD, и $cPLA_2$;

2.2. Нарушение биофизических свойств плазматической мембраны [12-15] за счет накопления в присутствии избытка кальция диацилглицерола (DAG), фосфатидной кислоты (PA), церамидов (Cer) и ацил-КоА (рис.3).

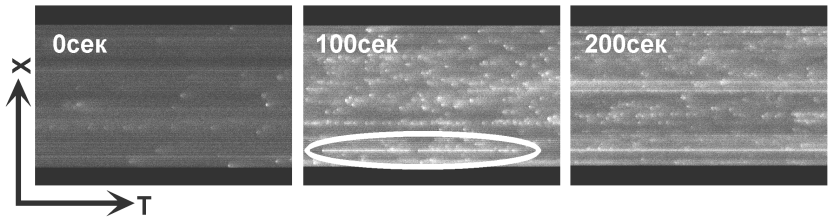


Рис.3. Конфокальные изображения кардиомиоцита, нагруженного кальций-чувствительным зондом Fluo-4. Режим сканирования – XT: по горизонтальной оси – время, по вертикальной – продольная ось клетки. Изображения получены непосредственно до (0сек) и через 100 и 200сек после добавки 10мкМ РС. Овалом Выделена область с повышенной концентрацией Ca^{2+}, которая возникает и сохраняется в течение длительного времени.

Из рис.4 видно, что существенную роль в активации фосфолипаз всех трех типов играет кальций (Ca^{2+}-кальмодулин), а случае с $cPLA_2$ (IV тип) также ее активация за счет фосфорилирования посредством CaMKII. Дополнительная активация $cPLA_2$ также должна иметь место за счет активации церамид-киназы (CerK) и накопление ее активатора C1P. В свою очередь, активация $cPLA_2$ приводит к накоплению арахидоновой кислоты (AA) – активатора PLD_2, что также должно усиливать действие кальция на PLD_2 (в отсутствие внеклеточных сигналов). Активация PLD_2, в свою очередь будет приводить к накоплению PA – активатора PLC, и, тем самым, усиливать действие Ca^{2+} на PLC. Активация PLC и

последующее накопление DAGs (активаторов PKC) и, тем самым, активация $cPLA_2$ и PLD_2 за счет их фосфорилирования посредством PKC, – замыкает цикл активации фосфолипаз («порочный цикл»).

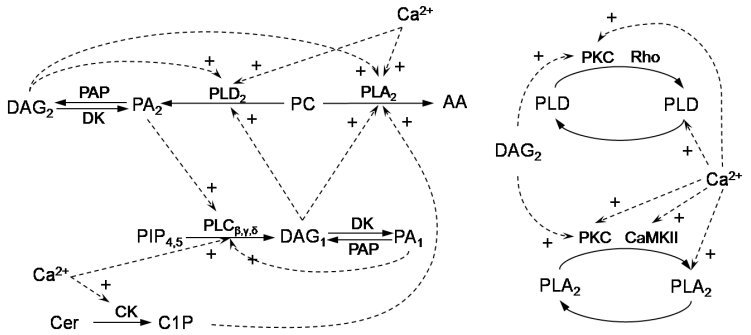


Рис.4. Пути активации «порочного цикла» с участием фосфолипаз.

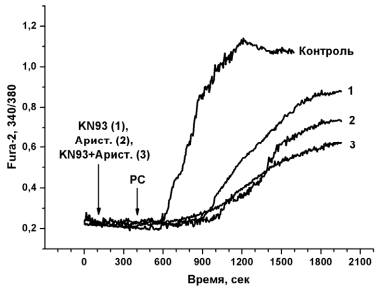


Рис.5. Влияние ингибиторов PLA_2 (Аристолоховая кислота, 100мкМ) и CaMKII (KN93, 20мкМ) на изменение $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах крысы при действии 20мкМ PC.

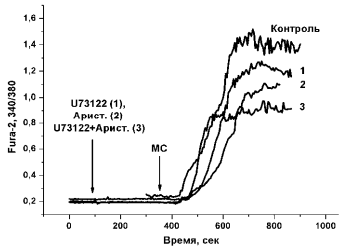


Рис.6. Влияние ингибиторов PLA_2 (Аристолоховая кислота, 100мкМ) и PLC (U73122 10мкМ) на изменение $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах крысы при действии 50мкМ MC.

На рисунках 5 и 6 представлены результаты экспериментов, из которых следует, что ингибирование фосфолипаз PLC и $cPLA_2$ (но не $iPLA_2$ – не показано) и кальций-зависимой киназы (CaMKII) приводит к заметному уменьшению токсического эффекта PC и MC на кардиомиоциты. В присутствии ингибитора $cPLA_2$ гибель клеток не наблюдается в течение экспенимента до 30мин после добавления PC. Поэтому не следует также исключать возможный токсический эффект образующейся в этой реакции арахидоновой кислоты, которая в сочетании с Ca^{2+} также может существенно изменять биофизические свойства мембраны.

Выводы. Механизмы токсического действия активированных производных длинноцепочечных ЖК, приводящие к гибели клеток по типу некроза вследствие нарушения кальциевого гомеостаза, связаны с:

– первичным выбросом кальция из ретикулума RyR и IP_3 при их активации ацил-КоА с одновременным накоплением Ca^{2+} в митохондриях.

– образованием Ca^{2+}-микродоменов в местах отсутствия контактов ретикулума и митохондрий и последующей активацией Ca^{2+}-зависимых ферментов (в порядке уменьшения вклада в наблюдаемый эффект $cPLA_2$, CaMKII, PLC и, возможно, PLD_2), приводящих к образованию неспецифических катион-проводящих пор в плазмалемме и к дополнительному увеличению уровня цитозольного кальция за счет входа снаружи клетки.

Работа поддержана грантом РФФИ №08-04-00439-а и «Фондом содействия отечественной науке».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дынник В.В. и др.* //Конф. «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» Пущино (2005): 238-43;
2. *Бережнов и др.* //Конф. «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» Пущино (2007): 9-12;
3. *Бережнов А.В. и др.* //Биофизика (2008) 53(6): 1025-32;
4. *Dumonteil E., Barre H., Meissner G.* //J. Physiol. (1994) 479(1): 29-39;
5. *Fulceri R. et al.* //Biochem. J. (1997) 325(2): 423-8;
6. *Abdul-Ghani M.A. et al.* //Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. (2008) 295(3): E678-85;
7. *Гришина Е.В. и др.* //Конф. «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» Пущино (2007): 215-8;
8. *Budd S.L., Nicholls D.G.* //J. Neurochem. (1996) 67(6): 2282-91;
9. *Duchen M.R.* //Cell Calcium (2000) 28(5-6): 339-48;
10. *Connor J.A. et al.* //Science (1988) 240(4852): 649-53;
11. *Petersen O.H., Sutton R., Criddle D.N.* //Cell Calcium (2006) 40(5-6): 593-600;
12. *Das S., Rand R.P.* //Biochem. Biophys. Res. Comm. (1984) 124(2): 491-6;
13. *Goldberg E.M., Zidovetzki R.* //Biochemistry (1998) 37: 5623-32;
14. *Huang H., Goldberg E.M. Zidovetzki R.* //Eur. Biophys. J. (1998) 27: 361-6;
15. *Silva L.C. et al.* //Biophys. J. (2007) 92(2): 502-16;

LIF – КАК ПОРООБРАЗУЮЩИЙ БЕЛОК

Борисова М.П.[1], Межевикина Л.М.[2], Петрова Р.Р.[2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Прогресс в области инженерной биологии вызвал интерес ко всему, что так или иначе имеет отношение к эмбриональным стволовым клеткам. Так попал в поле зрения цитокин LIF (Leukemia Inhibitory Factor). Данный белок относится к семейству интерлейкина-6. Исследована его молекулярная структура (гликопротеин, состоящий, в основном, из гидрофобных и положительно заряженных аминокислот) и выработан взгляд на его механизм действия на клеточном уровне. Он связывается с гетеромерным рецепторным комплексом, состоящим из LIF-рецептора и трансмембранного белка -gp130 [1-4] и активирует в ЭСК млекопитающих JAK-STAT3 [5,6], MAPK [7,8] и/или PI3K – регулируемые пути внутриклеточной сигнализации [7,9-10]. Гены-мишени, активируемые этими сигнальными системами, ответственны за плюрипотентность ЭСК, их дифференцировку и скорость пролиферации. В 2002г. нами исследовалась возможность действия самого белка LIF на клеточные мембраны путем воздействия на искусственный липидный бислой (БЛМ) [11].

Появление рекомбинантного LIF дало новые возможности для исследования его действия на клетки. Высокая физиологическая активность рекомбинантного белка LIF, его дополнительное стимулирующее влияние на пролиферацию и скорость роста ЭСК породили вопросы, на которые однозначных ответов не было получено. Неясны и причины различий в механизмах действия рекомбинантного белка LIF в случае продуцента эукариотического происхождения и прокариотического. LIF прокариотического происхождения, в отличие от LIF эукариотического, влияет на цитодифференцировку ЭСК, но не влияет на процесс пролиферации. Причины функциональных различий между рекомбинантными белками LIF различного происхождения мало исследованы и практически не отражены в литературе. Предполагая, что одной из причин этих различий может быть разное действие LIF различного происхождения на клеточную мембрану, мы в настоящей работе попытались сравнить их способность влиять на проводимость искусственного бислоя.

Материалы и методы. В работе были использованы: рекомбинантный белок LIF, продуцируемый эукариотическими клетками линии Cos-1, полученный в лаборатории механизмов рецепции ИБК РАН [12]; коммерческий рекомбинантный мышиный LIF прокариотического происхождения (ICN). Для образования бислоя использовался липидный раствор из фосфатидилхолина из сои (Sigma) и холестерина (Sigma) в гептане, в качестве буфера использовался трис (Sigma) и ХЕПЕС (Sigma). Измерения проводились в растворах KCl различной ионной силы при pH=7.15-7.2 в условиях фиксации потенциала с программным обеспечением «БЛМ», разработанным Зильберштейном А.Я. Знак потенциала указан для наружного отсека ячейки (*транс*), противоположного отсеку, где присутствовал белок.

Результаты. При внесении различных концентраций LIF (0.65, 2.0, 6.5, 19.5нг/мл) с одной стороны от мембраны (*цис*) наблюдалось изменение проводимости липидного бислоя. На рис.1 приведена запись тока через мембрану при напряжении 100 мВ. Видно нарастание тока скачками разной величины. Такие изменения тока обычно регистрируются при прохождении тока через ионные каналы. Величина скачков зависит от ионной силы окружающего раствора. Чем меньше концентрация соли, тем больше величина тока, проходящего через одну такую токопроводящую единицу. Так в 0.1M KCl при 100 мВ подаваемого напряжения средняя величина тока 90±20 пА, в 0.2M KCl – 22±6пА, в 1M KCl - 7±1пА. Средняя проводимость одиночного канала зависит также от знака потенциала – при отрицательном знаке средняя амплитуда одиночных скачков тока выше, чем при положительном – так в 0.1M KCl средняя величина тока – 175±19пА, в 1M KCl – 16±1пА (по сравнению с 90пА и 7пА соответственно).

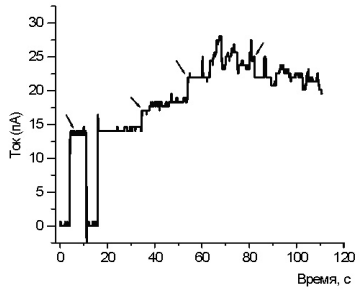


Рис.1. Скачки тока 13,6; 2,4; 3,2; 3,6пА; конц-я LIF (Cos-1) – 0,65нг/мл (*цис*); 0,1M KCl; Напряжение – 100мв; фосфатидилхолин 20мг/мл.

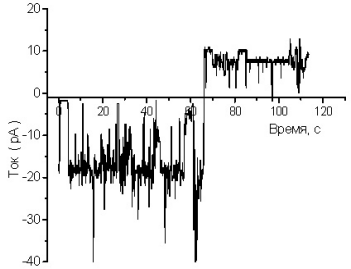


Рис.2. Флуктуации тока при -100мв и 100мв конц-я LIF (Cos-1) – 19,5нг/мл (*цис*); KCl-1M; фосфатидилхолин 20мг/мл.

Заметим, что при исследовании LIF невозможно достичь стационарной проводимости или даже относительно невысокой скорости нарастания ее. Поэтому здесь мы говорим только о качественной характеристике изменения интегрального тока через мембрану.

Приведенные на рис.3 вольтамперные характеристики сняты в одной области величин интегрального тока через мембрану в присутствии LIF. Учитывая это, можно констатировать, что в растворах 0.1M KCl зависимость тока от напряжения носит линейный характер, в 0.2M – наблюдается гиперфункция в условиях положительного потенциала с *транс*-стороны, и суммарный ток при 100мВ почти в два раза больше, чем при таком же потенциале обратного знака. В условиях 1M KCl интегральная зависимость тока от напряжения носит обратный характер.

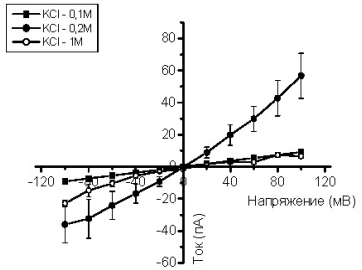


Рис.3. Вольтамперные характеристики ; концентрация LIF (Cos-1) – 0,65нг/мл (цис); фосфатидилхолин – 20мг/мл.

Вместе с тем на рис.2 можно увидеть, что проводимость одного и того же канала при отрицательном потенциале так и осталась выше. Внесение 10мМ $CaCl_2$ не изменяет вольтамперные характеристики мембраны в присутствии LIF. Величина одиночных скачков остается практически без изменений (в 1M KCl при 100 мВ – 11±5пА, при -100мВ средняя величина тока – 20±1пА). Различие в действии на клетки LIF эукариотического и прокариотического происхождения связывают с отсутствием посттрансляционного гликозилирования белка у бактерий, которые продуцируют его. В этой связи представлялось интересным сравнить действие рекомбинантного белка LIF, продуцированного эукариотическими клетками линии Cos-1, с рекомбинантным белком прокариотического происхождения фирмы ICN. Мембраны формировались из лецитина, концентрация белка мало отличалась от использованной для LIF - Cos-1. При напряжении в 100мВ ток через такую мембрану изменяется хаотично и не выявляет стабильных уровней проводимости в миллисекундном диапазоне измерений, а вольтамперная характеристика сохраняет S-образный вид.

В заключение, исходя из наших данных, можно сделать следующие выводы:

1. Белок LIF эукариотического происхождения образует в бислойных липидных мембранах молекулярные структуры – ионные каналы.

2. Белок LIF прокариотического происхождения не образует устойчивых организованных молекулярных структур в миллисекундном диапазоне регистрации тока через мембраны, хотя изменяет электропроводимость мембран.

3. Ответственность за образование устойчивых токопроводящих структур несет, вероятно, гликозилированный участок белка.

4. Характеристика тока через каналы, зависит от величины и знака потенциала на мембране, от ионной силы окружающего раствора.

5. Ca^{2+} не влияет на образование и проводимость ионных каналов.

6. Характер воздействия LIF на искусственный липидный бислой можно перенести на взаимодействие его с нативной клеточной мембраной, поскольку действующие концентрации в нашем случае были на порядок меньше, чем используют при работе с клеточными системами.

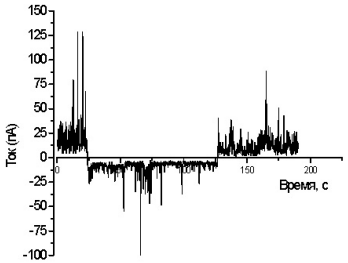


Рис.4. Флуктуации тока в присутствии LIF (ICN); Конц-я(ICN) – 2нг/мл (*цис*); напряжение 100мв и -100мв; фосфатидилхолин – 20мг/мл.

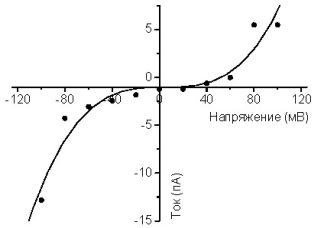


Рис.5. Вольтамперная харак-ка БЛМ в присутствии (ICN) – 2нг/мл (*цис*); KCl-1M; KCl-1M; фосфатидилхолин – 20мг/мл.

Обсуждение. Экспериментальные данные, полученные нами на бислойных липидных мембранах, указывают на возможность непосредственного влияния белка LIF на клеточную мембрану, задействуя для передачи сигнала в клетку иной механизм, а именно образуя пору. Сравнивая структурные молекулы известных порообразующих белков можно с уверенностью сказать, что молекула LIF весьма подходит на роль одного из них. Наличие гидрофобных аминокислот, представленных в виде 4-х α-спиралей, должны хорошо взаимодействовать с липидом мембран, а наличие петель, возможно, связать с устройством входа канала. Если говорить еще и о рецепторном взаимодействии LIF с клеткой, то есть примеры такого бинарного механизма взаимодействия с клеточной мембраной. Выяснен такой механизм двойного действия для α-латротоксина, а также для аеролизина. Зрелый аэролизин, как правило, состоит из 4-х доменов. Два домена

отвечают за связывание с мембраной, один из них связывается с гликановым ядром gp-заякоренного рецептора, а второй с сахарным остатком на белковой части рецептора, такое двойное взаимодействие обеспечивает высокое афинное связывание, домены 3 и 4 отвечают за сборку гептамера, который и образует пору.

Мы в настоящее время не можем определенно сказать, как на молекулярном уровне происходит формирование поры, но все необходимые атрибуты для такого действия присутствуют. Сообщение о том, что гликозилирование стабилизирует трехмерную структуру молекулы LIF, связывается с нашими данными об образовании стабильных уровней проводимости поры. В то же время, нам кажется объяснимым то обстоятельство, что изменение модифицирующего влияния на бислойную липидную мембрану в зависимости от продуцента (эукариот – прокариот) коррелирует с изменением влияния LIF на пролиферацию и дифференцировку мышиных линий ЭСК в зависимости от этого же фактора [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Davis S. et al.* //Science (1993), 260: 1805;
2. *Hudson K.R., Vernallis A.B., Heat J. K.* //J. Biol. Chem. (1996) 271: 11971;
3. *Metcalf D.* //Stem Cells (2003) 21: 5;
4. *Meyn M. et al.* //Mol. Pharmacol. (2005) 68: 1320;
5. *Niwa H. et al.* //Genes Dev. (1998). 12, 2048;
6. *Raz R. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 2846;
7. *Boiani M., Scholer H.R.* //Mol. Cell. Biol. (2005) 6: 872;
8. *Izumi M. et al.* //J. Mol. Cell. Cardiol. (2006) 40 (2): 224;
9. *Auernhammer* C., *Melmed S.* //Endocrine Rev. (2000) 21: 313;
10. *Kristensen M., Kalisz M., Nielsen J.H.* //APMIS (2005) 113(11-12): 756;
11. *Серышева В.В. и др.* //Бюл. Эксп. Биол. Мед.(2002)134 (12): 620;
12. *Петрова Р.Р. и др.* //Биотехнология (2006) 5: 3-11.

ТРАНСАКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

Бурова Е.Б., Гончар И.В., Дорош В.Н., Никольский Н.Н.

Институт цитологии РАН, СПб

Исследование путей внутриклеточной сигнализации с участием регуляторных молекул и транскрипционных факторов составляет одну из центральных областей клеточной биологии. В литературе активно дискутируется вопрос о трансактивации рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) при воздействии на клетку различных стимулов, не являющихся непосредственными лигандами рецептора [1,2]. В результате этих исследований сложилось представление, что EGFR занимает центральное место в интеграции множества сигналов различной природы. Цель нашей работы заключалась в изучении механизма лиганд-независимой активации EGFR под действием IFNγ, окисленного глутатиона и активных форм кислорода (АФК) в эпителиальных клетках.

На первом этапе работы было проведено изучение механизма трансактивации EGFR в клетках эпидермоидной карциномы человека линии А431 в условиях окислительного стресса. Известно, что лиганд-зависимая стимуляция профессионально-нефагоцитирующих клеток приводит к временному и быстро проходящему возрастанию уровня внутриклеточных АФК, которые рассматривают как вторичные сигнальные молекулы. АФК также интенсивно генерируются во время острых воспалительных процессов, при ишемии, атеросклерозе, а также вследствие облучения УФ-светом и рентгеновскими лучами. Повышенный уровень внутриклеточных АФК рассматривается как окислительный стресс. Генерация АФК в ответ на разные внешние стимулы, как и действие экстраклеточных АФК, связана с активацией таких сигнальных путей, как NF-κB, JNK-AP1, MAP-киназы, JAK-STAT. В настоящее время общепризнано, что в инициации этих клеточных ответов на окислительный стресс важную роль играет лиганд-независимая активация рецепторов ростовых факторов, как компонентов передачи стрессовых сигналов.

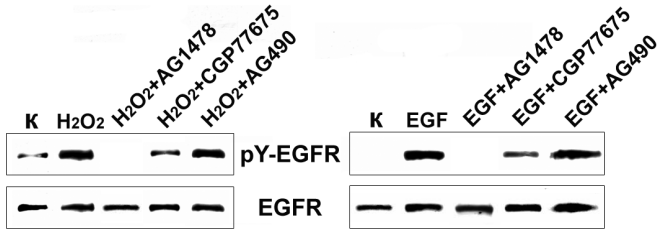


Рис.1. Участие тирозинкиназы EGFR, киназ JAK2 и Src в активации EGFR. Клетки А431 стимулировали H_2O_2 (2мМ, 2мин) или EGF (100нг/мл, 10мин).В указанных случаях перед стимуляцией клетки обрабатывали в течение 1ч ингибиторами тирозинкиназ: EGFR – AG1478, Src-семейства – CGP77675, JAK2 – AG490. Иммуноблотинг тотальных лизатов клеток проводили с использованием антител против фосфотирозина (pY).

Мы показали, что окислительный стресс, инициированный добавлением H_2O_2 к клеткам А431, вызывает быстрое (в течение 1-3мин)

увеличение фосфорилирования EGFR по тирозину по сравнению с нестимулированными клетками в зависимости от концентрации и времени действия окислителя [3]. Активация EGFR также была продемонстрирована при действии на клетки A431 окисленного глутатиона в широком диапазоне концентраций [4]. Однако эта активация имела волнообразный характер: уровень фосфорилирования рецептора повышался в течение 5мин после начала стимуляции и оставался повышенным вплоть до 8ч. Используя специфический ингибитор AG1478 для рецепторной тирозинкиназы, мы выяснили важную роль внутренней киназы EGFR в процессе его трансактивации под действием как окисленного глутатиона, так и H_2O_2 (рис.1).

В последнем случае это согласуется с нашими данными об отсутствии H_2O_2-индуцированной активации рецептора в клетках, экспрессирующих киназа-негативный EGFR [5]. Тирозинкиназа рецептора может быть мишенью действия H_2O_2, что следует из экспериментов по изучению влияния антиоксиданта N-ацетилцистеина (NAC) и ингибитора NADPH-оксидазы дифениленодониума (DPI) на EGF-индуцированную активацию рецептора. Использование ингибитора флавиновых ферментов дифениленодониума (DPI) в концентрации 2-10мкМ приводило к полному ингибированию EGF-индуцированного фосфорилирования исследуемых белков, причём ингибирующий эффект DPI был сильнее, чем NAC. Столь сильное действие DPI свидетельствует о том, что генерация АФК, вызывающая инактивацию клеточных фосфатаз, действительно может быть тем инициирующим импульсом, который запускает дальнейший процесс активации рецептора EGF под действием его физиологического лиганда.

Для выяснения роли цитоплазматических протеинкиназ в трансактивации EGFR были использованы следующие специфические ингибиторы тирозинкиназ: JAK2 (AG490), c-Src (radicicol), семейства Src (CGP77675) (рис.1). Наши результаты свидетельствуют о независимости H_2O_2-индуцированного фосфорилирования EGFR от активности JAK2 в клетках A431 [3]. Напротив, тирозинкиназы Src-семейства вовлечены в лиганд-независимую трансактивацию рецептора, что было продемонстрировано блокированием фосфорилирования в присутствии CGP77675. В качестве основного претендента из трех экспрессируемых в клетках A431 киназ семейства Src (c-Src, c-Yes, c-Fyn) на роль посредника в активации EGFR мы рассматривали киназу Src. Однако ее блокирование в присутствии специфического ингибитора c-Src радицикола (radicicol) не привело к ингибированию H_2O_2-индуцированного фосфорилирования рецептора. Аналогичный эффект оказывал радицикол и на EGF-индуцированную активацию рецептора. На основании полученных данных можно постулировать необходимость собственной тирозинкиназы EGFR, активность которой

опосредуется киназами c-Yes и c-Fyn, но не c-Src, для активации EGFR при стимуляции H_2O_2 и EGF.

Далее мы исследовали сигнальные пути, ведущие к активации факторов STAT (signal transducer and activator of transcription) в клетках A431 во время окислительного стресса. Транскрипционные факторы STAT являются семейством цитоплазматических белков, которые после активации соответствующих рецепторов цитокинами или ростовыми факторами фосфорилируются по С-концевым остаткам тирозина, образуют гомо- или гетеродимеры и быстро транслоцируются в ядро, где регулируют транскрипционную активность ряда генов [6]. STAT1 и STAT3 активируются также в ответ на стрессовые воздействия: АФК, ультрафиолетовое излучение и т.д. [7]. Наблюдаемая нами активация EGFR совпадает по времени с увеличением уровня фосфорилирования по тирозину STAT-факторов, который был максимален через 2-5мин после начала стимуляции H_2O_2. Для H_2O_2-индуцированной активации STAT1 и STAT3 в клетках A431 была продемонстрирована необходимость активной тирозинкиназы EGFR, при этом активация STAT3 зависела также от активности киназы JAK2 (рис.2).

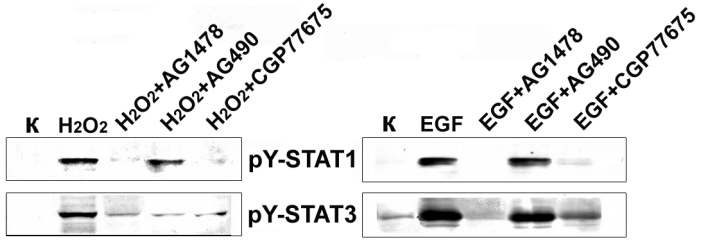


Рис.2. Активация STAT1 и STAT3 под действием H_2O_2 или EGF в зависимости от функциональной активности EGFR.Условия стимуляции клеток A431 указаны в подписи к рис.1. Для иммуноблота использовали антитела против фосфорилированных форм STAT1 и STAT3.

Представляло интерес изучить вовлечённость киназ Src-семейства в процесс фосфорилирования STAT1 и STAT3 при действии H_2O_2. Использование ингибитора CGP77675, подавляющего активность всех Src-киназ, приводило к уменьшению уровня фосфорилирования по тирозину STAT1 и STAT3 до контрольного значения. Чтобы установить ответственность именно киназы c-Src за наблюдаемый эффект, Src-киназу в клетках A431 блокировали радициколом с последующей стимуляцией H_2O_2. В результате активация фактора STAT3 уменьшалась до контрольного уровня, причём эффект зависел от концентрации ингибитора. Дополнительное подтверждение вовлеченности киназы c-Src в активацию STAT3 при действии H_2O_2 было получено в опытах на

фибробластах мыши Src-/-, нокаутированных по гену c-src (линия PURO), и в качестве контроля – на тех же фибробластах с обратной трансфекцией гена c-src (WT) [8]. В клетках WT при стимуляции H_2O_2 мы наблюдали отчетливую активацию STAT3 и, в меньшей степени, STAT1 (рис.3).

В клетках PURO отсутствие киназы c-Src приводило к заметному понижению уровня фосфорилирования обоих белков. Участие тирозинкиназы JAK2 в процессе H_2O_2-индуцированной активации STAT3 также было подтверждено на клетках Src-/- и WT, предварительно обработанных ингибитором JAK2 (AG490). Эти данные свидетельствуют о том, что тирозинкиназы c-Src и JAK2 участвуют, скорее всего, непосредственно в лиганд-независимой активации транскрипционного фактора STAT3, но не вовлечены в трансактивацию EGFR. Для активации STAT1, по-видимому, достаточно участия только Src-киназ. Полученные результаты позволяют предположить разные механизмы активации STAT3 и STAT1 при окислительном стрессе в одних и тех же клетках. Установлена важная регуляторная роль тирозинкиназы JAK2 в процессе H_2O_2-индуцированной активации факторов STAT1 и STAT3 в клетках, экспрессирующих функционально-неактивный EGFR [5]. Таким образом, совокупность полученных данных позволяет рассматривать активацию факторов STAT как необходимый компонент ответа клетки на окислительный стресс.

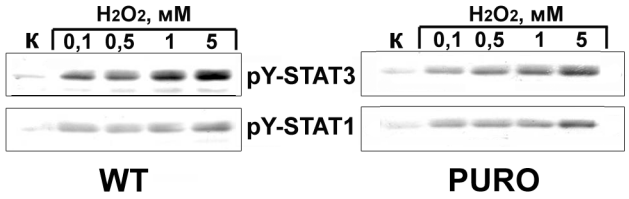


Рис.3. H_2O_2-индуцированная активация STAT1 и STAT3 в клетках WT и PURO. Фибробласты мыши линии Src-/-, нокаутированные по гену c-src (PURO), и те же фибробласты с обратной трансфекцией гена c-src (WT) стимулировали H_2O_2 в указанных концентрациях в течение 2мин.

В последнее время наши усилия направлены на выяснение механизма IFNγ-индуцированной трансактивации EGFR. Этот феномен был впервые установлен и описан нами [9]. Анализ участия цитоплазматических киназ в трансактивации EGFR показал, что регуляция активности рецептора при действии IFNγ на клетки A431 осуществляется его собственной тирозинкиназой, а также киназами семейства Src и JAK2 (рис.4).

Кроме того, активность EGFR зависит от активности мембранно-связанных металлопротеаз, что свидетельствует о роли аутокринной

регуляции в процессе трансактивации EGFR. При изучении эпителиальных опухолевых клеток, экспрессирующих разное количество EGFR, было установлено, что уровень IFNγ-индуцированной трансактивации коррелирует с количеством EGFR на плазматической мембране [10]. До недавнего времени считалось общепризнанным, что активация транскрипционного фактора STAT1 при действии IFNγ происходит только через рецептор этого цитокина [11]. Наши данные об участии EGFR в IFNγ-индуцированной активации STAT1 корректируют эту картину (рис.5).

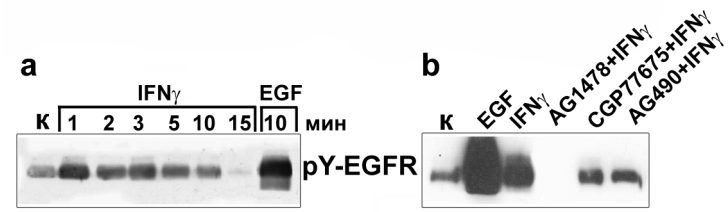


Рис.4. IFNγ трансактивирует EGFR. a – клетки A431 стимулировали IFNγ (10нг/мл) или EGF (100нг/мл) в течение указанного времени. Иммуноблот тотальных клеточных лизатов проводили с использованием антител против фосфотирозина (pY). b – клетки A431 были стимулированы IFNγ (10нг/мл, 1мин) и EGF или перед стимуляцией предобработаны указанными ингибиторами в течение 1ч. Иммуноблот тотальных лизатов – с антителами против pY.

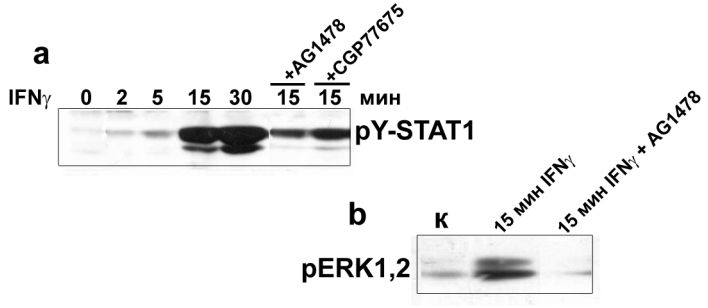


Рис.5. Эффект ингибирования тирозинкиназы рецептора и киназ семейства Src киназ на активацию STAT1 (a) и MAP-киназ ERK1,2 (b).

Наряду с этим было установлено, что трансактивированный EGFR играет определяющую роль в активации MAP-киназ ERK1,2 при стимуляции клеток IFNγ. Следовательно, EGFR вовлечён в передачу сигнала от IFNγ как на уровне трансактивации EGFR, так и активации сигнальных белков STAT1 и ERK1,2.

Вывод: действие на клетки таких агонистов, как IFNγ, H_2O_2, окисленный глутатион приводит к быстрому и обратимому фосфорилированию EGFR по тирозину. Механизм трансактивации EGFR при действии столь различных по природе стимулов имеет общие черты: трансактивация рецептора зависит от активности его тирозинкиназы и киназ Src-семейства, а также от активности мембранно-связанных металлопротеаз. Только в случае IFNγ процесс трансактивации дополнительно требует активности киназы JAK2. Показано, что необходимость активной тирозинкиназы EGFR для активации факторов STAT и MAP-киназ ERK1,2 является ключевым моментом при действии каждого из стимулов. Генерация внутриклеточных АФК также является необходимой стадией в процессе активации EGFR и факторов STAT. Следовательно, физиологический эффект исследованных агентов на клетки, реализуемый через STAT и MAP-киназные сигнальные пути, обеспечивается полностью (или частично) трансактивацией EGFR.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fischer O.M. et al.* //Biochem. Soc. Trans. (2003) 31: 1203-8;
2. *Gschwind A. et al.* //Oncogene (2001) 20: 1594-600;
3. *Гончар И.В. и др.* //Цитология (2003) 45(5): 478-87;
4. *Василенко К.П. и др.* //Цитология (2006) 48(6): 500-7;
5. *Бурова Е.Б. и др.* //Цитология (2001) 43(12): 1153-61;
6. *Bromberg J., Darnell J.E.* //Oncogene (2000) 19: 2468-73;
7. *Simon A.R. et al.* //Amer. J. Physiol. (1998) 275: 1640-52;
8. *Бурова Е.Б., Гончар И.В., Никольский Н.Н.* //Цитология (2003) 45(5): 466-77;
9. *Burova E. и др.* //FEBS Lett. (2007) 581(7): 1475-80;
10. *Гончар И.В. и др.* //Цитология (2008) 50(10): 887-92;
11. *Bach E.A., Aguet M., Schreiber R.D.* //Annu. Rev. Immunol. (1997) 15: 563-91.

ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ – УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ЯЗЫК КЛЕТОЧНОЙ РЕЦЕПЦИИ И СИГНАЛИЗАЦИИ

Дмитриевский И.М.[1], Юров С.С.[2]

[1]Московский государственный инженерно-физический институт
[2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Введение и постановка задачи. Клеточная сигнализация – и внутренняя, и наружная, а вместе с ними и рецепция – требуют, прежде всего, универсального, обобщенного сигнального языка. Вполне естественно предположить, что таким природным клеточным языком мог бы быть транспорт ионов. Звучит заманчиво. Но практически не продвигает нас вперед, поскольку механизм транспорта ионов (в первую очередь – активного) до сих пор нам остается непонятен, в той же степени, что и механизм сигнализации и рецепции. Ясно, что прогресс наступит одновременно в обеих проблемах, связанных между собой более широкой общностью. Но усилившаяся дифференциация науки ведет к разобщенности и уменьшению внимания к соседним областям. К примеру, мембранологи не интересуются достижениями магнитобиологов, которые отвечают им той же взаимностью. При этом и те, и другие из-за этой разобщенности одинаково теряют резервы для своего развития. Но есть и еще один принципиальный аспект дифференциации. Казалось бы, биология развивалась естественно и логично: от описательной биологии организмов к клеточной биологии и дальше - к молекулярной. В последние десятилетия прогресс биологии связывался именно с молекулярной биологией. Но с годами эти надежды не возрастали, а падали. Не смотря на неоспоримые достижения молекулярной биологии (до 1/3 докладов на каждом съезде биофизиков посвящено деталям активного транспорта), мы по-прежнему не понимаем клетку. Статья Л.Б. Марголиса [1] так и называется «Почему мы не понимаем живую клетку или мифы молекулярной биологии» Г. Альбрехт-Бюлер [2] в своей статье «В защиту «немолекулярной» клеточной биологии» считает, что молекулярный анализ – это анализ «букв», а не «слов» или тем более предложений (по-русски – «За деревьями не видно леса»). И продолжает: «Задача клеточной биологии – исследование того, как интегрируются в одно функциональное целое физические и химические реакции внутри одной клетки. Чем больше мы уходим в молекулярные детали, тем дальше уходим от этой задачи. Из «букв» текст не сложится, необходима общая теория, оперирующая надмолекулярными структурами». Клеточная и молекулярная биологии не конкурируют между собой, разве что за ассигнования. Но призыв к возврату от молекулярной биологии к клеточной в наши дни многими, естественно, воспринимается как анахронизм. В тоже время нельзя отрицать, что есть в этих «манифестах цитоплазматической революции» [3] не малая доля правды. Сами названия выходящих статей и книг говорят об уверенно амбициозных претензиях авторов (*Линг Г.* «Физическая теория живой клетки. Незамеченная революция» в русском переводе – изд-во Наука, 2008; *Полак Д.* «Клетки, гели и двигатели жизни» – доклад по этой теме в Вашингтонском университете в 2008г. и т.д.). Стосель [3] справедливо замечает: «Хотя интерпретация Полака бросает вызов общепринятым представлениям, такие вызовы должны всегда приветствоваться». Но, повидимому, всё дело в том, что за время этой революции не появилось пока «достаточно сумасшедших идей» (по выражению Бора), хотя обнародованные – и преподносятся в качестве новой биопарадигмы. В этом парадигмальном поиске мы готовы предложить свой вариант. Может быть он окажется истинно

сумасшедшим, который мы все хотим ухватить за хвост. В исследованиях, выполненных к этому моменту, у нас уже сложилась в немалой степени обоснованная парадигма – Реликтоэкология (или Обобщенная классическая механика), основанная на установленной нами новой фундаментальной роли реликтового излучения Вселенной во всех природных процессах нашего мира [4]. Эта парадигма родилась при решении биофизических проблем слабых воздействий, имеющих общенаучный характер. Её итогом стал магниторезонансный усилительный механизм, который был использован при решении фундаментальных физических задач. С его помощью была предложена реабилитация закона сохранения четности, решен парадокс существования стационарных квантовых орбит электронов в атоме, проблема дефицита солнечных нейтрино и многое другое. Сейчас пришла пора использования этой общефизической парадигмы в физической теории клетки. Естественно было выбрать для критической проверки парадигмы наиболее загадочные задачи. Поэтому мы сосредоточились пока на 3-х узловых проблемах: 1) энергетическое обеспечение активного транспорта (ряд исследователей утверждает, что клетка работает с нарушением закона сохранения энергии), 2) решение энергетического парадокса с использованием предлагаемого магниторезонансного механизма активного транспорта и 3) парадокс постоянства мембранного потенциала, не смотря на его, казалось бы, неизбежное постоянное уменьшение при пассивном транспорте. В этом и заключается постановка задачи данного исследования с надеждой на то, что ее решение поможет пролить свет на механизм клеточной сигнализации и рецепции.

Краткое изложение поисков новой парадигмы. Надежда на достижение этой цели связана с поиском и учетом всемирной среды, которая принципиально отсутствует в квантовой механике. В связи с этим квантовая механика должна изобретать и использовать новые понятия, такие, например, как «физ. вакуум» «поле», косвенно учитывающие неосознаваемое влияние неизвестной среды. Квантовая механика не способна дать ответ на вопросы такого типа: «Где распространяются электромагнитные волны? В пустоте?!» Пресловутый парадокс волна-частица в квантовой механике порожден тем же не учетом реальной среды. Представьте себе камень, брошенный в воду и создающий в воде волны. Если бы мы, как и в квантовой механике, не видели и не учитывали среды (в данном случае – водной) и судили о волнах по их косвенным проявлениям (интерференции, дифракции и т.п.), то мы и в этом случае говорили о дуализме камня, обладающего признаками материального тела (частицы) и волны. И таких парадоксов, возникающих из-за игнорирования среды, в квантовой механике более, чем достаточно. Но поиски этой фундаментальной среды

не легки. Об этом свидетельствует история эфира. Наиболее перспективным претендентом на роль универсальной среды из известных природных явлений является реликтовое излучение Вселенной, единственное – пронизывающее всю Вселенную с практически постоянной концентрацией. Но именно его никто не рассматривал в качестве претендента на роль активной среды. Физиков останавливало неверие в его достаточно ощутимое взаимодействие с объектами Вселенной. Поэтому поиск вселенской среды надо начинать с рассмотрения этой сложности. Эта трудность связана с общенаучной проблемой слабых воздействий (влияние солнечной активности; космофизические корреляции; КВЧ-терапия низкой интенсивности; биолокация; гомеопатия и т.д.). Какие воздействия – слабые? Самым естественным образом критерий слабых воздействий определяется универсальной зависимостью отклика биологический системы любого уровня организации на возрастающий стимул самой разной природы – рис.1.

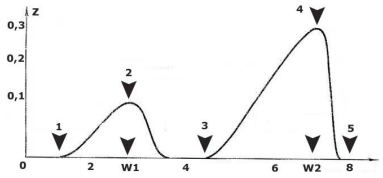


Рис.1. Фазовая реакция Z – сложной системы на возрастающий стимул – W (мощность адекватного стимула, электромагнитного излучения, концентрация микроэлемента и т.д.) в относительных единицах, по оси абсцисс – логарифмический масштаб. 1 – абсолютный порог чуствительности; 2 – порог включения компенсаторных систем; 3 – порог тотальной мобилизации; 4 – срыв; 5 – гибель. Анализ эксперементальных данных показывает, что отношение стимулов W1 и W2, соответствующих максимумам равно $(10^4\text{-}10^5)$ (иногда $(10^4\text{-}10^5)^2$ или $(10^4\text{-}10^5)^{1/2}$).

Первыми эту зависимость получили ак. Павлов И.П. и др. физиологи, но не было речи о слабых воздействиях, говорили о процессах адаптации и компенсации (*Кисловский Л.Д.*, 1982). Но два максимума этой зависимости естественным образом определяют область «сильных» и «слабых» воздействий [5]. Вопрос о первичном механизме слабых воздействий длительное время оставался открытым. По оценкам Д. Чернавского и Ю. Хургина (1989) во всех предложенных механизмах не хватало коэффициента усиления, по крайней мере, не меньше 10^4. Именно такой коэффициент усиления был обнаружен нами [5] экспериментально при воздействии поляризованного света по сравнению с неполяризованным в области малых интенсивностей. При этом исправлено неправильное толкование эксперимента И. Фейгенберга [7] и всеобщее убеждение, что существенной разницы при воздействии поляризованного и неполяризованного излучения – нет. Позже этот

вывод был подтвержден в диапазоне мм-излучения в экспериментах с клетками *E. coli* и профагом-λ. Установлено, что усиление возникает только от одной из циркулярно поляризованных компонент линейнополяризованного света, что связывается нами с известной асимметрией, присущей живой природе. Обнаруженный эффект позволил объяснить многие ранее не понятные явления: высокую эффективность зрительного рецептора – палочки; равенство квантовой эффективности палочки – 0,5; повышенную остроту зрения (на два порядка) у космонавтов, наблюдавших земные объекты невооруженным глазом; и многое другое. После открытия усилительного механизма уже не представляло большого труда предложить молекулярный механизм слабых воздействий [4,5]. Для этого следовало лишь указать природные источники возникновения поляризованного излучения. Это – спиновые механизмы ядерного магнитного и электронного парамагнитного резонанса (ЯМР и ЭПР), основанные на эффекте Зеемана – расщеплении энергетических уровней по спину в постоянном магнитном поле. Отметим, что ЭПР и ЯМР, известные до сих пор, как методы измерения, выступают здесь, как способы управления и регуляции, присущие самим природным объектам и процессам (И.Д. 2007). Необходимо также обратить внимание на экспериментальную работу [8], которая может рассматриваться, как прямое подтверждение предлагаемого нами механизма. В работе на клетках дрожжей и *E. coli* при изучении диэлектрических характеристик суспензии этих клеток был обнаружен резонанс в области 2кГц, соответствующий ларморовской частоте протонного магнитного резонанса в земном магнитном поле, аналогичные резонансы обнаружены и для других ионов. При погибших клетках, предварительно облученных ультрафиолетом, подобные резонансы не наблюдались. Для проверки универсальности разработанного МРМ мы обратились к ядерной физике [4]. На это нас надоумел остроумный вопрос Р.Фейнмана, остовавшийся до сих пор без ответа: «Почему при бета-распаде ядро стреляет электронами из левонарезанного ружья?», т.е. левополяризованными. При этом налицо практически полное сходство между этим биофизическим механизмом (эффективного преодоления мембранного дифузионного барьера при активном мембранном транспорте ионов против градиента их концентрации) и механизмом слабого β-распада (эффективного преодоления W^--бозоном (электрон-нейтринной парой) кулоновского барьера ядра. Мы задумались над механизмом нарушения фундаментального закона сохранения четности (левая-правая симметрия) в β-распаде, который более 50 лет остается неизвестным. Высказав предположение, что несохранение четности связано с неполнотой, незамкнутостью рассматриваемой системы (а законы сохранения справедливы только для замкнутых систем), мы определили

характеристики недостающей компоненты в системе, которая и восстанавливала закон сохранения четности. Далее мы обратили внимание на то, что характеристики этой компоненты точно совпали с характеристиками соответствующей компоненты такого фундаментального природного явления, как реликтовое излучение Вселенной. Были вновь проанализированы эксперименты по «несохранению» четности, и вывод неравенств Белла. Указаны ошибки в их интерпретации, связанные с неучетом реликтового излучения. Так возникла новая парадигма – реликтоэкология.

Применение реликтоэкологии к разрешению парадоксов активного транспорта ионов. Энергетика активного транспорта. Величина электрохимического барьера для иона Na^+ (11,7кДж/моль) и энергия, выделяющаяся при гидролизе молекулы АТФ (40-60кДж/моль), оказываются одного порядка (*Владимиров Ю.А.*, 1983 с.14) Это, по-видимому, и сформировало распространенное мнение, что энергетического несоответствия в клетке нет. Главный вызов, который бросает Линг (в упомянутой выше книге) общепринятым представлениям – это утверждение, что теория натриевого насоса нарушает закон сохранения энергии. Его расчеты показывают, что для поддержания наблюдаемого обмена ионами K^+ и Na^+ между клеткой и средой насосу требуется в несколько тысяч раз больше энергии, чем клетка способна произвести. К сходной оценке пришли и мы, исходя из данных о выделении и последующем поглощении тепла (100 и 93мкДж/г на импульс соответственно) при генерации импульса в нерве на опыте с вагусом кролика (*Волькенштейн М.В.*, 1988 с.357). Как же разрешить этот энергетический парадокс? Г. Линг видит спасение в отказе от ионных насосов, не смотря на их экспериментальную обоснованность. Но с точки зрения реликтоэкологии в этом нет нужды, т.к. парадокс разрешается повышенной эффективностью использования затраченной энергии, равной как раз величине 10^4, необходимой для решения парадокса. И последний парадокс. Каков механизм поддержания постоянства мембранного потенциала? Ведь по законам диффузии (пассивный транспорт) он должен постоянно падать. Решение этого парадокса подобно решению парадокса стационарных квантовых орбит электрона в атоме. Энергия, теряемая электроном (как заряженной частицы, движущейся с ускорением), компенсируется энергией резонансно поглощаемых реликтовых фотонов. Резонанс обеспечивается равенством энергии реликта расщеплению энергетических уровней электрона за счет спин-орбитального взаимодействия. Как только электрон теряет небольшую часть своей энергии на излучение, он попадает в зону оптимального резонанса, компенсирует потерю и возвращается в прежнее состояние. Такой же подход годится для объяснения постоянства мембранного потенциала клетки. Все та же компенсация за

счет реликта. Все условия для резонанса имеются. Штарковское расщепление в электрическом поле нормального потенциала (10^5В/см) здоровой клетки соответствуют средней энергии реликтового излучения (10^{-4}эВ). Здоровые клетки регулярно подкачиваются энергией реликта. Патологические клетки нуждаются в искусственной подкачке (КВЧ-терапия).

Заключение. Мембранный потенциал и ионный транспорт могут быть универсальным языком клеточной рецепции и сигнализации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Марголис Л.Б.* //Природа (1991) 3;
2. *Albrecht-Buchler G.* //Int. Rev. Cytology (1990) 120: 191-241;
3. *Stossel T.P.* //Science (2001) 293: 611;
4. *Дмитриевский И.М.* //Полигнозис (2000) 2: 38-59;
5. *Дмитриевский И.М.* //Биофизика (1992) 37: 674-80;
6. *Дмитриевский И.М.* //Биофизика (2001) 46 (5): 852-5;
7. *Фейгенберг И.М.* //Доклады АН СССР (1980) 253: 500-3;
8. *Jafary-Asl A.H. et. al.* //J. Biol. Phys. (1983) 11: 15-23.

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ МАТРИЦЫ ФОСФОИНОЗИТИДОВ. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ

Дынник В.В.[1], Бережнов А.В.[2], Федотова Е.И.[2,3], Ненов М.Н.[1]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Институт биофизики РАН, Пущино
[3]Пущинский государственный университет

Из инозititолфосфата (IP), составляющего до 15% липидов мембран клеток эукариотов, образуется 7-фосфоинозитидов (PI) при фосфорилировании фосфоинозитидного кольца по положениям 3, 4, 5 (PIP_3, PIP_4, PIP_5, $PIP_{3,4}$, $PIP_{3,5}$, $PIP_{4,5}$, $PIP_{3,4,5}$). Суммарное содержание фосфатидилинозитидов в плазмалемме (ПМ) не превышает 2-3%, с наибольшим содержанием в ней PIP_4 и $PIP_{4,5}$ [1,2].

Диапазон изменения «концентраций» PI на внутренней поверхности ПМ при активации различных рецепторов может составлять: для $PIP_{3,4,5}$ – от 1 до 20мкМ, для PIP_4 – от 10 до 100мкМ и для $PIP_{4,5}$. – от 10 до 300мкМ [1-6].

Каждый из семи PI имеет уникальное распределение в клеточных мембранах и выполняет собственные сигнальные функции. В разных мембранах клеток локализация разных форм PI гетерогенна.

PI выполняют многочисленные сигнальные функции в клетках, включая регуляцию транскрипции генов и трансляции РНК, регуляцию внутриклеточных процессов и активацию фосфорилирования белков разных типов, а также регуляцию мембранного транспорта, реорганизацию цитоскелета, хемотаксис и т.д. [1-3].

Принято считать, что сигнальные эффекты различных форм PI осуществляются через их связывание с различными эффекторными белками, благодаря наличию в этих белках специфических PH-, PX-, C2-, SH2-, PDZ-доменов, связывающихся с различными PI ($PIP_{3,4}$, $PIP_{4,5}$, $PIP_{3,4,5}$) [1,2,7,8].

Активация тирозинкиназных рецепторов (например, инсулинового рецептора – InsR) приводит к фосфорилированию субстрата инсулинового рецептора (IRS). IRS активирует фосфотидилинозитол-3-гидрокси киназу ($PI3K_\alpha$), которая, в свою очередь, переводит $PIP_{4,5}$ в $PIP_{3,4,5}$, с последующей активацией PDK_1 (фосфотидилинозитол-зависимая протеинкиназа). PDK_1 фосфорилирует Akt (протеинкиназа B) с последующей передачей сигнала на eNOS, mTOR и т.д.

Кроме того, при активации InsR может включаться вторая сигнальная система с участием $G_{\beta,\gamma}$-белков приводящая к активации фосфолипазы C (PLC) и, далее, атипичных форм протеинкиназа C (PKC).

В случае рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), таких как α_2-адренорецептор, может происходить одновременная G-белок-зависимая активация:
– $PI3K_\gamma$ (с включением всего каскада реакций до Akt),
– $PLC_{\beta,\delta}$, приводящая к накоплению DAG и IP_3, к росту Ca^{2+} и активации различных форм PKC.

Таким образом, могут одновременно включаться различные сигнальные каскады, связанные с активацией разных форм PI (рис.1).

Однако, на основании таких представлений, невозможно судить о регуляции скоростей различных каскадов реакций, ограничиваясь рассуждениями о передаче сигналов «от каскада А к каскаду Б».

Хотя известно, что в присутствии избытка Ca^{2+} активация PLC может приводить к росту DAG и фосфатидиной кислоты (PA) [4], сопряженных с ростом $PIP_{3,4,5}$, не смотря на то, что и PLC, и PI3K (продуктом которой является $PIP_{3,4,5}$), конкурируют за общий субстрат – $PIP_{4,5}$ [5].

Возможна также обратная ситуация, когда при активации PI3K (через GPCR) имеет место накопление продукта реакции $PIP_{3,4,5}$, сопряженное с первичным снижением, а затем ростом концентрации субстрата этой реакции $PIP_{4,5}$, а также накопление DAG и PA [4].

Таким образом, очевидно, что на смену линейным представлениям (чему обязывает сам термин «сигнализация») должны прийти представления, учитывающие как передачу сигналов как «вперед» – в

виде переноса химических групп – так и «вперед и назад» – в виде регуляторных сигналов, формирующих положительные и отрицательные прямые и обратные связи в системе.

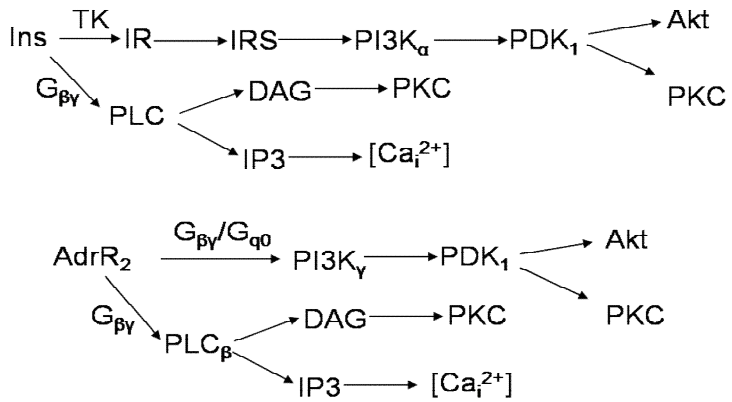


Рис.1. Альтернативные пути активации InsR и GPSR (α_2-адренорецептор). Ins – инсулин; IR – инсулиновый рецептор; IRS – субстрат инсулинового рецептора; $AdrR_2$ – α_2-адренорецептор; TK – тирозинкиназа; PI3K – фосфотидилинозитол-3-гидрокси киназа; PDK – фосфотидилинозитол-зависимая протеинкиназа; Akt – протеинкиназа B; PKC – протеинкиназа C; PLC – фосфолипаза C; DAG – диацилглицерол; IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат; $G_{\beta\gamma}$ – βγ-субъединица G-белка.

Каталитическая матрица фосфоинозитидов. Роль $PIP_{3,4,5}$ и $PIP_{4,5}$. Ферментативный катализ, в сравнении с неферментативным, обеспечивает ускоренное на несколько порядков течение реакции, благодаря фиксации и ориентации молекул субстратов на плоскости (вместо пространства случайных соударений).

$PIP_{3,4,5}$ и $PIP_{4,5}$ присутствуют в мембране и образуют гетерогенные каталитические структуры, обеспечивающие фиксацию и ориентацию на поверхности ПМ различных субстратов – белков (ферментов), имеющих домены для распознавания $PIP_{3,4,5}$ и $PIP_{4,5}$ (PH, PX, SH2, C2, PDZ).

Например:

- связывание с $PIP_{3,4,5}$ ферментов PDK_1 и Akt, при котором Akt выступает субстратом реакции для PDK_1, обеспечивает фосфорилирование Akt (катализ) и перевод ее в более активную форму (сигнализация),
- связывание PDK_1 с $PIP_{3,4,5}$ и PKC с $PIP_{4,5}$, где $PKC_{\alpha,\beta,\delta}$ является субстратом реакции, обеспечивает фосфорилирование (катализ) и активацию (сигнализацию) PKC,

- связывание PLA_2 или $PLD_{2(1)}$ с $PIP_{4,5}$ обеспечивает их фосфорилирование посредством PKC, CAMKII и т.д. Таким образом достигается перевод обоих ферментов в более активные формы.

Такие гетерогенные «каталитические матрицы», в отличие от каталитических центров ферментов, формируются на поверхности мембраны, и их размер (общее содержание $PIP_{3,4,5}$ и $PIP_{4,5}$) имеет существенное значение для скоростей процессинга (катализа) – т.е. для фосфорилирования различных субстратов (Akt, PKC, PLC, PLA_2 PLD) (рис.2). Также нужно учитывать, что в зависимости от входящих рецепторных сигналов и других факторов, концентрации $PIP_{3,4,5}$ и $PIP_{4,5}$ и, соответственно, скорости фосфорилирования и активации связанных с ними ферментов, могут увеличиваться на порядки (в первую очередь – для матрицы с участием $PIP_{3,4,5}$).

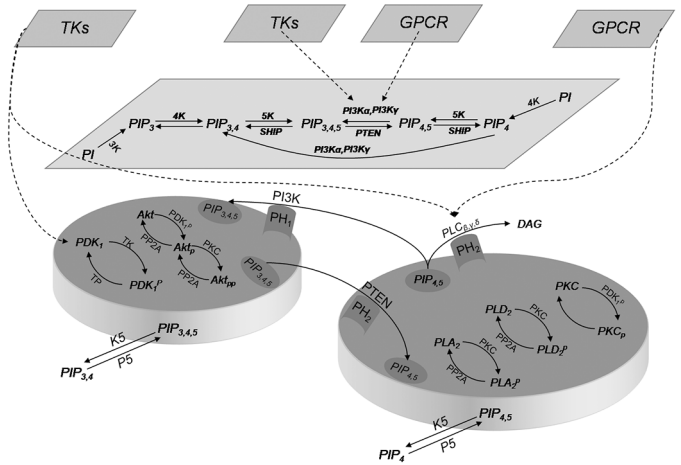


Рис.2. Передача сигналов от рецепторов к реакциям обмена PI и формирование двух каталитических матриц с участием $PIP_{3,4,5}$ и $PIP_{4,5}$, на которых происходит катализ – ковалентные модификации различных ферментов. $PH_{1,2}$ – плекстрин-подобные домены; $PIP_{4,5}$ – фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат; $PIP_{3,4,5}$ – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; $PIP_{3,4}$ – фосфатидилинозитол-3,4-бифосфат; PIP_3 – фосфатидилинозитол-3-фосфат; PIP_4 – фосфатидилинозитол-4-фосфат; 5K – фосфатидилинозитол-5-гидрокси киназы, 4K – фосфатидилинозитол-4-гидрокси киназы; PTEN, SHIP – фосфатидилинозитол фосфатазы; PLA_2 – фосфолипаза A_2; PLD_2 – фосфолипаза D_2; PP2A – протеинфосфатаза 2A; TP – тирозинфосфатаза. Разделение матриц произведено условно, чтобы разделить реакции активации PDK_1 и Akt – с одной стороны, и фосфолипаз – с другой стороны.

Другим существенным отличием таких дискретных матриц от обычных систем катализа является регуляция размеров каталитических

матриц самими участниками процесса (киназами, фосфатазами и PLC). Важно, что для превращения $PIP_{4,5}$ в $PIP_{3,4,5}$ с участием PI3K необходимо связывание PI3K с продуктом реакции – $PIP_{3,4,5}$. Для обратного превращения $PIP_{3,4,5}$ в $PIP_{4,5}$ фосфатазой PTEN также необходимо ее связывание с продуктом реакции $PIP_{4,5}$. В таких условиях оба фермента подобны двум паровозам – один укладывает рельсы впереди себя (PI3K), другой (PTEN) – их разбирает за собой.

Такое функциональное взаимодействие PI3K и PTEN является фундаментальной основой для миграции PI3K и PTEN и для формирования фронтов (градиентов) $PIP_{4,5}$ и $PIP_{3,4,5}$ на ПМ [9]. «Арбитром-стрелочником» в их споре выступает PLC, которой для расщепления $PIP_{4,5}$ в DAG и IP_3 необходимо связывание со своим субстратом – $PIP_{4,5}$ – при помощи PH-домена.

В динамическом смысле, необходимое для осуществления реакции превращение $PIP_{4,5}$ в $PIP_{3,4,5}$, связывание фермента PI3K со своим продуктом $PIP_{3,4,5}$, эквивалентно положительной обратной связи, т.е. активации этой реакции ее продуктом $PIP_{3,4,5}$. То же самое имеет место для реакции с участием PTEN. Для PLC – связывание со своим субстратом $PIP_{4,5}$ эквивалентно активации этой реакции своим субстратом.

Переводя такие представления в динамическую модель системы, мы получаем кинетическую модель системы обмена PI, представленную на рис.3. Наряду с реакциями фосфорилирования/дефосфорилирования PI, на этом рисунке также представлены реакции с участием фосфолипаз PLC, PLD и PLA_2. Без учета последних невозможно рассматривать регуляцию системы реакций обмена PI, ввиду наличия большого числа регуляторных (положительных и отрицательных) обратных связей. На рис.3 пунктирными стрелками показаны различные типы активирующих связей в системе: активация – фосфатидилинозитол-5-киназы (PI5K), посредством PA; активация PLC_γ и PLA_2 посредством $PIP_{3,4,5}$ и др. Штрихпунктирными стрелками выделена активация различных реакций посредством $PIP_{4,5}$ и $PIP_{3,4,5}$, возникающая за счет связывания PLC, PLD, PLA_2, PKC, CerK и др. с активаторами – $PIP_{4,5}$ и $PIP_{3,4,5}$.

Из этой модели следует, что невозможно анализировать обмен PI, не учитывая наличия фосфолипидных реакций, не только PLC, но и PLA_2 и $PLD_{2(1)}$.

Так, например, активация PLA_2, в присутствии избытка Ca^{2+}, должна происходить активация PLD_2 посредством AA и соответствующее накопление PA – активатора $PLC_{\beta,\gamma}$ и PI5K. Активация PI5K может обеспечивать рост концентраций $PIP_{4,5}$ и $PIP_{3,4,5}$ (размеров каталитических матриц), что в свою очередь, активирует PLC, PLD, PLA_2 за счет связывания соответствующих доменов с $PIP_{4,5}$ или за счет прямой

аллостерической активации $PLC_{\beta,\gamma}$ и PLD_2, посредством $PIP_{3,4,5}$, и CerK, посредством $PIP_{4,5}$.

Верно и обратное утверждение о том, что регуляция фосфолипидных реакций PLA_2 и PLD_2, не принимающих непосредственного участия в обмене PI, не может рассматриваться без учета реакций обмена PI, ввиду аллостерической и стерической активации этих реакций $PIP_{4,5}$ и $PIP_{3,4,5}$ (рис.3).

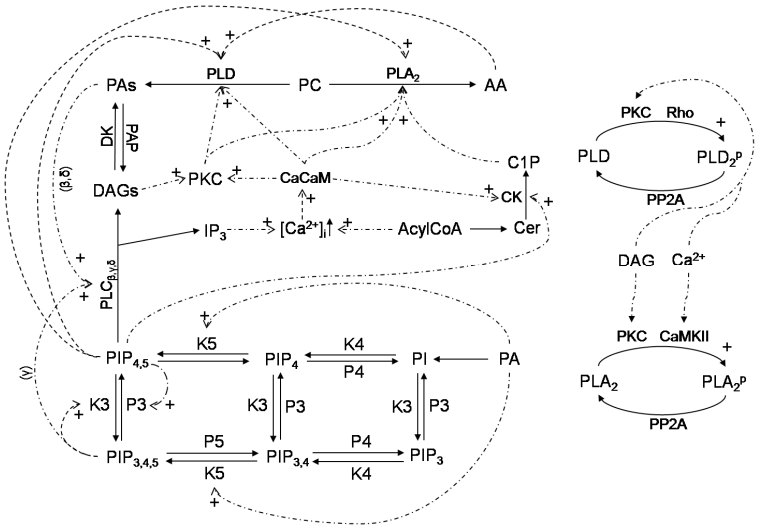


Рис.3. Функциональная схема реакции обмена PI и фосфолипаз в PM. Пунктирными стрелками показана стерическая активация различных белков – ферментов за счет связывания их доменов с $PIP_{3,4,5}$ или $PIP_{4,5}$ [1,2]. Штрих-пунктирными стрелками показаны реакции типа аллостерической активации [9-19]. PC – фосфотидилхолин; AA – арахидоновая кислота; DK – диацилглицеролкиназа; PAP – фосфатидной кислоты фосфатаза; C1P – церамид-1-фосфат; Cer – церамиды; CK – церамидкиназа; CaCaM – Ca-кальмодулин; CaMKII – кальмодулинкиназа II типа; Rho – малая ГТФаза; K3 (K4, K5) – фосфатидилинозитол киназы; P3 (P4, P5) – фосфатидилинозитол фосфатазы.

В предельном случае, в присутствии избытка жирных кислот (AcylCoA) и Ca^{2+} может возникнуть «порочный» автокаталитический цикл, приводящий к нарушению проницаемости ПМ и гибели клетки по типу некроза [20].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Overduin M. et al.* //Mol. Interv. (2001) 1(3): 150-9;
2. *Di Paolo G., De Camilli P.* //Nature (2006) 443(7112): 651-7;
3. *Blero D. et al.* //Pflugers Arch. (2007) 455(1): 31-44;
4. *Litosch I.* //IUBMB Life (2002) 54(5): 253-60;
5. *Balla A. et al.* //Mol. Biol. Cell (2008) 19(2): 711-21;
6. *Kortholt A. et al.* //Mol. Biol. Cell (2007) 18(12): 4772-9;
7. *Lemmon M.A., Ferguson K.M.* //Biochem. J. (2000) 350(1): 1-18;
8. *Tappia P.S.* //Can. J. Physiol. Pharmacol. (2007) 85(1): 25-41;
9. *Nishioka T. et al.* //Mol. Biol. Cell (2008) 19(10): 4213-23;
10. *Farooqui A.A., Horrocks L.A.* //Reprod. Nutr. Dev. (2005) 45(5): 613-31;
11. *Ochocka A.M., Pawelczyk T.* //Acta Biochim. Pol. (2003) 50(4): 1097-110;
12. *Gallegos L.L., Newton A.C.* //IUBMB Life (2008) 60(12): 782-9;
13. *Jarquin-Pardo M.* //J. Cell Biochem. (2007) 100(1): 112-28;
14. *Lamour N.F., Chalfant C.E.* //Mol. Interv. (2005); 5(6): 358-67;
15. *Evans J.H. et al.* //Mol. Biol. Cell (2006) 17(1): 56-66;
16. *Kanaho Y. et al.* //Biol. Pharm Bull. (2007); 30(9): 1605-9;
17. *Oude Weernink P.A., López de Jesús M., Schmidt M.* //Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. (2007) 374(5-6): 399-411;
18. *Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A.* //FEBS Lett. (2002) 531(1): 2-6;
19. *Cockcroft S.* //Cell Mol. Life Sci. (2001) 58(11): 1674-87;
20. *Бережнов А.В. и др.* //см. в этом сборнике. (2009) 1: 14-8.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКЦИИ МЕМБРАННОГО ХОЛЕСТЕРИНА НА ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ И АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ

Ефремова Т.Н., Чубинский-Надеждин В.И., Негуляев Ю.А., Хайтлина,С.Ю., Морачевская Е.А.

Институт цитологии РАН, СПб

Присутствие стеринов является характерной особенностью мембран клеток эукариот. Холестерин – один из основных липидных компонентов плазматической мембраны клеток млекопитающих. Известно, что физические свойства и динамика липидного бислоя существенным образом зависят от уровня мембранного холестерина. Как было показано для модельных мембран, холестерин регулирует текучесть и увеличивает механическую прочность липидного бислоя [1]. Значительно менее понятны изменения мембранных функций в зависимости от уровня холестерина в нативных клетках. Согласно

современным представлениям, в липидном бислое присутствуют микродомены (рафты), характеризующиеся более плотной упаковкой и повышенным содержанием холестерина и сфинголипидов [2,3]. Одним из основных подходов для выявления роли рафтов в процессах клеточной сигнализации являются эксперименты в условиях частичной экстракции холестерина, что, как предполагается, нарушает целостность микродоменов. Имеются данные, свидетельствующие об участии холестерина и мембранных микродоменов в регуляции некоторых типов ионных каналов [4-7]. Роль холестерина в функционировании механочувствительных каналов, активируемых при растяжении (stretch) плазматической мембраны, мало изучена, в настоящее время этот вопрос остается открытым. В нашей предшествующей работе показано, что частичная экстракция холестерина приводит к подавлению активности механочувствительных каналов в культивируемых клетках лейкемии человека линии К562 [8]. Наблюдаемые эффекты не могут быть объяснены изменением свойств физических свойств липидного бислоя клеточной мембраны. Имеющиеся данные позволяют предположить, что ингибирование механочувствительных каналов в условиях экстракции холестерина опосредовано реорганизацией кортикального цитоскелета, вызванной деструкцией мембранных микродоменов.

Для проверки этих предположений проведено сопоставление характеристик механочувствительных (стретч-активируемых) каналов в плазматической мембране клеток К562 в контроле, в условиях деструкции богатых холестерином мембранных микродоменов и при разборке F-актина. Для регистрации ионных токов через каналы плазматической мембраны использовали метод локальной фиксации потенциала (патч-кламп). При механической стимуляции участка мембраны путем уменьшения гидростатического давления в регистрирующей микропипетке наблюдали быструю активацию ионных токов через механочувствительные каналы. В контрольных экспериментах порог активации, т.е. минимальный уровень давления, необходимый для стимуляции активности каналов, составлял около 20-30мм рт. ст. Стоит отметить, что при формировании гигаомного контакта, как правило, используются сопоставимые (чаще более высокие) значения разности давлений в пипетке. Для частичной экстракции холестерина клетки инкубировали с метил-бета-циклодекстрином (МбЦД, 5мМ, 1ч.), олигосахаридом, являющимся селективным акцептором стеролов. В клетках с пониженным уровнем холестерина также обнаружена активация механочувствительных катионных каналов, характеризующихся типичной проводимостью 17пСм. Изменения затрагивали исключительно воротные характеристики: порог активации в 2,5-3 раза превышал контрольный уровень, а вероятность пребывания канала в открытом состоянии (Ро) в модифицированных клетках была

значительно ниже нормы. После обработки клеток МбЦД и цитохалазином Д минимальный уровень давления, необходимый для активации каналов составил 25-30мм рт.ст. Это значение близко к контролю и существенно ниже, чем уровень давления, необходимый для активации токов в клетках с пониженным уровнем холестерина до обработки цитохалазином Д (50-60мм рт.ст.). Экстракция холестерина снижала уровень активности каналов: значения Ро в контроле и после обработки МбЦД составляли 0.35 и 0.095, соответственно. Последуюшая обработка клеток цитохалазином Д приводила к обратному повышению активности механочувствительных каналов: значения Ро варьировали в диапазоне 0.3-0.5, что практически соответствует или даже превышает уровень активности исследуемых каналов в норме. Значение проводимости около 17пСм и потенциал реверсии, близкий к нулю характерны для исследуемых каналов в физиологических ионных условиях. Таким образом, разборка F-актина устраняет эффект подавления активации механочувствительных ионных каналов в клетках К562, наблюдаемый при частичной экстракции мембранного холестерина (рис.1).

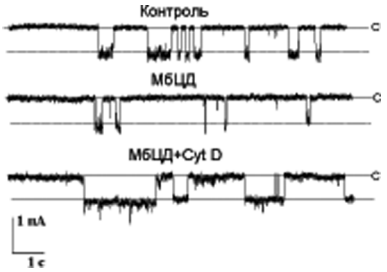


Рис.1. Активация механочувствительных каналов в клетках лейкемии человека К562 в контроле, при частичной экстракции холестерина (МбЦД) и при последующей разборке F-актина при действии цитохалазина Д (МбЦД+CytD). Мембранный потенциал -50мВ; с – закрытое состояние.

Визуализация F-актина с помощью родамин-фаллоидина в клетках К562 показывают, что нарушение целостности рафтов при снижении уровня холестерина приводит к формированию филаментов на базе имеющегося в суспензионных клетках пула глобулярного актина. Поэтому мы предполагаем, что реорганизация примембранных микрофиламентов вследствие деструкции рафтов зависит, в первую очередь, от соотношения глобулярного (G) и фибриллярного (F) актина в клетке. В данной работе для проверки предположений о механизмах реорганизации F-актина в качестве экспериментальной модели выбраны линии монослойных клеток млекопитающих, обладающих развитой в различной степени системой микрофиламентов: эмбриональные фибробласты мыши линий 3T3Balb и 3T3BalbSV40. Результаты микроскопирования показали, что инкубация нормальных фибробластов 3T3 с МбЦД (5мМ) приводит к разборке F-актина (рис.2). Напротив, в трансформированных фибробластах 3T3SV40 после экстракции

холестерина наблюдали развитие актиновой сети и образование стресс-фибрилл, аналогично процессам, происходящим в суспензионных клетках линии К-562 (рис.3).

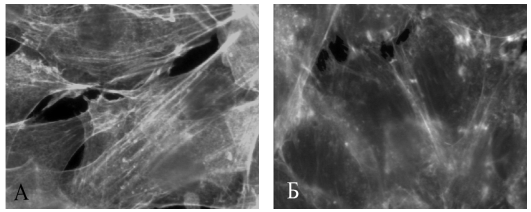


Рис.2. Реорганизация актинового цитоскелета эмбриональных фибробластов мыши линии 3T3 Balb. А – контроль. Б – метил-бета-циклодекстрин (5mM, инкубация 1 час).

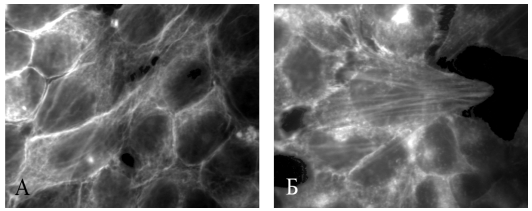


Рис.3. Реорганизация актинового цитоскелета эмбриональных фибробластов мыши линии 3T3 Balb SV40. А – контроль. Б – метил-бета-циклодекстрин (5mM, инкубация 1 час).

Анализ полученных данных подтверждает предположения о механизмах реорганизации F-актина, сопряженной с модификацией структуры микродоменов. Перестройки цитоскелета, вызванные экстракцией мембранного холестерина, по-видимому, включают декэпирование микрофиламентов и определяются, в первую очередь, балансом G- и F-актина. Полученные данные демонстрируют значение взаимосвязей мембранных структур с элементами цитоскелета для процессов внутриклеточной сигнализации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №08-04-00574 и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Needham D., Nunn R.S.*//J.Biophys. (1990) 58: 997-1009;
2. *Brown D.A., London E.*//J. Biol. Chem. (2000) 275: 17221-4;
3. *Edidin M.* //Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2003) 32: 257-83;
4. *Bergdahl A. et al.* //Circ. Res. (2003) 93: 839-47;
5. *Levitan I. et al.* //J. Gen. Physiol. (2000) 115: 405-16;
6. *Lundbaek J.A. et al.* //J. Gen. Physiol. (2004) 123: 599-621;
7. *Romanenko V.G. et al.* //J. Biophys. (2004) 87: 3850-61;
8. *Morachevskaya E.A., Sudarikova A.V., Negulyaev Y.A.* //Cell Biol. Int. (2007) 31: 374-81.

ВЛИЯНИЕ ГИПОДИНАМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ КАТИОНОВ КАЛЬЦИЯ В МИОЦИТАХ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ И МИОКАРДА КРЫС

Замай Т.Н., Кадкин А.А., Замай О.С.

Сибирский федеральный университет, Красноярск

Введение. Нормальное функционирование органов и тканей невозможно в условиях снижения функционального запроса со стороны организма, поскольку в этих условиях происходят регуляторные нарушения, связанные с отсутствием ростовых факторов, что приводит к деградации клеточных популяций. Одним из факторов снижения функциональной активности мышечных волокон является гиподинамия, приводящая к дегенеративным изменениям мышечного аппарата [1]. Снижение двигательной активности мышц в условиях гиподинамии вызывает снижение интенсивности транскрипции мРНК структурных белков и пролиферативной активности миосателлитоцитов, приводящее к уменьшению размера миоцитов и снижению в них числа ядер вследствие стимуляции апоптоза, что, в конечном счете, вызывает атрофию мышечных волокон [2].

Поскольку пусковой стимул, приводящий к атрофическим изменениям мышечных волокон в условиях гиподинамии, окончательно не выяснен, целью работы стало исследование структурно-функциональных показателей миоцитов скелетной мускулатуры и кардиомиоцитов в условиях ограничения двигательной активности.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 150-200г. Животные содержались в условиях вивария при температуре 23±2ºС без ограничения в воде и пище. Крысы опытной группы адаптировались к гиподинамии в течение 4-х недель, находясь в одиночных клетках размером 6x15x15см^3 в условиях полного ограничения подвижности. Животные контрольной группы находились в клетках без ограничения подвижности. Каждая экспериментальная группа состояла из 12-ти особей. Объектом исследования служили миоциты скелетной мускулатуры и миокарда. Выделение клеток осуществляли с помощью коллагеназы [3].

Концентрацию внутриклеточного кальция определяли с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA) при 25ºС [4,5]. Собственную флуоресценцию NAD(P)H определяли на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA) в течение двух минут при длине волны возбуждения 365нм и длине волны испускания 450нм [6]. Микровязкость липидного бислоя и белок-липидной зоны мембран миоцитов оценивали с помощью флуоресцентного зонда пирена. Микровязкость липидного бислоя мембран клеток оценивали при длине волны возбуждения 334нм, микровязкость зон белок-липидных контактов – при 286нм, микровязкость аннулярных липидов – при 282нм на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA) [7,8].

Результаты. Результаты исследований показали, что в условиях гиподинамии содержание катионов кальция $[Ca^{2+}]_{in}$ в миоцитах скелетной мускулатуры повысилось на 21% ($P<0,05$), а миокарда – на 28% ($P<0,05$) (рис.1).

Поскольку причиной такого повышения $[Ca^{2+}]_{in}$, помимо регуляторной, могло стать изменение физико-химических свойств клеточных мембран, мы провели исследование ее относительной микровязкости в области липидного бислоя, аннулярных липидов и зон белок-липидного контакта. Установлено, что, несмотря на повышение содержания катионов кальция в миоцитах обоих типов мышц, изменения микровязкости мембран наблюдались только в миоцитах скелетной мускулатуры (рис.2,3), о чем свидетельствовало изменение величины коэффициента эксимеризации пирена $J_э/J_м$, характеризующего текучесть мембраны. Причем наибольшие изменения мы наблюдали в области аннулярных липидов. Так, если коэффициент эксимеризации пирена $J_э/J_м$ в липидном бислое и зонах белок-липидного контакта повышался в среднем на 27% ($P<0,05$), то в зоне аннулярнных липидов это увеличение достигало 40% ($P<0,05$).

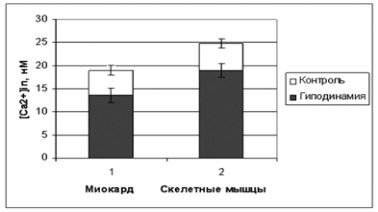


Рис.1. Влияние гиподинамии на содержание катионов кальция в миоцитах миокарда (1) и скелетных мышц (2). В каждой исследуемой группе n=12.

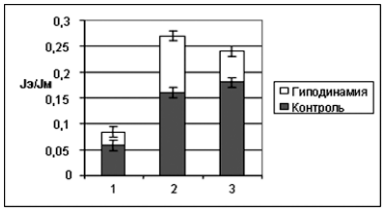


Рис.2. Влияние гиподинамии на коэффициент эксимеризации пирена $J_э/J_м$ клеточных мембран миоцитов скелетной мускулатуры. 1 – липидный бислой; 2 – аннулярные липиды; 3 – зона белок-липидного контакта. В каждой исследуемой группе n=12.

Обсуждение результатов. В норме размер клеток и постоянство клеточных популяций в составе организма регулируется различными механизмами с участием активаторов и ингибиторов клеточного деления

[10], соотношение которых находится в соответствии с функциональной активностью ткани. Повышение функционального запроса, например, при адаптации к эндогенным или экзогенным стрессорным факторам стимулирует гипертрофию ткани [11], а снижение зачастую вызывает ее гипотрофию или атрофию. Например, при кастрации происходит атрофия железистых клеток простаты, при снижении нервной регуляции – атрофия мышечных волокон.

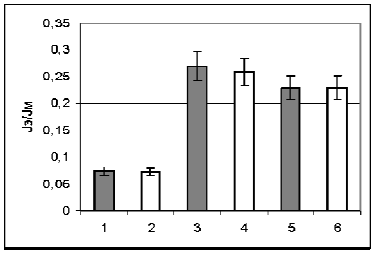


Рис.3. Влияние гиподинамии на коэффициент эксимеризации пирена $J_э/J_м$ клеточных мембран миоцитов миокарда. 1,2 – липидный бислой; 3,4 – аннулярные липиды; 5,6 – зона белок-липидного контакта. 1,3,4 – контроль; 2,4,6 – гиподинамия. В каждой исследуемой группе n=12.

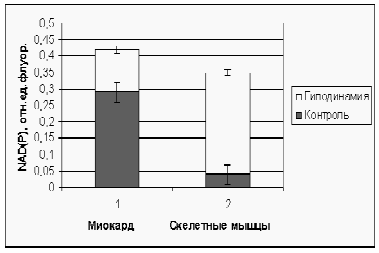


Рис.4. Влияние гиподинамии на уровень NAD(P)H в миоцитах миокарда (1) и скелетных мышц (2). В каждой исследуемой группе n=12.

Механизмы, с помощью которых реализуются процессы подавления клеточного деления или уменьшения размеров клетки, изучены недостаточно. Несмотря на то, что процессы гипотрофии и атрофии мышечной ткани сопровождаются нарушением многих биохимических констант и энергетического обмена, природа пускового стимула этих нарушений окончательно не ясна. Предположительно, одним из наиболее важных факторов, через который реализуется снижение мышечной массы, является внутриклеточный кальций, участвующий в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Для исследования роли катионов кальция в регуляции тканевой гипотрофии мы использовали модель гипокинезии, в которой ограничение двигательной активности вызывает вначале быстрое уменьшение размера клеток, а затем и их количества, в результате чего мышечная масса уменьшается.

Результаты наших исследований показали, что, действительно, в условиях подавления функциональной активности скелетной мускулатуры масса животных уменьшалась, что свидетельствовало о снижении объема мышц, при этом содержание внутриклеточного кальция

увеличивалось. Надо полагать, что, несмотря на то, что содержание катионов кальция возрастало, как в скелетной мускулатуре, так и в миокарде, механизм этого феномена в разных типах мышц отличался, поскольку только в миоцитах скелетной мускулатуры повышение $[Ca^{2+}]_{in}$ сопровождалось изменением микровязкости клеточной мембраны.

В миокарде причина увеличения $[Ca^{2+}]_{in}$ была, скорее всего, на этом этапе адаптации к гиподинамии регуляторной, вызванной усилением секреции стрессовых гормонов вследствие ограничения двигательной активности у крыс. В пользу таких выводов свидетельствует отсутствие отличий в относительной массе сердца между контрольными и опытными животными (0,33±0,02 – контроль; 0,32±0,03 – гипокинезия). В скелетной мускулатуре к этому времени, по-видимому, развивались уже не только функциональные, но и структурные нарушения. Однако, независимо от причины, длительное увеличение внутриклеточного содержания катионов кальция с неизбежностью оказывало неблагоприятный эффект на метаболизм миоцитов, активируя фосфолипазы, каспазы и т.д. В частности, известно, что накопление диастолического кальция в кардиомиоцитах активирует ДНКазу I, запускающую апоптоз, сопровождающийся межнуклеосомальным расщеплением ДНК [12]. Поэтому, очевидно, более длительное ограничение двигательной активности должно приводить к снижению массы сердца.

Кроме катионов кальция важное регуляторное значение играет окислительно-восстановительный статус клетки, который мы оценивали с помощью уровня NAD(P)H, повышение которого, как показали исследования, проведенные на клеточных линиях карциномы человека, фибросаркомы крысы и нормальных эмбриональных фибробластов, обладает антипролиферативным действием [13]. В наших экспериментах уровень NAD(P)H в миоцитах обоих типов мышц был увеличен, причем, если в кардиомиоцитах всего на 33%, то в миоцитах скелетной мускулатуры – на 89%. Эти данные еще раз подтвердили вывод о более выраженных нарушениях в скелетной мускулатуре в условиях гиподинамии по сравнению с кардиомиоцитами. Возможной причиной повышения уровня восстановленных пиридиннуклеотидов в миоцитах в условиях гиподинамии является подавление окислительных процессов в клетке из-за снижения энергетических расходов и увеличения в клетке уровня АТР.

Таким образом, стимулом, запускающим процесс снижения мышечной массы в условиях гиподинамии, является, по-видимому, внутриклеточный кальций, уровень которого возрастает под влиянием стрессовых гормонов, секреция которых у крыс в условиях ограничения двигательной активности повышается. Длительное увеличение уровня $[Ca^{2+}]_{in}$ в условиях сниженной функциональной активности мышечной

ткани подавляет окислительные процессы и увеличивает уровень NADH, обладающий антипролиферативным эффектом. Кроме того, в условиях внутриклеточного повышения кальция стимулируется активность ферментов, участвующих в реализации программы апоптоза. В совокупности все эти процессы приводят к уменьшению размера миоцита и снижению их количества, что вызывает гипотрофию мышечной массы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Тизул А.Я.* //Болез. челов., обуслов. дефицитом двигат. активн., и здоров. М. (2001) 248с;
2. *Волков Н.И.* //Биохим. мышечн. деятел. М. (2001) 406с;
3. *Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е.* //Фарм. рецепт. АТФ М. (1999) 209с;
4. *Grinkievich Y., Poenie M., Tsien R.I.* //J. Biol. Chem. (1985) 260: 3440-50;
5. *Замай Т.Н., Замай А.С.* //Биохимия (2006) 71(10): 1347-53;
6. *Petty H.R., Kindzelskii A.L.* //PNAS Biophys. (2001) 98: 3145-9;
7. *Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.* //Флуор. зонды в исслед. биол. мембр. М. (1980) 320с;
8. *Бордюшков Ю.Н. и др.* //Вопросы Мед. Химии (2000) 1: 72-80;
9. *Дак Д.К., Молик Н.* //Биохимия (2004) 69(1): 16-24;
10. *Епифанова О.И.* //Лекции о кл. цикле М. (2003) 159с;
11. *Замай Т.Н., Замай О.С.* //Бюлл. Эксп. Биол. Мед. (2007) 144 (9): 251-2;
12. *Nitahara J.A., Cheng W., Liu Y.* //J. Mol. Cell Cardiol. (1998) 30: 519-35;
13. *Slade N. et al.* //Anticancer Res. (1999) 19: 5355-60.

ДИНАМИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ В МИНИМАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АКТИВАЦИИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ SRC.

Каймачников Н.П.[1,2], Холоденко Б.Н.[2]

[1]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[2]Университет Томаса Джефферсона, Филадельфия, США

Около 40 лет назад в вирусе саркомы Рауса был идентифицирован ген v-*src*, отвечающий за развитие этой злокачественной опухоли. Его клеточный аналог c-*src* был первым из открытых протоонкогенов и в настоящее время наиболее хорошо изучен. Ген c-*src* кодирует тирозин-специфичную протеинкиназу семейства Src, объединяющего несколько ферментов со сходными структурными и функциональными свойствами. Эти протеинкиназы фосфорилируют широкий круг субстратов (белки фокальной адгезии, адапторные белки, факторы транскрипции, фосфолипазу Cγ) и принимают участие в целом ряде внутриклеточных процессов, к которым относятся адгезия и подвижность клеток, инициация синтеза ДНК, дифференциация, митоз. Src активируется рецепторными тирозинкиназами, фосфатазами и некоторыми другими механизмами. Неактивная конформация Src обеспечивается связыванием ингибирующего фосфотирозина pY_i на С-конце молекулы с ее SH2-областью. Дефосфорилирование этой группы дает частично активную конформацию, и полная активность требует автофосфорилирования тирозина Y_a в активационной петле каталитической области [1,2]. Была предложена математическая модель, включающая автофосфорилирование Src и две обратные связи, возникающие за счет того, что Src фосфорилирует деингибирующую фосфатазу и белок, который связывает и активирует ингибирующую киназу. В модели получены бистабильные переключения, возбудимость и колебания [3,4]. Ниже мы показываем, что сложное динамическое поведение Src возможно благодаря автофосфорилированию без регуляции конвертирующих ферментов. Вследствие наличия межмолекулярного автофосфорилирования у ряда других протеинкиназ мы предполагаем, что они могут обладать таким же поведением.

На рис.1 показаны рассматриваемые реакции, приводящие к активации и деактивации Src. Согласно данным [5], учтена вторая активная форма S_2, дополнительно фосфорилированная по ингибирующему тирозину, которая в результате дефосфорилирования pY_a превращается в исходную форму S_i.

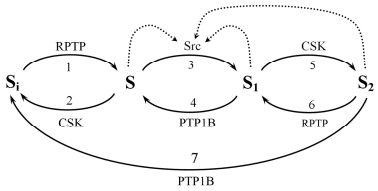


Рис.1. Кинетическая схема цикла активации/деактивации Src. S_i – ингибированная форма (pY_i, Y_a), S – частично активная (Y_i, Y_a), S_1 – полностью активная (Y_i, pY_a), S_2 – полностью активная (pY_i, pY_a). Сплошные стрелки представляют реакции, катализируемые указанными ферментами, пунктирные стрелки указывают на реакции межмолекулярного автофосфорилирования с участием различных форм Src.

При построении математической модели для простоты принято, что все реакции ненасыщенные кроме стадии 4, которая описана уравнением Михаэлиса-Ментен. Исследовались также случаи насыщаемости других стадий, которые продемонстрировали тот же набор свойств, что и в базисной модели. Уравнения модели имеют вид:

$$\frac{ds_i}{dt} = k_2 s - k_1 s_i + k_7 s_2, \quad (1)$$

$$\frac{ds_1}{dt} = k_3 s\left(\delta s + s_1 + s_2\right) - \frac{k_4 s_1}{\beta + s_1} + k_6 s_2 - k_5 s_1, \quad (2)$$

$$\frac{ds_2}{dt} = k_5 s_1 - (k_6 + k_7) s_2, \qquad (3)$$

где s_i, s_1, и s_2 – концентрации S_i, S_1 и S_2, нормированные на постоянный пул S_t, и $s = 1 - s_i - s_1 - s_2$. Стационарные состояния (СС) анализировались путем построения на плоскости s_i, s_1 двух квазистационарных кривых (рис.2), которые определяются условиями равенства нулю правых частей (1) и (2) при соотношении $s_2 = \xi s_1$, где $\xi = k_5/(k_6+k_7)$, полученном из $ds_2 / dt = 0$.

Из рис.2 видно, что первая квазистационарная кривая имеет Z-образную форму и пересекается со второй кривой (в данном случае прямая линия) в одной или трех точках в зависимости от значений параметров k_1 и k_2. Эти параметры отражают активность фосфатазы RPTP и киназы CSK, которые могут меняться при стимуляции клеточных рецепторов. При наличии трех СС два из них (O_1 и O_3) устойчивы и промежуточное O_2 неустойчиво. Такое сочетание, возникающее как при положительном (рис.2A), так и при отрицательном (рис.2B) наклоне прямых, означает бистабильность системы. В этом режиме система находится в одном из устойчивых СС и переключается между ними при достаточно сильных возмущениях концентраций. Если исходное СС находится на нижней ветви Z-образной кривой, то с ростом значения параметра (увеличивающееся k_1 на рис.2A,B) при достижении некоторого критического значения происходит резкий переход на верхнюю ветвь, а обратный переход происходит при меньшем значении параметра, то есть наблюдается явление гистерезиса. При относительно низких активностях RPTP и CSK единственное СС может располагаться на промежуточном участке Z-образной кривой, где оно неустойчиво и окружено устойчивым предельным циклом (рис.2C), которому соответствуют незатухающие колебания концентраций различных форм Src во времени.

Те же квазистационарные кривые применимы к редуцированной системе второго порядка, которая следует из модели (1)-(3) в предположении о том, что стадии 5 и 6 (рис.1) намного быстрее остальных. Тогда концентрации двух активных форм s_1 и s_2 связаны уравнением $s_2 = K_{eq} s_1$, которое формально совпадает с использованным выше соотношением при $\xi = K_{eq}$. Это позволяет сделать вывод, что основные динамические свойства не требуют наличия третьей переменной.

Построение на плоскости двух параметров границы устойчивости (бифуркация Андронова-Хопфа) и границы существования трех СС (бифуркация седло-узел) дает разбиение этой плоскости на области с различным поведением системы [6]. Для модели (1)-(3) плоскость k_1, k_2 или [RPTP], [CSK] содержит области режимов, представленных на рис.2, а также меньшие по размерам области одного устойчивого (O_1 или O_3) и трех неустойчивых СС (результаты не показаны).

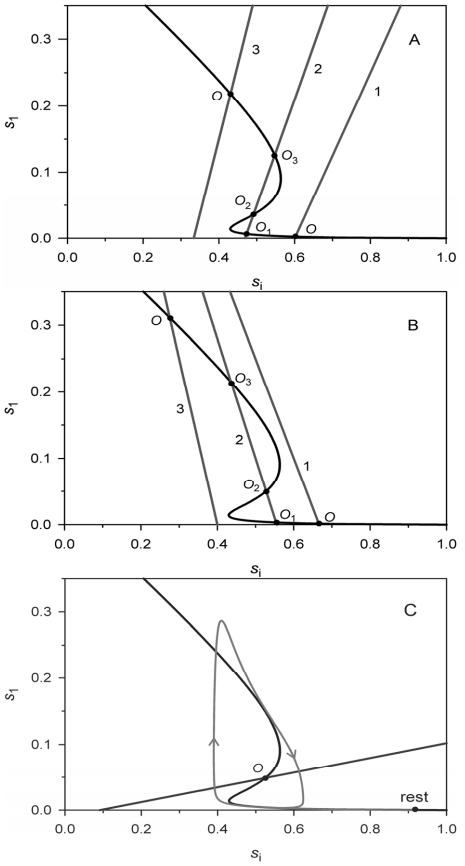


Рис.2. Различные типы пересечения квазистационарных кривых и соответствующие им стационарные состояния модели: единственное (O) или три (O_1, O_2 и O_3). На панели C неустойчивое состояние O окружено предельным циклом, стрелки на нем указывают направление движения Значения параметров (A) k_1=0.2 s^{-1} (линия 1), 0.34 s^{-1} (2) и 0.6 s^{-1} (3), k_2=0.3 s^{-1}. (B) k_1=0.5 (1), 0.8 (2) и 1.5 (3), k_2=1 (все константы скорости имеют размерность s^{-1}). (C) k_1=0.1, k_2=0.01, k_5=2, k_6=1 (s^{-1}). Точка «rest» – исходное состояние с s_i=0.916, s_1=s_2=7.32·10^{-5}. Для всех кривых на A – C остальные параметры имеют значения: k_3=20, k_4=1, k_7=1 (s^{-1}), β=0.01, δ=0.05, ξ=1.

При определенных условиях Src может демонстрировать свойство возбудимости. Если СС находится на нижней ветви Z-образной кривой, то существует порог по отклонению концентрации одной из форм Src и по отклонению активности конвертирующего фермента, сверх которого генерируется импульс высокой амплитуды. После спада импульса имеется рефрактерный период, в течение которого тот же стимул не вызывает ответа.

Для определения влияния внешних стимулов на незатухающие колебания Src численным интегрированием системы (1)-(3) были построены зависимости максимума и минимума активной формы s_1, а также периода, от [RPTP] и [CSK]. Установлено, что с ростом [RPTP] и с уменьшением [CSK] происходит увеличение частоты при сравнительно небольшом увеличении амплитуды колебаний. Это явление сходно с хорошо известной частотной модуляцией колебаний цитозольного Ca^{2+} агонистами в гепатоцитах и некоторых других клетках. Детальный анализ бифуркации исчезновения предельного цикла показал, что при изменении параметра диапазон колебаний шире диапазона неустойчивости СС, и имеются участки сосуществования колебаний с устойчивым СС. Так как предельный цикл исчезал с конечным периодом, то был сделан вывод, что происходит глобальная бифуркация слияния устойчивого предельного цикла с неустойчивым.

Экспериментальная проверка модельных предсказаний может быть проведена *in vitro* с использованием очищенных Src, CSK и фосфатаз, концентрация которых может варьироваться в необходимых пределах. Для отражения возможной мембранной локализации этих молекул в клетке [2], можно предложить использование мембранных бислоев или липосом. Регистрация состояния Src может производиться иммуноблоттингом, а также с помощью сенсоров FRET, которые способны обеспечить высокое временное разрешение при быстрых (например, колебательных) процессах.

Итак, Src может демонстрировать разнообразное динамическое поведение благодаря внутренне присущим свойствам цикла его активации и деактивации без участия каких-либо внешних регуляторных связей. Эти результаты помогают лучше понять особенности Src-медиируемой сигнализации в норме и ее нарушения при раке.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Harrison S.C.* //Cell (2003) 112: 737-40;
2. *Yeatman T.J.* //Nat. Rev. Cancer (2004) 4: 470-80;
3. *Fuss H. et al.* //Bioinformatics (2006) 22: E158-65;
4. *Fuss H. et al.* //Biophys. J. (2008) 94: 1995-2006;
5. *Sun G., Sharma A.K., Budde R.J.* //Oncogene (1998) 17: 1587-95;
6. *Каймачников Н.П., Сельков Е.Е.* //Биофизика (1975) 20(4): 703-8.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ

Ковалевский Д.А.[2], Михайлова И.Н.[1], Морозова Л.Ф.[1], Бурова О.С.[1], Голубева В.А.[1], Воронина Е.С.[3], Черемушкин Е.А.[1], Утяшев И.А.[1], Аллахвердян Г.С.[1], Петенко Н.Н.[1], Кондратьева Т.Т.[1], Киселев С.Л.[4], Демидов Л.В.[1], Бибилашвили Р.Ш.[2], Барышников А.Ю.[1]

[1]Государственное учреждение Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва
[2]ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий, Москва
[3]Государственное учреждение Медико-генетический научный центр РАМН, Москва
[4]Институт общей генетики им. Вавилова РАН, Москва

Введение. Меланома – злокачественная опухоль, развивающаяся из меланоцитов – пигментных клеток, продуцирующих меланины и преимущественно локализуется в коже. Одна из наиболее злокачественных опухолей человека, часто рецидивирующая и метастазирующая. Настоящие системы определения степени дифференцировки опухоли, основанные на морфологических особенностях опухоли, не могут точно определить степень дифференцировки или прогнозировать риск развития метастазов для отдельного пациента. Мы выдвигаем гипотезу, что характеристика экспрессии раково-тестикулярных генов при меланоме кожи улучшит классификацию этих опухолей и прогноз метастазирования. Для определения клинически значащую экспрессию раково-тестикулярных генов при меланоме мы использовали в исследовании метастатические клеточные линии меланомы, метастазы меланомы в лимфатические узлы и первичные опухоли для исследования методом обратной транскрипции совмещенной с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР).

Материалы и методы. Образцы опухоли были получены у 27 пациентов меланомы, 17 первичных опухолей после эксцизионной биопсии и 10 тонкоигольных аспирационных биопсий метастазов в лимфатические узлы на поздней стадии. Также были получены 21 меланомная клеточная линия от пациентов с диссеминированной меланомой. Суммарную РНК из культур опухолевых клеток меланомы выделяли методом с применением кислого фенола, гуанидина изотиоцианата и аммония тиоцианата. Далее суммарная РНК была транскрибирована (ОТ) и амплифицирована (ПЦР). Фотографии гель-электрофореза продуктов ПЦР были оцифрованы при помощи

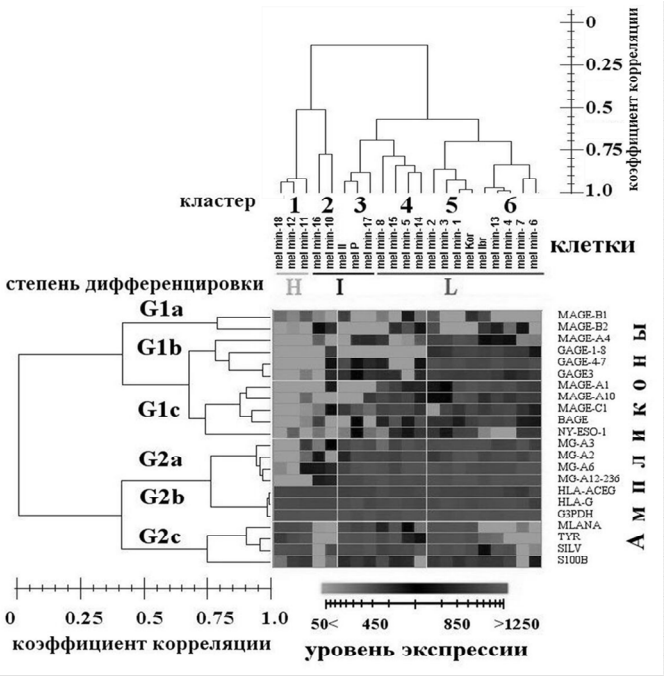


Рис.1. Двумерный кластерный анализ экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов (РТА) и дифференцировочных антигены меланомы методом ОТ-ПЦР в культурах клеток меланомы [1]. Представлены результаты полно связного кластерирования (по обоим направлениям) данных по экспрессии 22 генов в 21 культуре клеток полученных от пациентов с диссеминированной меланомой. Кластерированию подвергался весь набор логарифмированных по основанию 2 данных ОТ-ПЦР, нормированных для каждой культуры на среднюю величину интенсивности полос ОТ-ПЦР генов HLA-G1, HLA-E и GAPDH для каждой клеточной линии. Никакой последующей центровки или нормировки данных не производилось. Для расчета меры несходства узлов дендрограмм использовалась корреляция по Спирману или эвклидово расстояние и коэффициент корреляции Пирсона, с одинаковым результатом. Цветовая шкала, приведенная на двумерной кластерной картине и на врезке, соответствует исходной интенсивности полос на электрофореграммах, а не их логарифмированному преобразованию использованному для расчета связности при кластерировании. Гены обозначены символами по вертикали, культуры клеток по горизонтали кластерной картины. Шкалы коэффициентов корреляции генов (слева) и культур клеток (сверху) отвечают корреляции для узлов дерева. Для дендрограмм использованы коэффициенты корреляции по Пирсону. При кластерировании для зондов генов с вырожденной специфичностью использованы весовые коэффициенты обратно пропорциональные числу зондов соответствующих их вырожденности: для GAGE-1-8 и GAGE-4-7 – 0.5, для MG-A3, MG-A2, MG-A6, MG-A12-236 – 0.25, HLA-G и HLA-A – 0.5. Дендрограмма культур клеток однозначно разбивает все клеточные линии на 6 групп, отсеченных по коэффициенту корреляции 0,75.

программы ImageQuant и результаты представлены в произвольных единицах. Иерархическое двухмерное кластерирование данных ОТ-ПЦР проводили при помощи программ Майкла Эйзена «Gene Cluster v3» и «Tree View». Для определения статистического значения корреляции использовали t-тест Стьюдента.

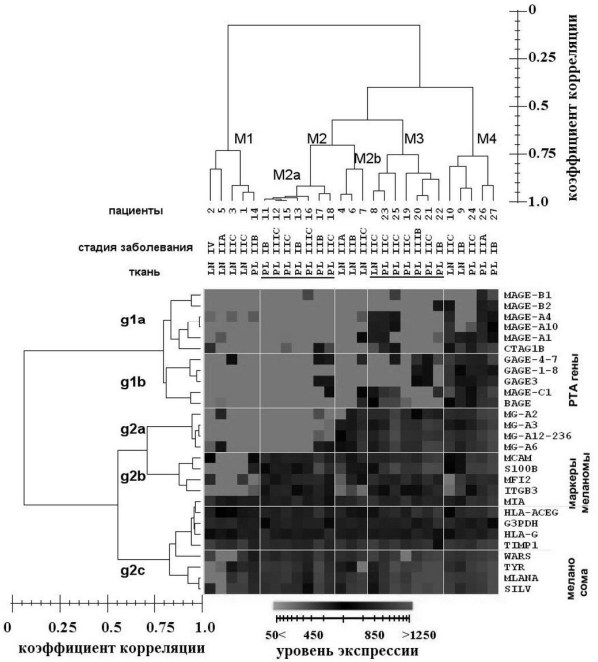


Рис.2. Двумерный кластерный анализ экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов (РТА) и дифференцировочных антигены меланомы методом ОТ-ПЦР в первичных опухолях и метастазах меланомы в лимфатические узлы [1]. Детали кластерирования см. в подписи к рис.1.

Результаты. Экспрессия 4 дифференцировочных антигена меланомы и 15 раково-тестикулярных генов анализировалась во всех клеточных линиях, первичных опухолях и метастазах в лимфатические узлы. Морфологические характеристики степени дифференцировки также изучались во всех случаях. Митотический индекс был определен в первичных опухолях. Определение экспрессии генов и морфологии клеток меланомы выявило корреляцию между экспрессией раково-тестикулярных генов и степенью дифференцировки опухолевых клеток (рисунки 1 и 2). Также была выявлена корреляция между экспрессией раково-тестикулярных генов и митотическим индексом в первичных опухолях.

Обсуждение результатов. Приведенные на рисунках 1 и 2 результаты свидетельствуют о том, что между степенью дифференцировки клеточной культуры и уровнем экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов существует корреляция, определяемая, вероятно, частотой митозов. Соответствующие коэффициенты корреляции между степенью дифференцированности (морфологическим типом) и уровнем экспрессии генов групп *G1в, G1c, G2a* равны соответственно 0,65, 0,79 и 0,87, а групп генов *G1a и G2c равны* 0,3 и -0,34. Следует также отметить отсутствие корреляции между экспрессией генов дифференцировочных антигенов меланомы и раково-тестикулярных антигенов, (коэффициент корреляции варьирует между 0,25 и 0,09). Соответствующие коэффициенты корреляции между экспрессией генов раково-тестикулярных антигенов и митотическим индексом в первичных опухолях для MAGEA1,2,3,6,10,12 варьирует между 0,48 и 0,60.

Заключение. Настоящее исследование выявило [1]: отсутствие корреляции между экспрессией генов кодирующих компоненты меланосом (MLANA; TYR; WARS; SILV) и степенью дифференцировки клеток и наличие корреляции между уровнем экспрессии раково-тестикулярных генов (MAGEA1,2,3,6,10,12; GAGE1-8, BAGE, MAGEC1) и степенью дифференцировки клеток меланомы. Экспрессия этих генов, по-видимому, будет лучшей характеристикой постепенной потери дифференцировки клеток меланомы и, возможно, постепенному увеличению их злокачественности. Это исследование позволит нам определить их потенциал для прогнозирования клинического течения меланомы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mikhaylova I.N. et al.* //Melanoma Res. (2008) 18(5):303-13.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МЕХАНО-РОСТОВОГО ФАКТОРА

Кравченко И.В., Фуралёв В.А., Попов В.О.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Введение. Механо-ростовой фактор (МРФ) образуется в мышечных волокнах в результате альтернативного сплайсинга мРНК инсулино-подобного фактора роста 1 (ИПФР-1) и отличается от него наличием вставки из 49 нуклеотидных пар, приводящей к сдвигу рамки считывания. Эта форма представляет особый интерес для исследователей в области мышечной биохимии, поскольку её экспрессия резко возрастает в ответ на механические стимулы и на повреждение мышечной ткани – так, спустя 2,5 часа после интенсивной мышечной нагрузки количество мРНК этой формы возрастает в 4-8 раз [1,2]. ИПФР-1 и МРФ выполняют различные функции в таких процессах, как мышечная регенерация и развитие гипертрофии скелетной мышцы в результате упражнений. МРФ стимулирует деление миобластов, но замедляет их дифференцировку, тогда как ИПФР-1 активирует этот процесс [3]. В системе *in vivo* при повреждении мышцы пик экспрессии мРНК, кодирующей МРФ, наблюдается раньше, чем ИПФР-1. МРФ действует на клетку через другие рецепторы, чем ИПФР-1. Более того, химически синтезированный пептид, содержащий 24 аминокислоты из участка человеческого МРФ, отсутствующего в зрелом ИПФР-1, оказывает *in vitro* то же воздействие на миобласты, что и полноразмерный МРФ [3]. Этот пептид обладает и ещё одним физиологическим эффектом, играющим роль в восстановлении повреждённой мышцы – он стимулирует миграцию клеток – миогенных предшественников [4]. Наконец, недавно было обнаружено, что данный пептид защищает клетки миокарда от апоптоза, вызываемого ишемией [5], а также мотонейроны [6]. В научной литературе широко обсуждаются возможности использования МРФ для исправления возрастного ослабления мышечных функций, для лечения миодистрофий и для улучшения спортивных показателей [7,8].

Однако до сих пор остаётся практически неизученным процесс индукции синтеза МРФ: неизвестны ни индукторы синтеза этого белка при повреждении мышечной ткани, ни компоненты сигнального пути, приводящего к запуску его синтеза; малоизученным остаётся и регуляция синтеза МРФ в других физиологических состояниях помимо повреждения скелетной мышцы. В связи с вышеизложенным, изучение индукции синтеза МРФ является весьма актуальной биохимической проблемой.

В нашей лаборатории впервые были получены моноклональные антитела к МРФ, и на их основе создана высокочувствительная тест-система для определения его концентрации [9]. Это позволило изучать экспрессию МРФ не только на уровне мРНК с помощью метода ПЦР в реальном времени, что практикуется многими исследователями, но и на уровне белка.

В ходе выполнения данной работы были поставлены следующие цели: 1) изучить механизм индукции МРФ при повреждении скелетной мышцы; 2) исследовать влияние факторов клеточного стресса на синтез МРФ; 3) изучить участие вторичных мессенджеров в активации экспрессии МРФ.

Результаты и обсуждение. В ходе исследований, посвящённых изучению механизма индукции МРФ при повреждении скелетной мышцы, было обнаружено, что обработка гомогенатом скелетной мышцы индуцирует выработку МРФ в культурах миобластов и миотуб, но не фибробластов или мезотелиальных клеток, причем индуктор имеет белковую природу. Дальнейшие исследования показали, что индуктор является миофибриллярным белком, локализованным в толстых филаментах.

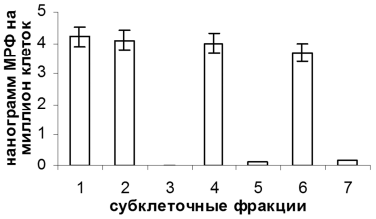


Рис.1. Индукция синтеза МРФ в миобластах мыши различными субклеточными фракциями мышечного гомогената. 1 – исходный гомогенат; 2 – супернатант 600g; 3 – осадок 600g; 4 – супернатант 2000g; 5 – осадок 2000g; 6 – изолированные миофибриллы; 7 – гомогенат без миофибрилл.

Таким образом, было показано, что одним из факторов, стимулирующих синтез МРФ в миобластах при повреждении мышечной ткани, является освобождение из поврежденных мышечных волокон миофибриллярного белка, который может оказывать паракринное действие на расположенные рядом миобласты.

В ходе исследований, посвящённых влиянию факторов клеточного стресса на синтез МРФ, было обнаружено, что гипертермия стимулируют синтез МРФ как в миобластах, так и в многоядерных миотубах, причем активация наблюдается как на уровне мРНК, так и белка.

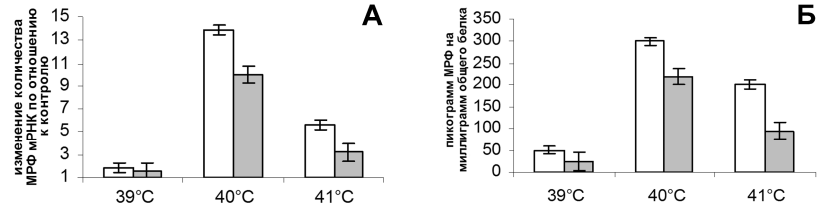


Рис.2. Активация синтеза МРФ в условиях гипертермии на уровне мРНК (А) и белка (Б) в культуре миобластов (белые столбики) и дифференцированных миотуб (серые столбики). В качестве контроля были взяты клетки, инкубировавшиеся при 37°С и pH 7,4.

Было показано, что ацидификация культуральной среды также стимулирует экспрессию этого ростового фактора в культурах миобластов и миотуб.

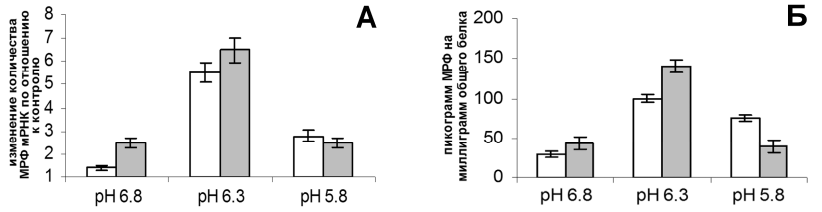


Рис.3. Активация синтеза МРФ в условиях ацидификации на уровне мРНК (А) и белка (Б) в культуре миобластов (белые столбики) и дифференцированных миотуб (серые столбики). В качестве контроля были взяты клетки, инкубировавшиеся при 37°С и pH 7,4.

Следует отметить, что ни один из других изучавшихся факторов клеточного стресса (гипоксия, гипероксия, гиперосмос, обработка липополисахаридом) не вызывал стимуляции синтеза этого ростового фактора. Воздействие обоих факторов, повышавших экспрессию МРФ в наших экспериментах, – гипертермии и ацидификации – имеет место в процессе интенсивного мышечного сокращения. Более того, максимальная стимуляция синтеза этого ростового фактора наблюдалась при физиологических значениях температуры и pH. Это даёт основание предполагать, что обнаруженная активация экспрессии МРФ может служить одним из физиологических механизмов повышения мышечной массы в результате интенсивных физических нагрузок.

В ходе дальнейших экспериментов было обнаружено, что гидрокортизон блокирует стимулирующий эффект гипертермии и ацидификации на синтез МРФ.

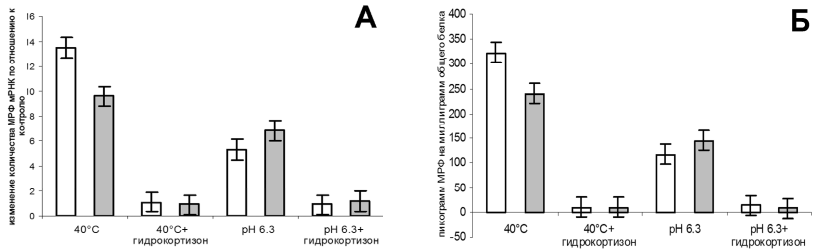


Рис.4. Ингибирование гидрокортизоном синтеза МРФ, индуцированного с помощью гипертермии и ацидификации, на уровне мРНК (А) и белка (Б) в культуре миобластов (белые столбики) и дифференцированных миотуб (серые столбики). В качестве контроля были взяты клетки, инкубировавшиеся при 37°С и pH 7,4.

Хорошо известным побочным эффектом терапевтического действия глюкокортикоидов является развитие стероидной миопатии: уменьшение мышечной массы и возникновение мышечной слабости. Наряду с другими механизмами (стимуляция апоптоза, блокирование митогенного эффекта ростовых факторов), обнаруженное нами ингибирование синтеза МРФ также может вносить свой вклад в развитие стероидной миопатии.

В ходе исследований, посвящённых изучению участия вторичных мессенджеров в активации экспрессии МРФ, было обнаружено, что среди изучавшихся соединений только проникающий через мембраны аналог цАМФ (дибутирил-цАМФ) оказывает стимулирующее воздействие на синтез данного ростового фактора как в миобластах, так и в дифференцированных миотубах. При этом кальциевый ионофор А23187 существенно понижал экспрессию миостатиновой мРНК, а активатор протеинкиназы С форбол-миристоил-ацетат и индуктор образования высокоактивных форм кислорода LY-83583 не оказывали значительного эффекта на синтез МРФ.

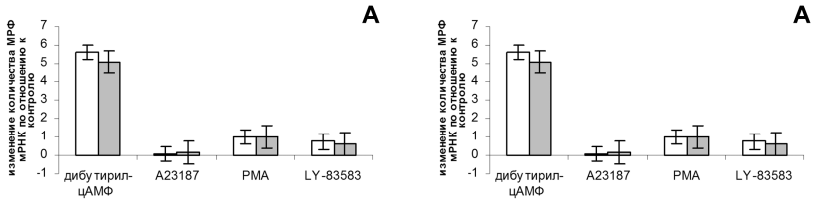


Рис.5. Влияние вторичных мессенджеров на синтез МРФ на уровне мРНК (А) и белка (Б) в культуре миобластов (белые столбики) и дифференцированных миотуб (серые столбики).

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что гипертермия и ацидификация входят в число механизмов, индуцирующих синтез МРФ при интенсивной мышечной нагрузке. Было также показано, что одним из механизмов активации синтеза МРФ в ответ на повреждение является освобождение белка-индуктора, входящего в состав толстых филаментов. Было обнаружено стимулирующее действие цАМФ на синтез данного ростового фактора.

ЛИТЕРАТУРА

1. *McKoy G.et al.* //J. Physiol. (1999) 516(2): 583-92;
2. *Hameed M. et al.* //J. Physiol. (2003) 547(1): 247-54;
3. *Yang S.Y., Goldspink G.* //FEBS Lett. (2002) 522 (1-3): 156-60;
4. *Mills P. et al.* //Exp. Cell Res. (2007) 313(3): 527-37;

5. *Carpenter V. et al.* //Heart Lung Circ. (2008) 17(1): 33-9;
6. *Riddoch-Contreras J. et al.* //Exp. Neurol. (2009) 215(2): 281-9;
7. *Goldspink G.* //Rejuvenation Res. (2007) 10(3): 397-405;
8. *Goldspink G., Wessner B., Bachl N.* //Curr. Opin. Pharm. (2008) 8(3): 352-7;
9. *Kravchenko I.V. et al.* //Hybridoma (Larchmt) (2006) 25(5): 300-5.

ГОМОЛОГИЧНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ИЗОФОРМ РЕЦЕПТОРА ПРОЛАКТИНА В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЕЗЫ КОРОВ

Лебедева И.Ю.[1,2], Гладырь Е.А.[1], Сингина Г.Н.[1]

[1]Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства РАСХН, Подольск

[2]Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, СПб-Пушкин

Пролактин (ПРЛ) является полипептидным гормоном гипофиза, играющим значительную роль в регуляции многих физиологических процессов в организме млекопитающих, в том числе связанных с репродуктивной функцией [1]. Влияние ПРЛ реализуется путем его взаимодействия со специфическими рецепторами, находящимися на поверхности плазматических мембран клеток-мишеней. У большинства исследованных видов животных обнаружены, по крайней мере, две альтернативные изоформы рецептора ПРЛ, которые кодируются единственным геном и образуются в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК [2,3]. Длинная изоформа рецептора отвечает за проведение сигнала ПРЛ в клетки, тогда как короткая изоформа, характеризующаяся усеченным цитоплазматическим доменом, рассматривается в качестве негативного модулятора сигнала, индуцируемого через длинную изоформу. Кроме того, короткая изоформа связана с реализацией ряда тканеспецифических эффектов ПРЛ [3,4]. В этой связи полагают, что характер и эффективность гормонального влияния на клетки-мишени зависят не только от общей концентрации в них рецептора ПРЛ, но и в значительной степени от соотношения альтернативных изоформ последнего.

Как известно, одной из функций ПРЛ является регуляция фолликулогенеза у млекопитающих, что подтверждается наличием лактогенных рецепторов или их мРНК в фолликулярных клетках разного типа [5,6]. В половых и соматических клетках фолликулов овец и коров была выявлена экспрессия альтернативных изоформ рецептора ПРЛ [7,8], что согласуется с данными, полученными на мышах [9]. Также ранее

было показано регуляторное действие ПРЛ на экспрессию изоформ своего рецептора в различных овариальных тканях крыс [10,11]. Поскольку механизмы образования альтернативных изоформ рецептора ПРЛ у грызунов и жвачных животных имеют существенные различия [3,12], в представленной работе нами было исследовано влияние ПРЛ *in vitro* на содержание длинной и короткой изоформы собственного рецептора в клетках гранулезы коров.

Методы исследования. Клетки гранулезы выделяли путем аспирации жидкости фолликулов диаметром 2-5мм и культивировали в среде, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, с целью получения монослоя. Через 24ч проводили замену среды на таковую, содержащую бычий ПРЛ (Эндокринологический научный центр РАМН, Москва) в концентрации 0 (контроль), 5, 50 или 500нг/мл, и клетки снова культивировали в течение 24ч. После удаления культуральной среды в чашки с гранулезными клетками вносили TRI Reagent (Sigma, США) для выделения тотальной РНК (тотРНК) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. В каждом эксперименте часть свежевыделенных клеток (до культивирования) также использовали для выделения тотРНК. Эксперименты по культивированию клеток гранулезы были выполнены в 4 независимых повторностях.

Содержание мРНК длинной (ПРЛ-Рд) и короткой изоформы рецептора ПРЛ (ПРЛ-Рк) в клетках гранулезы коров определяли методом полуколичественного ОТ-ПЦР-анализа. Процедуру синтеза первой цепи кДНК выполняли с помощью набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) согласно инструкции фирмы-производителя при использовании случайных 6-мерных праймеров (0,2мкг гексапраймеров на 2мкг тотРНК). ПЦР проводили в инкубационной смеси (15мкл), содержащей 1х буфер для Taq-полимеразы, 200мкМ dNTP, 1ед.акт. Taq-полимеразы, 1,5мМ $MgCl_2$ и 1мкл смеси реакции ОТ или воды (отрицательный контроль). В пробы добавляли по 20пМ прямого и обратного праймеров для рецептора ПРЛ или по 2пМ соответствующих праймеров для β-актина быка. Последовательности использованных олигонуклеотидов для рецептора ПРЛ: 1) прямой праймер для амплификации кДНК обеих изоформ ПРЛ-Р – 5'-CAAGCCAGACCATGGATACT-3', обратный праймер для амплификации кДНК ПРЛ-Рд – 5'-GCTGGTCCTCACAGTCATCT-3' (ПЦР-продукт 347н.п, Ac. NM001039726) или обратный праймер для амплификации кДНК ПРЛ-Рк – 5'-GCGAGAAGGCTGTGATATCT-3' (ПЦР-продукт 250н.п, Ac. NM174155); 2) прямой праймер для амплификации кДНК обеих изоформ ПРЛ-Р – 5'-ATACTGGAGTGAGTGGAGCC-3', обратный праймер для амплификации кДНК обеих изоформ ПРЛ-Р – 5'-CTCCAGCAGATGAACATCAA-3' (ПЦР-продукт 217н.п).

Последовательность олигонуклеотидов для β-актина (ПЦР-продукт 483н.п, Ac. NM173979): прямой праймер – 5'-AGATGACCCAGATCATGT-3' и обратный праймер – 5'-AGGTAGTTTCGTGAATGC-3'. Амплификацию проводили в следующем режиме: 95ºС 30с, 54ºС 30с, 72ºС 60с, 34-40 циклов. Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 3%-ном агарозном геле и фотодокументировали. Относительную интенсивность полос на геле, соответствующих определенным ПЦР-продуктам, определяли с помощью компьютерной программы TotalLab v2.01. Полученные данные были нормализованы на длину амплифицируемых фрагментов. Содержание мРНК ПРЛ-Рд, ПРЛ-Рк и ПРЛ-Р выражали в относительных единицах (о.е.) интенсивности сигнала ПЦР-продуктов для β-актина быка, используемого как внутренний стандарт. Для каждой группы клеток в одном эксперименте вычисляли среднее значение для нескольких циклов двух независимых ПЦР. Данные, полученные в 4-х экспериментах, обрабатывали методом дисперсионного анализа при помощи программы SigmaStat.

Результаты исследования. Было обнаружено, что содержание мРНК длинной изоформы рецептора ПРЛ в клетках гранулезы не зависит существенно от концентрации гормона в среде культивирования (рис.1 и табл.). В то же время внутриклеточное содержание этой мРНК во всех группах после культивирования было значительно ниже, чем в группе до культивирования.

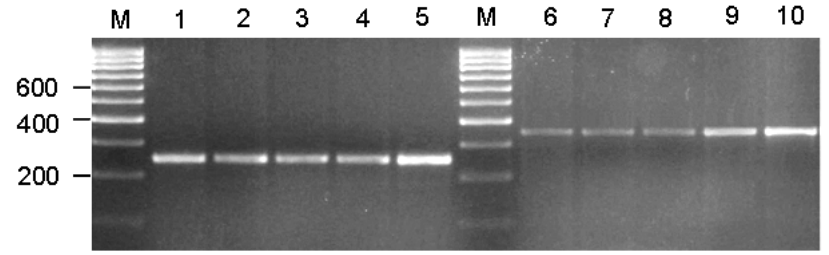


Рис.1. Репрезентативные результаты ОТ-ПЦР-анализа содержания мРНК ПРЛ-Рд и ПРЛ-Рк в клетках гранулезы коров при культивировании в присутствии ПРЛ (38 циклов). ***Дорожки*:** 1,6 – 500 нг/мл ПРЛ; 2,7 – 50 нг/мл ПРЛ; 3,8 – 5 нг/мл ПРЛ; 4,9 – 0 нг/мл ПРЛ; 5, 10 – до культивирования; М – маркеры длины в н.п. 1-5 – ПЦР-продукты, соответствующие ПРЛ-Рк; 6-10 – ПЦР-продукты, соответствующие ПРЛ-Рд.

Уровень экспрессии короткой изоформы рецептора ПРЛ в гранулезных клетках также снижался в процессе культивирования, как в контрольной группе, так и во всех группах, обработанных ПРЛ (рис.1 и табл.). При этом содержание мРНК короткой изоформы рецептора в

клетках гранулезы было выше в присутствии 500нг/мл ПРЛ, чем в отсутствие гормона (P<0,05).

Табл. Влияние ПРЛ *in vitro* на экспрессию альтернативных изоформ своего рецептора в клетках гранулезы коров.

Экспериментальная группа	Содержание мРНК изоформ ПРЛ рецептора (о.е.[а])		
	ПРЛ-Рд	ПРЛ-Рк	ПРЛ-Рд+ПРЛ-Рк
До культивирования	1,06±0,14	2,00±0,04	3,06±0,17
Контроль	0,49±0,08**	0,81±0,11***[б]	1,29±0,22***
5нг/мл ПРЛ	0,44±0,04***	0,86±0,10***	1,28±0,14***
50нг/мл ПРЛ	0,38±0,09***	0,95±0,10***	1,31±0,22***
500нг/мл ПРЛ	0,33±0,06***	1,24±0,10**[в]	1,56±0,18***

[а]о.е. – относительные единицы; [б,в]P<0,05. Достоверность различий, по сравнению с группой до культивирования: **P<0,01, ***P<0,001.

Кроме того, статистическая обработка данных выявила наличие позитивной корреляции между уровнем мРНК ПРЛ-Рк в клетках и гормональной концентрацией в среде культивирования (r=0,62; P<0,01).

Также нами было установлено, что ПРЛ (5-500нг/мл) не влияет *in vitro* на суммарное содержание мРНК двух альтернативных изоформ собственного рецептора в клетках гранулезы (табл.). Эти расчеты подтверждались данными ОТ-ПЦР-анализа при использовании праймеров для амплификации участка кДНК, общего для обеих изоформ. Уровень мРНК ПРЛ-Р в гранулезных клетках в этом анализе был сходным во всех культуральных группах, но ниже, чем таковой до культивирования (рис.2).

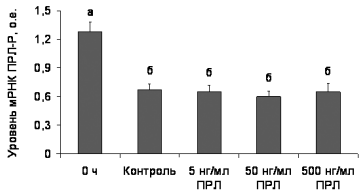


Рис.2. Содержание мРНК рецептора ПРЛ в клетках гранулезы коров при культивировании в присутствии ПРЛ. Каждый *столбик* – среднее для 4 экспериментов. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: [а,б]P<0,001. о.е. – относительные единицы.

Напротив, ПРЛ в концентрации 500нг/мл понижал соотношение уровней мРНК длинной и короткой изоформ своего рецептора в клетках по сравнению с группами, культивируемыми без ПРЛ или в присутствии 5нг/мл ПРЛ (рис.3). Также была обнаружена значительная негативная корреляция между концентрацией гормона в культуральной среде и величиной соотношения альтернативных изоформ мРНК рецептора ПРЛ (r=-0,67; P<0,01).

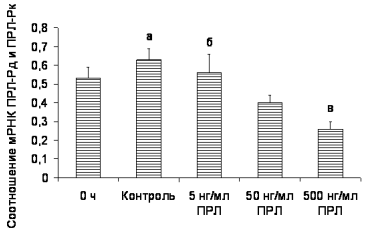


Рис.3. Влияние ПРЛ на соотношение мРНК ПРЛ-Рд и ПРЛ-Рк в культивируемых клетках гранулезы коров. Каждый *столбик* – среднее для 4 экспериментов. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: [а,в]P < 0,01; [б,в]P < 0,05.

Обсуждение результатов. Снижение общего содержания мРНК рецептора ПРЛ, а также обеих его изоформ в клетках гранулезы коров при культивировании в контрольной среде в течение 48ч свидетельствует о регулируемом характере экспрессии соответствующего гена. Этот вывод согласуется с данными о низком содержании мРНК ПРЛ-Рд и ПРЛ-Рк в гранулезных клетках гипофизэктомированных крыс [10]. В нашем исследовании внесение ПРЛ в среду на вторые сутки культивирования не приводило к изменению общего уровня мРНК ПРЛ-Р. Следовательно, ПРЛ не влиял на активность транскрипции гена своего рецептора в клетках гранулезы коров. Результаты исследований, выполненных на грызунах, довольно противоречивы, но все они предполагают наличие регуляторного влияния ПРЛ на экспрессию своего рецептора. Одни авторы обнаружили, что ПРЛ может стимулировать экспрессию ПРЛ-Р в клетках гранулезы зрелых фолликулов крыс, однако эта способность зависит от физиологического состояния фолликулов и удаленности клеточного слоя от ооцита [5]. В другом исследовании, напротив, обработка крыс ПРЛ обусловливала снижение содержания мРНК обеих изоформ ПРЛ-Р в клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов [10]. Поскольку нами были использованы гранулезные клетки из незрелых фолликулов коров, отсутствие гомологичной регуляции транскрипции гена ПРЛ-Р могло бы быть следствием ее зависимости от степени дифференцировки клеток.

Полученные в нашей работе данные также показали, что ПРЛ понижает соотношение между длинной и короткой изоформой своего рецептора в культивируемых клетках гранулезы коров. Это снижение было обусловлено, в первую очередь, повышением содержания мРНК ПРЛ-Рк, поскольку содержание мРНК ПРЛ-Рд уменьшалось лишь незначительно. Сходное влияние ПРЛ на соотношение альтернативных изоформ собственного рецептора было обнаружено в регрессирующем желтом теле крыс [11]. Однако в этом случае ПРЛ негативно регулировал экспрессию длинной изоформы рецептора ПРЛ, которая является доминантной в яичнике крыс. Согласно нашему исследованию, в клетках гранулезы коров, напротив, преобладает короткая изоформа ПРЛ-Р, содержание которой повышается под влиянием ПРЛ. Таким образом, эти данные согласуются с представлением о том, что механизмы образования

альтернативных изоформ рецептора ПРЛ у грызунов и жвачных животных имеют существенные различия [12].

В целом, результаты представленного исследования показывают, что ПРЛ регулирует экспрессию собственного рецептора в клетках гранулезы из незрелых антральных фолликулов коров на уровне альтернативного сплайсинга, но не влияет на активность транскрипции соответствующего гена. Таким образом, ПРЛ может участвовать в детерминации проведения своего сигнала в гранулезные клетки, повышая долю короткой изоформы своего рецептора.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Goffin V. et al.* //Annu. Rev. Physiol. (2002) 64(1): 47-67;
2. *Jabbour H.N., Kelly P.A.* //Rev. Reprod. (1997) 2(1): 14-8;
3. *Смирнова О.В., Богорад Р.Л.* //Биохимия (2004) 69(4): 437-52;
4. *Huang K.T. et al.* //J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia (2008) 13(1): 69-79;
5. *Коток Т. и др.* //Онтогенез (2000) 31(2): 144-51;
6. *Лебедева И.Ю., Лебедев В.А., Кузьмина Т.И.* //Биохимия (2001) 66 (9): 1188-94;
7. *Picazo R.A. et al.* //Reproduction (2004) 128(5): 545-53;
8. *Lebedeva I. et al.* //Reprod. Fertil. Dev. (2009) 21(1): 222;
9. *Kiapekou E. et al.* //Reprod. Biomed. Online (2005) 10(3): 339-46;
10. *Russell D.L., Richards J.S.* //Mol. Endocrinol. (1999) 13(12): 2049-64;
11. *Bowen J.M. et al.* //Eur. J. Endocrinol. (2000) 143(2): 285-92;
12. *Bignon C. et al.* //J. Mol. Endocrinol. (1997) 19(2): 109-20.

РОЛЬ ТИРОЗИНКИНАЗ И ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛКИНАЗ В ДЕЙСТВИИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г., Бутов С.Н.

Санкт-Петербургский государственный университет

Введение. Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, работа которой обеспечивает создание и поддержание электролитического и водного гомеостаза. Различные белковые компоненты этой системы могут

являться мишенью для окислительного стресса. Ранее нами было показано, что транспорт Na^+ в коже лягушки модулируется различными окисляющими агентами [1]. Впервые обнаружено, что окисленный глутатион (GSSG) и его фармакологический аналог препарат глутоксим(r) («ФАРМА-ВАМ», Москва), приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+. Однако механизмы действия GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ остаются не ясными.

Известно, что влияние инсулина на транспорт Na^+ инициируется связыванием гормона с рецептором с собственной тирозинкиназной активностью, локализованным в базолатеральной мембране эпителиальных клеток [2]. Ранее нами было показано, что действие инсулина на транспорт Na^+ в коже лягушки зависит от активности тирозинкиназ и тирозинфосфатаз и осуществляется при участии фосфатидилинозитолкиназ (ФИ-киназ) и протеинкиназы С [2]. Данные литературы свидетельствуют о том, что в клетках эпидермоидной карциномы человека линии А431 GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности [3]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль тирозинкиназ и ФИ-киназ в регуляции GSSG и глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки Rana temporaria с использованием ингибитора тирозинкиназ генистейна и двух структурно различных ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназ (ФИ-3-киназ) и фосфатидилинозитол-4-киназ (ФИ-4-киназ) вертманнина и LY 294002 [4].

Методика. Для регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала [5]. Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC}=I_T$ при $V_T=0$, где I_T – трансэпителиальный ток), потенциал открытой цепи V_{OC} ($V_{OC}=V_T$ при $I_T=0$, где V_T – трансэпителиальный потенциал) и трансэпителиальную проводимость g_T. Транспорт Na^+ оценивали как амилорид-чувствительный I_{SC} [5]. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов.

Результаты и обсуждение. Показано, что добавление 100мкг/мл GSSG или 100мкг/мл глутоксима (280±20мин) к базолатеральной поверхности интактной кожи лягушки вызывает увеличение транспорта Na^+ (рис.1а). В среднем (по результатам 10 экспериментов) I_{SC} возрастает на 40.37±11.24% ($P<0.05$) и 20.31±1.04% ($P<0.01$), а V_{OC} на 48.05±10.34% ($P<0.05$) и 19.64±1.13% ($P<0.01$) для GSSG и глутоксима, соответственно. Величина g_T при этом не меняется.

Обнаружено, что ингибитор тирозинкиназ генистейн существенно снижает стимулирующее действие GSSG или глутоксима на транспорт

Na^+ (рис.1б). Так, изменение электрических характеристик (по данным 10 экспериментов) после добавления 100мкг/мл GSSG или 100мкг/мл глутоксима (280±20мин) к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30мин 100мкМ генистейна, составило: I_{SC} увеличился на 10,05±2,11% (P<0,05) и 10,05±1,48% (P<0,05), а V_{OC} на 30,25±4,32% (P<0,05) и 11,05±1,25% (P<0,05) для GSSG и глутоксима, соответственно. Изменения величины g_T не наблюдалось.

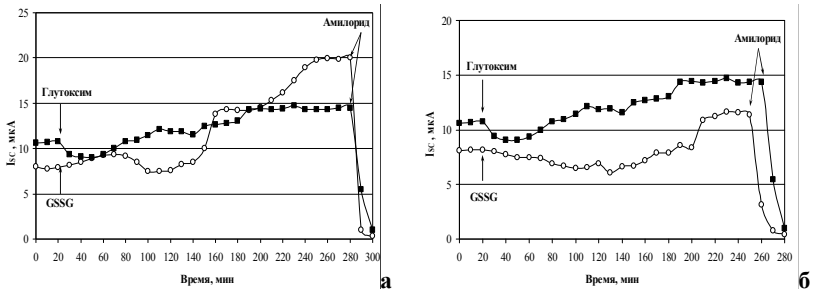


Рис.1. Кинетика изменения тока короткого замыкания (I_{SC}) после добавления 100мкг/мл глутоксима или 100 мкг/мл GSSG к базолатеральной поверхности интактной (***а***) и обработанной 100мкМ генистейна (***б***) коже лягушки и последующего приложения блокатора эпителиальных Na^+-каналов (ENaC) амилорида (20мкМ).

Ранее нами было показано, что влияние блокаторов ФИ-киназ на транспорт Na^+ в коже лягушки зависит от концентрации и приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи [6]. В связи с этим, были проведены четыре серии экспериментов для каждого из окисляющих агентов. В первой и третьей серии экспериментов апикальную поверхность кожи лягушки предварительно инкубировали в течение 30мин с вертманнином (500нм и 1мкМ для первой серии) или соединением LY 294002 (100нм и 200нм для третьей серии). Во второй и четвертой сериях вертманнин и LY 294002 в аналогичных концентрациях добавляли со стороны базолатеральной поверхности кожи. После этого, в каждой серии экспериментов 100мкг/мл GSSG или 100мкг/мл глутоксима вводили со стороны базолатеральной поверхности кожи лягушки.

Обнаружено, что предварительная инкубация кожи лягушки с вертманнином или LY 294002 существенно снижает стимулирующее действие глутоксима на транспорт Na^+ (рис.2). Так, в первой серии экспериментов изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления глутоксима к коже, предварительно обработанной вертманнином в различных концентрациях, составило: I_{SC} увеличился на 8.45±1.29% (P<0.01) и 3.36±0.24% (P<0.01), а V_{OC} на 9.34±2.08% (P<0.01)

и 4.01±1.23% (P<0.01) для 500нм и 1мкМ вертманнина, соответственно. В третьей серии экспериментов увеличение I_{SC} составило 13.84±3.48% (P<0.01) и 11.42±4.04% (P<0.01), а V_{OC} – 15.01±3.43% (P<0.01) и 12.34±4.32% (P<0.01) для 100нм и 200нм LY 294002, соответственно. Во второй серии экспериментов I_{SC} увеличился на 10.45±2.48% (P<0.01) и 6.33±2.24% (P<0.01), а V_{OC} на 11.31±3.33% (P<0.01) и 7.12±2.28% (P<0.01) для 500нм и 1мкМ вертманнина, соответственно. В четвертой серии экспериментов I_{SC} увеличился на 22.73±9.48% (P<0.01) и 19.39±8.01% (P<0.01), а V_{OC} на 26.51±9.14% (P<0.01) и 21.34±9.21% (P<0.01) для 100нм и 200нм LY 294002, соответственно. Во всех экспериментах величина g_T не менялась. Сходные результаты были получены при приложении к коже лягушки, предварительно обработанной ингибиторами ФИ-киназ, 100мкг/мл GSSG.

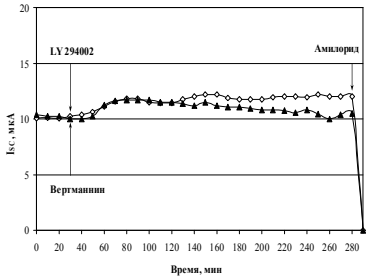


Рис.2. Кинетика изменения тока короткого замыкания (I_{SC}) после добавления 100мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи лягушки, обработанной блокаторами фосфатидилинозитолкиназ (200нм LY 294002 со стороны апикальной поверхности или 1мкМ вертманнина со стороны базолатеральной поверхности кожи), и последующего приложения блокатора эпителиальных Na^+-каналов (ENaC) амилорида (20мкМ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что во всех вариантах экспериментов, блокаторы ФИ-киназ оказывают дозо-зависимое влияние на эффект GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Так, предварительная инкубация кожи с низкими концентрациями блокаторов ФИ-киназ приводит к значительно меньшему (по сравнению с действием более высоких доз) подавлению стимулирующего действия глутоксима или GSSG на транспорт Na^+. Известно, что вертманнин и LY 294002 являются высоко эффективными блокаторами ФИ-киназ. Низкие концентрации этих агентов необратимо ингибируют все известные типы ФИ-3-киназ, тогда как в более высоких (субмикромолярных) концентрациях, вертманнин и LY 294002 ингибируют и ФИ-4-киназы [7]. Таким образом, результаты наших экспериментов свидетельствуют об участии ФИ-киназ в регуляторном действии GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Однако то, что оба блокатора действуют менее эффективно в малых концентрациях, которые специфически ингибируют ФИ-3-киназы, позволяет предположить, что ФИ-4-киназы в большей степени, чем ФИ-3-киназы вовлечены в этот процесс, или же активация ФИ-4-киназ является более ранним этапом в реализации

стимулирующего действия GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria*. Возможно также, что ФИ-4-киназы могут ослаблять ингибирование ФИ-3-киназы, фосфорилируя фосфатидилинозитол-3-фосфат, остающийся в клетке.

Известно, что различные ключевые Na^+-транспортирующие белки, такие как амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+-каналы (ENaC) или Na^+/K^+-АТФазы, содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенью для внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов [8,9]. Однако, введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки блокатора ENaC амилорида (20мкМ), вызывало полное подавление I_{SC} (рис.1,2), что свидетельствует о том, что влияние GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ связано преимущественно с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами впервые показано участие тирозинкиназ и ФИ-киназ в стимулирующем действии GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria*. На основании результатов настоящей работы и ранних работ [1,10] можно предположить, что GSSG и глутоксим могут взаимодействовать с богатыми цистеином доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывать его трансактивацию и запускать сигнальный каскад, включающий тирозинкиназы и ФИ-киназы. Это приводит к стимуляции ENaC и увеличению транспорта Na^+ в коже лягушки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Крутецкая З.И. и др.* //ДАН (2008) 421(5): 709-12;
2. *Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е.* //Цитология (2006) 48(10): 817-40;
3. *Бурова Е.Б. и др.* //ДАН (2005) 404(1): 122-4;
4. *Walker E.H. et al.* //Mol. Cell (2000) 6: 909-19;
5. *Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Мельницкая А.В.* //Цитология (2003) 45(6): 590-5;
6. *Крутецкая З.И. и др.* //ДАН (2006) 410(4): 568-70;
7. *Vlahos C.J. et al.* //J. Biol. Chem. (1994) 269: 5241-8;
8. *Firsov D. et al.* //J. Biol. Chem. (1999) 274: 2743-9;
9. *Boldyrev A.A., Bulygina E.R.* //Ann. NY Acad. Sci. (1997) 834: 666-8;
10. *Melnitskaya A.V. et al.* //Materials conf. «Biol. Motility» Pushchino (2008) 1: 164-6.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ АИК ВО ВРЕМЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОПЕРАЦИЙ ПО ПРОТЕЗИРОВАНИЮ КЛАПАННОГО АППАРАТА СЕРДЦА

Миндукшев И.В.[1,4], Вивуланец Е.В.[2,3], Кузнецов С.В.[2], Песочинская С.Д.[1], Добрылко И.А.[1], Кривошлык В.В.[4], Петрищев Н.Н.[2,5]

[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, СПб
[2]Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова
[3]НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека МЗ РФ, СПб
[4]НПФ «ЛЮМЭКС», СПб
[5]ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова», СПб

Несмотря на разработку различных типов аппаратов искусственного кровообращения (АИК), основной проблемой их применения является неизбежное повреждение форменных элементов крови, преимущественно приводящее к гемолизу эритроцитов [1,3]. Есть основания полагать, что гемолиз эритроцитов, является не единственным следствием воздействия АИК на эритроциты. Так было показано, что применение систем искусственного кровообращения приводит к снижению фильтруемости эритроцитов [9], уменьшению внутриклеточной концентрации 2,3-дифосфоглицерата и снижению способности эритроцитов к деформации [2,7], в некоторых случаях наблюдается эхиноцитоз этих клеток [8]. Некоторые из этих характеристик достаточно, часто выявляются при старении клеток, а в свете новых представлений, могут быть косвенными маркерами развития апоптотической программы гибели клеток [4,6]. Следует отметить, что, несмотря на большое количество работ по травматическому действию АИК, цельной картины по поводу трансформации эритроцитов нет. Действительно возникает некоторое противоречие, с одной стороны гемолиз является некротическим сценарием гибели эритроцитов, в то время как развитие апоптоза эритроцитов является альтернативным процессом. В связи с этим нами была предпринята попытка кинетического исследования трансформации эритроцитов новым методом в условиях применения АИК во время.

Материалы и методы. Были исследованы функциональные свойства эритроцитов у 7 пациентов во время проведения плановой операции по протезированию клапанного аппарата сердца в условиях применения АИК (Jostra HL 20) и в постоперационном периоде.

Пациенты с приобретенными пороками клапанного аппарата сердца (недостаточность и стеноз митрального, аортального и трикуспидального клапана), относились к III функциональному классу по степени тяжести недостаточности кровообращения (Нью-йоркская классификации кардиологов). Возраст больных от 40 до 65л. Отбор крови производился непосредственно до начала операции (0ч), через 5мин, 1ч, 2ч и 3ч после начала операции (среднее время операции около 3ч), и далее, в пост-операционном периоде: 5ч, 24ч, 48ч (иногда, 72ч).

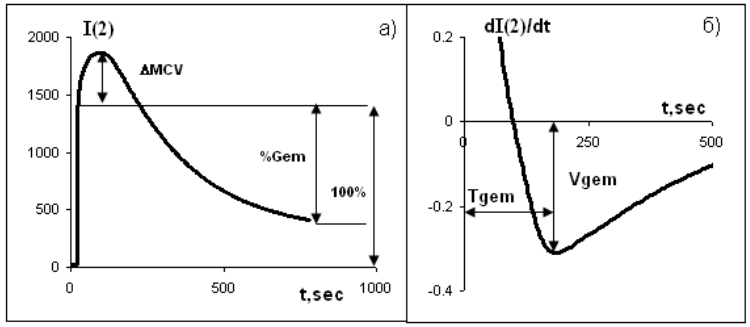


Рис.1. а) Динамика изменения интенсивности светорассеяния (угол регистрации –2 градуса) при помещении эритроцитов в аммонийную среду. б) Дифференцированный вид этой динамики изменения интенсивности светорассеяния. Показано графическое определение количественных параметров (пояснения в тексте).

Образцы суспензии эритроцитов были получены при немедленном разбавлении 5мкл крови человека в 1мл солевой среды (мМ): 140 NaCl, 5 KCl, 5 HEPES, 5 glucose, 1 $CaCl_2$ (pH 7.4). Аммонийную нагрузку эритроцитов проводили в среде следующего содержания (мМ): 140 NH_4Cl, 5 KCl, 5 HEPES, 5 glucose, 1 $CaCl_2$ (pH 7.4).

Исследования кинетики трансформации эритроцитов проводили техникой малоуглового светорассеяния на лазерном анализаторе размеров частиц «ЛАСКА-1К» (НПФ «ЛЮМЭКС» СПб) [6]. Основой нового метода исследования функционального статуса эритроцитов является способность эритроцитов гемолизировать в изотонической аммонийной среде, где катион натрия заменен катионом аммония [6]. Эритроциты, в этих условиях (за счет изменения внутриклеточного pH и последующего функционирования Cl^-/OH^--обменника) набухают, достигая критического объема, после чего гемолизируют. Данный кинетический процесс регистрируется по изменению интенсивности светорассеяния в малых углах регистрации. На рис.1а показана динамика изменения сигнала в 2 градусном углу: После помещения эритроцитов в аммонийную среду, наблюдается повышение их среднего объема (MCV),

пропорциональное первичному повышению сигнала – ΔMCV. Клетки, достигнув критического объема, гемолизируют, – о чем свидетельствует снижение интенсивности светорассеяния. Полнота гемолиза (%Gem), определяется по величине сигнала в конце процесса (рис.1а). Дифференцирование данной кинетической кривой (метод эритрограмм), позволяет определить максимальную скорость гемолиза – Vgem и время ее достижения Tgem. Все эти четыре величины (ΔMCV, %Gem, Vgem, Tgem) позволяют достаточно полно количественно характеризовать данный процесс функциональной нагрузки эритроцитов.

Результаты и обсуждение. На рис.2 представлены данные по гемолизу эритроцитов в аммонийной среде одного из пациентов для контрольных эритроцитов (кровь отбиралась непосредственно перед операцией), во время операции и после операции через 2 суток. Видно, что по отношению к контролю, у эритроцитов, через 2 часа после воздействия АИК, усиливается скорость и полнота гемолиза. Обратная картина наблюдается через двое суток после операции: как скорость первичного набухания, так и последующая скорость гемолиза резко снижена (Tgem более чем в 3 раза больше чем для контроля). Ранее нами было показано, что эритроциты, в которых была запущена апоптозная программа (Ca^{2+}-ионофором), при аммонийной нагрузке значительно медленнее набухают, и соответственно, меньше гемолизируют [6]. Поэтому, можно предположить, что на 2-3 сутки часть эритроцитов переходят в предапопточиское состояние.

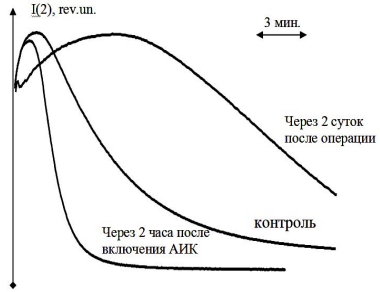


Рис.2. Гемолиз эритроцитов в аммонийной среде, для контроля, через 2 часа после включения АИК (во время операции) и через 2 суток после операции пациента 12230.

В той или иной степени, подобный характер изменения прослеживался практически для всех пациентов. У шести пациентов из семи, эритроциты во время операции проявляли повышенную неустойчивость к аммонийной нагрузке, т.е. проявлялся гемолитический процесс. У четырех пациентов из семи на 2-3 сутки после операции наблюдается повышенная устойчивость к этой функциональной нагрузке. Но следует отметить, несмотря на выявленную эту тенденцию, характер изменения состояния эритроцитов носил достаточно индивидуальный вид: в некоторых случаях повышенная гемолитическая неустойчивость проявлялась сразу после включения АИК, а в других носил отставленный

характер. У трех пациентов на 2-3 сутки не выявлялись значимые различия изменения состояния эритроцитов по отношению к контролю. На рис.3 и рис.4 показана динамика изменения параметров (**%Gem, Vgem, Tgem)**, характеризующих гемолиз в аммонийной среде для двух пациентов: 12230 и 11603. Видно, что изменение этих параметров отличается у пациентов. В общем, это можно было ожидать: пациенты отличаются как по степени тяжести операции, так и по компенсационным возможностям (по эритропоэзу).

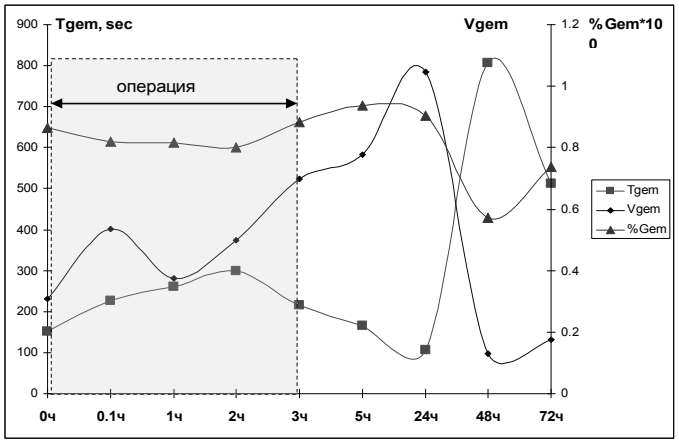


Рис.3. Динамика изменения параметров (**%Gem, Vgem, Tgem)**, характеризующих гемолиз в аммонийной среде для пациента 12230.

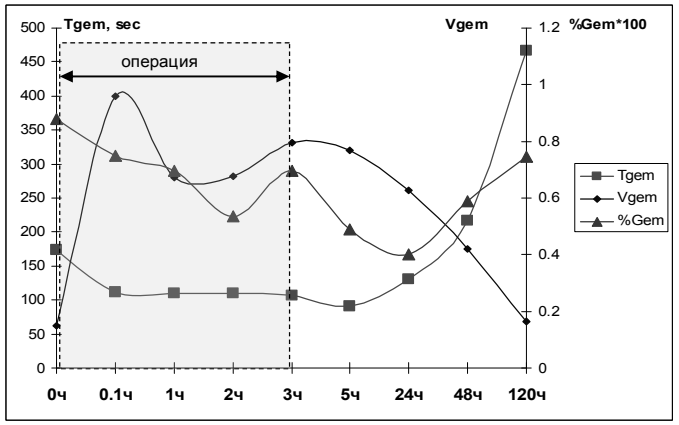


Рис.4. Динамика изменения параметров (**%Gem, Vgem, Tgem)**, характеризующих гемолиз в аммонийной среде для пациента 11603.

По существу, нагрузка, оказываемая аппаратом искусственного кровообращения на эритроциты и последующая компенсация, является сложно составным процессом. Применение АИК приводит к гемолизу эритроцитов (некротический процесс), что неизбежно ведет к последующему компенсированию эритроцитарной массы костным мозгом. В то же время, окислительный стресс может вызвать запуск в эритроцитах апоптозной программы, что и проявляется у части пациентов на 2-3 сутки. Все эти процессы различны по длительности. Скорость гемолитического процесса значительно превышает скорость развития апоптоза у эритроцитов. На эти два процесса дополнительно «накладывается» выброс молодых эритроцитов из костного мозга. Естественно как тяжесть операции, так и компенсационные возможности пациентов различны, в силу чего наблюдаемая нами динамика изменения функционального статуса эритроцитов достаточно индивидуальна для каждого пациента.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Ding M.J. et al.* //Cell Biol. Int. (2007) 31(8): 763-7;
2. *Gu Y.J. et al.* //Ann. Thorac Surg. (2008) 86(5): 1570-5;
3. *Hansbro S.D. et al.* //Perfusion (1999) 14(1): 3-10;
4. *Lang K.S. et al.* //Cell Physiol. Biochem. (2005) 15(5): 195-202;
5. *Lawson D.S. et al.* //Pediatr. Crit. Care Med. (2005) 6(5): 573-7;
6. *Mindukshev I.V. et al.* //Spectroscopy (2007) 21(2): 105-20;
7. *Otsuki M.* //Masui. (1992) 41(10): 1627-34;
8. *Tamura A. et al.* //Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi (1990) 38(7): 1152-7;
9. *Tsai S.K. et al.* //Br. J. Clin. Pharmacol. (1994) 37(5): 457-9.

РОЛЬ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА *STAT* В ПРОЛИФЕРАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, КЛЕТОК ЭРИТРОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ *K562* И *T*-КЛЕТОК *JURKAT*

Митюшова Е.В., Аксенов Н.Д., Марахова И.И.

Институт цитологии РАН, СПб

При запуске иммунного и пролиферативного ответа нормальных лимфоцитов периферической крови (ЛПК) человека используются практически все известные сигнальные молекулы и сигнальные каскады. JAK/STAT путь является ключевым компонентом системы сигнализации с рецепторов цитокинов. Отмечается, что в нормальных Т лимфоцитах сигнализация с участием двух представителей семейства белков STAT

(signal transducer and activator of transcription) STAT3 и STAT5, характерна только для ИЛ-2-зависимой стадии активации, тогда как на первой, антиген-завивисмой стадии ответа ЛПК (когда «включается» Т-клеточный рецептор), белки STAT для сигнализации не используются [1,2]. Оптимальная активность нерецепторных тирозинкиназ семейства JANUS (JAK) и транскрипционных факторов STAT является необходимым условием успешной передачи пролиферативного сигнала при взаимодействии цитокина (в частности, интерлейкина-2) с рецептором плазматической мембраны. Неудивительно, что нарушение функционирования этого пути лежит в основе различных заболеваний, таких как лейкемии, лимфомы, иммунодефицит. Показано, что в трансформированных лимфоидных клетках белки STAT (преимущественно STAT3 и STAT5) находятся в гиперактивном состоянии. Эти транскрипционные факторы участвуют в онкогенезе, активируя гены, которые контролируют вхождение в клеточный цикл (циклины, *c-myc*), и также гены, способствующие выживанию (*bcl*). Высокий уровень активности белков STAT рассматривается в качестве диагностических маркеров при лейкемиях разного вида, а сами компоненты JAK/STAT пути являются перспективными терапевтическими мишенями при разработке подходов в лечении аутоиммунных заболеваний и лейкозов разного типа. Вместе с тем, механизмы, контролирующие гиперактивность JAK/STAT пути в опухолевых клетках, изучены недостаточно. Трудность подобных исследований состоит в первую очередь в том, что в клетках разных опухолей выявляются разные генные мишени STAT3 и пока не удается выявить общие признаки в нарушении JAK/STAT сигнализации при развитии разных заболеваний. В этой связи информативным является тестирование адекватных биологических систем (таковыми, в частности, могут быть клетки постоянных линий) для того, чтобы составить детальную картину регуляции JAK/STAT пути внутриклеточной сигнализации в связи с действием цитокинов и трансформирующих факторов.

Цель настоящей работы - охарактеризовать роль белков STAT в поддержании пролиферативного статуса постоянных линий эритроидной лейкемии K562 и Т-клеточной линии Jurkat. Эти линии клеток широко используются в лабораторных исследованиях и могут служить модельной системой для сравнительного исследования специфики внутриклеточной сигнализации в трансформированных лимфоидных клетках и нормальных лимфоцитах человека. Для выявления фосфорилированных форм STAT3 (pY-STAT3) и STAT5 (pY-STAT5) использовали метод электрофореза с последующим электропереносом на нитроцеллюлозную мембрану. Иммунные комплексы выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham). Для оценки уровня активности

STAT3 и STAT5 использовали антитела, специфически узнающие STAT3, фосфорилированный по тирозину 705, и STAT5, фосфорилированный по тирозину 694. Одновременно с тестированием STAT, в параллельных пробах с помощью метода проточной цитофлуорометрии оценивали уровень пролиферации клеток в культуре и следили за изменениями структуры клеточного цикла при ведении культур в присутствии соответствующих ингибиторов.

Сравнительное исследование фосфорилирования STAT3 и STAT5 в нормальных лимфоцитах, стимулированных разными митогенами, обнаружило существенное различие в динамике их активации. В присутствии ФГА (10 мкг/мл) pY-STAT5 обнаруживается не ранее 5-го часа и его количество возрастает в интервале 5-24ч. В этих же условиях стимуляции количество pY-STAT3 увеличивается уже в первые 30мин, продолжает нарастать в течение первых суток, снижаясь до уровня в контроле к концу вторых суток. В ряде опытов наблюдали высокий базальный уровень фосфорилирования STAT3 в нестимулированных, покоящихся лимфоцитах человека. Различие в динамике активации STAT3 и STAT5 связано с особенностями экспрессии высокоаффинного рецептороа ИЛ-2 в мембране стимулированных Т-лимфоцитов: обнаружена корреляция между изменением количества pY-STAT5, способностью клеток к переходу $G_0/G_1/S$ и изменением уровня экспрессии CD25 (маркер на альфа-субъединицу рецептора интерлейкина-2). Динамика нарастания количества pY-STAT5 (но не pY-STAT3) согласуется с динамикой увеличения числа $CD25^+$ клеток. На основании полученных данных сделано предположение, что именно STAT5 является ключевым в запуске клеточного цикла у нормальных лимфоцитов человека.

Сравнительная оценка состояния белков STAT3 и STAT5 в клетках активно пролиферирующих постоянных линий K562 и Jurkat показало, что клетки K562 характеризуются высоким уровнем фосфорилирования белков STAT3 и STAT5, тогда как в Т-клетках Jurkat в растущей культуре присутствуют фосфорилированные формы STAT3 и практически не детектируются фосфорилированные формы STAT5.

Для выяснения роли белков STAT в поддержании пролиферации исследуемых клеток провели ингибиторный анализ. Установлена разная степень подавления фосфорилирования STAT3 и STAT5 в клетках K562 при действии специфического ингибитора тирозинкиназы JAK3: в присутствии WHI-P131 (75мкг/мл) на фоне значительного снижения количества фосфорилированых форм STAT5 активность STAT3 остается высокой (рис.1). Ингибирующее действие WHI-P131 на фосфорилирование STAT является дозо-зависимым: увеличение концентрации ингибитора с 50 до 100мкМ почти полностью активные фосфоформы белка STAT5 в клетках K562 (рис.1). Важно отметить, что

длительное ведение клеточных культур в присутствии специфичных ингибиторов JAK3 не сопровождается гибелью клеток: к концу вторых суток инкубции растущих культур K562 в присутствии WHI-P131 в концентрациях, которые снижают количество pY-STAT5, в клетках поддерживается высокое отношение концентраций моновалентных катионов K_i/Na_i и сохраняется высокий ионный гетерогенитет.

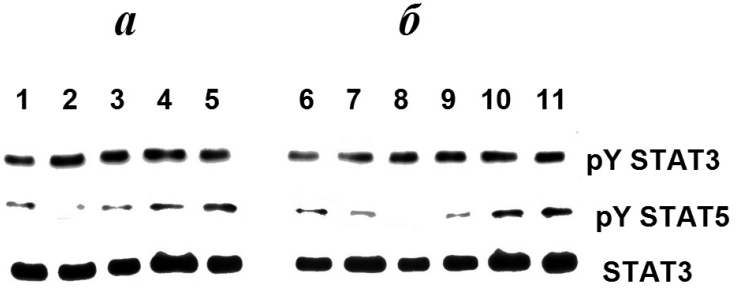


Рис.1. Изменение уровня фосфорилирования STAT3 (pYSTAT3)) и STAT5 (pY-STAT5 в клетках K562 при действии ингибиторов JAK-киназ WHI-131 и Ag-490. Приведены иммуноблоты, окрашенные антителами против фосфорилированных форм STAT5 и STAT3. Для оценки равномерности нанесения лизатов мембрану инкубировали в специальном буфере для удаления антител и подвергали повторной окраске с антителами против STAT3. а и б – два независимых электрофореза. 1,6,7 – растущие культуры клеток K562 без ингибиторов (контроль); 2,8 – то же, в присутствии WHI-P131, 100мкМ; 3,9 – то же, WHI-131, 50мкМ; 4,10 – то же, в присутствии Ag-490, 100мкМ; 5,11 – то же, Ag-490, 50мкМ.

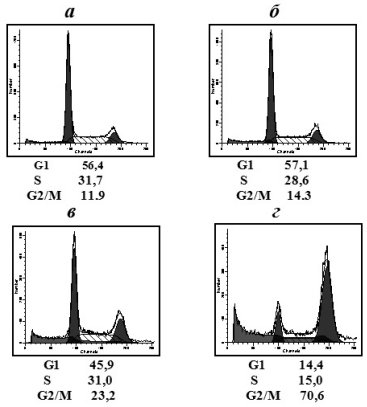


Рис.2. Изменения распределениея клеток по фазам клеточного цикла в культуре клеток эритроидной эритролейкемм K562 в присутствии ингибитора JAK3-киназы WHI-131. По горизонтали – содержание ДНК в клетке, отн. ед.; по вертикали – количество клеток. а – растущие культуры клеток K562 без ингибиторов, б – кульутры клеток K562, растущие в течение 48ч в присутствии WHI-P131, 50мкМ , в – то же, 75мкМ, г – то же, 100мкМ. Цифры под гистограммами – суммарная доля клеток в фазах G_1, S и, G_2/M. Приведены результаты одного опыта из 5 на культурах клеток K562 разного посева.

В условиях подавления активности STAT-белков ингибитором JAK-3 исследовали изменения уровня пролиферации культур клеток K562 (рис.2). В присутствии WHI-P131 (75-100мкМ) рост культур K562 останавливается. После суток инкубации клеток в течение 48ч в среде, содержащей WHI-P131 (30, 50 и 75мкМ) изменяются цитограммы распределения клеток по фазам клеточного цикла: происходит отчётливое накопление клеток в постсинтетических фазах клеточного цикла – М и G_2, при этом доля клеток в фазе синтеза ДНК (S-фаза) остаётся высокой, а доля клеток в фазе G_1 снижается. Такие изменения свидетельствуют о возникновении блока клеточного цикла на границе фаз S и G_2/M. Остановка роста культур клеток Jurkat в присутствии WHI-P131 (75мкМ) также сопряжена с остановкой клеточного цикла и накоплением клеток в фазах М и G_2. Примечательно, что остановка роста культур K562, сопряженная с накоплением клеток в фазах G_2/M, является обратимой. Следует отметить, что известные в литературе случаи остановки роста клеточных культур в присутствии ингибиторов JAK/STAT пути, как правило, связаны с индукцией апоптоза. Результаты исследования свидетельствуют о ключевой роли транскрипционных факторов STAT в поддержании пролиферативного статуса культур клеток эритроидной лейкемии K562 и Т-клеточной линии Jurkat.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы «Молекулярная и клеточная биология», РФФИ №09-04-00492-а.

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ИНОЗИТОЛ-(1,4,5)-ТРИСФОСФАТА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ *C2C12* В ХОДЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Муслихов Э.Р.[1], Сурков К.В.[1], Суханова И.Ф.[1], Авдонин П.В.[1,2]

[1]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
[2]Институт общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

Введение. В зависимости от типа клеток, изменение концентрации ионов кальция в цитоплазме может приводить к разным физиологическим эффектам: к сокращению - для мышечных клеток, к секреции инсулина – для β-клеток поджелудочной железы, для нейронов – к активации работы синапса [2]. Известно, что характер изменения концентрации ионов кальция в цитоплазме в ответ на разные гормоны и нейротрансмиттеры отличается [3]. Также характер кальциевого ответа меняется в процессе приобретения клеткой определенных функций, то есть при её дифференцировке. Возможно, по ходу дифференцировки

клеток исходные сигнальные системы заменяются на другие, характерные для данного типа клеток.

В зрелых скелетных мышцах основным механизмом, вызывающим повышение уровня цитоплазматического кальция, является деполяризация мембран Т-системы, которая вызывает вход кальция в клетку через потенциалуправляемые каналы L-типа и высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СПР) через рианодиновые рецепторы (RyR) [4,5]. Однако в мышечных клетках выявлена также сигнальная система, присущая электроневозбудимым клеткам - инозитолтрисфосфат-зависимое высвобождение ионов кальция из ретикулума [6]. До сих пор остается неясным, как изменяется уровень экспрессии рецепторов инозитолтрисфосфата ($InsP_3R$) в процессе преобразования миобластов в миотубулы. Кроме того, существует мнение, что наличие $InsP_3R$ является своего рода показателем того, что линейные мышечные клетки отличаются от нормальных мышц и поэтому являются не совсем адекватной моделью для изучения сигнальных систем в целом организме. Целью данной работы было оценить методом количественной полимеразной цепной реакции изменение уровня экспрессии $InsP_3R1$, $InsP_3R2$ и $InsP_3R3$ в культивируемых клетках скелетной мускулатуры мыши в процессе их дифференцировки из миобластов в миотубулы.

Материалы и методы. Исследования проводили на культуре клеток линии C2C12 (скелетные миобласты, полученные из бедра задней конечности мыши, коллекция ATCC). Дифференцировку вызывали заменой среды культивирования (DMEM), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, на среду, содержащую 4% лошадиной сыворотки. Дифференцировка миобластов *C2C12* заключается в остановке деления клеток и в дальнейшем их слиянии с образованием протяженных многоядерных миотубул (рис.1).

Для оценки уровня экспрессии $InsP_3R1$, $InsP_3R2$ и $InsP_3R3$ в ходе дифференцировки мы исследовали: недифференцированные миобласты, миобласты через сутки инкубации в дифференцировочной среде, миобласты через трое суток инкубации в дифференцировочной среде и на седьмой день инкубации в дифференцировочной среде. Основная часть миобластов на седьмые сутки инкубации в среде дифференцировки преобразуется в миотубулы.

Выделение тотальной РНК из культуры клеток, осуществляли с помощью TRI® Reagent (MRC). Все процедуры проводили согласно инструкции производителя. Библиотеки кДНК синтезировали с помощью набора фирмы «Силекс» на тотальной РНК, предварительно обработанной ДНКазой (Fermentas), с использованием случайных гексапраймеров. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Applied Biosystems 7500 с помощью Taq ДНК-

полимеразы «Синтол», используя дезоксинуклеотидтрифосфаты и реакционный буфер той же фирмы. В качестве эндогенного контроля использовали β-актин.

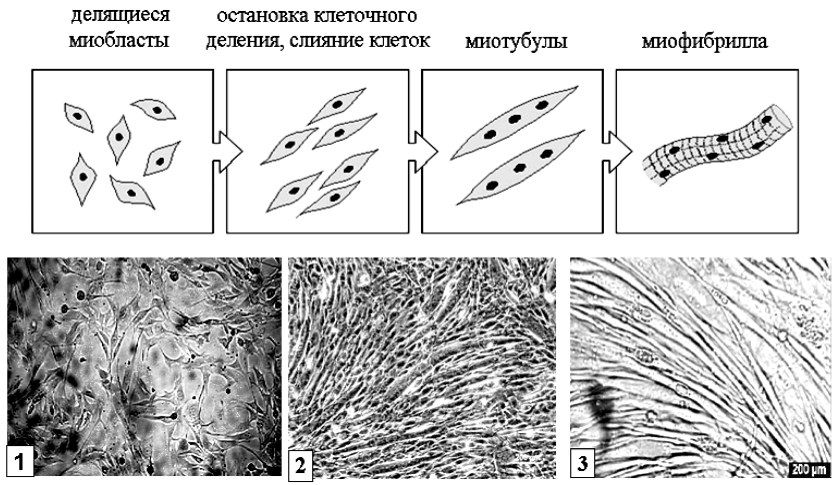


Рис.1. Процесс дифференцировки клеток скелетной мускулатуры культуры *C2C12*. Внизу – фотографии: 1) делящиеся миобласты; 2) сливающиеся миобласты; 3) дифференциирующиеся миотубулы.

В работе использовали следующие праймеры:
$InsP_3R1$: F=5'- atc atg gtc atg gac acc aag tt-3',
зонд =5'- R6G - tgg att ata gga tct cct gcc tcc tgt g - BHQ2-3',
R= 5'- gat gtt tct gat gac tgg gaa ttg-3';
$InsP_3R2$: F=5'- ctg ctg ggg ctc tac atc aat-3',
зонд =5'- R6G - ctg gag agc ttg acc gag tac tgc ca - RTQ2-3',
R= 5'- gat tcg tga gtg gcg ata cag-3';
$InsP_3R3$: F=5'- gtg ggc cac aac atc tac atc-3',
зонд =5'- R6G - cag ctt tcc agg cac aac aag cag ct - RTQ2-3',
R= 5'- gag gct gag cat gga aga ga-3';
β-актин: F=5'- agc cat gta cgt agc cat cca-3',
зонд =5'- FAM - tgt ccc tgt atg cct ctg gtc gta cca c - RTQ1-3',
R= 5'- tct ccg gag tcc atc aca atg-3'.

Результаты и обсуждение. Относительный уровень экспрессии всех трех типов рецепторов к $InsP_3$ увеличивается в процессе дифференцировки в мышечных клетках (рис.2). На начальном этапе дифференцировки уровень экспрессии всех трех типов рецепторов примерно одинаковый, а на стадии 7 дней рецепторов 2 и 3 типа становиться в 2 раза больше по сравнению с первым типом. В клетках

мРНК, кодирующей $InsP_3R1$, меньше по сравнению с мРНК остальных типов рецепторов инозитолтрисфосфата на всех стадиях дифференцировки.

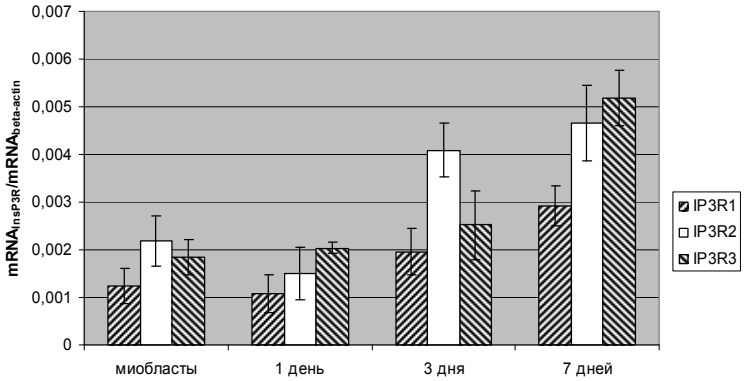


Рис.2. Изменение уровня экспрессии изоформ $InsP_3R$ в процессе дифференцировки миобластов линии *C2C12* в миотубулы.

В дифференцирующихся миотубулах линии *C2C12* и в культуре миотубул, выделенных из скелетных мышц, выявлены P2Y-пуринорецепторы, а также P2X-пуринорецепторы, сопряженные с фосфоинозитидным обменом и входом Ca^{2+} [7,8]. Эти рецепторы регулируют процесс дифференцировки миобластов в миотубулы [9]. Повышение уровня экспрессии рецепторов инозитолтрисфосфата, в особенности 2 и 3 типа, в процессе дифференцировки в совокупности с вышеизложенными литературными данными, позволяют предположить их важную роль в развитии мышечных тканей. Возникает вопрос, какой тип рецепторов инозитолтрисфосфата выполняет ключевую роль в дифференцировке? Этот вопрос требует дальнейших исследований. Возможность его решения появилась после успешного избирательного подавления экспрессии генов в скелетных миотубулах при помощи метода РНК-интерференции. Недавно с помощью этого подхода было показано наличие депо-зависимого входа кальция в клетках *C2C12* через каналы Orai1 [1]. Представленные в настоящей работе данные являются еще одним подтверждением того, что в мышечных клетках работают механизмы, характерные для электроневозбудимых клеток.

Выводы. Рецепторы инозитолтрисфосфата, обеспечивающие $InsP_3$-зависимый выброс ионов кальция из ретикулума, присутствуют в скелетных миобластах *C2C12*. В процессе мышечной дифференцировки данных клеток возрастает экспрессия рецепторов всех трех типов, но, в особенности, рецепторов 2 и 3. Это свидетельствует об их участии в процессе дифференцировки. Кроме того, из этих данных следует, что наличие $InsP_3$-зависимого выброса кальция в культивируемых скелетных клетках не является артефактом их дедифференцировки.

Работа поддержана грантами РФФИ №08-04-01466 и SCOPES №IB 74A0-110940.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Авдонин П.В. и др.* //Биол. Мембраны (2008) 25(6): 472-9;
2. *Iijima T. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005) 102(47): 17190-5;
3. *Matsumoto J.* //Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi (1980) 32(11): 1749-57;
4. *Fleischer S., Inui M.* //Annu. Rev. Biophys. Chem. (1989) 18: 333-64;
5. *Rios E., Pizarro G.* //Physiol. Rev. (1991) 71(3): 849-908;
6. *Moschella M.C. et al.* //J. Muscle Res. Cell Motil. (1995) 16(4): 390-400;
7. *Henning R.H. et al.* //Br. J. Pharmacol. (1996) 117(8): 1785-91;
8. *Deli T. et al.* //Pflugers Arch. (2007) 453(4): 519-29;
9. *Araya R. et al.* //Brain Res. Rev. (2004. 47(1-3): 174-88.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ЭФФЕКТОВ ГОРМОНОВ РЕПРОДУКЦИИ НА ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

Некрасова И.В., Ширшев С.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

Нейтрофилы известны не только как первичные эффекторы неспецифической резистентности, но и как активные участники родовой деятельности [1,2]. Основными гормонами, контролирующими репродуктивную функцию женского организма при беременности являются эстрадиол (E_2), прогестерон (Pr), а также индуктор их синтеза – хорионический гонадотропин (ХГ) [2,3]. Известно также, что они способны оказывать ярко выраженное иммуномодулирующее действие [2,4]. При этом стероидные гормоны могут реализовывать свои эффекты двумя путями: геномным – за счет непосредственной транскрипционной регуляции генов – и негеномным, опосредуемым различными внутриклеточными мессенджерами [5,6]. Так как второй путь действия стероидов не связан с процессами синтеза белка, он реализуется достаточно быстро, что особенно важно для нейтрофилов, время жизни которых в культуре обычно не превышает суток.

Цель настоящей работы – исследование молекулярных механизмов действия гормонов репродукции на окислительный потенциал нейтрофилов.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось *in vitro*. Для выделения популяции нейтрофилов кровь здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста центрифугировали в двойном градиенте плотности фиколла-верографина. Плотности нижнего и верхнего слоев составили соответственно 1,112 и 1,077г/мл. Клетки собирали с нижней интерфазы. Гормоны использовали в дозах, сопоставимых с их уровнями в периферической крови в I и III триместрах беременности: ХГ – 100 и 10МЕ/мл, E_2 – 1 и 10нг/мл, Pr – 20 и 100нг/мл соответственно [7]. Окислительную активность оценивали по интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) нейтрофилов, стимулированных опсонизированным зимозаном. Хемилюминесцентный анализ проводили на биолюминометре БЛМ-8703М по общепринятой методике [8]. После инкубации в течение 3-5мин при 37°С и замера фонового свечения добавляли 50мкл клеточной суспензии (4×10^6/мл), предварительно инкубированной с гормонами в течение часа, и измеряли интенсивность спонтанной ЛЗХЛ. Затем в кювету вносили 30мкл опсонизированного зимозана (15мг/мл) и фиксировали интенсивность стимулированной хемилюминесценции до того момента, когда, пройдя максимум, показатель снизится на 2/3. Для оценки некоторых внутриклеточных механизмов реализации гормональных эффектов, E_2 и Pr на уровне нейтрофилов применяли ингибиторы Ca^{2+}-каналов L-типа – верапамил и инозитол-1-монофосфатазы – оксибутират лития (Li^+) – в концентрациях 0,025мг/мл и 1,5мг/мл соответственно [9]. Ингибиторы вносили в клеточную культуру одновременно с гормонами и инкубировали в течение 60 мин. После 15-минутного центрифугирования (1000об/мин) надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 800мкл среды. ЛЗХЛ также определяли как в спонтанном, так и стимулированном (с опсонизированным зимозаном – 15мг/мл) вариантах. Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Бактерицидная и цитотоксическая функции нейтрофилов в значительной степени определяются продукцией активных кислородных метаболитов. Поскольку свечение люминола наблюдается при контакте с разными формами оксидантов (H_2O_2, O^-_2, HOCl) и он легко проникает внутрь клеток [10], интенсивность ЛЗХЛ является интегральной величиной, отражающей вне- и внутриклеточную продукцию оксидантов. Спонтанная ЛЗХЛ нейтрофилов достоверно усиливалась в присутствии низкой концентрации Pr. Данный эффект, по-видимому, реализуется за счет активации гормоном NADPH-оксидазного комплекса. Эффекты ХГ и E_2 не были статистически значимы (табл.).

Табл. Механизмы регуляции репродуктивными гормонами окислительной активности нейтрофилов.

№ группы	Экспериментальное воздействие	Интенсивность ЛЗХЛ, имп/с (M±m)	
		Спонтанный вариант	Стимулированный вариант
1	Контроль	3838,12±701,051	38208,71±3447,535
2	Верапамил	3092,10±808,289	35449,81±7590,905
3	Li^+	3365,5±997,131	36504,91±5115,171
4	ХГ 100МЕ/мл	3725,38±696,077	32265,13±3072,453 ***p(4-1)<0,05***
5	ХГ 10МЕ/мл	3642,38±653,610	30017,73±3308,923 ***p(4-1)<0,05***
6	E_2 1,0нг/мл	3719,10±1150,916	46881,81±5657,060 ***p(4-1)<0,05***
7	E_2 10нг/мл	3523,22±904,842	38984,71±5832,681
8	Pr 20нг/мл	4319,41±692,037 ***p(6-1)<0,05***	45442,469±5201,174 ***p(6-1)<0,05***
9	Pr 100нг/мл	3823,33±921,938	36818,00±6606,428
10	E_2 1,0нг/мл+Верапамил	3159,44±1010,910	37685,55±6615,387 ***p(8-6)<0,05***
11	E_2 10нг/мл+Верапамил	3060,78±929,372	44045,75±6746,743
12	Pr 20нг/мл+Верапамил	3196,00±761,650 ***p(10-8)<0,05***	45206,95±4373,098
13	Pr 100нг/мл+Верапамил	3519,33±958,405	33002,80±6578,71
14	E_2 1,0нг/мл+Li^+	3554,67±860,166	41401,15±4295,147 ***p(12-6)<0,05***
15	E_2 10нг/мл+Li^+	3789,22±1193,991	42400,25±4604,664
16	Pr 20нг/мл+Li^+	5189,22±938,649 ***p(11-1,8)<0,05***	43120,20±6723,373
17	Pr 100нг/мл+Li^+	3351,00±895,251	45577,40±5072,258

Стимулированная ЛЗХЛ нейтрофилов повышалась под действием низких доз Pr и E_2. Напротив, обе исследованные концентрации ХГ обладали ингибирующим действием в отношении стимулированного

варианта ЛЗХЛ (табл.). Поскольку отрицательное действие ХГ на окислительный потенциал нейтрофилов проявилось только при исследовании стимулированного варианта ЛЗХЛ, можно предположить, что снижение уровня ЛЗХЛ активированных нейтрофилов происходит в большей степени при ингибировании ХГ проведения сигнала с FcγR и CR, чем при его непосредственном действии на NADPH-оксидазный комплекс. Ранее при исследовании механизма действия ХГ на стимулированную зимозаном ЛЗХЛ нейтрофилов показано, что его эффекты отменялись при ингибировании протеинкиназы А (РКА), которая через различные внутриклеточные мессенджеры способна ингибировать NADPH-оксидазу в нейтрофилах [11,12].

Поскольку мы фиксировали только негеномное действие стероидов в краткосрочной культуре, а этот механизм недостаточно изучен, в спонтанном и стимулированном вариантах дополнительно был проведен ингибиторный анализ. В спонтанном варианте ЛЗХЛ на фоне верапамила стимулирующий эффект Pr снижался, а в присутствии Li^+, напротив, усиливался. По-видимому, действие гормона на интактные нейтрофилы частично опосредуется Ca^{2+}-зависимым сигналом, тогда как фосфоинозитидный путь препятствует реализации Pr-модулирующего влияния. В стимулированном варианте на фоне ингибиторов эффект низкой дозы E_2 достоверно снижался, указывая на участие в его реализации как Ca^{2+}, так и фосфоинозитидного путей (табл.).

Результаты исследования возможных механизмов модуляции окислительной активности нейтрофилов E_2 и Pr можно обобщить в виде интегральной схемы (рис.). NADPH-оксидаза – ключевой фермент, определяющий окислительную активность нейтрофилов, – стимулируется рядом сигналов, важнейшими из которых являются кальциевый и фосфоинозитидный [13,14]. Индуцируемое ХГ повышение цАМФ, приводящее к активации РКА, оказывает отрицательное влияние на этот фермент [11,12]. Так как в наших исследованиях показано, что действие E_2 и Pr зависит от Ca^{2+}-каналов, а E_2 использует в реализации своего стимулирующего влияния метаболиты фосфоинозитидного цикла, неудивительно, что эффекты женских половых стероидов на окислительную активность нейтрофилов являются стимулирующими.

Таким образом, гормоны репродукции эффективно регулируют окислительную активность интактных и активированных опсонизированным зимозаном нейтрофилов. При этом в реализации негеномных механизмов действия половых стероидов принимают участие Ca^{2+}-каналы L-типа и метаболиты фосфоинозитидного цикла.

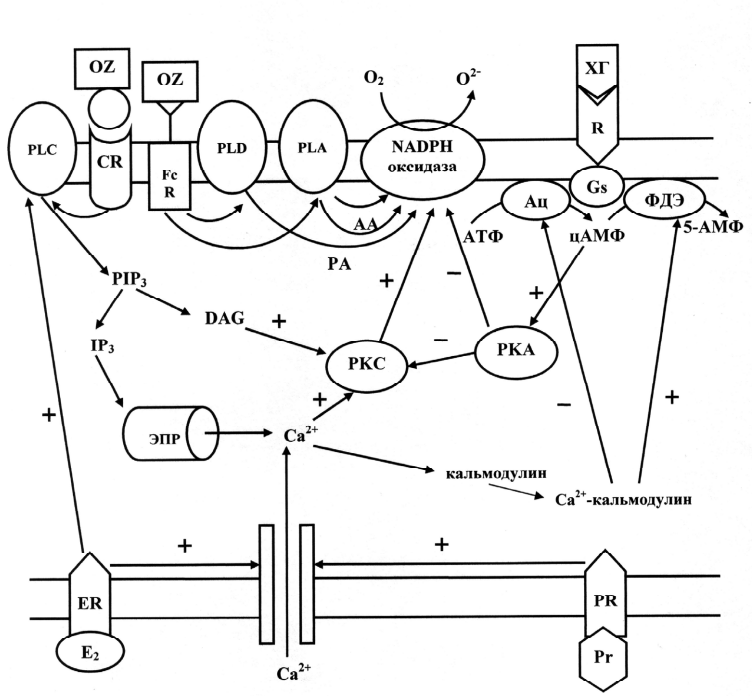


Рис. Механизмы регуляции окислительной активности нейтрофилов основными репродуктивными гормонами. Условные обозначения: OZ – опсонизированный зимозан, PLCγ – фосфолипаза-Cγ, PLD – фосфолипаза D, PLA – фосфолипаза A_2, CR – рецептор для компонентов комплемента, FcR – рецептор для Fc-фрагмента иммуноглобулина G, AA – арахидоновая кислота, PA – фосфатидная кислота, G_S – G-стимулирующий белок, Ац – аденилатциклаза, ФДЭ – фосфодиэстераза, PIP_2 – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, IP_3 – инозитолтрифосфат, DAG – диацилглицерол, РКС – протеинкиназа С, РКА – протеинкиназа А, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, АТФ – аденозинтрифосфат, 5-АМФ – 5-аденозинмонофосфат, цАМФ – циклический аденозинмонофосфат, E_2 – эстрадиол, ER – рецептор эстрогенов, Pr – прогестерон, PR – рецептор прогестерона.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ширшев С.В.* //Механизмы иммунного контроля процессов репродукции. Екатеринбург (1999);
2. *Ширшев С.В.* //Механизмы иммунноэндокринного контроля процессов репродукции. Екатеринбург: УрО РАН (2002) 2;
3. *Баграмян Э.Р.* //Акуш. и гинекология. (1984) 4: 8-12;

4. *Кеворков Н.Н. и др*. //Гормоны репродукции в регуляции процессов иммунитета. Екатеринбург (1993);
5. *Razandi M. et al*. //Mol. Endocrinol. (1999) 13: 307-13;
6. *Stefano G.B. et al*. //J. Immunol. (1999) 163: 3758-63;
7. *Йена С.С., Джаффе Р.Б.* //Репродуктивная эндокринология. / М. (1998) 2;
8. *Tono-Oka T., Ueno N., Matsumoto T*. //Clin. Immunol. Immunopathol. (1983) 26(1): 66-75;
9. *Ширшев С.В., Кеворков Н.Н*. //Мол. Биология (1993) 27(3): 500-6;
10. *Dahlgren C., Stendahl O*. //Infect. Immun. (1983) 39: 736-43;
11. *Mahomed A.G. et al*. //Inflammation (1998) 22: 545-57;
12. *Mitsuyama T., Takeshige K., Minakami S.* //Biochim. Biophys. Acta (1993) 1177: 167-73;
13. *Dana R., Malech H.L., Levy R*. //Biochem. J. (1994) 297: 217-23;
14. *Tithof P.K., Peters-Golden M., Ganey P.E.* //J. Immunol. (1998) 160: 953-60.

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИПИДАХ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАН ИНДУЦИРОВАННЫЕ α-ТОКОФЕРОЛОМ, ИНГИБИТОРОМ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С

Пальмина Н.П., Белов В.В., Мальцева Е.Л.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Протеинкиназа С (ПК-С) – ключевой фермент фосфоинозитидного цикла, его активность зависит от липидов и их перекисей. В схему регуляции ПК-С включено множество интермедиатов и сигнальных веществ [1,2]. Протеинкиназа С фосфорилирует ряд мембраносвязанных и цитоплазматических белков [3,4] и рассматривается как важнейшее звено в системе трансмембранной передачи сигнала при многих кратковременных и долговременных клеточных ответах, включая пролиферацию и трансформацию [5-7]. Известно, что данные процессы наряду со специфическими регуляторами контролируются работой системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, основными компонентами которой являются продукты ПОЛ (свободные радикалы и гидроперекиси), природные антиоксиданты, состав липидов и структура мембраны [8,9]. Установлено, что активность ПК-С в мембраносвязанной форме гораздо выше, нежели в растворимой [10,11], что природный антиоксидант α-токоферол (α-ТФ) является ингибитором фермента [5,12], причём проявляет своё действие в широком интервале концентраций , в том числе и в сверхнизких ($<10^{-12}$М). В связи с этим нами было высказано предположение о том, что природный антиоксидант α-ТФ оказывает влияние на мембраносвязанную ПК-С и через изменение структурного состояния липидной компоненты плазматической мембраны (ПМ), в которой локализованы системы вторичных посредников. Поэтому и была поставлена данная работа, целью которой явилось изучение влияния α-ТФ на структуру плазматических мембран печени в широком спектре концентраций (10^{-4}М-10^{-25}М) *in vitro*.

Методы. Плазматические мембраны выделялись из клеток печени 40-50 мышей линии $F_1(C_{57}xDBA_2)$ последовательным центрифугированием по методу, описанному в работе [13]. Определение концентрации белка проводили по методу Лоури [14]. Полученные мембраны ресуспендировались в среде выделения; концентрация белка доводилась до 2,5мг/мл суспензии.

Спирто-водные растворы α-ТФ были получены методом последовательного разведения через один порядок его исходного 10^{-1}М раствора спиртом высокой очистки фирмы «MERCK» (Германия) до концентрации 10^{-3}М, а затем дистиллированной водой. Структура мембраны изучалась методом спинового зонда [15,16] на ЭПР-спектрометре «Bruker EMX» и описывалась следующими параметрами, определяемыми при постоянной температуре 293К:
– жесткость поверхностных областей липидов (~8Å);
– микровязкость глубоколежащих областей липидов (~20Å).

В качестве спинового зонда для изучения жесткости поверхностных областей мембраны применялся стабильный нитроксильный радикал – 5-доксилстеариновая кислота (зонд C_5). Жесткость мембраны в области локализации этого зонда (~8Å) описывалась параметром упорядоченности S, характеризующим подвижность жирнокислотных цепей липидов:

$$S = 1.66\frac{T_{II} - T_{\perp}}{T_{II} + 2T_{\perp}}$$

Для изучения микровязкости глубоколежащих областей липидного бислоя в качестве спинового зонда применялся стабильный нитроксильный радикал – 16-доксилстеариновая кислота (зонд C_{16}). Микровязкость мембраны в области локализации этого зонда (~20Å) характеризовалась временами вращательной корреляции зонда C_{16} τ_{c1} и τ_{c2}, которые рассчитывались по формулам для быстрого анизотропного вращения радикала [15]:

$$\tau_{c_1} = 6{,}5 \cdot \Delta H_0 (\sqrt{\frac{I_0}{I_-}} - 1) \cdot 10^{-10}, \text{ сек}$$

$$\tau_{c_2} = 6.65 \cdot \Delta H_+ (\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_-}} - 1) \cdot 10^{-10}, \text{ сек},$$

В дальнейшем данные анализируются на основе параметра τ_{c1}, поскольку результаты по τ_{c2} в значительной степени идентичны.

Результаты и обсуждение. На рис.1*а* и 1*б* представлены данные о действии α-ТФ на жесткость поверхностных и микровязкость глубоколежащих областей липидов при температуре 293К. Эффект выражался в процентах по отношению к контролю.

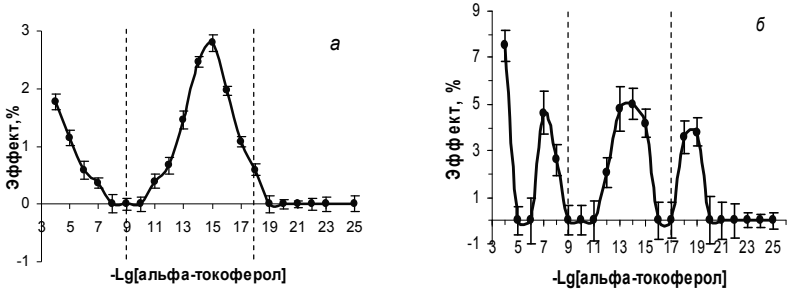


Рис.1. Действие α-токоферола на жесткость поверхностных (а) и микровязкость глубоколежащих (б) областей плазматических мембран при температуре 293К. Концентрация белка в мембранной суспензии 2,5мг/мл.

Приведенные дозовые зависимости имеют полимодальный характер, типичный для действия БАВ в широком спектре концентраций, включающем область сверхмалых доз (СМД), где максимумы, соответствующие увеличению жесткости поверхностных и микровязкости глубоколежащих областей липидов, наблюдаются в определенных интервалах доз, разделенных между собой так называемыми «мертвыми зонами», в которых эффект не проявляется.

Анализ данных дозовых зависимостей позволил выделить три области концентраций α-ТФ с различными доминирующими механизмами его действия на вязкостные характеристики мембран:

Область традиционных «физиологических» концентраций, в которых α-ТФ обычно действует в организме **(10^{-4}М-10^{-9}М)**. Эффект α-ТФ в этой области, наблюдающийся как в поверхностных (~8Å), так и в глубоколежащих (~20Å) областях мембраны, обусловлен прежде всего его непосредственным неспецифическим влиянием на ее структуру при встраивании. Упорядочивание поверхностных и глубоколежащих областей липидного бислоя при действии α-ТФ в «физиологических» концентрациях (10^{-4}М-10^{-9}М) может быть связано прежде всего с ограничениями при упаковке углеводородных цепей липидов вблизи молекулы α-ТФ, что снижает их конформационную подвижность [17]. Значительный вклад в динамику этих процессов может вносить взаимодействие α-ТФ с молекулами фосфолипидов. Различными биофизическими методами были получены непрямые доказательства

того, что в мембране α-ТФ распределен не произвольно, а существует в виде комплексов с определенной стехиометрией [18].

Область СМД (10^{-9}М-10^{-17}М), где весьма значительный эффект наблюдается в обеих областях мембраны. Возможным объяснением может быть специфическое взаимодействие α-ТФ со связывающими центрами на мембране, что, судя по нашим [19] и литературным [20] данным, может приводить к изменению вязкостных свойств мембраны. В данном случае в роли такого связывающего центра может выступать протеинкиназа-С, содержание которой в плазматических мембранах весьма высоко. На наш взгляд, подтверждением возможности существования такого механизма может служить полученная высокая корреляция (рис.2) между увеличением жесткости поверхностных областей плазматических мембран печени и ингибированием α-ТФ в СМД активности протеинкиназы-С (r=0,82;P=0,0126).

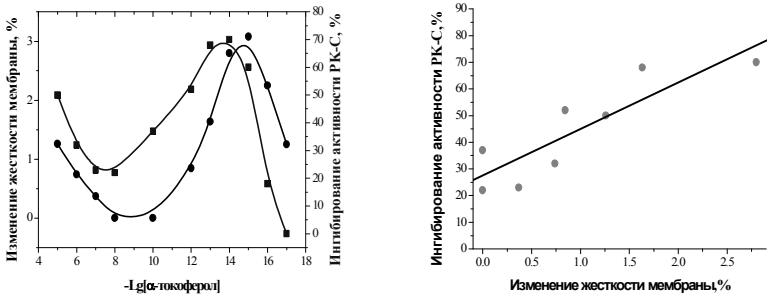


Рис.2. Корреляция между увеличением жесткости поверхностных областей плазматических мембран и ингибированием α-ТФ активности протеинкиназы-С *in vitro*.

Другое вероятное объяснение увеличения вязкости липидного бислоя при действии α-ТФ в СМД, по нашему мнению, заключается в инициировании им образования новых высокоупорядоченных микродоменных комплексов в мембране или модификации уже имеющихся. В роли таких комплексов в данном случае могут выступать рафты, которые представляют собой особые области в мембране, значительно более упорядоченные по сравнению со своим микроокружением из-за повышенного содержания холестерина, сфингомиелина и ганглиозидов, а также преимущественно насыщенного характера жирнокислотных цепей фосфолипидов [21,22]. Известно, что многие белки, участвующие в передаче сигналов в клетке, способны локализоваться в рафтах, в том числе и ПК-С [22]. Время жизни таких комплексов невелико (меньше 1мс), однако действие внешних сигналов (в роли которых могут выступать лиганды), вызывающих

конформационные изменения в белковых молекулах, может его значительно увеличить (вплоть до нескольких минут) и, кроме того, привести к объединению отдельных рафтов в более крупный домен [22]. Поэтому мы предполагаем, что подобные процессы могут сопровождать взаимодействие α-ТФ в СМД с ПК-С в процессе ингибирования ее активности. В пользу этого предположения свидетельствуют также полученные данные о появлении дополнительного структурного перехода в глубоколежащих областях липидов при действии α-ТФ в концентрации 10^{-15}М.

Область так называемых «мнимых» концентраций (<10^{-17}М), когда вероятность содержания хотя бы одной молекулы α-ТФ в мембранной суспензии близка к нулю. Эффект здесь присутствует только в глубоколежащих областях мембраны. Как это было выяснено в наших прежних экспериментах [23], решающую роль в появлении эффекта α-ТФ в данной области играют полярные свойства растворителя.

Таким образом, в нашей работе впервые изучено *in vitro* действие ингибитора ПК-С, природного антиоксиданта α-ТФ в широком диапазоне концентраций (10^{-4}М-10^{-25}М) на вязкостные характеристики плазматических мембран печени мышей. Установлено, что одним из факторов, влияющих на активность фермента, является структурное состояние липидной компоненты ПМ.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Nishizuka Y.* //Science (1986) 233(4761): 305-12;
2. *Kikkava U., Nishizuka Y.* //Ann. Rev.Cell Biol. (1986) 2: 149-78;
3. *Takai Y. et al.* //J. Biol. Chem. (1979) 254(10): 5049-52;
4. *Rando R.R.* //FASEB (1988) 2(8): 2348-55;
5. *Пальмина Н. П. и др.* //Биохимия (1994) 59(2): 193-201;
6. *Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г.* //Успехи химии (1985) 54(5): 1540-5;
7. *Ed. Kuo J.* //Protein kinase C. New York (1994): 231;
8. *Burlakova Ye. B., Palmina N. P., Maltseva Ye. L.* //Membrane Lipid Oxidation Ill/Ed.Vigo-Pelfrey C. Boca Raton (1991): 209-31;
9. *Kagan V. E., Bakalova R. A., Karakashev P.* //Membrane Lipid Oxidation Ill/Ed.Vigo-Pelfrey C. Boca Raton (1991): 191-208;
10. *Epand R., Bottega R.* //Biochim. Biophys. Acta (1988) 944(2): 144-54;
11. *Maltseva E. L., Palmina N. P., Pryme I.F.* //J. Cell. Biochem. (1991) 46(3): 260-6;
12. *Boscoboinik D. et al.* //Biol. Chem. (1991) 266(10): 6188-94;
13. *Loten E.G., Redshaw-Loten J.C.* //Analit. Biochem. (1986) 154(1): 183-5;
14. *Lowry O. et al.* //J. Biol. Chem. (1951) 193 (1): 265-75;
15. *Кузнецов А.Н.* //Метод спинового зонда. М. (1976): 210;
16. *Гриффит О., Джост П.* //Метод спиновых меток. Теория и применение М. (1979): 489-569;
17. *Wassall S. et al.* //Chem. Phys. Lipids (1991) 60 (1): 29-37;
18. *Quinn P.J.* //Eur. J. Biochem. (1995) 233(3): 916-925;
19. *Пальмина Н.П. и др.* //Биолог. мембраны (1992) 9(8): 810-820;
20. *Полезина А.С., Аникиенко К.А., Курочкин В.К.* //Российский химический журнал. (1999). XLIII(5): 72-79;
21. *Lommerse P.H.M., Spaink H.P., Schmidt T.* //Biochim. Biophys. Acta. (2004) 1664 (2):. 119-31;
22. *Monastyrskaya K. et al.* //J. Biol. Chem. (2005) 280(8):7135-46;
23. *Белов В.В., и др.* //ДАН (2004) 399(4): 550-48.

РОЛЬ АУТОФАГИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ТУБЕРОЗНОГО СКЛЕРОЗА

Пархитько А.А.[1,2], Henske E.P.[2]

[1]ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, Москва
[2]Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA

Туберозный склероз (ТС) – аутосомно-доминантное заболевание, вызванное мутациями в опухолевых супрессорных генах, *TSC1* (tuberous sclerosis complex 1) и *TSC2* (tuberous sclerosis complex 2) и характеризуется образованием гамартом разных тканей. Белковые продукты генов *TSC1* и *TSC2* – гамартин и туберин, соответственно. Туберин физически взаимодействует с гамартином, образуя гетеродимер, который функционирует как ГТФаза-активирующий белок, негативно регулируя активность Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain). В активной форме Rheb стимулирует активность мультибелкового киназного комплекса mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin Complex 1), который является ключевым регулятором синтеза белка и аутофагии (рис.1) [1]. Таким образом, опухоли у пациентов с туберозным склерозом характеризуются гиперактивацией киназного комплекса mTORC1.

Аутофагия (от греческого auto – само и phagos – поедать) – процесс, при котором клетка подвергается мембранным перестройкам, захватывает порцию цитоплазмы, доставляет ее в компартменты деградации и обеспечивает повторное использование макромолекул. Аутофагия необходима для поддержания гомеостаза во всех клетках на базальном уровне; в результате аминокислотного голодания аутофагия быстро индуцируется, приводя к деградации различных органелл и обеспечивая клетку аминокислотами и АТФ. Мультибелковый киназный комплекс mTORC1 является ключевым ингибитором аутофагии при избытке аминокислот, глюкозы и факторов роста [2]. Аутофагия

индуцируется в клетках как адаптивный механизм, помогающий выживать в условиях биоэнергетического стресса. Помимо адаптивной роли в физиологии нормальных клеток, аутофагия играет важную роль в патогенезе различных заболеваний, включая рак, нейродегенеративные заболевания, бактериальные и вирусные инфекции [3]. Недавние работы показывают, что аутофагия может играть важную роль в регуляции онкогенеза и малигнизации опухолей. Аутофагия может обеспечивать выживаемость опухолевых клеток при инактивации апоптозного комплекса *in vitro* и *in vivo* в условиях стресса [4,5]. С другой стороны, снижение аутофагии приводит к нарушению регуляции биогенеза митохондрий и накоплению активных форм кислорода. Мыши, гетерозиготные по гену *Beclin1* (*Atg6*), белковый продукт которого требуется для образования аутофагических вакуолей, предрасположены к образованию различных типов опухолей, включая лимфомы и рак печени [6]. Делеция одного из аллелей гена *Beclin1* была показана для опухолей груди, яичников и простаты. Кроме того, мыши, нокаутные по генам, кодирующим белки UVRAG и Bif-1, связывающие Beclin1 и необходимые для индукции аутофагии, также предрасположены к развитию различных опухолей [7,8].

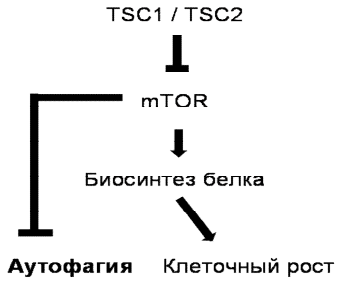


Рис.1. Схема сигнального пути туберина.

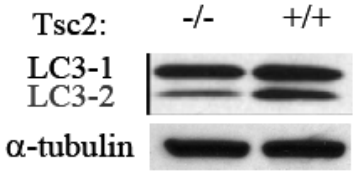


Рис.2. Анализ аутофагии в Tsc2 MEFs с помощью LC3-II

В нашей работе мы показали, что потеря экспрессии туберина приводит к снижению уровня аутофагии в нормальных условиях и условиях стресса. Также мы показали, что регуляция аутофагии туберином зависит от активности киназы mTOR. Также мы показали, что в клетках, теряющих экспрессию туберина, происходит накопление митохондрий.

Мышиные эмбриональные фибробласты (MEF, mouse embryonic fibroblasts) с нокаутом по гену *TSC2* имеют сниженный уровень образования LC3-II в сравнении с контрольными клетками. Для выяснения роли гена *TSC2* в регуляции аутофагии мы использовали мышиные эмбриональные фибробласты с нокаутом по гену *TSC2*, полученные в лаборатории Dr. Kwiatkowski. Помимо нокаута *TSC2*, эта клеточная линия имеет нокаут по гену *p53*, для предотвращения преждевременного старения. В качестве контроля мы использовали мышиные эмбриональные фибробласты с нокаутом по гену *p53*, но имеющие функциональный ген *TSC2*. В качестве маркера аутофагии мы использовали белок LC3-II. В ходе аутофагии этот белок процессируется из цитоплазматической формы LC3-I размером 18кД в форму, ассоциированную с мембраной аутофагосом, LC3-II, размером 16кД. Основываясь на этих данных, уровень LC3 можно анализировать с помощью вестерн-блоттинга [9]. Вестерн-блоттинг показал, что клетки MEF, не имеющие ген *TSC2*, имеют сниженный уровень образования LC3-II в сравнении с интактными клетками MEF в нормальных условиях, означая, что уровень аутофагии также снижен (рис.2).

Мышиные эмбриональные фибробласты с нокаутом по гену *TSC2* имеют сниженный уровень образования аутофагосом в сравнении с контрольными клетками. Для подтверждения данных, полученных с помощью вестерн-блоттинга, мы использовали трансмиссионную электронную микроскопию для оценки уровня образования аутофагосом клеткой. Трансмиссионная электронная микроскопия подтвердила данные вестерн-блоттинга, что клетки MEF, не имеющие гена *TSC2*, имеют сниженный уровень аутофагии в сравнении с интактными клетками MEF в нормальных условиях (рис.3). На рисунке показаны клетки при 9300х кратном увеличении. Звездочками отмечены ядра, стрелочками – аутофагосомы.

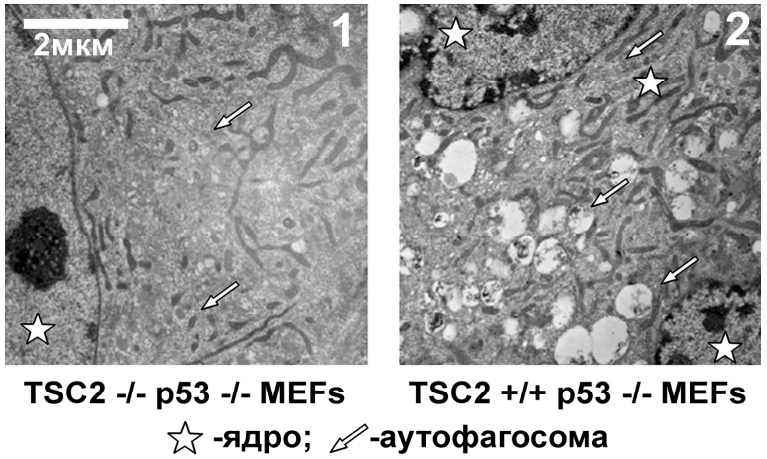


Рис.3. Анализ аутофагии в Tsc2 MEFs с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Клетки, полученные из ангиомиолипомы с подтвержденной потерей экспрессии *TSC2,* имеют сниженный уровень образования LC3-II в сравнении с клетками с восстановленной экспрессией *TSC2.* Результаты, полученные для мышиных эмбриональных фибробластов, подтвердили наше предположение, что потеря гена *TSC2* приводит к снижению уровня аутофагии. Однако мышиные эмбриональные фибробласты имеют происхождение, отличное от опухолей, возникающих при ТС, а аутофагия является тканеспецифическим процессом. Кроме того, в этих клетках отсутствует ген *p53*. Поэтому мы решили проанализировать клеточную линию 621-101, полученную от пациента с ангиомиолипомой (ангиомиолипома – доброкачественная почечная опухоль, возникающая при ТС в 80% случаев). Мы также использовали клеточные линии 621 TRI102 и 621 TRI103 – клеточные линии, полученные путем стабильной трансфекции клеток 621.101 пустым вектором или вектором с геном *TSC2* соответственно. Вестерн-блоттинг показал, что экспрессия туберина повышает образование LC3-II.

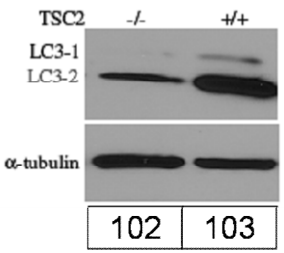


Рис.4. Анализ *аутофагии* в 621 клетках, используя LC3-II.

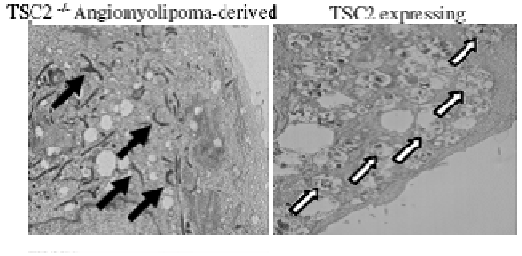


Рис.5. Анализ аутофагии в 621 клетках, используя трансмиссонную электронную микроскопию**.**

Клетки, полученные из ангиомиолипомы с подтвержденной потерей экспрессии *TSC2* имеют сниженный уровень образования аутофагосом в сравнении с клетками с восстановленной экспрессией *TSC2.* Трансмиссионная электронная микроскопия подтвердила данные вестерн-блоттинга, что клетки 621 TRI101 *TSC2*$^{-/-}$, не имеющие функционального гена *TSC2*, имеют сниженный уровень аутофагии в сравнении с клетками 621 TRI101 103, с реэкспрессированным *TSC2* в нормальных условиях (рис.5).

Мышиные эмбриональные фибробласты с нокаутом по гену *TSC2* имеют сниженный уровень образования LC3-II в сравнении с контрольными клетками в условиях гипоксии. Ранее мы показали, что клетки, теряющие экспрессию *TSC2* или *TSC1* (данные не показаны) имеют сниженный уровень аутофагии в нормальных условиях. Так как

опухолевые клетки обычно находятся в условиях стресса (сниженное содержание кислорода и питательных веществ), мы решили выяснить роль *TSC2* в регуляции аутофагии в условиях гипоксии (1% кисорода). Уровень аутофагии был проанализирован с использованием p62 (p62 связывает LC3-II и деградирует в аутолизосомах, таким образом, когда аутофагия активирована, уровень p62 снижается). Вестерн-блоттинг показал, что гипоксия активирует аутофагию и в Tsc2$^{+/+}$, и в Tsc2$^{-/-}$ мышиных эмбриональных фибробластах, но уровень аутофагии в Tsc2$^{-/-}$ клетках был ниже по сравнению с клетками, экспрессирующими TSC2 (рис.6).

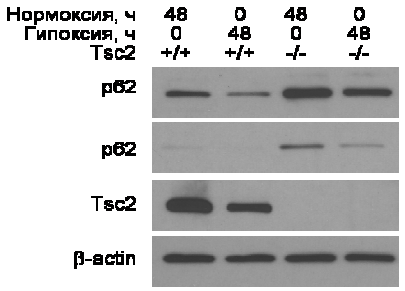


Рис.6. Анализ аутофагии в Tsc2 MEFs, используя p62, в условиях гипоксии.

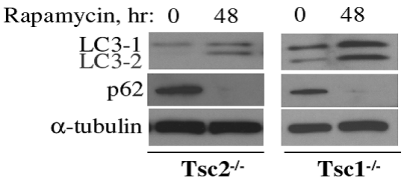


Рис.7. Индукция аутофагии в Tsc2-/- и Tsc1-/- MEFs после воздействия Рапамицином

Рапамицин индуцирует аутофагию в Tsc1$^{-/-}$ и Tsc2$^{-/-}$ мышиных эмбриональных фибробластах. Ранее мы показали, что клетки, теряющие экспрессию *TSC2* или *TSC1* (данные не показаны) имеют сниженный уровень аутофагии по сравнению с нормальными клетками. Далее мы решили выяснить, является ли сниженный уровень аутофагии следствием повышенной активности мультикиназного комплекса mTORC1. Для этого мы использовали специфический ингибитор mTORC1 – рапамицин. *Tsc2*$^{-/-}$ и *Tsc1*$^{-/-}$ мышиные эмбриональные фибробласты выращивались в нормальной среде или в присутствии 20нм рапамицина в течение 48ч. Уровень аутофагии был проанализирован с использованием LC3-II или p62. Вестерн-блоттинг показал, что супрессия активности mTORC1 индуцирует аутофагию в Tsc2$^{-/-}$ и Tsc1$^{-/-}$ мышиных эмбриональных фибробластах (рис.7).

В нашей работе мы показали, что потеря экспрессии туберина приводит к снижению уровня аутофагии в нормальных условиях и условиях стресса. Также мы показали, что регуляция аутофагии туберином зависит от активности киназы mTOR. Также мы показали, что в клетках, теряющих экспрессию туберина, происходит накопление

митохондрий, возможно, вследствие снижения митофагии (митофагия – аутофагия, вовлеченная в деградацию митохондрий) (данные не показаны). Так как роль аутофагии в онкогенезе окончательно не ясна, наша дальнейшая цель - выяснить, как снижение аутофагии влияет на развитие опухолей, возникающих вследствие потери гена *TSC2*. Так как не существует эффективной терапии для лечения опухолей, возникающих при ТС, важно выяснить влияние фармакологически доступных модуляторов аутофагии на мышиных моделях ТС.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Astrinidis A., Henske, E.P.* //Oncogene (2005) 24: 7475-81;
2. Levine B., Yuan, J. //J. clinical invest. (2005) 115(10): 2679-88;
3. Shintani T., Klionsky D.J. //Science (2004) 306:990-5;
4. Degenhardt K. et al. //Cell (2006) 10: 51-64;
5. Lum J.J. et al. //Cell (2005) 120: 237-48;
6. Yue Z. et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) 100(25): 15077-82;
7. Liang C. et al. //(2007) 3(1): 69-71;
8. Takahashi Y. et al. //Nat. Cell Biol. (2007) 9(10): 1142-51.

РЕОРГАНИЗАЦИЯ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА СВЯЗАНА С ПРОМЕЖУТОЧНЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ И СОЗРЕВАНИЕМ ЭНДОСОМ

Харченко М.В., Злобина М.В., Корнилова Е.С.

Институт цитологии РАН, СПб

Эндоцитоз – один из видов везикулярного транспорта, характерного для всех эукариот. Перемещение везикул на значительные расстояния происходят с участием системы микротрубочек (МТ). Считается общепринятым, что МТ являются пассивными «рельсами», вдоль которых за счет моторных белков идет транспорт эндосом[1]. Однако результаты наших исследований не согласуются с этой гипотезой. С помощью методов двойной непрямой иммунофлуоресценции и параллельного субклеточного фракционирования в градиенте плотности Перколла мы показали, что эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов сопровождается реорганизацией тубулинового цитоскелета в клетках HeLa.

До добавления ЭФР и через 15мин после стимуляции эндоцитоза сеть МТ была радиальной. К этому времени мелкие везикулы, содержащие рецептор ЭФР, были выявлены на периферии клеток (рис.1). Затем параллельно с увеличением размера эндосом и перемещением их к центру клетки (30 и 60мин) число длинных радиальных МТ уменьшалось, а интенсивность окрашивания тубулина вокруг ЦОМТ усиливалась. В целом система приобретала «губкоподобный» вид (спутанная сеть МТ), отдельные МТ укорачивались, возможно, фрагментировались и даже частично деполимеризовались. Очевидно, что сеть МТ утрачивала радиальность.

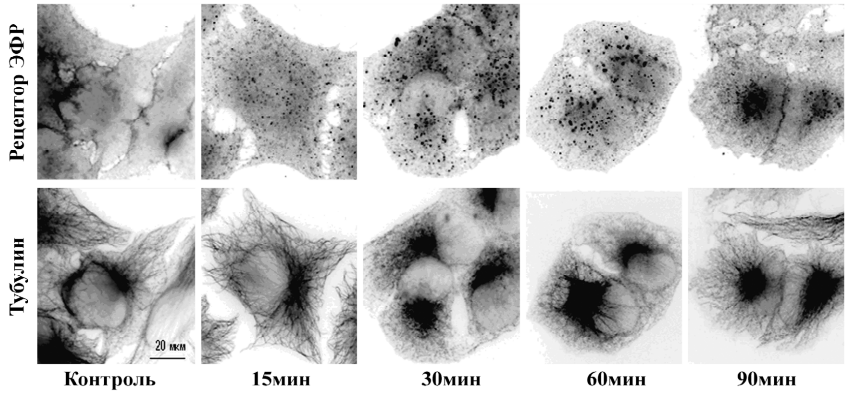


Рис.1. Выявление рецептора ЭФР и тубулина методом иммунофлуоресценции в клетках HeLa после стимуляции эндоцитоза рецептора ЭФР.

Наибольшие изменения претерпевали МТ именно в той области, в которой концентрировались эндосомы. С помощью метода субклеточного фракционирования показали, что стадия дезорганизации радиальной системы совпадала по времени с переходом ЭФР-рецепторных комплексов в поздние эндосомы. Затем радиальная система МТ восстанавливалась. Эта стадия совпадала по времени с уменьшением окрашивания везикул антителами к рецептору ЭФР и появлением продуктов деградации ^{125}I-ЭФР в среде, то есть со стадией лизосомальной деградации ЭФР и его рецептора [2,3].

Можно заключить, что при стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов стадия перехода лиганд-рецепторных комплексов в поздние эндосомы сопровождается «спутыванием», «фрагментацией» и (или) деполимеризацией МТ, в то время как деградация ЭФР коррелирует с восстановлением радиальности.

Наши данные позволяют предположить, что на стадии дезорганизации тубулинового цитоскелета фрагменты МТ могут стабилизироваться в околоядерной зоне, возможно, за счет взаимодействия с другими элементами цитоскелета [4]. Поэтому мы

попытались выяснить роль микрофиламентов и промежуточных виментиновых филаментов в реорганизации МТ. В условиях коллапса актиновых структур под действием цитохалазина D реорганизация системы МТ в ходе эндоцитоза протекала без нарушений. Таким образом, изменения тубулинового цитоскелета не связаны с реорганизацией актиновой сети.

Для проверки влияния промежуточных филаментов на перестройку сети МТ были использованы клетки мыши и MFT-16, лишенные гена виментина, и клетки MFT-6 с восстановленной экспрессией виментина. В клетках обеих линий до стимуляции эндоцитоза мы наблюдали спутанную сеть МТ. В клетках MFT-6 эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов приводит к фрагментации МТ, в некоторых клетках наблюдается частичная деполимеризация (30-90мин). Подобных изменений в клетках, лишенных виментина, не происходило. Таким образом, можно предположить непосредственное участие виментина в реорганизации системы МТ в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

Для выявления сигналов, вызывающих ремоделирование, мы использовали клеточные линии, полученные на основе фибробластов мыши NIH 3T3, экспрессирующие нормальную и мутантные формы рецептора ЭФР человека. Эти формы лишены С-терминальных доменов разной длины, несущих сайты связывания с сигнальными субстратами рецептора (CD165, CD123, CD63). Одной из особенностей этих клеток является разная динамика эндоцитоза. Так, лиганд-рецепторные комплексы в клетках CD165 не попадают в поздние эндосомы, а в основном рециклируют из ранних. В клетках CD123 комплексы сортируются в поздние эндосомы с низкой эффективностью, а в CD63 ─ с эффективностью, присущей нормальному рецептору (HER14). В клетках линий HER14, CD63 и CD123 эндоцитоз рецептора ЭФР приводит к фрагментации МТ (15мин), а потом и к деполимеризации тубулина (60мин). В то же время, радиальная система МТ в клетках CD165 сохраняется в ходе всего эксперимента и не подвергается никаким изменениям (рис.2). Таким образом, способность рецептора ЭФР к переходу в поздние эндосомы может быть критичной для инициации перестроек тубулинового цитоскелета.

Приведенные результаты позволяют предположить, что для начала реорганизации радиальной системы МТ необходимо достижение рецептор-содержащими эндосомами определенной стадии зрелости, по-видимому, соответствующей переходу в поздние эндосомы. Для созревания поздних эндосом необходимо участие определенных сортирующих комплексов, компоненты которых могут взаимодействовать с белками, дестабилизирующими МТ [5].

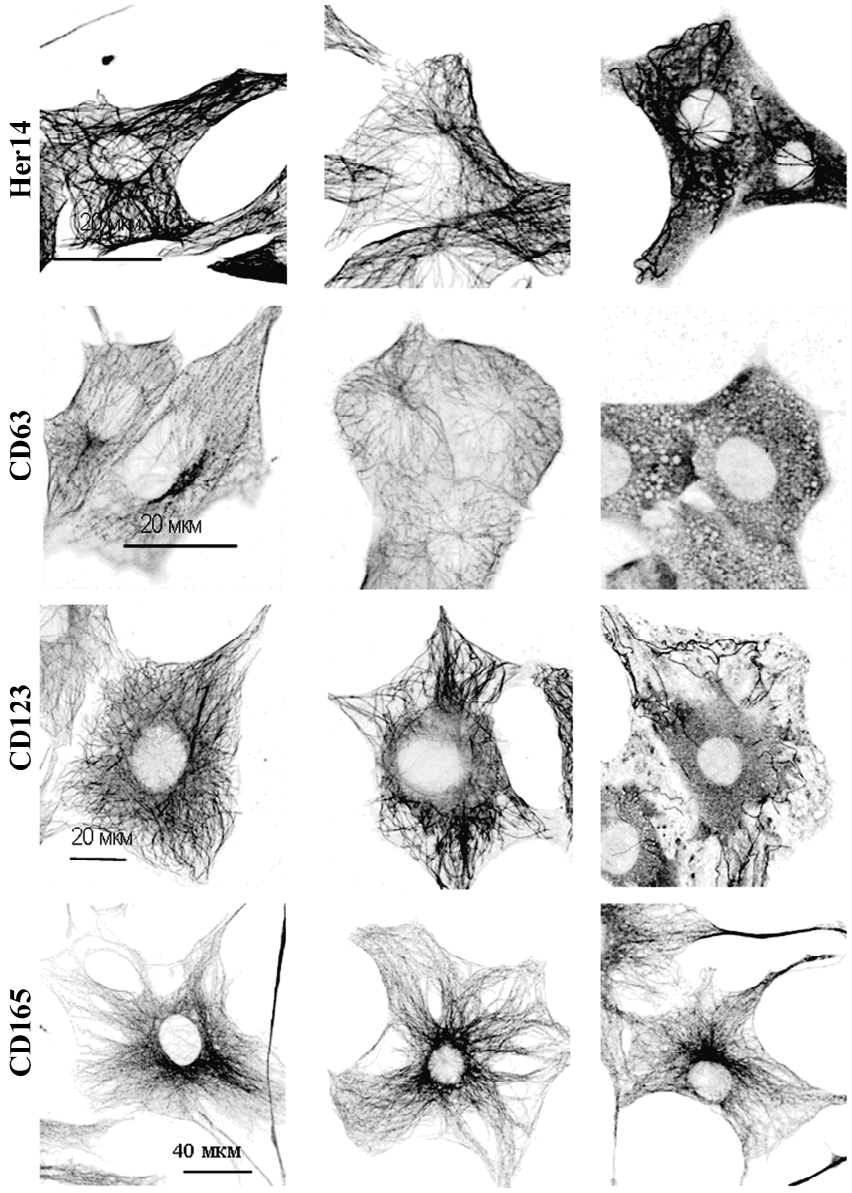


Рис.2. Выявление тубулина методом иммунофлуоресценции после стимуляции эндоцитоза рецептора ЭФР в фибробластах мыши, экспрессирующих нормальную (HER 14) или мутантные формы рецептора ЭФР человека (CD63, CD123 и CD165).

Связь реорганизации тубулинового цитоскелета со стадиями эндоцитоза кажется логичной в качестве рабочей гипотезы. Действительно, радиальная сеть МТ присутствует именно на тех стадиях эндоцитоза, которые нуждаются в перемещении везикул на значительные расстояния.: на ранних этапах эндоцитоза необходимо переместить ранние эндосомы в околоядерную область. В тоже время передвижение везикул на стадиях формирования мультивезикулярных эндосом (МВЭ) и существования гибридной эндо-лизосомы не нужно. Вторичные МВЭ после отделения от лизосом, по-видимому, выводятся из клеток экзоцитозом с участием МТ. Действительно, появление продуктов деградации ЭФР во внеклеточной среде имеет место при восстановлении радиальных МТ. Косвенно это подтверждается тем, что количество ацетилированного тубулина, предпочтительно взаимодействующего с кинезинами [6], значительно возрастает, когда деградация ЭФР-рецепторных комплексов достигает максимальной скорости. Тем не менее, нельзя исключать возможную роль реорганизации системы МТ в координации внутриклеточного сигналинга. Например, при фрагментации и деполимеризации МТ могут высвобождаться сигнальные молекулы, депонированные на МТ (например, NF-каппаВ). Таким образом, МТ, как и цитоскелет в целом, могут играть роль интегратора транспортных и сигнальных процессов.

Выражаем благодарность А.А. Минину (Институт белка РАН) за любезное предоставление линии фибробластов мыши MFT-16 и MFT- 6.

Работа частично выполнена при поддержке РФФИ №06-04-49046-а, №09-04-01215-а и ГК ФЦП №02.512.12.0024.

ЛИТЕРАТУРА

1. *De Brabander M. et al.* //Cell Motil. Cytoskeleton (1988) 9 (1):30-47;
2. *Харченко М.В.***,** *Корнилова Е.С., Меликова М.С.* //Цитология (2007) 49(3): 236-41;
3. *Kharchenko M.V. et al.* //Cell Biol. Int. (2007) 31: 349-59;
4. *Kornilova E.S., Zlobina M.V., Kharchenko M.V***.** //Abstracts of 33rd FEBS Congress (2008): 253;
5. *Tsang H.T. et al.* //Genomics (2006) 88: 333-46;
6. *Reed N.A. et al.* //Curr. Biol. (2006) 16(21): 2166-72.

МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ПОСРЕДСТВОМ ТУННЕЛЬНЫХ НАНОТРУБОЧЕК В СОВМЕСТНОЙ КУЛЬТУРЕ МУЛЬТПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК ПОЧЕЧНЫХ КАНАЛЬЦЕВ

Хряпенкова Т.Г.[1], Плотников Е.Ю.[1], Сухих Г.Т.[2], Зоров Д.Б.[1]

[1]НИИ Физико–химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва
[2]ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Росмедтехнологий, Москва

За последние годы применение стволовых клеток в терапии получило широкое распространение. С тех пор как в 1966 году впервые были описаны мезенхимальные стромальных клетки (МСК) [1], а в 1998 году Томсоном выделены в культуру человеческие эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) [2], стволовые клетки активно исследуются как средство регенеративной и заместительной клеточной терапии, и с каждым годом интерес к ним растет. В настоящее время клеточную терапию применяют при самых различных патологических состояниях (в частности при острой и хронической пост-ишемической почечной недостаточности), являющихся как самостоятельными заболеваниями, так и осложнениями, часто сопутствующими многим другим болезням. Это связано с тем, что традиционные способы лечения почечной недостаточности (диализ, трансплантация почки) оказались недостаточно эффективными. Уже имеются положительные данные по применению стволовых клеток в лечении почечной недостаточности [3,4]. Но надо отметить, что выраженные положительные эффекты клеточной терапии могут быть не связаны с прямым замещением погибших почечных клеток [5]. Поэтому для понимания механизмов клеточной терапии необходимо исследование на клеточном уровне контактных и дистантных взаимодействий клеток организма реципиента с трансплантированными клетками. Целью данной работы было исследование механизмов взаимодействия мультпотентных мезенхимальных МСК (ММСК) с культивируемыми клетками почечных канальцев крыс.

Для достижения этой цели нами использовалась культура клеток эпителия почечных канальцев крыс и ММСК. Клетки эпителия почечных канальцев получали от 1-2-дневных крысят и культивировали в среде DMEM/F12(1:1) с 10% содержанием телячьей сыворотки в течение 2-4 дней при температуре 37^{o}C, 5%CO_2 во влажной атмосфере. В экспериментах использовали первичную непассированную культуру ММСК, полученную по описанной ранее методике [6]. Фенотип ММСК был подтвержден позитивной окраской на маркеры CD90 и CD105, и отрицательной на маркеры CD34, CD45. Для визуализации митохондрий,

цитоплазматического содержимого и мембранных компонентов использовались флуоресцентные зонды: Mitotracker Green, Calcein-AM и DiO, соответственно. Микроскопическое изучение клеток смешанной культуры проводилось на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM510; сравнительный анализ транспорта различных зондов в клетках на разных этапах сокультивирования проводили с помощью проточного цитометра CyFlow (Partec GmbH, Германия). Мы обнаружили, что в процессе сокультивирования ММСК и почечного эпителия происходит образование множества протяженных межклеточных структур, причем длина таких цитоплазматических выростов в ряде случаев была сопоставима с размерами клетки. Такие межклеточные образования описаны для многих типов культивируемых клеток и названы туннельными нанотрубочками (ТНТ) [7]. В данном случае ТНТ и более крупные по диаметру тяжи цитоплазмы практически не образуются в условиях монокультуры почки или ММСК. Активация их образования происходит именно в условиях сокультивирования, причем они начинали образовываться и у ММСК и у канальцевых клеток (рис.1).

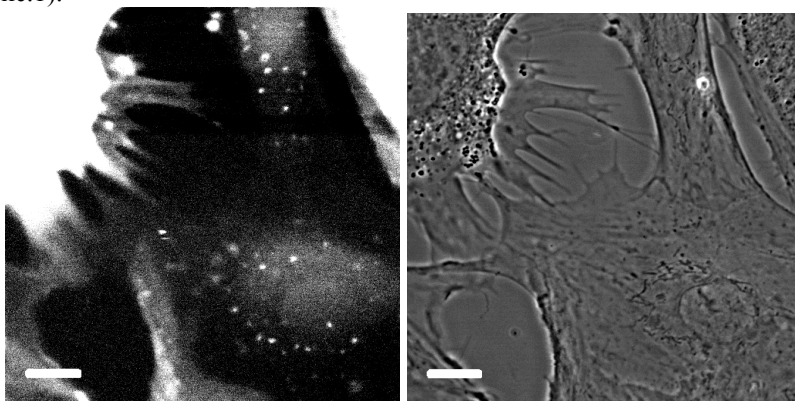


Рис.1. Образование туннельных нанотрубочек (ТНТ) при сокультивировании клеток почки и ММСК (фазовый контраст, справа) и передача по ТНТ цитоплазматического красителя из окрашенной клетки ММСК в неокрашенную почечную клетку (флуоресценция Calcein, слева). Шкала 10мкм.

Поскольку известно, что по туннельным нанотрубочкам могут передаваться некоторые клеточные компартменты [6], нами была исследована возможность транспорта цитоплазмы и органелл между ММСК и клетками эпителия почечных канальцев крысы при сокультивировании. Действительно, было выявлено, что через 24 часа сокультивирования между ММСК и клетками почки наблюдается обмен флуоресцентными зондами. При двойном окрашивании клеток

(ММСК – кальцеин, зеленая флуоресценция почечные клетки – DiL, обладающий красной флуоресценцией), конфокальная микроскопия показала, что в клетках, контактирующих с помощью нанотрубочек выявлялись оба зонда. При этом по интенсивности флуоресценции было видно, что клетки почки, имеющие интенсивную красную флуоресценцию DiL, после сокультивирования приобретают еще и флуоресценцию в области 505-530нм, то есть получают от ММСК Calcein, однако более низкой интенсивности, чем наблюдается в ММСК. В свою очередь, в ММСК появлялись компартменты, флуоресцирующие в красной области, то есть в них передавался зонд DiL. Процесс транспорта цитоплазматического содержимого является ненаправленным и идет как через крупные специализированные структуры щелевых контактов, так и через ТНТ.

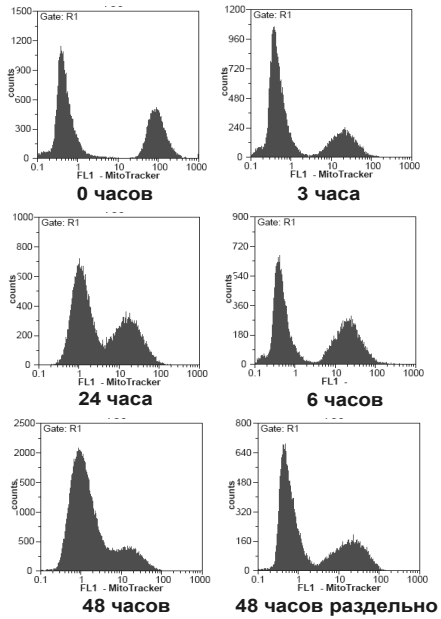


Рис.2. Передача между почечными клетками и МСК митохондриального красителя Mitotracker, исследованная методом проточной цитометрии по изменению соотношения окрашенной и неокрашенной популяций клеток в совместной культуре. Представлены различные сроки сокультивирования, а также результат сокультивирования в условиях, препятствующих образованию ТНТ.

При цитометрическом исследовании на разных сроках сокультивирования было обнаружено, что сразу после смешивания культура разделяется на две популяции с разной интенсивностью флуоресценции митохондриального зонда. Уже через 3 часа наблюдался сдвиг популяции, нагруженной Mitotracker, в сторону уменьшения интенсивности флуоресценции. Эта тенденция продолжала развиваться к 24 часам; к 48 часам сокультивирования пики обеих популяций практически сливались. Таким образом, происходит транспорт митохондриального красителя, то есть ММСК передают окрашенные

Mitotracker митохондрии в клетки почки. При контрольном сокультивировании в одной культуральной чашке, но на отдельных покровных стеклах, обнаружено некоторое сближение пиков через 48 часов, однако клетки по–прежнему четко разделялись на две популяции. Это указывает на то, что в данном случае имеет место незначительный обмен красителем через культуральную среду (рис.2).

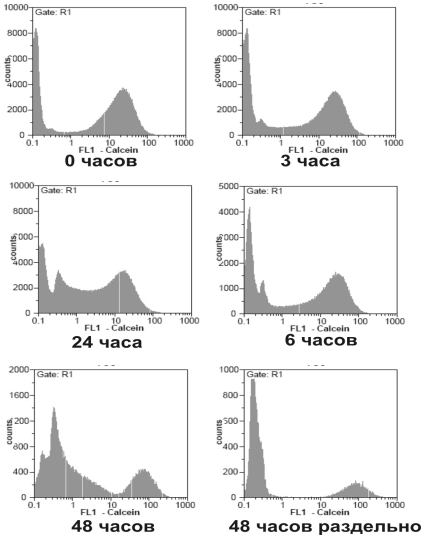


Рис.3. Передача между почечными клетками и ММСК цитоплазматического красителя Calcein, исследованная методом проточной цитометрии по изменению соотношения окрашенной и неокрашенной популяций клеток в совместной культуре. Представлены различные сроки сокультивирования, а также результат сокультивирования в условиях, препятствующих образованию ТНТ.

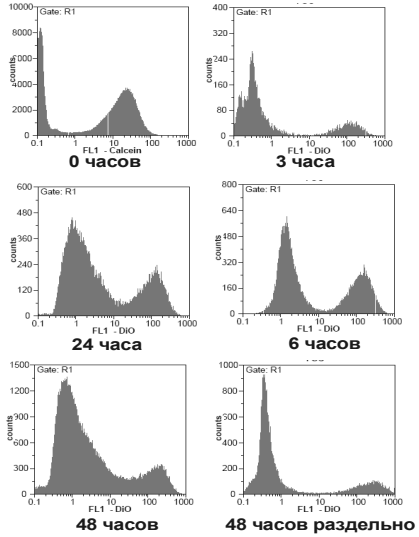


Рис.4. Передача между почечными клетками и ММСК мембранного красителя DiO, исследованная методом проточной цитометрии по изменению соотношения окрашенной и неокрашенной популяций клеток в совместной культуре. Представлены различные сроки сокультивирования, а также результат сокультивирования в условиях, препятствующих образованию ТНТ.

Аналогично исследовался обмен цитоплазматическим содержимым и мембранными компонентами. Было обнаружено, что сразу после смешивания в культуре выделяются две популяции с разной интенсивностью флуоресценции Calcein (цитоплазматический краситель) или DiO (липидный краситель): неокрашенные клетки почки попадают в пик низкой флуоресценции, а клетки, несущие флуоресцентный зонд, в

пик с высокой флуоресценцией. При сокультивировании происходит уменьшение обеих начальных популяций и появление большого числа клеток с промежуточными значениями интенсивности флуоресценции, то есть клеток почки, в которые транслоцировался зонд из ММСК. В случае с Calcein через 6 часов доля таких клеток составляла 19,4%, через 24 часа – 32%, а через 48 часов – более 38% всей культуры (рис.3); в случае с DiO через 6 часов доля таких клеток составляла 14,7%, а через 24 часа и 48 часов – около 45% всей культуры (рис.4). При контрольном сокультивировании в одной культуральной чашке, но на отдельных покровных стеклах, клетки и в обоих случаях разделялись на две популяции, значительно различающиеся по интенсивности флуоресценции даже через 48 часов. Это исключает бесконтактный способ передачи красителя. Форма пиков при этом указывает на то, что, скорее всего, появление промежуточной популяции клеток идет за счет передачи флуорохрома неокрашенным клеткам.

Можно сделать вывод, что межклеточные контакты, образующиеся между двумя разными типами клеток – ММСК и клетками эпителия почечных канальцев крыс – способны осуществлять транспорт митохондрий и различных цитоплазматических и мембранных компонентов. Возможно, именно эти явления межклеточного транспорта могут обеспечивать терапевтический эффект при пересадке ММСК в поврежденную ткань почки. При этом ММСК могут служить донорами сигнальных или дефицитных внутриклеточных компонентов, в том числе митохондрий, что может обеспечивать нормализацию различных внутриклеточных процессов в клетках почки при их повреждении.

Работа поддержана грантом РФФИ №08–04–01667.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Friedenstein A.J., et al.* //J. Embryol. Exp. Morphol. (1966) 16: 381-90;
2. *Thomson J.A., et al.* //Science (1998) 282: 1145–7;
3. *Tögel F., et al.* //Am. J. Physiol. Renal. Physiol. (2005) 289(1):31-42;
4. *Semedo P., et al.* //Transplant Proc. (2007) 39(2): 421-3;
5. *Кудрявцев Ю.В.,и др.* //Кл. Технол. Биол. Мед. (2009) 1: 3-10;
6. *Plotnikov E.Y., et al.* //J. Cell. Mol. Med. (2008) 12(5A): 1622-31;
7. *Rustom A., et al.* //Science (2004) 303: 1007-10.

АНАЛИЗ ИНСУЛИНРЕЦЕПТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ТКАНЯХ МОЗГА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

Чистякова О.В.[1], Лошкарева М.Л.[2], Сухов И.Б.[2], Шипилов В.Н.[1]

[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, СПб
[2]Государственный политехнический университет, СПб

В настоящее время оценка нейрогормональной роли инсулина является предметом активных исследований. Механизм внутриклеточной реализации инсулинового сигнала в мозге не имеет принципиальных отличий от такового в периферических тканях-мишенях [1,2]. Рецепторы инсулина обнаружены во всех отделах мозга с заметно большей концентрацией в обонятельных луковицах и аркуатных ядрах гипоталамуса. Показано участие инсулинрецепторного сигнального пути мозга в контроле энергетического гомеостаза, уровня периферической глюкозы, а также процессов памяти и обучения [3]. При определении статуса инсулина как нейропептида особый интерес представляют исследования функциональных нарушений инсулиновой сигнальной системы мозга при таких патологиях как нейродегенеративные процессы, ожирение, диабет [4].

Целью настоящей работы являлось изучение реакции рецепторного звена инсулиновой сигнальной системы мозга на системный дефицит инсулина и инсулинорезистентность тканей в условиях экспериментального диабета 1-го и 2-го типов у крыс.

Материалы и методы исследования. Сахарный диабет 1-го типа вызывали у крыс Wistar введением стрептозотоцина (СТ), избирательно разрушающего В-клетки поджелудочной железы, в дозе 65мг/кг веса. Развитие диабета контролировали по гипергликемии, повышению уровня сахара в 3-5 раз, глюкозурии и полиурии. Диабет 2-го типа (с инсулинорезистентностью тканей) вызывали интраперитониальным введением крысятам (1.5-2 дня после рождения) диабетогенной дозы СТ (80мг/кг веса). При такой схеме введения СТ признаки диабета 2-го типа развиваются через 2.5-3 месяца. Для диагностики диабета у крыс исследовали толерантность к глюкозе по сахарной кривой: определяли уровень гликемии натощак, с последующим введением глюкозы и контролем уровня гликемии. В опыты отбирали крыс, сахар в крови которых в течение двух часов после нагрузки глюкозой не возвращался к исходному значению и превышал его в 1.5-2 раза.

Гетерогенную фракцию мембран тканей головного мозга крысы получали по методу Хавранковой [5]. Фракцию плазматических мембран печени получали по методу Невилла (1968) с незначительными изменениями.

Для изучения связывающих характеристик рецепторов инсулина головного мозга и печени крыс применяли метод радиорецепторного анализа. Инсулин («Sigma», США) метили ^{125}I («Изотоп», Россия) хлораминовым методом с последующей очисткой на колонке с целлюлозой, специфическая активность ^{125}I-инсулина составляла 160-180мкКи/мкг. Меченый инсулин инкубировали с рецепторным материалом в составе фракций плазматических мембран в присутствии концентраций немеченого гормона от 10^{-10} до 10^{-5}М. Полученные на основе экспериментальных данных кривые конкурентного вытеснения связанного с рецептором меченого гормона немеченым анализировали преобразованием в координатах Скэтчарда. Были рассчитаны константа диссоциации $K_д$, характеризующая аффинность рецепторов, и R_0, определяющее число связывающих мест. Регрессионный анализ был применен отдельно для высокоаффинных и низкоаффинных рецепторов.

Результаты исследования и обсуждение. Нами дана характеристика рецепторного связывания ^{125}I-инсулина в мозговых мембранах контрольных крыс (табл.1). По данным других авторов во фракции плазматических мембран, полученных из обонятельных луковиц, связывание инсулина составляло 23%/мг белка [6], преобладая над таковым в гипоталамусе, коре и мозжечке (6-14%/мг белка). Как и в наших исследованиях, анализ данных в координатах Скэтчарда позволил выявить в мозге крыс два класса связывающих мест – высокоаффинных ($K_д$ =3нМ) и низкоаффинных ($K_д$=12нМ). По связывающим параметрам рецепторы инсулина мозга у крыс сходны с таковыми у человека [7, 8].

Табл.1. Характеристика рецепторного связывания ^{125}I-инсулина в мозге и печени крыс в норме и в динамике развития диабета 1-го типа.

	Уровень специфического связывания, %/0.5 мг	Высокоаффинные рецепторы		Низкоаффинные рецепторы	
		$K_д$, нМ	R_0, fmol/0.5мг	$K_д$, нМ	R_0, fmol/0.5мг
Мозг					
Контроль	5.59±0.74	1.63±0.27	93±20	37.86±3.5	996±277
Диабет 15 дней	10.87±3.05*	1.62±0.69	174±93	58.32±2.94*	2360±776
Диабет 30 дней	11.46±1.35*	2.23±0.46	229±43*	41.63±4.87	2217±739
Печень					
Контроль	15.3±1.87	2.15±0.37	305±65	55.86±9.68	4467±900
Диабет 15 дней	20.43±2.49*	1.52±0.48	336±79	54.04±4.04	3837±610
Диабет 30 дней	13.65±2.46	3.6±0.78*	565±108	82.19±10.66*	5681±1559

Звездочкой отмечены достоверные отличия опытных данных от контроля, $p<0.05$

По нашим данным связывание ^{125}I-инсулина в мозге у контрольных крыс было в 2.5 раза ниже, чем в печени. Сравнительная характеристика связывающих параметров рецепторов инсулина в двух тканях показала, что сродство рецепторов двух тканевых локализаций достоверно не различалось, а число как высоко- так и низкоаффинных рецепторов в печени преобладало над таковым в мозге в 3.3 и 4.5 раза, соответственно. Эти различия и обуславливали больший уровень специфического связывания ^{125}I-инсулина в печени, чем в мозге, что согласуется с данными других авторов [8].

При диабете 1-го типа в мозге крыс специфическое связывание ^{125}I-инсулина в 2 раза превышало контрольный уровень (табл.1). Анализ данных в координатах Скэтчарда показал, что повышение связывание было обусловлено увеличением числа рецепторов. В печени крыс на 15-е сутки развития диабета уровень связывания ^{125}I-инсулина возрастал на 33%, по сравнению с контролем.

Имеющиеся литературные данные о реакции рецептора инсулина мозга на системный дефицит гормона, вызванный введением СТ, неоднозначны. В ранних работах на гомогенатах мозга [9] и в плазматических мембранах коры [5] у диабетических крыс уровень связывания инсулина не отличался от такового у контрольных животных. Также в мозге у диабетических крыс не было обнаружено достоверных изменений числа рецепторов инсулина [10] и уровня экспрессии мРНК рецептора [11] в отличие от рецепторов гормона в других тканях – мышцах, печени. Этот факт трактовался как независимость рецепторов инсулина в ЦНС от критических колебаний уровня инсулина и сахара крови в отличие от рецепторов периферической локализации. Кроме того, появились работы на животных моделях с нокаутом гена рецептора инсулина в нейронах, результаты которых указывали на вовлеченность инсулинового сигнального пути мозга в контроль метаболизма [1]. В недавних исследованиях введение СТ в желудочки мозга крысам приводило к падению уровня специфического связывания инсулина [12], снижению экспрессии гена инсулинового рецептора и возрастанию активности рецепторной тирозинкиназы [13] в различных отделах ЦНС. Авторы предполагают, что выявленные изменения указывают на комплексную дисфункцию инсулиновой сигнальной системы мозга в ответ на СТ, что существенно для установления причин развития диабета и сопряженных с ним нейродегенеративных процессов. По нашим данным рецепторы инсулина мозга на системное снижение инсулина отвечали повышением связывания, что подтверждает нейрогормональные функции инсулина.

В динамике развития диабета 2-го типа специфическое связывание ^{125}I-инсулина плазматическими мембранами печени крыс по сравнению с контролем снижалось на 31% к 110-ому и на 27% к 190-ому дню развития

диабета, что было обусловлено снижением числа рецепторов (табл.2). Эти данные согласуются с классическим представлением о том, что основной характеристикой диабета 2-го типа является развитие инсулинорезистентности в периферических органах-мишенях для действия инсулина.

Табл.2. Характеристика рецепторного связывания ^{125}I-инсулина в мозге и печени крыс в норме и в динамике развития диабета 2-го типа.

	Уровень специфического связывания, %/0.5мг	Высокоаффинные рецепторы		Низкоаффинные рецепторы	
		$K_д$, нМ	R_0, fmol/0.5мг	$K_д$, нМ	R_0, fmol/0.5мг
Мозг					
Контроль	5.59±0.74	1.63±0.27	93±20	37.86±3.5	996±277
Диабет 110 дней	6.2± 0.96	1.49±0.21	82±16	43.26±8.86	1120±292
Диабет 190 дней	4.6± 0.4	2.25±0.93	115±62	39.96±6.47	1746±1098
Печень					
Контроль	15.3±1.87	2.15±0.37	305±65	55.86±9.68	4467±325
Диабет 110 дней	10.5±2.25*	3.67±1.3	311±57	77.21±22.5	3849±868
Диабет 190 дней	11.2±0.98*	2.02±0.38	233±32	57.32±7.3	3425±448*

Звездочкой отмечены достоверные отличия опытных данных от контроля, $p<0.05$

В отличие от печени в мозге диабетических крыс уровень специфического связывания ^{125}I-инсулина не отличался от контроля, сравнительный анализ параметров рецепторного связывания также не выявил достоверных различий величин $K_д$ и R_0 у контрольных и диабетических крыс. Однако, как следует из данных других авторов, это не исключает изменений на последующих этапах сигнальной трансдукции гормона. Так, тирозинкиназная активность бета-субъединиц рецепторов инсулина в ЦНС снижалась на фоне инсулинорезистентности [14]. Поэтому, мы можем говорить только об отсутствии изменений в связывающих параметрах рецептора инсулина мозга при диабете 2-го типа, но не о реакции всей сигнальной системы гормона в ЦНС на диабетические повреждения.

Выявленные различия в ответе рецептора инсулина мозга на системный дефицит инсулина (диабет 1-го типа) и на инсулинорезистентность тканей (диабет 2-го типа), что подтверждает представление о функциональной активности и пластичности действия инсулиновой сигнальной системы в ЦНС.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schwartz M.W. et al.* //Endocr. Rev. (1992) 13(3): 387-414;
2. *Morton G.J. et al.* //Nature (2006) 21: 289-95;
3. *Obici S., Rossetti L.* //Endocrinology (2003) 144(12): 5172-8;
4. *Gelling R.W. et al.* //Cell Metab. (2006) 3(1): 67-73;
5. *Havrankova J., Roth J., Brownstein M.J.* //J. Clin. Invest. (1979) 64(2): 636-42;
6. *Marks J.L., Madisson J., Eastman C.J.* //J. Neurochem. (1988) 50: 774-81;
7. *Roth R.A. et al.* //J. Biol. Chem. (1986) 261(8): 3753-7;
8. *Hopkins D.F., Williams G.* //Diabet. Med. (1997) 14(12): 1044-50;
9. *Pacold S.T., Blackard W.G.* //Endocrinology (1979) 105(6): 1452-7;
10. *Pezzino V. et al.* //J. Endocrinol. Invest. (1996) 19(9): 593-7;
11. *Sechi L.A. et al.* //Diabetes (1992) 41(9): 1113-8;
12. *Lester-Coll N. et al.* //J. Alzheimers Dis. (2006) 9(1): 13-33;
13. *Grünblatt E. et al.* //J. Neurochem. (2007) 101(3): 757-70;
14. *Frölich L. et al.* //Ann. N.Y. Acad. Sci. (1999) 893: 290-3.

СНИЖЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ К ХОРИОНИЧЕСКОМУ ГОНАДОТРОПИНУ И ПЕПТИДНЫМ ГОРМОНАМ В ТКАНЯХ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА

Шпаков А.О., Бондарева В.М., Соколова Е.П., Дроздов А.А., Деркач К.В., Чистякова О.В.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, СПб

Введение. Сахарный диабет 2-го типа (СД2), характерной особенностью которого является резистентность к инсулину, приводит к развитию широкого спектра заболеваний репродуктивной системы, в том числе к синдрому поликистозных яичников у женщин и гипогонадизму у мужчин. Предполагается, что основными причинами этих заболеваний являются нарушения регуляции гормонами функций репродуктивной системы, возникающие в условиях СД2. Ранее мы показали, что при экспериментальном СД2 (ЭСД2) наблюдается снижение чувствительности аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) к действию пептидных гормонов и биогенных аминов в скелетных мышцах, миокарде и мозге диабетических крыс [1-4]. При этом в наибольшей степени ослабляется передача гормональных сигналов, осуществляемых через G-белки ингибирующего типа (G_i-белки), в то

время как передача сигналов, реализуемых через G-белки стимулирующего типа (G_s-белки), меняется в меньшей степени. Возможными причинами выявленных нарушений могут быть как снижение экспрессии компонентов АЦСС, так и нарушение функционального взаимодействия между ними в процессе передачи гормонального сигнала.

Следует, однако, отметить, что общая картина нарушений, возникающих при СД2 в чувствительной к гормонам АЦСС, в настоящее время отсутствует, а лежащие в их основе молекулярные механизмы изучены недостаточно. Это в полной мере относится к гормоночувствительной АЦСС в тканях репродуктивной системы в условиях СД2. Большинство работ ограничены определением уровня гормонов в организме страдающих СД2 людей, изучением процессов их секреции и метаболизма, а также некоторых конечных эффектов гормонов на клетки и ткани, в то время как процессы передачи сигнала через АЦСС и другие гормональные сигнальные системы остаются вне поля зрения исследователей. Одной из возможных причин этого являются трудности с подбором адекватной модели СД2, которую можно использовать для исследования функциональной активности гормональных сигнальных систем. Эти трудности нам удалось преодолеть, выбрав недавно разработанную неонатальную модель стрептозотоцинового диабета, который имеет черты сходства с СД2 человека [5]. В основе этой модели лежит введение стрептозотоцина новорожденным крысятам, что в дальнейшем приводит к развитию у них инсулиновой резистентности и ожирения. При этом уровень глюкозы у крыс с ЭСД2 либо не отличается от нормы, либо незначительно ее превышает, а уровень инсулина заметно превышает норму, что характерно для СД2 человека.

Цель исследования состояла в выявлении нарушений в регулируемой гонадотропинами и пептидными гормонами АЦСС в тканях репродуктивной системы крыс с ЭСД2. Изучали влияние хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), являющегося структурным и функциональным гомологом лютеинизирующего гормона (ЛГ), и пептидных гормонов релаксина, PACAP (Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide) и соматостатина на активность АЦСС в яичниках, тестикулах и матке диабетических крыс. Следует отметить, что ХГЧ, релаксин и PACAP действуют на активность аденилатциклазы (АЦ) в тканях репродуктивной системы в основном через G_s-белки, в то время как соматостатин – через G_i-белки [6-8].

Методика. Исследования проводили на крысах линии *Wistar* возраста 180 дней. Изучали две группы животных с ЭСД2 – самцов (n=10, масса тела 425±50г) и самок (n=9, 405±55г), в сравнении с двумя группами контрольных животных – самцов (n=14, 335±40г) и самок (n=9,

320±35г). ЭСД2 вызывали введением стрептозотоцина (Sigma, США) новорожденным 1-2-сут крысятам в дозе 80мг/кг веса животного [5]. Развитие ЭСД2 подтверждали в тесте на толерантность к глюкозе при исследовании сахарной кривой и наличием глюкозурии.

Активность АЦ в частично очищенных фракциях плазматических мембран яичников, тестикул и матки крыс определяли, как описано ранее [2]. Инкубацию фракций плазматических мембран в реакционной смеси проводили при 37°С в течение 10мин. Активность АЦ оценивали по количеству цАМФ, который получался в результате ферментативной реакции. Определение ГТФ-связывания G-белков проводили, как описано ранее [9], используя нитроцеллюлозные фильтры, тип НА, 0.45мкм (Millipore, США). Специфическое ГТФ-связывание определяли как разность между связыванием меченого [8-^{3}H]Gpp[NH]p в пробе в отсутствие и в присутствии 10мМ ГТФ.

Результаты и обсуждение. Базальная активность АЦ в яичниках, тестикулах и тканях матки контрольных крыс составила 68±7, 105±9 и 138±12 пмоль цАМФ за 1мин на мг мембранного белка. У крыс с ЭСД2 она была снижена в яичниках (56±5) и тестикулах (81±11), но в тканях матки практически не отличалась от контроля (132±15). Базальный уровень ГТФ-связывания G-белков в яичниках, тестикулах и, в меньшей степени, в матке диабетических крыс был снижен в сравнении с контрольными животными (табл.).

В яичниках, тестикулах и матке контрольных крыс ХГЧ (10^{-9}М) стимулировал активность АЦ на 298, 722 и 245%, соответственно, и повышал ГТФ-связывание G-белков, в наибольшей степени – в тестикулах (табл.). У диабетических животных стимулирующие АЦ эффекты ХГЧ были отчетливо снижены в яичниках и тестикулах (192 и 383%), но мало отличались от таковых в матке контрольных крыс (218%). Снижена была и стимуляция гормоном ГТФ-связывания (табл.). Изучение дозозависимости действия ХГЧ на активность АЦ показало, что его максимальный стимулирующий эффект снижался на 30%, а значение EC_{50} повышалось с 0.019 до 0.064нМ. Это, как мы полагаем, связано с нарушением сопряжения между рецептором ЛГ, с которым связывается ХГЧ, и G_s-белком.

Таким образом, нами показано, что при ЭСД2 наблюдается ослабление влияния гонадотропинов на АЦСС в яичниках и тестикулах, являющихся основными мишенями их регуляторного действия. Вероятно, со снижением чувствительности АЦСС к гонадотропинам связан и широкий спектр нарушений контролируемых этими гормонами функций репродуктивной системы как у людей, страдающих СД, так и у крыс с ЭСД [10]. Наиболее частыми среди них являются нарушения процессов сперматогенеза и фолликулогенеза, которые сопровождаются изменением содержания стероидных гормонов и их предшественников,

синтез которых контролируется гонадотропинами через посредство цАМФ-зависимых сигнальных каскадов.

Гормональное воздействие	ГТФ–связывание, пмоль [8-^{3}H]GppNHp на мг мембранного белка					
	Яичники		Тестикулы		Матка	
	Контроль	ЭСД2	Контроль	ЭСД2	Контроль	ЭСД2
Без гормона	1.22±0.11 (100)*	1.01±0.08 (100)	1.45±0.13 (100)	1.11±0.10 (100)	2.17±0.18 (100)	2.06±0.17 (100)
ХГЧ, 10^{-9}М	3.07±0.36 (252)	2.03±0.34 (201)	4.04±0.40 (279)	2.29±0.31 (206)	3.37±0.29 (155)	3.01±0.17 (146)
РАСАР, 10^{-8}М	3.16±0.19 (259)	2.27±0.30 (225)	3.87±0.28 (267)	2.12±0.20 (191)	3.10±0.17 (143)	2.88±0.23 (140)
Релаксин, 10^{-8}М	1.84±0.22 (151)	1.50±0.14 (149)	2.15±0.23 (148)	1.67±0.19 (150)	4.62±0.34 (213)	4.22±0.38 (205)
Соматостатин, 10^{-7}М	1.49±0.08(122)	1.12±0.13	2.17±0.14 (150)	1.32±0.08	3.75±0.26 (173)	2.43±0.31

*ГТФ–связывание G-белков в процентах (ГТФ-связывание в отсутствие гормона принято за 100%).

РАСАР и релаксин (10^{-8}М), регулирующие важнейшие функции репродуктивной системы, стимулировали АЦ в яичниках (380 и 94%), тестикулах (542 и 153%) и матке (102 и 378%) и повышали уровень ГТФ-связывания в этих тканях (табл.). У крыс с ЭСД2 АЦ эффекты РАСАР снижались в яичниках (288%) и тестикулах (330%), но слабо менялись в матке (89%). Стимулирующие эффекты релаксина на АЦ в условиях ЭСД2 практически не менялись. Сходная картина действия гормонов наблюдалась и в случае ГТФ-связывания (табл.). Таким образом, нами обнаружено снижение чувствительности яичников и тестикул крыс с ЭСД2 к РАСАР, в то время как чувствительность матки к РАСАР и всех исследованных нами тканей к релаксину при ЭСД2 мало отличалась от контроля.

Для выявления ингибирующего АЦ эффекта соматостатина (10^{-7}М) изучали его влияние на стимулированную форсколином активность АЦ. Наиболее отчетливое снижение соматостатином активности АЦ было обнаружено в матке (61%), в тестикулах и яичниках оно составляло 49 и 27%, соответственно. Соматостатин также стимулировал ГТФ-связывание, в наибольшей степени в матке (табл.). Стимуляция гормоном ГТФ-связывания G-белков обусловлена тем, что соматостатин с высокой эффективностью активирует G_i-белки. В тканях крыс с ЭСД2 ингибирующий АЦ эффект соматостатина был ослаблен.

Снижение стимулированной форсколином активности АЦ составляло в матке, тестикулах и яичниках – 28, 24 и 21%, соответственно. Снижена была и стимуляция соматостатином ГТФ-связывания (табл.). Эти результаты согласуются с данными, полученными нами и другими авторами, о значительном повреждении сопряженных с G_i-белками сигнальных каскадов в условиях СД [3,4,11]. Выявление нарушений в передаче соматостатинового сигнала через АЦСС в тканях репродуктивной системы крыс с ЭСД2 указывает на то, что возникающие при диабете нарушения в сопряженных с G_i-белками сигнальных каскадах затрагивают широкий спектр тканей и гормонов. Поскольку соматостатин вовлечен в процесс регуляции стероидогенеза и, в частности, контролирует синтез прегненолона, то нарушение функционирования регулируемой им АЦСС также может вносить заметный вклад в развитие патологии репродуктивной системы в условиях СД.

Заключение. Таким образом, нами впервые выявлены нарушения чувствительности АЦСС к действию ХГЧ и пептидных гормонов, регуляторов репродуктивной системы, в яичниках, тестикулах и матке крыс с ЭСД2. Обнаружено, что стимулирующие эффекты ХГЧ и РАСАР на АЦСС снижены в яичниках и тестикулах диабетических животных. Во всех исследованных тканях ослаблены ингибирующие АЦ эффекты соматостатина, что указывает на нарушение функционирования сопряженной с G_i-белками АЦСС в условиях СД2. Выявленные нарушения в регулируемых ХЧГ, РАСАР и соматостатином АЦ сигнальных каскадах, как мы полагаем, лежат в основе патогенетических изменений в тканях репродуктивной системы при СД2. Наряду с этим показано, что изменения чувствительности АЦСС к ХГЧ и пептидным гормонам являются ткане- и гормоноспецифичными. Так стимулирующие АЦ эффекты ХГЧ и РАСАР в тканях матки при диабете изменены в незначительной степени, а соответствующие эффекты релаксина мало отличаются от контроля во всех исследованных тканях. Изучение гормональной регуляции в условиях СД2 является одним из важнейших направлений в диагностике и лечении дисфункций и заболеваний репродуктивной системы человека, возникающих при этом заболевании.

Работа поддержана РФФИ №09–04–00746а и Программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (2009г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шпаков А.О. и др.* //Бюл. Экспер. Биол. Мед. (2006) 142: 641-45;
2. *Shpakov A.O. et al.* //Cent. Eur. J. Biol. (2006) 1: 530-44;
3. *Шпаков А.О. и др.* //Технологии живых систем (2007) 4: 96-108;
4. *Шпаков А.О. и др.* //Цитология (2007) 49: 442–50;
5. *Hemmings S.J., Spafford D.* //Int. J. Biochem. Cell Biol. (2000) 32: 905-19;
6. *Costagliola S., et al.* //Reproduction (2005) 130: 275-81;
7. *Shpakov A. et al.* //Ann. N.Y. Acad. Sci. (2005) 1041: 305-7;
8. *Vaccari S. et al.* //J. Endocrinol. (2006) 191: 287-99;
9. *Шпаков А.О. и др.* //Биол. мембраны. (2005) 22: 435-42;
10. *Ballester J. et al.* //J. Androl. (2004) 25: 706-19;
11. *Hashim S. et al.* //Mol. Cell. Biochem. (2002) 240: 57-65.

***

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В ЭЛЕКТРОВОЗБУДИМЫХ КЛЕТКАХ

Сигнализация в мышечных клетках и нейронах

УЧАСТИЕ Ca^{2+}-АКТИВИРУЕМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ БОЛЬШОЙ ПРОВОДИМОСТИ В ПРЕКОНДИЦИОНИРУЮЩИХ ЭФФЕКТАХ ГИПОКСИИ И ПОСТГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПЕРВОЗБУДИМОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА ПОЛЯ CA1

Левин С.Г.[1], Годухин О.В.[1,2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Пущинский государственный университет

Введение. В наших предыдущих работах [3], а также другими авторами [17] было показано, что кратковременные эпизоды гипоксии или аноксии оказывают быстрое прекондиционирующее влияние на способность последующей гипоксии угнетать активность нейронов поля CA1 в срезах гиппокампа. Кроме того, однократная кратковременная гипоксия [19] или ее повторяющиеся эпизоды [9,12] способны индуцировать постгипоксическую гипервозбудимость нейронов поля CA1 гиппокампа, проявляющуюся в форме развития у них эпилептиформных разрядов. Известно, что одним из первичных ответов клеток мозга на гипоксию или ишемию является увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция [5]. Отсюда следует, что играющие важную роль в возбудимости нервных клеток Ca^{2+}-активируемые калиевые каналы могут иметь ключевое значение в таких индуцируемых кратковременной гипоксией формах нейропластичности, как прекондиционирование и постгипоксическая гипервозбудимость.

Из литературы известно, что гипоксия способна снижать вероятность открытого состояния одного из подтипов этих каналов: Ca^{2+}-активируемых калиевых каналов большой проводимости (БК(Ca^{2+})), индуцируя при этом гипервозбудимость нейронов поля CA1 гиппокампа крысы [8]. Показано также участие этих каналов в развитии гипервозбудимости нейронов гиппокампа и церебральной коры, индуцируемой проконвульсантами [15]. Однако на модели химической ишемии *in vitro* было обнаружено, что вызванная кратковременным ишемическим инсультом гипервозбудимость нейронов гиппокампа подавляется не селективным блокатором БК(Ca^{2+})-каналов иберiотоксином (ИТ), а блокатором потенциал-зависимых калиевых каналов тетраэтиламмонием [13]. Таким образом, литературные данные об участии БК(Ca^{2+})-каналов в механизмах развития постгипоксической/ постишемической гипервозбудимости являются противоречивыми.

В связи с изложенным выше целью настоящей работы было исследование влияния специфического блокатора БК(Ca^{2+})-каналов ИТ на следующие индуцируемые кратковременной гипоксией процессы в поле CA1 срезов гиппокампа:
1 – угнетающее действие гипоксии на активность нейронов непосредственно во время гипоксического эпизода;
2 – прекондиционирующее действие эпизодов гипоксии;
3 – постгипоксическую гипервозбудимость нейронов.

Методика. В экспериментах использовали 2-х месячных самцов крыс линии Вистар (n=20). Три 3-минутных эпизода гипоксии (интервал между эпизодами 10мин) вызывали переключением раствора Кребса-Рингера, насыщенного газовой смесью O_2(95%)/CO_2(5%), на раствор, насыщенный газовой смесью N_2(95%)/CO_2(5%) (pH=7.4). Популяционные спайки (ПС) регистрировали от пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа в ответ на электрическую тестирующую стимуляцию коллатералей Шаффера одиночными импульсами тока до, во время и после предъявления трех 3-минутных эпизодов гипоксии. Эффективность гипоксического эпизода угнетать амплитуду ПС оценивалась по формуле: $Г_{эфф}=Т^{в}_{г}–Т^{д}_{г}$, где $Г_{эфф}$ – эффективность эпизода гипоксии угнетать амплитуду ПС (в секундах); $Т^{д}_{г}$ – время, через которое амплитуда ПС снижается до 50% от ее прегипоксических значений при предъявлении эпизода гипоксии; $Т^{в}_{г}$ – время, через которое амплитуда ПС восстанавливается до 50% от ее прегипоксических значений после окончания действия гипоксии. Оценку развития постгипоксической гипервозбудимости нейронов в срезах гиппокампа, проявляющейся в форме эпилептиформных ПС-разрядов, производили по разработанной в нашей лаборатории оригинальной методике [9]. Гипоксические эпизоды предъявляли при следующих условиях: без добавления в среду блокатора БК(Ca^{2+})-каналов ИТ и через 10 минут после добавления в среду ИТ в концентрациях 10 или 20нМ.

Результаты исследований. Через 63±4с. после переключения среды суперфузии срезов гиппокампа на «гипоксическую» среду амплитуда ПС снижалась до 50% от своих прегипоксических значений. На фоне ИТ наблюдалась тенденция к снижению эффективности угнетающего действия гипоксии на амплитуду ПС во время гипоксического эпизода (рис.1 и табл.1). Как видно из таблицы, значения $Г_{эфф}$ для эпизодов гипоксии и гипоксии на фоне ИТ (10нМ) составляли соответственно: 1-й эпизод – 368±10с. и 316±21с., 2-й эпизод – 395±17с. и 359±34с., 3-й эпизод – 305±13с. и 291±11с. Эта тенденция к снижению эффективности угнетающего действия гипоксии на фоне ИТ

определялась, по крайней мере для 1-го эпизода, достоверным снижением параметра $T^{B}_{г}$ (1-й эпизод гипоксии – 431±10с. и 1-й эпизод гипоксии на фоне ИТ – 372±17с., $p<0.05$). Похожие результаты были получены и при использовании ИТ в концентрации 20нМ.

Табл.1 Значения параметров $T_г^{д}$, $T_г^{в}$ и $Г_{эфф}$ (в секундах) на фоне гипоксии и гипоксии с ИТ.

	Гипоксия			Гипоксия+ИТ (10нм)		
	1-й эпизод	2-й эпизод	3-й эпизод	1-й эпизод	2-й эпизод	3-й эпизод
$T_г^{д}$	63±4	75±4	98±7*	56±4	77±4	96±6*
$T_г^{в}$	431±10	470±16	403±13	372±17**	436±34	387±14
$Г_{эфф}$	368±10	395±17	305±13*	316±21	359±34	291±11

*-значения параметров во время 3-го эпизода гипоксии, отличающиеся достоверно от значений тех же параметров во время 1-го эпизода внутри одной и той же группы (Гипоксия или Гипоксия+ИТ). **-отмечено значение параметра во время 1-го эпизода гипоксии на фоне ИТ, достоверно отличающееся от значения того же параметра во время 1-го эпизода гипоксии без ИТ.

Как видно из таблицы, 1-й и 2-й эпизоды гипоксии вызывали прекондиционирующий эффект на способность 3-го эпизода гипоксии угнетать амплитуду ПС. Прекондиционирующий эффект выражался в том, что длительность угнетающего действия гипоксии во время третьего эпизода (305±13с.) была достоверно меньше длительности первого эпизода (368±10с., $p<0.05$). Во время гипоксии на фоне ИТ (10нМ) такого достоверного снижения не наблюдалось (1-й эпизод гипоксии+ИТ – 316±21 с и 3-й эпизод гипоксии+ИТ – 291±11с.). Наблюдаемый прекондиционирующий эффект не был связан с влиянием ИТ на параметр $T^{Д}_{г}$, поскольку значения этого параметра во время 3-го эпизода гипоксии или 3-го эпизода гипоксии на фоне ИТ были достоверно больше соответствующих значений во время 1-го эпизода гипокии без или на фоне ИТ (табл. и рис.1). ИТ (10-20нМ) не влиял на постгипоксические значения амплитуды ПС после предъявления трёх 3-минутных эпизодов гипоксии (данные не приведены).

Анализ влияния блокатора БК(Ca^{2+})-каналов на развитие постгипоксической гипервозбудимости нейронов показал, что ИТ (10-20нМ) устраняет ее развитие в пирамидных нейронах поля СА1 в срезах гиппокампа (рис.2). Из рис.1 и 2 видно, что значения параметра ЧПС после эпизодов гипоксии на фоне ИТ не отличаются от их прегипоксических значений. Наблюдалась также тенденция к устранению вызванного тремя 3-минутными эпизодами гипоксии снижения порога стимулирующего тока, при котором развиваются ПС разряды в пирамидных нейронах, на фоне блокатора БК(Ca^{2+})-каналов (данные не показаны).

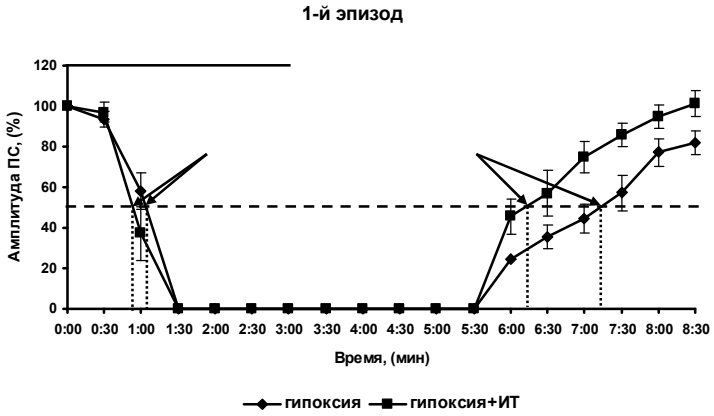


Рис.1. Изменения амплитуды ПС на фоне гипоксии до и после эпизодов гипоксии.

Обсуждение результатов. Данные литературы указывают, что способность кратковременных эпизодов гипоксии индуцировать постгипоксическую гипервозбудимость коррелирует с увеличением внеклеточной концентрации ионов калия [12,14,19]. Во время 3-минутного эпизода гипоксии концентрация внеклеточных ионов калия может достигать 9мМ (при нормальной концентрации около 2-3мМ) [14]. Поэтому блокада БК(Ca^{2+})-каналов во время такого гипоксического эпизода, по-видимому, способна нормализовать значения внеклеточной концентрации ионов калия и, как следствие этого, устранять индукцию постгипоксической гипервозбудимости нейронов. С другой стороны, блокада этих каналов во время гипоксических эпизодов устраняет также прекондиционирующий эффект гипоксии через механизмы, которые в настоящее время не исследованы.

Одной из функций БК(Ca^{2+})-каналов в пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа являются усиление фазы реполяризации кальциевых спайков и подавление повторяющихся разрядов натриевых спайков [10]. Известно, что БК(Ca^{2+})-каналы мембраны нейронов формируют комплексы с потенциал-активируемыми Ca^{2+}-каналами (ПАКК), открытие которых повышает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} до значений более 10мкМ, что достаточно для активации БК(Ca^{2+}) каналов при физиологических значениях мембранного потенциала [2]. Если БК(Ca^{2+})-каналы и L-тип ПАКК пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа функционируют кооперативно, то блокада последних во время кратковременных эпизодов гипоксии также должна устранять постгипоксическую гипервозбудимость этих нейронов. Это

предположение согласуется с нашими ранее полученными данными [9]. Роль другого подтипа Ca^{2+}-активируемых калиевых каналов – каналов низкой проводимости, которые также могут быть сопряжены с L-типом ПАКК в мембране нейронов [6], – в механизмах постгипоксической гипервозбудимости не ясна и требует дальнейших исследований.

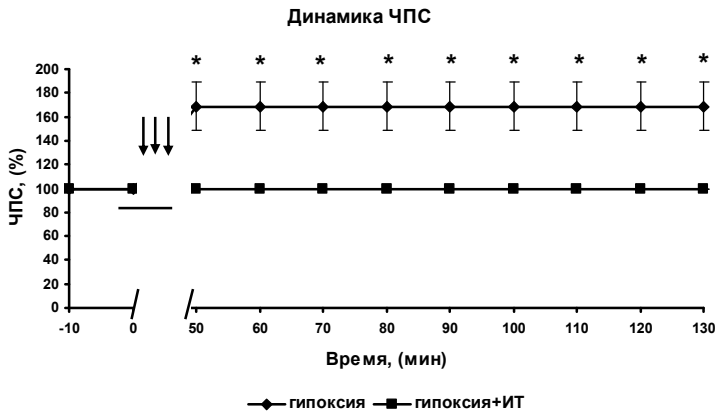


Рис.2. Изменения параметра ЧПС до и после эпизодов гипоксии.

Предполагается, что в механизмах быстрого аноксического прекондиционирования в нейронах гиппокампа важное участие принимают АТФ-зависимые калиевые каналы, активация которых во время аноксии приводит к гиперполяризации мембраны нейронов [17]. Результаты настоящей работы продемонстрировали, что специфический блокатор БК(Ca^{2+})-каналов ИТ устраняет быстрый прекондиционирующий эффект кратковременных эпизодов гипоксии, что говорит также о вовлечении каналов этого типа в феномен быстрого гипоксического прекондиционирования в клетках поля CA1 гиппокампа.

Заключение. Результаты проведенных исследований позволили показать, что БК(Ca^{2+})-каналы играют важную роль в механизмах развития таких индуцируемых кратковременными эпизодами гипоксии формах нейропластичности как быстрое гипоксическое прекондиционирование и постгипоксическая гипервозбудимость в пирамидных нейронах поля CA1 гиппокампа.

Работа выполнена при поддержке РФФИ №08-04-00002 и целевой программы Минобрнауки РФ «Развитие научного потенциала высшей школы (проект №2.1.1./3876)».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Berkefeld H., Fakler B.* //J. Neurosci. (2008) 28(33): 8238-45;
2. *Burkovetskaya M.E., Levin S.G., Godukhin O.V.* //Neurosci. Lett. (2007) 416: 236-40;
3. *Du C. et al.* //J. Cereb. Blood Flow Metabol. (2005) 25: 1078-92;
4. *Fakler B., Adelman J.P.* //Neuron (2008) 59: 873-81;
5. *Gao T.M., Fung M.L.* //Neurosci. Lett. (2002) 332(3): 163-6;
6. *Godukhin O. et al.* //Neuropharmacol. (2002) 42: 459-66;
7. *Golding N.L. et al.* //J. Neurosci. (1999) 19(20): 8789-98;
8. *Kawasaki K., Traynelis S.F., Dingledine R.* //J. Neurophys. (1990) 63(3): 385-94;
9. *Misonov H. et al.* //J. Neurosci. (2005) 25(48): 11184-93;
10. *Muller M., Somjen G.G.* //J. Neurophysiol. (2000) 83: 735-45;
11. *Otalora L.F.P. et al.* //Brain Res. (2008) 1200: 116-31;
12. *Perez-Pinzon M.A., Born J.G.* //Neuroscience (1999) 89(2): 453-9;
13. *Schiff S.J., Somjen G.G.* //Brain Res. (1985) 337(2): 337-40.

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ AKT/GSK-3B В РЕАКЦИЯХ НЕЙРОНОВ И ГЛИИ РЕЦЕПТОРА РАСТЯЖЕНИЯ РАКА НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Лобанов А.В., Узденский А.Б.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

Окислительный стресс – важнейший повреждающий фактор, лежащий в основе патогенеза многих болезней. Интенсивный окислительный стресс развивается в клетках при фотодинамическом (ФД) воздействии, когда окрашенные клетки освещаются в присутствии кислорода. В ФД-индуцированной смерти клеток важную роль играют внутриклеточные сигнальные процессы, модулирующие разные стадии некроза и апоптоза [1,2]. В частности, ФД инактивация и смерть нервных и глиальных клеток контролируются Ca^{2+}-зависимым и cAMP-зависимым сигнальными путями, в которых участвуют фосфолипаза С, кальмодулин, кальмодулин-зависимая киназа II, аденилатциклаза, протеинкиназы А и С [3-5].

Важную роль в реакциях клеток на ФД воздействие играют межклеточные взаимодействия, способные модулировать их выживаемость и смерть. Особенно важную роль они играют в критические периоды развития организма и при экстремальных воздействиях. Так, в нервной системе повреждение нейронов вызывает

смерть окружающих глиальных клеток, а повреждение глии нарушает функции нейронов, снижает их резистентность и ведет к дегенерации. С другой стороны, нейроны и глия защищают друг друга от повреждающих воздействий. Нейроглиальные взаимодействия основаны на обмене молекулярными сигналами: нейротрофическими факторами и нейромедиаторами, которые запускают внутриклеточные сигнальные каскады, направленные на регуляцию функциональной активности, дифференцировку, выживание, деление или смерть этих клеток [6,7]. Нейроглиальные взаимодействия с участием фактора роста нервов NGF оказывают защитное противоапоптозное и противонекротическое действие на фотосенсибилизированные глиальные клетки [8]. Какие внутриклеточные сигнальные пути опосредуют эти эффекты? Известно, что нейротрофины распознаются рецепторными тирозинкиназами, инициирующими MAP-киназный и фосфатидилинозитол 3-киназный (PI3K) сигнальные пути. Участие некоторых компонентов первого пути (протеинкиназ JNK и p38) в реакциях нейронов и глиальных клеток на ФД воздействие изучено в работе [9]. Но роль PI3K пути, в котором участвуют протеинкиназа B/Akt (Akt) и киназа гликогенсинтазы-3 (GSK-3β) оставалась неизвестной, несмотря на важную роль этих белков в выживании клеток.

В настоящей работе с помощью специфических ингибиторов изучено участие протеинкиназ Akt и GSK-3β в ФД-индуцированных изменениях нейронной активности, некрозе и апоптозе нейронов и глиальных клеток, а также опосредованной NGF модуляции выживаемости этих клеток.

Объектом исследования служил рецептор растяжения речного рака, состоящий из двух механорецепторных нейронов, окруженных сателлитными глиальными клетками. Импульсную активность нейронов и динамику их инактивации регистрировали с помощью присасывающихся электродов. Для визуализации ядер живых, некротических и апоптозных клеток использовали двойное флуорохромирование пропидиум-иодидом и Hoechst 33342. Фотосенсибилизатором служил алюмофталоцианин Фотосенс, источником света – полупроводниковый лазер с длиной волны 670нм. Интенсивность излучения поддерживалась на уровне 0.4мВт/см^2. Для изучения роли Akt в реакциях нейронов и глии на ФД воздействия использовался специфический ингибитор AktI, а для изучения роли GSK-3β – ингибитор TDZD-8 (Sigma). Нейротрофин NGF (mNGF 7S) любезно предоставлен фирмой Alomone (Israel).

В темновых условиях ингибирование Akt с помощью AktI (1мкМ) не влияло на импульсную активность нейронов и не вызывало их некроз (рис.1А,Б). Оно также не влияло на некроз глии, но повышало фоновый уровень апоптоза глиальных клеток (рис.1В,Г). Это указывает на противоапоптозное действие протеинкиназы B/Akt.

На фотосенсибилизированные нейроны и глиальные клетки AktI действовал по-другому. Он замедлял ФД-индуцированное торможение и прекращение импульсной активности нейронов (рис.1А). Можно предположить, что Akt участвует в ФД-индуцированном повышении уровня Ca^{2+} в нейроне, которое, вероятно, служит причиной фототорможения импульсной активности [10]. В присутствии NGF защитное действие AktI не проявлялось (рис.1А). Другой защитный эффект AktI – ослабление ФД-индуцированного некроза нейронов и глиальных клеток (рис.1Б,В). Оно предполагает участие Akt в некрозе фотосенсибилизированных клеток. В присутствии NGF наблюдалась тенденция к предотвращению этого эффекта. AktI не влиял на ФД-индуцированный апоптоз глиальных клеток и на противоапоптозное действие NGF на фотосенсибилизированные глиальные клетки (рис.1Г). Видимо, протеинкиназа B/Akt не участвует в противоапоптозных путях в глиальных клетках рака, опосредованных или не опосредованных нейротрофином NGF.

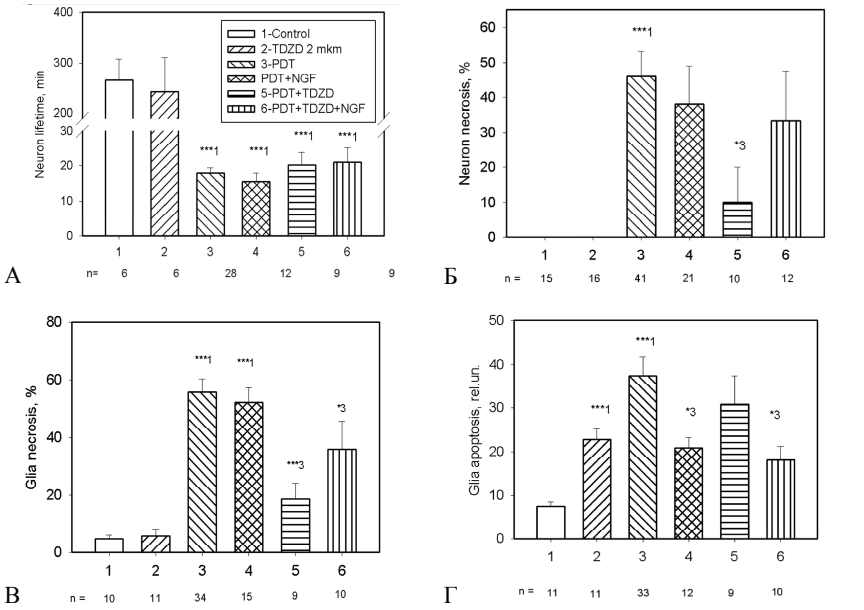


Рис.1. Влияние 1мкМ AktI, ингибитора протеинкиназы B/Akt, и 100нг/мл нейротрофина NGF на (А) продолжительность импульсной реакции нейронов (neuron lifetime), (Б) некроз нейронов, (В) некроз глиальных клеток и (Г) апоптоз глиальных клеток речного рака после изоляции и ФД воздействия (PDT). Цифры внизу графиков обозначают число опытов. *p<0,05; **p<0,01

Ингибирование GSK-3β с помощью TDZD-8 (2мкМ) в темноте не влияло на импульсную активность и некроз изолированных нейронов, но достоверно усиливало некроз и апоптоз глиальных клеток (рис.2). Это свидетельствует об участии GSK-3β в защите глиальных клеток от смерти, вызванной аксотомией и изоляцией рецептора растяжения. При ФД воздействии мы не обнаружили достоверного влияния TDZD-8 на изменения нейронной активности, некроз нейронов и глии (рис.2В,Г). Однако, TDZD-8 усиливал ФД-индуцированный апоптоз глии, как в присутствии нейротрофина NGF, так и без него (рис.2Г). Это может указывать на участие GSK-3β в защите глиальных клеток от ФД-индуцированного апоптоза. При этом противоапоптозное действие NGF не проявлялось, т.е. GSK-3β, возможно, участвовал в защите фотосенсибилизированных глиальных клеток от апоптоза, опосредованной NGF.

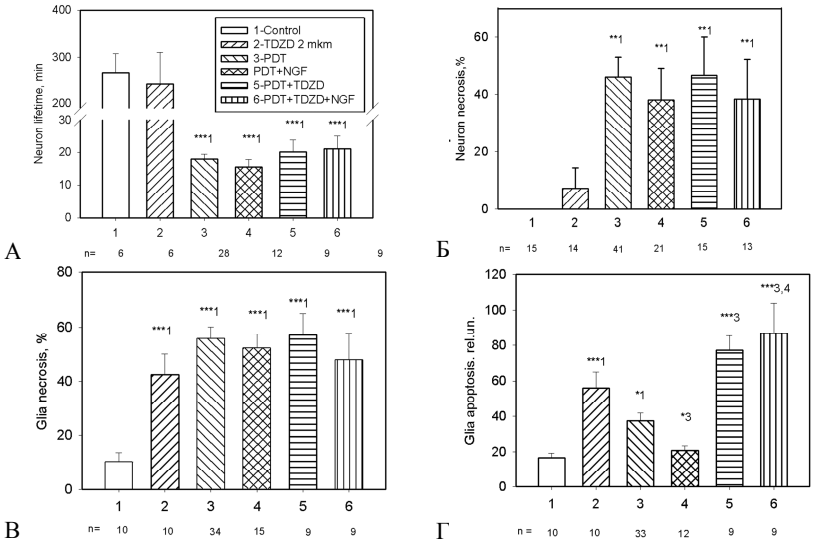


Рис.2. Влияние 2мкМ TDZD-8, ингибитора гликогенсинтетазы GSK-3β и 100нг/мл NGF на (А) продолжительность импульсной реакции нейронов (neuron lifetime), (Б) некроз нейронов, (В) некроз глиальных клеток и (Г) апоптоз глиальных клеток речного рака после изоляции и ФД воздействия (PDT). Цифры внизу графиков обозначают число опытов. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Таким образом, Akt и GSK-3β защищают глиальные клетки, но не нейроны от смерти, вызванной изоляцией рецептора растяжения, и участвуют в фотоповреждении этих клеток. Но при ФД повреждении эти ферменты играют другие роли (рис.3). Эксперименты свидетельствуют об участии Akt в ФД-индуцированном прекращении нейронной

активности и некрозе нейронов и глии, тогда как GSK-3β, как и в темноте, защищал глию от апоптоза.

Известно, что Akt активируется PI3K при связывании нейротрофинов с рецепторными тирозинкиназами и регулирует активность более 30 ферментных каскадов. Обычно она играет противоапоптозную роль, ингибируя проапоптозные пути, опосредуемые Bad/Bcl-X_L/Bax; forkhead/Bim/Bax; JNK; p53 и GSK-3β. В нервной ткани поддерживается низкий уровень Akt, но при повреждении, когда включаются механизмы выживания клеток, он резко возрастает [11]. ФД воздействие активирует Akt в разных клетках [12,13]. Однако, наши данные не показывают участия Akt в ФД-индуцированном апоптозе глиальных клеток. Более того, Akt способствовал ФД-индуцированному прекращению нейронной активности и некрозу нейронов и глии, причем в этих процессах не участвовала киназа GSK-3β (рис.3).

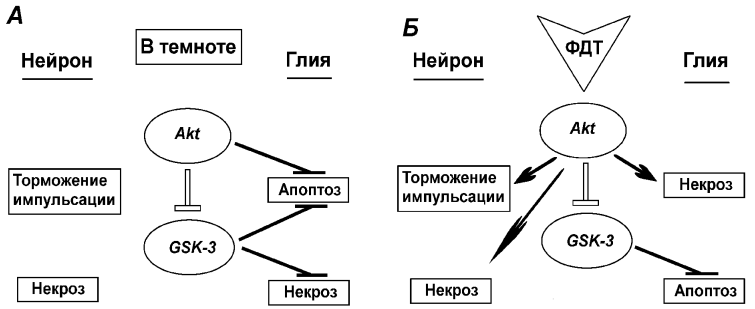


Рис.3. Схема участия Akt и GSK-3β в реакциях нейронов и глиальных клеток рака на изоляцию и инкубацию в темноте (А) и фотодинамическое воздействие (Б).

В мозгу киназа GSK-3β – изобильный и нейрон-специфический белок. Она играет узловую роль в координации многих внутриклеточных реакций, включая биоэнергетические процессы и апоптоз. При фосфорилировании протеинкиназой B/Akt GSK-3β инактивируется, и это блокирует апоптоз [13]. Наши опыты свидетельствуют о противоапоптозном действии GSK-3β на глиальные клетки, как в темноте, так и при ФД воздействии (рис.3). Этот эффект, видимо, не был опосредован Akt, которая обычно ингибирует GSK-3β, поскольку в наших опытах ингибирование Akt не влияло на апоптоз. Весьма интересны данные о возможном участии GSK-3β в NGF-опосредованной защите фотосенсибилизированных глиальных клеток от апоптоза. Сигнальные пути, как управляющие активностью GSK-3β, так и управляемые этим ферментом в глиальных клетках рака, еще предстоит выяснить.

Работа поддержана грантами РФФИ №09-04-01322 и Минобрнауки РФ (2.1.1/6185).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.* //Photodiagn. Photodyn. Ther. (2005) 2: 1-23;
2. *Uzdensky A.B.* //Curr. Sign. Transduct. Therapy. (2008) 3: 55-74;
3. *Uzdensky A. et al.* //Glia (2005) 49: 339-48;
4. *Uzdensky A. et al.* //J. Neurosci. Res. 2007 (85): 860-70;
5. *Узденский А.Б., Колосов М.С., Лобанов А.В.* //Морфология (2007) 132: 7-15;
6. *Barres B.A., Barde Y.A.* //Curr. Opin. Neurobiol. (2000) 10: 642-48;
7. *Verkhratsky A., Butt A.* //Glial. Neurobiol. Wiley (2007);
8. *Лобанов А.В., Узденский А.Б.* //Ж. Эвол. Биохим. Физиол. (2007) 43: 448-9.
9. *Петин Я.О., Бибов М.Ю. Узденский А.Б.* //Материалы конф. «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» Пущино (2007): 94-6;
10. *Uzdensky A.B. et al.* //Photochem. Photobiol. (2002) 76: 431-7;
11. *Chong Z.Z., Li F., Mai K.* //Progr. Neurobiol. (2005) 75: 207-46;
12. *Zhuang S., Kochevar I.E.* //Photochem. Photobiol. (2003) 78: 361-71;
13. *Bozkulak O. et al.* //Photochem. Photobiol. (2007) 83: 1029–33.

ВЛИЯНИЕ СОСТОЯНИЯ ГИПОТЕРМИИ У КРЫС НА ЛИПИДЫ ОРГАНЕЛЛ КЛЕТОК НЕОКОРТЕКСА

Маркевич Л.Н., Перепелкина Н.И., Быкова О.В., Игнатьев Д.А., Коломийцева И.К.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Липиды являются структурными компонентами клеточных мембран и участвуют в работе сигнальных систем клеток в качестве биоэффекторов [1]. Разнообразные стимулы, полученные клеткой, определяя особенности метаболизма, могут влиять на липидный состав мембран. В этих условиях липидный состав мембран определяется не только интенсивностью синтеза и распада липидов и свойствами макромолекулярных компонентов мембран, но и локализацией процессов внутриклеточной сигнализации [2]. Связь между кальциевыми волнами и изменениями липидного состава клеток и мембран вследствие распада фосфатидилинозитола под влиянием агонистов в клетках была одним из первых обнаружений, когда было показано в течение 15мин уменьшение

количества фосфатидилинозитола на 10% в гепатоцитах крысы после добавления 0,23мкМ вазопрессина. В такой же пропорции падал и инозитол-4,5-бифосфат. Уменьшение фосфатидилинозитола наблюдали в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов в этих же условиях (0,23мкМ вазопрессина, 1-15мин), на секреторных везикулах электростимулированных синаптосом, на микросомах стимулированной ацетилхолином панкреатической железы и в плазматической мембране ацетилхолин-стимулированной слюнной железы [3]. Механизмы воздействия низких температур окружающей среды на млекопитающих давно привлекают внимание исследователей. Связь между температурой перехода мембранных функций и низшей летальной температурой позволила предполагать, что температурные реакции липидов мембран являются лимитирующими для выживаемости организма при гипотермии [4,5]. Фазовые переходы и физические свойства липидов исключительно чувствительны к изменениям температуры. Температурное реструктурирование мембран обозначают как гомеофазная или гомеовязкостная адаптация [6]. Представляет несомненный интерес выяснение вопроса о том, вносят ли сигнальные липиды мембран вклад в температурную адаптацию клеток млекопитающих к воздействию низких температур. Мембраны и органеллы головного мозга незимоспящих млекопитающих представляются подходящим объектом для изучения участия сигнальных липидов в ответных реакциях организма на влияние низких температур. Реакция на снижение температуры тела до состояния холодового наркоза представляет собой стресс-реакцию, во многом отличаясь от естественной зимней спячки млекопитающих [5,7]. Для понимания роли липидов в процессах адаптации организма млекопитающего к действию низких температур представляется важным исследование липидного состава мембран функционально различных внутриклеточных органелл. Головной мозг является главным регулирующим органом гибернации млекопитающих [8]. Мы поставили задачу исследования влияния состояние холодового наркоза на липиды органелл нервных клеток коры головного мозга крыс-микросомальной фракции, цитозольной фракции (105000х супернатанта), ядер нейронов и глии.

Материалы и методы. Крыс линии Вистар, массой 190-230г вводили в состояние холодового наркоза в условиях гипоксии/гиперкапнии. Техника охлаждения в условиях гипоксии/гиперкапнии, слежения за состоянием животных, методы выделения микросомальной фракции и выделения, разделения и определения липидов и белка описаны нами ранее [9,10]. Ядра нейронов и глии выделяли по модифицированному методу Томпсона [11]. Для статистической обработки использовали Т-тест по Стьюденту.

Табл.1. Количество общих фосфолипидов и нейтральных липидов (мкг/мг белка) в ткани, во фракциях ядер глии и ядер нейронов неокортекса в норме и в условиях гипотермии/гипоксии/гиперкапнии крыс.

Липид, мкг/мг белка, воздействие	неокортекс, ткань	ядра глии	ядра нейронов
ОФЛ, контроль гипотермия	391,7±38,3 n=4 392,0±33,0 n=4	77,1±7,5 n=8 59,0±4,6 n=6	64,4±2,8 n=8 80,1±12,0 n=4
Холестерин, нормотермия гипотермия	90,8±8,3 n=8 74,3±14,7 n=5	21,4±2,9 n=7 32,0±3,4** n=5 p<0,05	14,5±2,8 n=7 27,8±8,3 n=5
МГ, нормотермия гипотермия	11,8±3,4 n=7 7,8±1,8 n=5	33,0±4,7 n=8 36,9±9,3 n=7	23,9±5,0 n=7 28,7±5,4 n=5
ДГ, нормотермия гипотермия	5,6±0,6 n=7 7,1±0,5 n=4	36,6±6,0 n=8 30,0±4,8 n=5	21,4±5,3# n=7 24,1±7,3 n=6
Жирные кислоты, нормотермия гипотермия	22,6±2,4 n=7 18,3±1,3 n=5	105,1±19,2 n=6 69,6±16,0 n=6	82,9±21,0 n=8 94,4±21,3 n=5
Белок, мг/г ткани нормотермия гипотермия	85,7±4,6 n=9 73,3±4,8 n=6	0,74±0,15 n=8 0,77±0,12 n=6	0,90±0,12 n=8 0,95±0,14 n=6

*-различие по отношению к нормотермии при P<0,1; #-различие по отношению к ядрам глии при P<0,1; **-различие по отношению к нормотермии при P<0,05.

Табл.2. Фосфолипидный состав ядер глии и ядер нейронов неокортекса, в % от общих фосфолипидов.

Липид, условия	Ядра глии	Ядра нейронов
Фосфатидилхолин, нормотермия гипотермия	44,1±0,6 n=4 44,4±12,6	46,3±2,4 n=6 36,8±3,7* P<0,1
Фосфатидилэтаноламин нормотермия гипотермия	21,8±7,3 22,2±5,7	24,7±3,0 15,5±1,9**P<0,05
Фосфатидилсерин, нормотермия гипотермия	6,2±1,3 8,6±1,6	4,7±1,3 5,0±1,0
Фосфатидилинозитол нормотермия гипотермия	12,0±2,3 11,6±1,2	12,0±1,1 8,9±0,9
Сфингомиелин, нормотермия гипотермия	5,6±0,7 9,4±0,7**P<0,05	6,3±0,4 5,1±1,2
Кардиолипин, нормотермия гипотермия	4,0±1,5 7,1±2,0	4,4±1,0 2,2±0,8

*-различие по отношению к нормотермии при P<0,1; **-различие по отношению к нормотермии при P<0,05.

Результаты исследований. Изменение температуры тела от нормотермии (t^o тела 37-38^{o}C) до состояния гипотермии (t^o тела 15-20^o C) вызывает изменения липидного состава органелл. В ядрах глии возрастает количество холестерина (табл.1) и сфингомиелина, в ядрах нейронов падает доля фосфатидилэтаноламина и проявляется тенденция к падению доли фосфатидилхолина (табл.2). Величина молярного отношения ХОЛ/ФЛ увеличивается в ядрах глии и проявляет тенденцию к увеличению в ядрах нейронов, не изменяясь во всех остальных фракциях (рис.1). В ткани и микросомальной фракции неокортекса гипотермия вызывает уменьшение количества фосфатидилинозитола (рис.2).

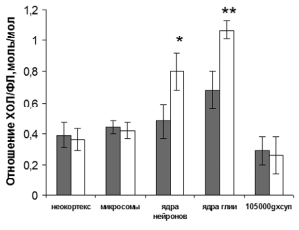


Рис.1. Влияние гипотермии на молярное отношение ХОЛ/ФЛ в неокортексе, фракциях микросом, ядер нейронов, ядер глии и цитозоля (105000хсупернатант).

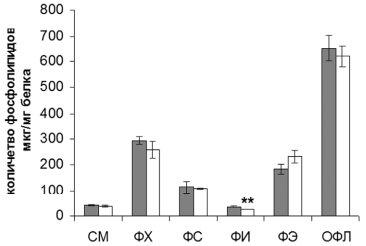


Рис.2. Влияние гипотермии на количество фосфолипидов в микросомах неокортекса крыс.

Обсуждение результатов. Несмотря на интерес исследований роли липидов ядер в клеточной сигнализации [12,13], незначительное число работ посвящено влиянию различных факторов на липиды ядер органов и тканей млекопитающих [14]. Как следует из табл.1, ядра нейронов и глии обеднены фосфолипидами и холестерином и обогащены промежуточными продуктами метаболизма глицеридов и других липидов - жирными кислотами, моно и диглицеридами. Такие же величины для фосфолипидов, холестерина и жирных кислот ядер нейронов и глии получены в других работах [15]. Представляет интерес обогащение ядер моно- и диглицеридами, особенно по отношению к микросомальной фракции [10], поскольку принято считать наружную ядерную мембрану продолжением эндоплазматического ретикулума. В мозгу крыс моноглицериды представлены примерно на 50% 2-арахидоноилглицеридом, эндогенным канабиоидом, важным метаболитом в синтезе и деградации фосфолипидов, участником сфингомиелинового и инозитол-3-фосфатного сигнальных циклов и источником арахидоновой кислоты [16]. Ядра обогащены и

диглицеридами, которые также являются липидными метаболитами и играют важнейшую роль в клеточной сигнализации [17]. Гипотермия вызывает рост количества холестерина в ядрах глии (табл.1), в ядрах нейронов наблюдается тенденция к увеличению отношения ХОЛ/ФЛ, М/М (рис.1). Холестерин не только влияет на структуру мембран и активность важнейших ферментов, но и является сигнальной молекулой, участвующей в процессах памяти и дегенерации нервных клеток [18]. Рост величины отношения ХОЛ/ФЛ в мембранах обнаруживали при активации специфических функций органелл, например, при активации синтеза белков в микросомах сусликов при выходе из спячки [19] или в микросомах печени крыс также при активации синтеза белка после воздействии ионизирующей радиации [20]. Рост количества холестерина в ядрах клеток глии и рост отношения ХОЛ/ФЛ в ядрах нейронов после воздействия гипотермии на крыс может быть связан с активацией клеток. Ядра глии, выделенные по Томпсону, представляют собой в основном ядра олигодендроглии и микроглии [11]. Микроглия считается источником пулов макрофагов в мозге. Она отвечает на повреждение или хроническое заболевание активацией пролиферации и продукцией цитокинов провоспалительного действия; чувствительна к действию гормонов [21]. Гипотермия у крыс сопровождается выбросом катехоламинов, глюкокортикоидов и ацетилхолина [5]. Увеличение количества холестерина в ядрах глии, возможно, является ответом на изменение гормонального фона при гипотермии. Холестерин регулирует метаболизм холинсодержащих фосфолипидов и сфингомиелина [22]. Подавление активности сфингомиелиназы, рост количества сфингомиелина и уменьшение продукции церамидов защищает нейрональные клетки от апоптоза [23], а накопление сфингомиелина в ядрах связывают с активацией деления клеток [24]. Гипотермия вызывает рост количества сфингомиелина в ядрах глии и уменьшение фосфатидилэтаноламина в ядрах нейронов (табл.2). Рост количества холестерина и сфингомиелина в ядрах свидетельствует, на наш взгляд, об активации глиальных клеток под влиянием гипотермии. Уменьшение количества фосфатидилинозитола в микросомах неокортекса (рис.2) указывает на участие инозитол-3-фосфатного цикла в ответных реакциях мембран эндоплазматического ретикулума на гипотермию, и, возможно, обуславливает накопление белков и липидов микросом в неокортексе через 48ч после воздействия гипотермии [10]. Результаты свидетельствуют об эффективности исследования липидного состава органелл для характеристики локализации сигнальных систем в клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №09-05-00993-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дятловицкая Э.В., Безуглов В.В.* //Биохимия (1998) 63(1): 3-5;
2. *Berridge M.J., Cobbold P.H., Cuthbertson K.S.R.* //Phil. Trans. R. Soc. Lond. (1988) B320: 325-43;
3. *Michell R.H. et al.* //Phil.Trans. R. Soc. Lond. (1981) B296: 123-37;
4. *Aloia R.C., Raison I.K.* //Biochim. Biophys. Acta (1989) 988: 123-46;
5. *Тимофеев Н.Н., Прокопьева Л.П.* //Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма. М. (1997) 208с.;
6. *Hazel J.R.* //Annu. Rev. Physiol. (1995) 57: 19-24;
7. *Lyman C.P. et al.* //Hibernation and Torpor in Mammals and Birds N-Y (1987) 317p.;
8. *Drew K.L. et al.* //J. Neurochem. (2007) 102: 1713-26;
9. *Игнатьев Д.А. и др.* //Радиац. биол. Радиоэкол. (2006) 46(6): 705-12;
10. *Перепелкина Н.И. и др.* //Радиац. биол. Радиоэкол. (2008) 48(1): 76-81;
11. *Baker R.R., Chang H.Y.* //Can. J. Biochem. (1980) 58: 620-8;
12. *Divecha N., Irvine R.F.* //Cell (1995) 80: 269-78;
13. *D'Santos. C.S., Clarke J.H., Divecha N.* //Biochem. Biophys. Acta (1998) 1436: 201-32;
14. *Kolomiytseva I.K. et al.* //Bioelectrochemistry (2002) 58(1): 31-9;
15. *Кулагина Т.П., Шевченко Н.А., Архипов В.И.* //Биохимия (2004) 69(10): 1404-09;
16. *Sugiura T. et al.* //Bioch. Biophys. Res. Comm. (1995) 215(1): 89-97;
17. *Carraso S., Merida I.* //Trend. Biochem. Sci. (2006) 32(1): 27-36;
18. *Nelson T.J., Alkon D.L.* //Biochem. Soc. Trans. (2005) 33(5): 1033-6;
19. *Kolomiytseva I.K. et al.* //Comp. Biochem. Physiol. B. (2008) 151: 386-91;
20. *Коломийцева И.К.* //Радиац. Биохим. Мембран. Липидов (1989) 189;
21. *Ganter S. et al.* //J. Neurosci. Res. (1992) 33: 218-30;
22. *Leppimaki P., Kronqvist R., Slotte J.P.* //Biochem. J. (1998) 335: 285-91;
23. *Soeda S. et al.* //Neurochem. Int. (2004) 45(5): 619-26;
24. *Алесенко А.В. и др.* //Биохимия (1989) 54(2): 328-37.

РОЛЬ ТАЙТИНА И БЕЛКОВ ЕГО СЕМЕЙСТВА В ОБРАЗОВАНИИ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ

Марсагишвили Л.Г.[1], Бобылёв А.Г.[1], Шпагина М.Д.[1], Подлубная З.А.[1,2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Пущинский государственный университет

Тайтин, гигантский эластичный саркомерный белок скелетных и сердечных мышц позвоночных [1]. Молекулы тайтина формируют

третью филаментную систему в миофибриллах. Тайтин и белки его семейства (Х-, С-, Н-белки) являются важными многофункциональными компонентами сократительного аппарата мышечной клетки, участвуя в построении, стабилизации структуры саркомера и в его функционировании. Влияние белков семейства тайтина на АТФазу актомиозина указывает на их важную регуляторную функцию в норме. Данные о локализации тайтина в саркомере и его свойствах позволяют сделать предположение и об участии этого белка в процессах сигнализации в мышцах [2,3]. Результаты, полученные при исследовании свойств полифункциональных белков семейства тайтина в норме, при адаптации и заболеваниях дают основание предполагать, что изменения их структурно-функциональных характеристик может вносить вклад в развитие патологических процессов в мышцах [4-7]. Выяснение роли тайтина, Х-белка, С-белка и Н-белка в патогенезе разных болезней является чрезвычайно актуальной задачей. В данной работе объектом нашего внимания были амилоидозы и, в частности, роль белков семейства тайтина в амилоидогенезе *in vitro*. Неограниченно растущие в разных органах и тканях амилоидные отложения играют центральную роль в патогенезе болезней, от которых страдают миллионы пациентов (болезнь Альцгеймера, Паркинсона, второй тип диабета, синдром Дауна, системные амилоидозы, прионные амилоидозы и др.). Уже сейчас эти болезни – главная причина смерти после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Процессы, лежащие в основе аномальной агрегации белка в амилоиды и ее патологического проявления при болезнях, изучены еще недостаточно. Известно более 20 белков, образующих амилоидные фибриллы и участвующих в патогенезе амилоидозов [8]. Несмотря на различие в белках-предшественниках амилоидов, образуемые ими амилоидные фибриллы имеют общие свойства: бета-складчатую структуру с отдельными бета-слоями, ориентированными параллельно главной оси фибриллы; нерастворимость *in vivo*; специфическое связывание с красителями Конго красным и тиофлавином Т [9,10]. Важно отметить, что большинство белков-предшественников амилоидов претерпевают трансформацию типа «α-спираль – β-складчатость», необходимую для образования амилоидных фибрилл. Ранее нами было показано, что цитоскелетные мышечные белки семейства тайтина (тайтин, Х-, С-, Н-белки) способны легко образовывать амилоидные фибриллы, поскольку изначально содержат ~90% β-складчатой структуры, необходимой для формирования амилоидов [11]. При электронно-микроскопическом сравнении амилоидных фибрилл Х-белка и Аβ-пептидов мозга было обнаружено их структурное сходство. Это позволило высказать предположение о возможности сходных подходов к разрушению их амилоидов. Методом электронной микроскопии мы показали антиамилоидное действие

тетрациклина и актиномицина на амилоиды Х-белка, сходное с действием этого антибиотика на амилоиды Аβ-пептидов мозга, тау белка, хантингтина и прионного белка. [12,13]. Антиамилоидное действие также показано нами для гидратированного фуллерена C_{60} и натриевой соли поликарбоксильного производного фуллерена $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ [14]. Эти вещества не только разрушали зрелые амилоидные фибриллы, но и предотвращали образование новых фибрилл. Такое двойное действие применяемых препаратов важно в терапии амилоидозов. Известно, что амилоиды разных белков и пептидов являются цитотоксичными, индуцируя гибель клеток. В экспериментах по исследованию цитотоксичности амилоидов нами была продемонстрировано снижение выживаемости полиморфноядерных лейкоцитов в присутствии амилоидных фибрилл Х-белка, а также ее увеличение при разрушении фибрилл тетрациклином. Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что регистрация амилоидной цитотоксичности *in vitro* в отсутствие и в присутствии препаратов, разрушающих амилоидные фибриллы, может быть многообещающим подходом к поиску наиболее эффективных веществ для предотвращения и лечения мышечных амилоидозов и тем самым к восстановлению нормальной функции таких многофункциональных белков, как белки семейства тайтина.

Работа поддержана грантом Президента РФ «Ведущие научные школы», Программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и РФФИ №09-04-01161-а, РФФИ-офи №07-04-12228.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Labeit S., Kolmerer B.* //Science (1995) 270: 293-6;
2. *Подлубная З.А.* //Материалы конф.: «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» Пущино (2005): 155-8;
3. *Lange S. et al.* //Science 308: 1599-603;
4. *Лукоянова Н.А. и др.* //Биофизика (1996) 41: 116-22;
5. *Вихлянцев И.М. и др.* //Биофизика (2002) 47(4): 701-5;
6. *Вихлянцев И.М. и др.* //ДАН (2006) 407(5): 692-4;
7. *Макаренко И.В. и др.* //Биофизика (2002) 47(4): 706-10;
8. *Uversky V.N., Fink A.L.* //Biochim. Biophys. Acta (2004) 1698: 131-53;
9. *Klunk W.E. et al.* //J. Histochem. Cytochem. (1989) 37: 1273-81;
10. *Krebs M.R. et al.* //J. Structural Biol. (2005) 149: 30-7;
11. *Марсагишвили Л.Г. и др.* //Биофизика (2005) 50: 803-9;
12. *Forloni G. et. al.* //FEBS Lett. (2001) 487: 404-7;
13. *Марсагишвили Л.Г. и др.* //Биофизика (2006) 51(5): 799-803;
14. *Марсагишвили Л.Г. и др.* //Биофизика (2008) 54(2): 202-5.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ГИППОКАМПА В НЕЙРОГЛИАЛЬНОЙ СЕТИ, РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ *IN VITRO*: КАЛЬЦИЕВЫЙ ИМИДЖИНГ И СПОНТАННАЯ АКТИВНОСТЬ В КУЛЬТУРЕ НА МУЛЬТИЭЛЕКТРОДНОЙ МАТРИЦЕ

Мухина И.В.[1,3], Хаспеков Л.Г.[2], Казанцев В.Б.[1,3], Ведунова М.В.[1], Митрошина Е.В.[1], Бобров М.Ю.[2,4], Фрумкина Л.Е.[2], Захаров Ю.Н.[5], Коротченко С.А.[1], Корягина Е.А.[1]

[1]ГОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ, Нижний Новгород
[2]ГУ Научный центр неврологии РАМН, Москва
[3]Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород
[4]Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва
[5]ГОУ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

Успешным экспериментальным исследованиям механизмов, лежащих в основе процессов формирования функциональных свойств и пластичности центральных нейронов, в последние десятилетия способствовало использование конфокальной лазерной микроскопии для регистрации ионных токов в нейронах и глиальных клетках *in vitro*, в сочетании с неинвазивными мультиэлектродными методами отведения биоэлектрической активности и электростимуляции культивируемых нейронов [5,4,7]. В данной работе динамику спонтанных кальциевых осцилляций, отражающих состояние кальциевого гомеостаза клеток, формирующих *in vitro* нейроглиальную сеть, исследовали с применением конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM510 NLO Duoscan. Клетки гиппокампа мышиных эмбрионов, культивируемые на покровном стекле, покрытом опорным субстратом (полиэтиленимином), помещали в пластиковую чашку, заполненную термостатируемой инкубационной средой и расположенную на предметном столике конфокального микроскопа. В качестве флуоресцентных зондов использовали специфический кальциевый краситель Oregon Green 488 BAPTA-1 и Ca^{2+}-нечувствительный краситель Sulforhodamine 101, селективно маркирующий глиальные клетки [8]. Относительный уровень внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в нейронах и глии оценивали по относительной интенсивности флюоресценции Oregon Green 488 BAPTA-1 ($\Delta F/F$). В ходе эксперимента регистрировали спонтанные изменения характера осцилляций, а также влияние на них возбуждающего нейромедиатора глутамата и ретроградного регулятора синаптической передачи – синтетического аналога эндоканнабиноидов *N*-арахидоноилдопамина (ААДА) [1,2].

Для моделирования различных стадий функционального развития *in vitro* нейронных цепей использовали мультиэлектродную систему MED64 (Alpha MED Sciences, Japan), важными преимуществами применения которой в электрофизиологических экспериментах являются возможность одновременной неинвазивной внеклеточной регистрации сигналов от нескольких нейронов, длительный хронический эксперимент на одной и той же культуре и ряд других [3,6]. В состав системы входят зонд MED-P5155, усилитель и коннектор. Стеклянное основание зонда содержит цилиндрическую камеру, в центре которой на площади 1мм^2 расположена 64-электродная матрица для регистрации спонтанной активности и электрической стимуляции нейронов. Размер электродов – 50х50мкМ, межэлектродное расстояние – 150мкМ. На покрытое полиэтиленимином основание цилиндрической камеры, заполненной инкубационной средой, наносили суспензию клеток гиппокампа, формировавших в процессе культивирования нейроглиальную сеть (рис.1).

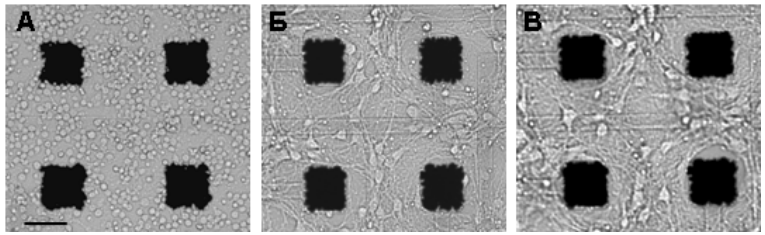


Рис.1. Клетки гиппокампа в культуре на мультиэлектродной матрице MED64. А – 2 часа, Б – 4 дня, В - 10 дней *in vitro*. Черные квадраты – электроды. Живая культура, фазовый контраст. Масштаб 50мкм.

Спонтанные кальциевые осцилляции (СКО), свидетельствующие о функциональном состоянии нейроглиальной сети культивируемых клеток, можно было зарегистрировать, начиная с 9-го дня *in vitro* (DIV) (рис.2А). Осцилляции, генерируемые нейронами (рис.2А1,Б1), следовали с частотой 0,5-1мин$^{-1}$, $\Delta F/F$ для нейронов составляла 17%. У глиальных клеток $\Delta F/F$ составляла 7-10%, а СКО следовали с частотой 3-5мин$^{-1}$ (рис.2А2, Б2). Синхронизация между СКО у нервных и глиальных клеток отсутствовала (рис.2А).

В присутствии ААДА (2мкМ/мл) происходила синхронизация СКО (рис.2Б), регистрируемых в нервных и глиальных клетках, а также возрастало количество астроцитов, проявляющих активность, т.е. генерирующих СКО (рис.3).

Эксайтотоксическое действие глутамата (100мкМ) приводило к исчезновению осцилляций и возрастанию базального уровня $[Ca^{2+}]_i$ в

нейронах в среднем на 30%. Последующее добавление ААДА снижало базальный уровень флуоресценции на 13% относительно предыдущего повышения при введении глутамата в среду. Таким образом, ретроградная регуляция этим каннабиноидом возбуждающей синаптической передачи нормализовала изменения внутриклеточного кальциевого гомеостаза, индуцированные глутаматом.

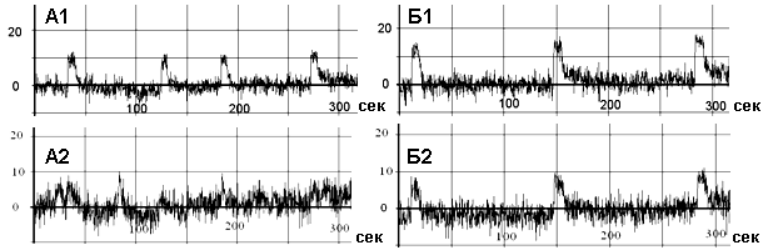


Рис.2. Спонтанные кальциевые осцилляции в культуре клеток гиппокампа. 10DIV. Пояснения в тексте.

При исследовании клеток, культивируемых на микроэлектродной матрице, с 3-5-го DIV регистрировалась спонтанная активность (СА) нейронов в виде единичных спайков (внеклеточных потенциалов) длительностью 1-1,5мс и амплитудой 24,5±2,4мкВ (рис.4), что указывало на начало формирования в нейронной цепи функциональных синаптических связей и, таким образом, позволило впервые показать возможность регистрации СА на самых ранних этапах развития нейронов *in vitro*.

Кроме того, выявлены особенности СА в зависимости от плотности нейронной сети. При плотности более 1500кл/мм^2 СА в виде одиночных спайков возникала на 3-5-й DIV, а при 700-1200кл/мм^2 – на 5-7-й день DIV, тогда как при 200кл/мм^2 СА на 5-й DIV еще отсутствовала.

Плотностью клеток в культуре определялось и время появления паттернов пачечной активности (рис.5), наблюдавшейся с 7-10-го DIV, что обусловлено, по-видимому, дальнейшим развитием синаптических контактов. Интервал между пачками импульсов составлял 2-4 с, а частота спайков в пачке варьировала от 45 до 75 с$^{-1}$.

Параллельная электронная и конфокальная лазерная микроскопия выявили в процессе культивирования нарастающую динамику формирования *de novo* дендритных шипиков и зрелых синаптических межнейронных связей.

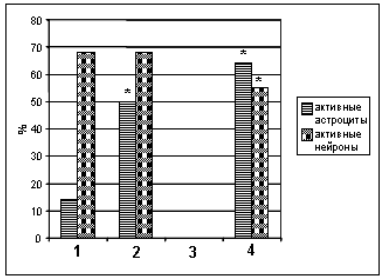


Рис.3. Количество нейронов и астроцитов, генерирующих Ca^{2+}-осцилляции, в % от общего количества нейронов и астроцитов при различных воздействиях на культуру клеток гиппокампа. 1-нативная культура; 2-воздействие ААДА; 3-воздействие глутамата; 4-совместное воздействие ААДА и глутамата. *p<0,05–достоверность различий по сравнению с показателями, полученными без применения глутамата и ААДА.

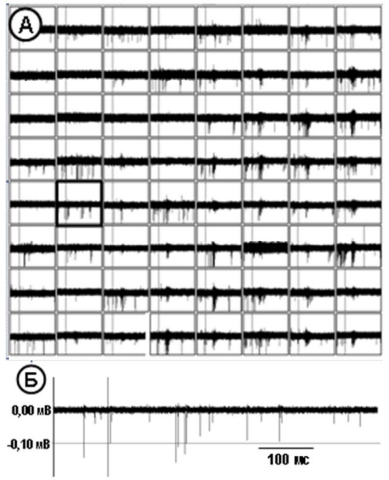


Рис.4. Спонтанная одиночная активность нейронов, регистрируемая одновременно со всех 64-х микроэлектродов в культуре клеток гиппокампа на матрице МЕД64. 5DIV.

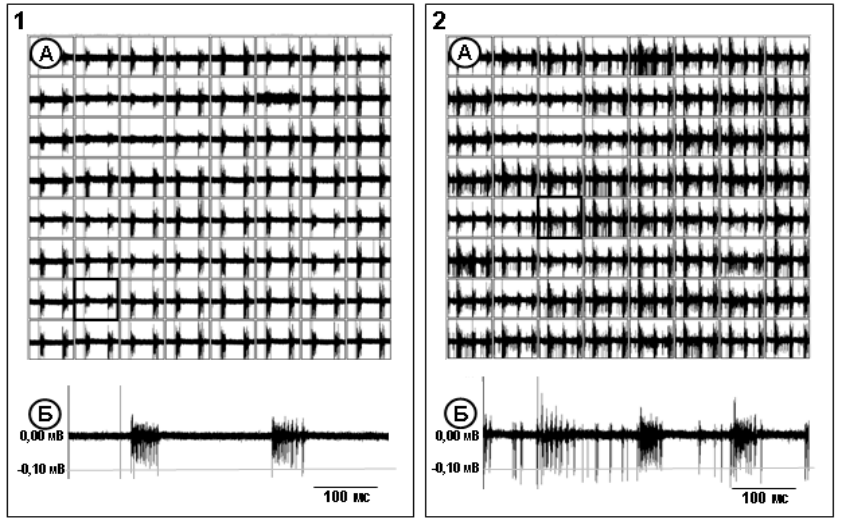


Рис.5. Паттерны пачечной активности нейронов, регистрируемой в культуре клеток гиппокампа на матрице MED64 на 9-й (1) и 14-й (2) день *in vitro*. А-одновременная регистрация со всех 64-х электродов; Б-регистрация с одного электрода (обозначен черной рамкой на А).

Появление СА только при сравнительно высокой плотности клеток *in vitro* свидетельствует о пороговом характере ее генерации. Известно, что дифференцировка клеток в процессе культивирования сопровождается эволюционными изменениями их морфологии и формированием межклеточных взаимодействий (синаптических связей между нейронами, нейроглиальных связей). Поэтому чем выше плотность нейронов, тем больше вероятность установления локальных синаптических связей с ближайшими соседними нейронами на ранних стадиях развития. Высокая плотность клеток способствует развитию более тесной структуры связей на каждую клетку, и, как, следствие, ведет к возможности ранней генерации спонтанной пачечной активности, возникающей, например, за счет интеграции локальных возбуждений, приходящих по большому числу активных входов. Другими словами, функциональная активность культуры, регистрируемая как на внеклеточных электродах MED64, так и с помощью конфокальной микроскопии (кальциевые осцилляции), в сопоставлении с данными ультраструктурного и морфологического имиджингового исследований, является фактически индикатором формирования в процессе культивирования активной нейроглиальной сети. Далее, как мы ожидаем, под действием повторяющихся стимулов (например, с определенных стимулирующих электродов MED64) сеть будет способна эволюционировать как морфологически, так и в плане нейропластических изменений в направлении формирования простейших функциональных систем, «целью» которых будет адаптация к заданным модельным условиям стимуляции.

Работа поддержана грантами РФФИ (08-02-00724, 08-04-97109, 08-04-12213), Программами Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и Министерством образования и науки РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Beierlein M. Regehr W.G.* //J. Neurosci. (2006) 26: 9935-43;
2. *Bobrov M.Yu. et al.* //Neurosci. Lett. (2008) 431: 6-11;
3. *Chen C. et al.* //Biosystems (2006) 85: 137-43;
4. *Chiappalone M., Massobrio P., Martinoia S.* //Eur. J. Neurosci. (2008) 28: 221-37;
5. *Chien C.B, Pine J.* //Biophys. J. (1991) 60: 697-711;
6. *Cohen E. et al.* //Brain Res. (2008) 1235: 21-30;
7. *Madhavan R., Chao Z., Potter S.* //Phys. Biol. (2007) 4: 181-93;
8. *Nimmerjahn A. et al.* //Nat. Methods (2004) 1: 31-37.

АКТИВАЦИЯ α_2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ L-АРГИНИНОМ В КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫС SD И SHR.

Ненов М.Н.[1], Бережнов А.В.[2], Федотова Е.И.[2,3], Грушин К.С.[1], Пименов О.Ю.[1], Семушина С.Г.[4], Пахомова И.А.[4], Мурашев А.Н.[4], Дынник В.В.[1], Зинченко В.П.[2], Кокоз Ю.М.[1]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[3]Пущинский государственный университет
[4]Филиал института биоорганической химии РАН, Пущино

Введение. L-Аргинин широко используется для профилактики и лечения широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Большинство эффектов L-аргинина связано с модулированием активности NOS и NO-cGMP каскада. Высокие дозы L-аргинина (до 5мМ) стимулируют NOS-зависимую продукцию NO, несмотря на высокое сродство NOS к L-аргинину (2мкМ) и большую концентрацию последнего в клетках от 0,8 до 2мМ [2]. В литературе этот феномен известен как «аргининовый парадокс». Существует несколько гипотез, объясняющих «аргининовый парадокс»: высокий уровень конкурентного ингибитора NOS asymmetric dimetyle arginine, [3], компартментализация внутриклеточного L-аргинина и его недоступность для NOS [4], сопряженность транспортера L-аргинина CAT-1 и eNOS [5], взаимодействие L-аргинина с α_2-адренорецепторами [6].

Ранее нами, было показано, что присутствие L-аргинина (1мМ) при выделении, хранении клеток и проведении экспериментов стабилизирует действие активаторов NO-cGMP каскада на амплитуду Ca^{2+} тока L-типа в изолированных кардиомиоцитах [7]. Фактически, эти эксперименты, указывали на проявление «аргининового парадокса» в кардиомиоцитах. В настоящей работе с помощью методов флуоресцентной микроскопии и perforated patch clamp показано, что при дополнительном введении L-аргинина, наряду с подавлением Ca^{2+} тока L-типа в кардиомиоцитах SD, наблюдается увеличение скорости синтеза NO, а также приводятся доказательства участия α_2-адренорецепторов и PI3K-Akt сигнального пути в реакции кардиомиоцитов на дополнительное введение L-аргинина.

Результаты

Действие L-аргинина на продукцию оксида азота и потенциал-зависимые Ca^{2+} токи в кардиомиоцитах SD и SHR. Добавление 5мМ L-аргинина в среду инкубации на фоне электрической стимуляции кардиомиоцитов SD вызывает, после непродолжительной лаг-фазы, увеличение скорости продукции оксида азота (n=3). В кардиомиоцитах

SHR добавление 5мМ L-аргинина в тех же условиях, не оказывало влияния на скорость роста NO (n=3) (рис.1).

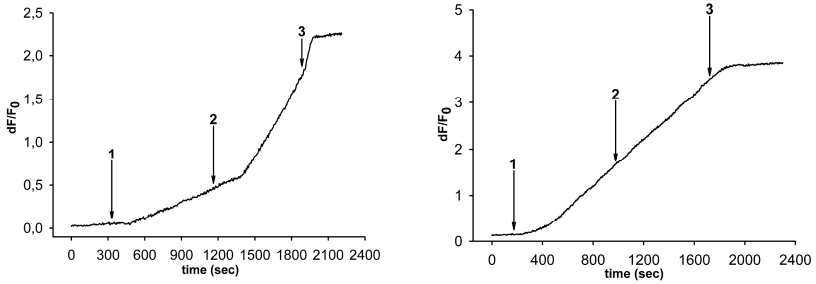


Рис.1. Флуоресценция DAF-FM. Влияние добавки 5мМ L-аргинина на продукцию NO в кардиомиоцитах SD (слева) и SHR (справа) при электрической стимуляции клеток с частотой 0.1Гц. 1–начало электрической стимуляции; 2–5мМ L-аргинина; 3–10мкМ 7NI.

В кардиомиоцитах SD добавка 5мМ L-аргинина вызывала подавление Ca^{2+} тока L-типа на 30±5% (n=8). В присутствии 10мкМ иохимбина – селективного антагониста α_2-адренорецепторов, добавка 5мМ L-аргинина вызывала много меньший эффект: амплитуда Ca^{2+} тока уменьшалась лишь на 11±2% (n=6). Известно, что агонисты α_2-адренорецепторов способны активировать eNOS, через каскад, сопряженный с активацией PI3 киназы [8]. Вортманин – ингибитор PI3 киназы, также в значительной степени снимал эффекты L-аргинина. На фоне 100нМ вортманина L-аргинин уменьшал амплитуду Ca^{2+} тока на 10±2% (n=5). На фоне 2мкМ ингибитора NOS 7NI эффект L-аргинина уменьшался до 4±5% (n=5), а на фоне 1мкМ – ингибитора cGMP-зависимой протеинкиназы KT5823 до 7±2% (n=6), указывая на то, что подавление Ca^{2+} тока L-аргинином происходит в результате cGMP-зависимого фосфорилирования. В кардиомиоцитах SHR, в отличие от кардиоцитов SD, добавка 5мМ L-аргинина не оказывала заметного действия на Ca^{2+} ток (3±2%, n=5) (рис.2).

Действие активатора α_2-адренорецепторов гуанабенза на амплитуду Ca^{2+} тока L-типа и скорость продукции NO в кардиомиоцитах SD и SHR. Выше было показано, что в кардиомиоцитах SHR, в отличие от SD, L-аргинин не оказывал эффекта на скорость продукции NO и амплитуду Ca^{2+} тока L-типа. Отсутствие эффекта L-аргинина может быть связано со снижением реактивности α_2-адренорецепторов. Для подтверждения этой гипотезы, мы исследовали действие гуанабенза на амплитуду Ca^{2+} тока L-типа в кардиомиоцитах SD и SHR.

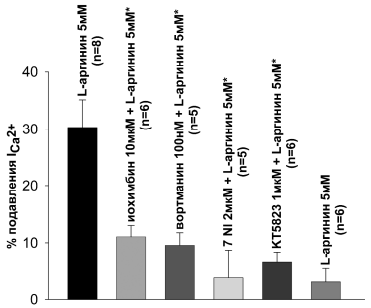


Рис.2. Действие L-аргинина на амплитуду Ca^{2+} тока L-типа в контроле и в присутствии соединений, регулирующих активность NO-cGMP и PI3K-Akt сигнальных путей. Слева направо: действие 5мМ L-аргинина в кардиомиоцитах SD; действие 5мМ L-аргинина на фоне: 10мкМ иохимбина; 100нМ вортмания; 2мкм 7NI; 1мкМ KT5823; действие 5мМ L-аргинина в кардиомиоцитах SHR. *P<0,05.

Селективный агонист α_2-адренорецепторов гуанабенз (10мкМ) подавлял амплитуду Ca^{2+} тока L-типа в кардиомиоцитах крыс SD на 29±4% (n=5). Как и в случае L-аргинина эффект гуанабенза значительно снижался в присутствии 300нМ вортманина до 8±3% (n=5), 10мкМ 7NI до 16±1% (n=6) и 1мкМ KT5823до 18±1% (n=5) (рис.3).

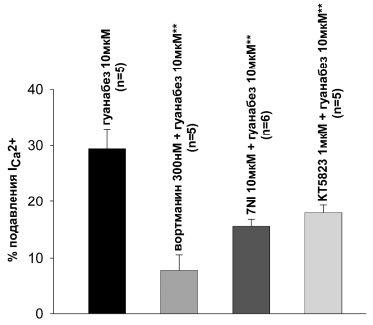


Рис.3. Действие гуанабенза на амплитуду Ca^{2+} тока L-типа в контроле и в присутствии соединений, регулирующих активность NO-cGMP и PI3K-Akt сигнальных путей в кардиомиоцитах SD. Слева направо: действие 10мкМ гуанабенза; действие гуанабенза на фоне: 300нМ вортманина; 10мкМ 7NI; 1мкМ KT5823. **P<0,05.

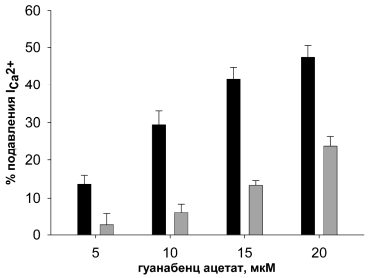


Рис.4. Гистограмма дозозависимого эффекта гуанабенза на амплитуду Ca^{2+} тока L-типа в кардиомиоцитах SD и SHR. Черные бары – действие гуанабенза на амплитуду Ca^{2+} тока L-типа в кардиомиоцитах SD. Серые бары – действие гуанабенза на амплитуду Ca^{2+} тока L-типа в кардиомиоцитах SHR.

Гуанабенз подавлял амплитуду Ca^{2+} тока L-типа как в кардиомиоцитах SD, так и SHR. Однако, наблюдаемый эффект при одних и тех же концентрациях агониста был значительно ниже в кардиомиоцитах SHR, чем в кардиомиоцитах SD (рис.4).

Добавление 20мкМ гуанабенза на фоне электрической стимуляции 0.1Гц в кардиомиоцитах SD вызывало увеличение скорости продукции NO, в то время как в кардиомиоцитах SHR заметного действия гуанабенза не наблюдалось (рис.5). Смещение кривой доза-эффект крыс линии SHR по отношению к SD, а также отсутствие эффекта гуанабенза на скорость продукции NO свидетельствуют о том, что реактивность α_2-адренорецепторов в кардиомиоцитах SHR понижена, по сравнению с реактивностью α_2-адренорецепторов у крыс SD.

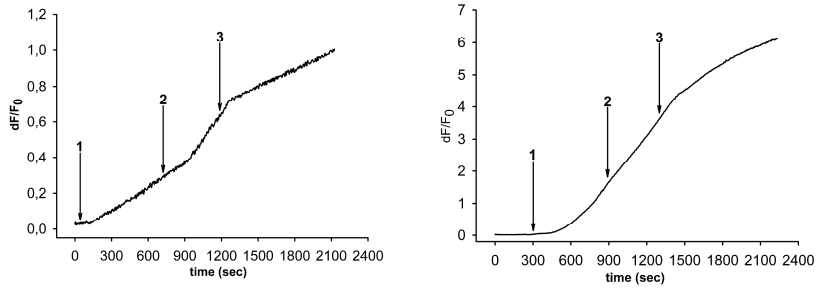


Рис.5. Флуоресценция DAF-FM. Влияние добавки гуанабенза на продукцию NO в кардиомиоцитах SD (слева) и SHR (справа) при электрической стимуляции клеток с частотой 0.1Гц. 1 – начало электрической стимуляции; 2 – гуанабенз 20мкМ; 3 – 10мкМ 7NI.

Обсуждение. Для исследования возможного влияния L-аргинина на α_2-адренорецепторы, мы использовали селективные агонист и антагонист этих рецепторов гуанабенз и иохимбин, а для доказательства активации PI3K-Akt сигнального пути вортманин – ингибитор PI3 киназы. Из приведенных результатов видно, что в кардиомиоцитах крыс SD «аргининовый парадокс» связан с активацией NOS через взаимодействие L-аргинина с α_2-адренорецепторами. Действительно, гуанабенз, также как и L-аргинин, вызывал увеличение продукции NO и подавлял амплитуду Ca^{2+} токов L-типа. В свою очередь, подавление L-аргинином амплитуды Ca^{2+} токов резко уменьшалось в присутствии иохимбина. В присутствии вортманина и гуанабенз и L-аргинин также подавляли амплитуду Ca^{2+} тока в значительно меньшей степени. Действие гуанабенз и L-аргинина на скорость продукции NO и амплитуду Ca^{2+} токов L-типа было значительно ниже в присутствии 7NI. Кроме того, эффект гуанабенз и L-аргинина на амплитуду Ca^{2+} токов снижался в присутствии ингибитора cGMP-зависимой протеинкиназы KT5823. Из полученных данных видно, что активация α_2-адренорецепторов играет существенную роль в реализации «аргининового парадокса» в кардиомиоцитах. L-аргинин, взаимодействуя с α_2-адренорецепторами, активирует NO-синтазу через PI3K-Akt путь, с последующим подавлением амплитуды Ca^{2+} тока посредством cGMP-зависимого фосфорилирования.

Помимо кардиомиоцитов крыс SD возможность рецепторной регуляции NOS L-аргинином была исследована в кардиомиоцитах крыс SHR. Нами показано, что 5мМ L-аргинина не изменяют скорости продукции NO и амплитуду Ca^{2+} тока L-типа в кардиомиоцитах SHR. Таким образом, в кардиомиоцитах SHR «аргининовый парадокс» отсутствует. Отсутствие эффекта L-аргинина на скорость продукции NO может быть связано: с десенситизацией α_2-адренорецепторов, с изменением активности PI3K-Akt пути, или с изменениями в экспрессии eNOS. Однако, продукция NO в ответ на электрическую стимуляцию в кардиомиоцитах SHR сохраняется. Показано, что в кардиомиоцитах SHR наряду с уменьшением экспрессии eNOS происходит значительное увеличение экспрессии nNOS [9]. Можно предположить, что в кардиомиоцитах SHR сохранена Ca^{2+}-зависимая регуляция NO-синтаз, и, благодаря компенсаторным механизмам, общий пул конститутивных NOS не меняется. В тоже время, многие типы рецепторов, в том числе α_2-адренорецепторы, активируют именно eNOS через PI3K-Akt каскад. Поэтому десенситизация этих рецепторов, нарушение активности или регуляции PI3K-Akt каскада или снижение экспрессии eNOS могут играть заметную роль. В наших экспериментах в кардиомиоцитах SHR гуанабенз также как и L-аргинин не оказывал влияние на скорость продукции оксида азота. Исследование дозозависимого эффекта гуанабенз на амплитуду Ca^{2+} тока показало, что реактивность α_2-адренорецепторов в кардиомиоцитах SHR значительно снижена по сравнению с SD. Данные факты хорошо объясняют отсутствие действия 5мМ L-аргинина на скорость продукции NO и амплитуду Ca^{2+} тока в кардиомиоцитах SHR за счет сниженной реактивности рецепторов. Тем не менее, не ясно с какой из вышеперечисленных гипотез связано снижение реактивности α_2-адренорецепторов у SHR. Все предлагаемые гипотезы нуждаются в экспериментальном подтверждении. В то же время существуют данные о том, что у мышей, нокаутов по α_2-адренорецепторам, развивается гипертрофия миокарда [10]. Не исключено, что обнаруженное нами снижение реактивности α_2-адренорецепторов в кардиомиоцитах SHR имеет отношение к развитию гипертрофии миокарда у крыс этой линии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cylwik D., Mogielnicki A., Buczko W.* //Pharmacol. Rep. (2005) 57(1): 14-22;
2. *Pieper G.M., Siebeneich W.* //J. Cardiovasc. Pharmacol. (1997) 30(6): 734-8;
3. *Bode-Böger S.M., Scalera F., Ignarro L.J.* //Pharmacol. Ther. (2007) 114(3): 295-306;

4. *Flam B.R. et al.* //Nitric Oxide (2001) 5(2): 187-97;
5. *Li C. et al.* //Biochem. J. (2005) 386(3): 567-74;
6. *Joshi M.S. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2007) 104(24): 9982-7;
7. *Dynnik V.V. et al.* //Dokl. Biochem. Biophys. (2005) 404: 353-6;
8. *Plato C.F., Garvin J.L.* //Am. J. Physiol. Renal. Physiol. (2001) 281(4): 679-86;
9. *Piech A. et al.* //Cardiovasc. Res. (2003) 57(2): 456-67;
10. *Hein L., Altman J.D., Kobilka B.K.* //Nature (1999) 402(6758): 181-4.

ИЗМЕНЕНИЕ РАБОТЫ МЕМБРАННОЙ Na^+,K^+-АТФазы БЫСТРОЙ И МЕДЛЕННОЙ МЫШЦ КРЫСЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОГРАВИТАЦИИ

Нуруллин Л.Ф.[1], Тяпкина О.В.[1], Волков Е.М.[2], Никольский Е.Е.[1,2]

[1]Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН
[2]Казанский государственный медицинский университет

Введение. Изменение режимов активности скелетной мускулатуры приводит к существенным перестройкам морфо-функциональной организации мышечных волокон [6,8,14]. Наиболее серьезные изменения возникают в мышце в условиях ее полной денервации, что выражается, в частности, в качественном изменении экспрессии семейства генов, ответственных за электрогенные свойства возбудимой мышечной мембраны [13]. Не столь драматические, но не менее важные с точки зрения функционирования мышцы, как сократительного органа, изменения возникают в условиях гипогравитации [1,3,5,7,12,15]. Известно, что величина МПП является одним из основных фенотипических признаков различных функциональных типов мышечных волокон, и что особенно важно, имеющим непосредственное отношение ко всем этапам процесса передачи возбуждения на сократительный аппарат [9], поэтому понимание механизмов влияния гипогравитации на его генерацию трудно переоценить. Ранее у животных, находившихся в условиях реальной невесомости, было обнаружено достоверное снижение МПП в *m. Soleus* [*Магазанник и др.*, неопубл. сообщ.]. У животных при моделировании действия невесомости методом антиортостатического вывешивания задних конечностей также было выявлено значительное снижение МПП в этой мышце [11]. Однако эти сообщения носят единичный характер, и механизм, ответственный за снижение МПП в условиях гравитационной разгрузки, остается неизвестным.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния антиортостатического вывешивания задних конечностей крысы, позволяющее имитировать состояние гипогравитации, на механизмы поддержания заданного уровня МПП, характерного для быстрых и медленных скелетных мышечных волокон на примере *m. extensor digitorum longus* (*EDL*) - быстрой и *m. Soleus* - медленной.

Методика. Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах (*m. EDL, m. Soleus*) половозрелых крыс-самцов линии Вистар (вес 250-280г). При содержании и кормлении животных (*ad libitum*) руководствовались международными правилами и инструкциями Минздрава СССР. Животные были разделены на контрольную группу, и группы, которые составили животные, содержавшихся в условиях, обеспечивающих опорную разгрузку по методу Morey-Holton [10] в течение 7, 14, 21 и 28 суток. По истечении срока экспозиции животных забивали под глубоким эфирным наркозом. Изолированную мышцу с подходящим к ней нервом помещали в экспериментальную ванночку, через которую протекал аэрированный карбогеном (O_2 95%, CO_2 5%, в течение 45мин) раствор Рингера-Кребса, следующего состава (ммоль/л): NaCl – 118.0, KCl – 5.0, $CaCl_2$ – 2.0, $MgCl_2$ – 2.0, NaH_2PO_4 – 1.0, $NaHCO_3$ – 24.0, глюкоза – 17.0, pH раствора поддерживали на уровне 7.2-7.4 при температуре 20.0±0.2°C. Измерение величины МПП осуществляли во внесинаптической зоне поверхностно расположенных мышечных волокон. В каждом мышечном препарате производили по 20-30 измерений МПП. Средние значения и стандартные ошибки величин МПП для каждой серии определяли по результатам экспериментов на 6-7 животных. В опытах по изучению вклада электрогенного компонента Na^+,K^+-насоса регистрацию МПП мышечных волокон осуществляли через 10-15мин после добавления в инкубационный раствор блокатора Na^+,K^+-АТФазы – уабаина (10^{-4}моль/л, «Serva»). Достоверность различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента по уровню значимости $p<0.05$.

Результаты и обсуждения

Мышца EDL. Контрольные эксперименты показали, что МПП в мышечных волокнах *m. EDL* составлял 71.1±0.3мВ (табл.1).

Длительное антиортостатическое вывешивание задних конечностей крысы приводило к снижению МПП и к 7 суткам наблюдения его величина составляла 65.2±0.5мВ (рис.1, табл.1). В дальнейшем до 28 суток эксперимента МПП оставался сниженным (рис.1, табл.1) без тенденции к дальнейшему понижению или восстановлению.

Табл.1. Средние значения МПП мышечных волокон *m. EDL* и *m. Soleus* у контрольных животных и после опорной разгрузки, *n* – количество волокон.

Группы крыс	*m. EDL*	*m. Soleus*
Контроль	71.1±0.3 мВ (n=120)	68.1±0.2 мВ (n=120)
7 дней	65.2±0.5 мВ (n=250)*	62.3±0.6 мВ (n=250)*
14 дней	66.2±0.3 мВ (n=430)*	62.1±0.3 мВ (n=314)*
21 дней	66.1±0.3 мВ (n=250)*	64.2±0.4 мВ (n=250)*
28 дней	66.3±0.4 мВ (n=250)*	62.2±0.5 мВ (n=273)*

*-достоверность отличий величин МПП мышечных волокон по сравнению с контролем, $p<0.05$.

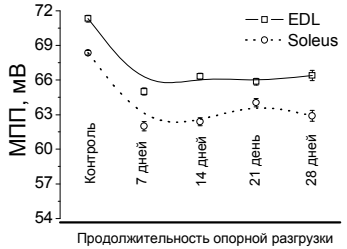


Рис.1. Влияние опорной разгрузки задних конечностей крысы продолжительностью 7, 14, 21, 28 дней на уровень МПП мышечных волокон «быстрой» – *m. EDL* (пустые квадраты) и «медленной» – *m. Soleus* (пустые кружки). Контроль – отсутствие антиортостатического вывешивания.

Последнее дает основание полагать, что трансмембранная разность потенциалов перешла на новый стационарный уровень, что, в свою очередь, предполагает наличие изменений в основных механизмах поддержания заданного уровня МПП мышечных волокон, характерного для данного типа. Для исследования механизма, обеспечивающего деполяризацию мышечных волокон, дальнейшие эксперименты проводили на 7 сутки «вывешивания».

Известно что, одной из причин снижения МПП может быть увеличение проводимости сарколеммы для Na^+ [4]. Для проверки состояния натриевой проводимости мембраны мышечных волокон нами были проведены эксперименты с заменой в растворе Рингера-Кребса Na^+ на трис. Если предположить, что уменьшение МПП действительно явилось следствием увеличения проводимости мембраны для Na^+, то удаление этих ионов из среды должно было бы приводить к гиперполяризации мышечных волокон. Проведенные эксперименты показали, что у интактных животных безнатриевый раствор уменьшал МПП (рис.2). После опорной разгрузки отсутствие Na^+ в среде также деполяризовало мембрану мышечных волокон (рис.2), однако изменение МПП в мышцах крыс на 7 сутки вывешивания было достоверно менее выражено. Следовательно гипотеза о повышенной натриевой проводимости мембраны, как ведущей причины снижения МПП в условиях моделирования гипогравитации, не находит подтверждения. Другой причиной развития деполяризации мышечных волокон при моделировании гипогравитации могло быть изменение эффективности работы Na^+,K^+-насоса сарколеммы. Известно, что в интегральной величине МПП имеется потенциал, создаваемый работой Na^+,K^+-АТФазы по ассиметричному переносу потенциалобразующих ионов [2]. Проведенные эксперименты показали, что в интактной мышце инактивация Na^+,K^+-помпы уабаином или удалением из раствора Na^+ снижала МПП мышечных волокон (рис.2).

У испытуемых крыс добавление в раствор уабаина также деполяризовало мембрану мышечных волокон (рис.2). Однако, как и в случае с отсутствием Na^+ в среде, это снижение было менее выражено, а показатели МПП как в растворе свободным от Na^+, так и в присутствии уабаина соизмеримы (рис.2). Добавление уабаина в безнатриевый раствор не усугубляло деполяризацию (рис.2). Из этого следует, что снижение МПП под действием уабаина и дефицита Na^+ являются результатом ингибирования Na^+,K^+-насоса. Поскольку инактивация ионного насоса, так же как и антиортостатическое вывешивание вызывали деполяризацию мышечной мембраны (рис.2), есть основание полагать, что одной из причин снижения МПП и перехода его на новый стационарный уровень в условиях моделирования гипогравитации является снижение доли «насосного» потенциала в МПП, создаваемого работой Na^+,K^+-АТФазы, а не увеличение натриевой проводимости мембраны.

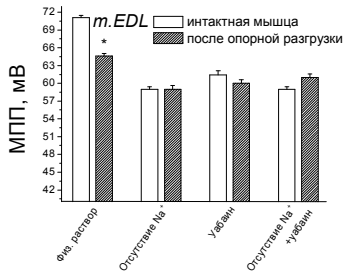


Рис.2. Влияние уабаина (10^{-4}моль/л) и отсутствия Na^+ на уровень МПП мышечных волокон «быстрой» – *m. EDL* зарегистрированных у крыс в контроле и после 7 дней опорной разгрузки задних конечностей. *-достоверность различий значений МПП мышечных волокон между интактными (контрольными) и мышцами после опорной разгрузки.

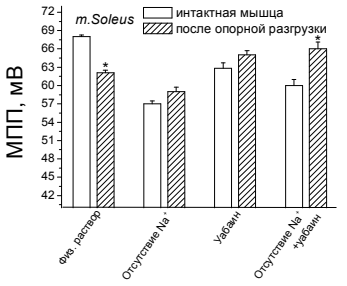


Рис.3. Влияние уабаина (10^{-4}моль/л) и отсутствия Na^+ на уровень МПП мышечных волокон «медленной» – *m. Soleus* зарегистрированных у крыс в контроле и после 7 дней опорной разгрузки задних конечностей. *-достоверность различий значений МПП мышечных волокон между интактными (контрольными) и мышцами после опорной разгрузки.

Мышца Soleus. У контрольных крыс было показано, что МПП в волокнах *m. Soleus* составлял 68.1±0.2мВ, что несколько ниже, чем в волокнах быстрой мышцы (рис.1, табл.1). Антиортостатическое вывешивание задних конечностей также приводило к снижению МПП, в *m. Soleus*, как и в *m. EDL* (рис.1, табл.1). В дальнейшем динамика падения МПП в *m. EDL* и *m. Soleus* была сходной (рис.1). В контрольных экспериментах присутствие уабаина или удаление из раствора Na^+ снижало МПП мышечных волокон *m. Soleus*, подобно тому, как это было отмечено для *m. EDL* (рис.3). Добавление уабаина в безнатриевый раствор не усугубляло возникшую деполяризацию (рис.3). Следовательно, в *m. Soleus* как и в быстрой мышце, в суммарную величину МПП вносит вклад электрогенного компонента насоса. Однако по абсолютной величине его вклад меньше, чем в быстрой мышце. В безнатриевой среде величина МПП мышечных волокон *m. Soleus* после 7 суток вывешивания снижалась, но в меньшей степени по сравнению с деполяризацией, возникающей в этих условиях у интактных мышц (рис.3). С одной стороны это указывает на отсутствие в этих мышечных волокнах увеличения натриевой проводимости мембраны, а с другой - на выпадение электрогенной составляющей в величине МПП. Интересен тот факт, что в данном случае, в отличие от «быстрых» волокон мы наблюдали увеличение МПП в присутствии уабаина по сравнению с показателями МПП мышц в обычном растворе на 7 сутки гипогравитационной разгрузки (рис.3). Увеличение МПП наблюдалось также и при добавлении уабаина в безнатриевый раствор, причем в этом случае даже в более выраженном варианте (рис.3). Однако на сегодняшний день данный феномен трудно объясним, и для его изучения требуются специальные исследования.

Таким образом, проведенные эксперименты позволяют прийти к однозначному выводу о том, что гипогравитационная разгрузка вызывает снижение МПП и переход его показателей на новый стационарный уровень в волокнах как «быстрой», так и «медленной» мышц млекопитающих. Основным механизмом такого уменьшения трансмембранной разности потенциалов является утрата электрогенного компонента в результате изменения в количественном соотношении противопотоков основных потенциалобразующих ионов, осуществляемых при участи работы Na^+,K^+-АТФазы мышечной мембраны.

Поддержано грантами РФФИ №08-04-00923 и №09-04-01280; НШ-4177.2008.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Adams G.R., Caiozzo V.J., Baldwin K.M.* //J. Appl. Physiol. (2003) 95: 2185-201;
2. *Akaike N.* //J. Physiol. (1975) 245(3): 499-520;
3. *Baldwin K.M., Haddad F.* //J. Appl. Physiol. (2001) 90: 345-57;
4. *Desaphy J.-F. et al.* //Brain (2001) 124: 1100-13;
5. *Fitts R.H., Riley D.R., Widrick J.J.* //J. Appl. Physiol. (2000) 89: 823-39;
6. *Flück M., Hoppeler H.* //Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. (2003) 146: 159-216;
7. *Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S.* //Human Space Flight (1996) 1(10): 231-46;
8. *McGeachie J.K.* //Cell Tissue Res. (1989) 257(2): 455-7;
9. *MacIntosh B.R., Gardiner P.F., McComas A.J.* //Book: Human Kinetics (2006): 118;
10. *Morey-Holton E. et al.* //Adv. Space Biol. Med. (2005) 10: 7-40;
11. *Pierno S. et al.* //Brain (2002) 125: 1510-21;
12. *Thomason D.B., Booth F.W.* //J. Appl. Physiol. (1990) 68: 1-12;
13. *Волков Е.М.* //Каз. Мед. Журнал (1994) 75(3): 180-3;
14. *Волков Е.М.* //Успехи Физиол. Наук (1989) 2: 26-45;
15. *Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С.* // Росс. Физиол. Ж. (2004) 90(5): 508-21.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРА ГЛИЦИНА НА СТАБИЛИЗАЦИЮ ФОСФОРИЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ТКАНЕЙ КОРЫ МОЗГА ПРИ ГИПОКСИИ

Селин А.А.[1], Лобышева Н.В.[1,2], Тоньшин А.А.[2], Воронцова О.Н.[3], Ягужинский Л.С.[2], Нарциссов Я.Р.[1]

[1]НИИ Цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва
[2]НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва
[3]ГУ НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва

Введение. Работа связана с проблемой стабилизации функциональной активности нейронов при ишемическом инсульте (ИИ). Данное заболевание связано с тромбоэмболией или с давлением извне сосудов головного мозга, что приводит к снижению кровоснабжению участка мозга и, следовательно, снижению доставки энергетических субстратов в ткани. При этом в мозге могут протекать необратимые процессы, приводящие к утрате функции и клеточной гибели. Основной задачей в лечении ИИ является увеличение сроков пребывания клеток в

жизнеспособном состоянии до момента восстановления нормального кровоснабжения. В клинике себя хорошо зарекомендовал фармацевтический препарат «глицин», как нейропротекторное средство [1]. Но механизм противоишемического действия глицина пока не изучен полностью. Ранее нами было показано, что глицин, при его добавлении в среду инкубации переживающих в аноксии мозговых срезов, способен снижать уровень межнуклеосомной фрагментации ДНК, маркера апоптоза [2]. Цель настоящей работы заключается в исследовании связи между способностью глицина предотвращать деструктивные процессы в ткани мозга и его влиянием на систему окислительного фосфорилирования митохондрий в условиях гипоксии головного мозга *in vivo* и на модели срезов мозга, переживающих в аноксии.

Результаты. Эксперименты проводились на срезах коры головного мозга, переживающих в условиях аноксии *in vitro*, и на модели ИИ *in vivo.* В последнем случае гипоксия создавалась методом перевязки левой общей сонной артерии. Данная модель давно используется исследователями [3] и принята фармакологическим комитетом для доклинического испытания противоинсультных препаратов. В обоих случаях исследовалось нарушение функции окислительного фосфорилирования митохондрий: анализировалось изменение максимальной скорости дыхания митохондрий и измерялся дыхательный контроль при добавлении субстрата АТФ-синтазы (АДФ). В модели ишемии *in vitro* было обнаружено, что на коротких сроках инкубации в условии аноксии (30 минут) в тканях мозга сохраняется электрон-транспортная активность при окислении глутамата и малата, что свидетельствует об интактности комплексов I-IV, а также при окислении сукцината, что свидетельствует об интактности комплекса II (рис.1 кривые Б, В). Также было обнаружено, что в условиях аноксии полностью исчезает дыхательный контроль (Дк) и фосфорилирующая функция митохондрий (рис.1Б). Предварительное внесение в среду инкубации срезов мозга нейромедиатора глицина в миллимолярных концентрациях приводило к частичной стабилизации системы окислительного фосфорилирования. В этих условиях на гомогенатах наблюдается четко выраженный эффект при добавлении АДФ, что свидетельствует о частичном сохранении фосфорилирующей функции (рис.1В). Стимуляция дыхания в среднем составляла 30% в 5 независимых экспериментах. Существенным является тот факт, что время сохранения фосфорилирующей функции митохондрий в присутствии глицина намного превосходит время сохранения функциональной активности мозга в условиях глубокой гипоксии, которое не превышает 3-5 минут.

Полученные результаты стимулировали нас провести исследования влияния глицина, как фактора защищающего ткани мозга, в

модели ишемии *in vivo*. Для этого проводилась операция по перевязке левой общей сонной артерии у беспородных белых крыс (♀) массой 200±30г. Животные получали глицин четыре раза перед операцией. Каждая доза составляла 3,4мг/кг и вводилась перорально за 420, 390, 330 и 60мин. перед перевязкой. Через 24 часа после операции анализировалось функциональное состояние митохондрий и активность каспазы 3 в коре головного мозга крыс. При исследовании этих параметров левое и правое полушария анализировались по отдельности. В ходе экспериментов было установлено, что через 24ч после перевязки левой общей сонной артерии функциональное состояние митохондрий в составе коры головного мозга ухудшается в левом и правом полушариях. Причем, наиболее сильное влияние перевязки левой общей сонной артерии на дыхательный контроль наблюдается в левом полушарии (табл.1). В модели ишемии *in vivo* глицин также проявил выраженное свойство улучшать энергетику нервных клеток. При пероральном введение глицина животным до операции наблюдается стабилизация функционального состояния митохондрий коры головного мозга (табл.1). Достоверный эффект глицина наблюдается в обоих полушариях.

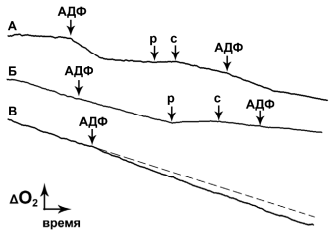


Рис.1. Регистрация дыхания (ΔO2) гомогенатов срезов коры головного мозга. 30-ти минутная аноксия приводит к исчезновению реакции на добавку АДФ (кривая Б). При наличии глицина в среде инкубации наблюдается четко выраженная стимуляция дыхания при добавлении АДФ (кривая В). А – интактная ткань (n=5); Б – 30мин аноксии (n=5); В – 30мин аноксии+глицин (5мМ) (n=5). Добавки: р – ротенон, с – сукцинат. Состав среды (мМ): 120 KCl, 5 HEPES-Tris, 0,5 EDTA, 5 малат, 5 глутамат, 2 K_2HPO_4, pH 7,4.

Достоверное отличие максимальных скоростей дыхания митохондрий гомогенатов, полученных из левого и правого полушарий, наблюдается только у контрольных и оперированных животных, не получавших глицин. При этом можно видеть тенденцию к повышению максимальной скорости дыхания у животных, которым перорально вводился глицин (табл.2). Количество белка в гомогенатах было одинаковым, это достигалось путем пропорционального добавления среды гомогенизации к предварительно взвешенной ткани.

Каспаза 3 играет важную роль в развитии клеточной гибели, запуская ключевые стадии апоптоза, такие как разрушение ядерных белков, межнуклеосомная фрагментация ДНК, деградация цитоскелета и т.д. (см. обзор [4]). Исследование активности каспазы 3 флуорометрическим методом показало, что односторонняя перевязка приводит к увеличению активности каспазы 3 в обоих полушариях

(табл.3). Было обнаружено, что у животных, получавших глицин до операции, уровень каспазной активности оставался на уровне интактного животного (табл.3).

Табл.1. Глицин предотвращает нарушение функционального состояния митохондрий нервных клеток при ишемии *in vivo*. Дк митохондрий в составе гомогенатов левого и правого полушарий животных получавших глицин достоверно выше Дк митохондрий животных после операции.

Операции по перевязке левой общей сонной артерии у крыс (среднее по 3-м экспериментам)	Дыхательный контроль по Чансу (V_3/V_4)	
	Левое полушарие	Правое полушарие
Интактное животное (контроль)	7,7±0,5	7,1±0,4
24ч ишемии	4,5±0,3*	5,8±0,3*
24ч ишемии+глицин	6,4±0,9$^{\#}$	7,0±0,4$^{\#}$

*-отличие от контроля $p<0,05$, $^{\#}$ отличие от 24ч ишемии $p<0,05$

Табл.2. Наблюдается тенденция к повышению максимальной скорости дыхания у животных, которым вводился глицин.

Операции по перевязке левой общей сонной артерии у крыс (среднее по 3-м экспериментам)	Величина максимальной скорости дыхания (V_3 по Чансу), нг ат O_2/мин	
	Левое полушарие	Правое полушарие
Интактное животное (контроль)	105±13	107±10
24ч ишемии	76±8*	67±6*
24ч ишемии+глицин	84±9	91±9

*-отличие от контроля $p<0,05$

Табл.3. Односторонняя перевязка левой сонной артерии приводит к увеличению активности каспазы 3 в обоих полушариях. У животных, получавших глицин до операции, уровень каспазной активности оставался на уровне интактного животного.

Операции по перевязке левой общей сонной артерии у крыс (среднее по 3-м экспериментам)	Активность каспазы 3, у.е.	
	Левое полушарие	Правое полушарие
Интактное животное (контроль)	0,188±0,012	0,188±0,012
24ч ишемии	0,296±0,011*	0,322±0,013*
24ч ишемии+глицин	0,200±0,016$^{\#}$	0,188±0,015$^{\#}$

*-отличие от контроля $p<0,05$, $^{\#}$-отличие от 24ч ишемии $p<0,05$

Выводы. Полученные данные позволяют говорить, что в присутствии нейромедиатора глицина наблюдается стабилизация системы окислительного фосфорилирования митохондрий и подавление процесса развития апоптоза в моделях гипоксии коры головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gusev E.I. at al.* //Cerebrovasc. Dis. (2000) 10(1): 49-60;
2. *Lobysheva N.V. at al.* //Neurochem. Int. (2009) 54(5-6): 322-9;
3. *Levy D.E. at al.* //Arch. Neuro. (1975) 32(7): 450-6;
4. *Porter A.G., Janicke R.U.* //Cell Death Differ. (1999) 6(2): 99-104;

ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО NAD(P)H И НАРУШЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ ПРИ ГИПЕРСТИМУЛЯЦИИ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Сурин А.М.[1], Зобова С.Н.[3], Тухбатова Г.Р.[2], Сенилова Я.Е.[2], Пинелис В.Г.[2], Ходоров Б.И.[1]

[1]НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва
[2]Научный центр здоровья детей РАМН, Москва
[3]Красноярский государственный медицинский университет им. Войно-Ясенецкого

Введение. Гибель нейронов при гипоксии/ишемии мозга обусловлена, главным образом, гиперстимуляцией ионотропных глутаматных рецепторов NMDA-типа, имеющих высокую Na^+ и Ca^{2+} проницаемость. Массивный вход Ca^{2+} по NMDA-каналам вызывает развитие отсроченной кальциевой дизрегуляции (ОКД), которая характеризуется вторичным подъемом свободной концентрации внутриклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), происходящим синхронно с сильной митохондриальной деполяризацией (МД). Несмотря на многочисленные исследования [см. обзоры 1,2], причины синхронности ОКД и вторичной сильной МД окончательно неустановленны. Митохондриальный потенциал (ΔVm) возникает в результате работы ферментов дыхательной цепи, активность которых поддерживается NADH, вырабатываемым пируват дегидрогеназой и тремя дегидрогеназами цикла трикарбоновых кислот. ΔVm обеспечивает синтез АТФ и захват Ca^{2+} митохондриями. В настоящей работе, используя методы флуоресцентной микроскопии, исследованы изменения $[Ca^{2+}]_i$ и интегральных параметров, характеризующих энергетическое состояние митохондрий, а именно, ΔVm и суммарного уровня NADH и NADPH (NAD(P)H) в покоящихся нейронах и во время токсического действия глутамата (Glu). Целью исследования была проверка на модели культуры гранулярных нейронов мозжечка крысы того, что падение NAD(P)H предшествует ОКД и сильной МД, как это было недавно обнаружено на примере культуры

гиппокампальных нейронов крысы [3]. Показано, что в гранулярных нейронах подобное падение наблюдалось только в 30% нейронов, имевших ОКД и вторичную МД, тогда как в оставшихся 70% вторичное падение NAD(P)H совпадало с началом ОКД. Высказано предположение, что одним из факторов, вызывающих падение NAD(P)H при развитии ОКД, является закисление матрикса митохондрий.

Материалы и методы. В работе использованы первичные культуры гранулярных клеток из мозжечка крысы. Приготовление культур и растворов для проведения измерений описано ранее [4]. Для флуоресцентно-микроскопических измерений использовали клетки после 7-14 дней в культуре (7-14 ДВК). Для оценки изменений ΔVm применяли потенциал-чувствительный флуоресцентный зонд родамин 123 (Rh123) по методике описанной ранее [4,5]. Измерения $[Ca^{2+}]_i$ проводили с помощью низкоаффинного флуоресцентного Ca^{2+}-индикатора Fluo-3FF, позволяющего адекватно регистрировать изменения $[Ca^{2+}]_i$ в микромолярном диапазоне концентраций. Индикатор вводили в клетки в форме ацетоксиметилового эфира (1-2мкМ, 50-60мин, 23-25^oC), смешанного с неионным детергентом Pluronic F-127 (0,02%). Для регистрации сигналов использовали те же светофильтры, что и для Rh123 (возбуждение 490±8нм и 530±20нм). Для возбуждения и регистрации флуоресценции NAD(P)H использовали светофильтры 360±8нм и 460±20нм. Время накопления сигнала NAD(P)H составляло 2-3сек при биннинге камеры 4x4 или 8x8 и использовании, соответственно, 40- или 63-кратного объектива. Величины сигналов NAD(P)H и Rh123, соответствующие минимальному уровню NAD(P)H и максимальной МД, определяли в конце эксперимента, добавляя протонофор FCCP (1мкМ).

Система регистрации сигналов индивидуальных клеток включала 175Вт ксеноновую лампу («Sutter Instrument», США), инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert–200 («Zeiss», Германия) и 12-битную охлаждаемую CCD камеру SnapCool-fx, (Roper Scientific, США). Изображения обрабатывали с помощью программ MetaFluor и MetaFluor Analyst («Moltcular Device Corporation», США).

Измерения выполняли при температуре предметного столика микроскопа 28-32^oC в буфере, содержащем (мМ): 145 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 D-глюкозы; 20 Hepes, pH 7,4. Буферы с глутаматом (Glu) и ингибиторами приготавливали непосредственно перед применением. Все реактивы фирмы «Sigma». Флуоресцентные индикаторы и Pluronic F-127 приобретены в «Invitrogen» (США).

Результаты. Изображения покоящихся нейронов демонстрируют преимущественную автофлуоресценцию цитозоля, обусловленную суммарным свечением NADH и NADPH (NAD(P)H) и совпадающую с распределением флуоресценции митохондриального потенциал-чувствительного зонда Rh123. В совокупности с данными о

чувствительности автофлуоресценции к митохондриальным ядам (см. ниже) это свидетельствует о доминирующем вкладе митохондриальной NADH в изменения суммарной автофлуоресценции [6].

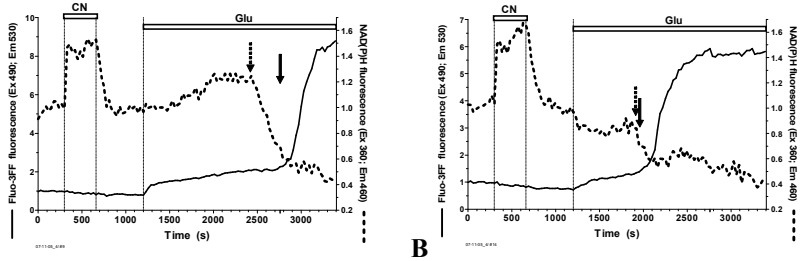


Рис.1. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и митохондриального NAD(P)H в двух представительных гранулярных нейронах из мозжечка крысы. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ (левые шкалы ординат) и суммарной автофлуоресценции нейронов, обусловленной NAD(P)H, (правые шкалы ординат), регистрировали как описано в «Материалах и методах». Концентрации цианида натрия (CN) и глутамата (Glu) составляли 3 и 0,1мМ. Glu добавляли в безмагниевом буфере, содержащем 10мкМ глицина. Сплошными стрелками обозначены моменты возникновения ОКД, пунктирными – начало снижения автофлуоресценции нейронов. Сигналы Fluo-3FF и NAD(P)H нормированы относительно начального сигнала в покоящихся клетках.

Кратковременное добавление ингибитора дыхательной цепи цианида натрия (CN, 3мМ) к покоящимся клеткам не влияло на $[Ca^{2+}]_i$, но вызывало быстрый обратимый подъем автофлуоресценции нейронов (рис.1). CN индуцировал 1,81±0,33-кратный рост NAD(P)H относительного базального уровня, что на 13% выше прироста, вызванного остановкой АТФсинтазы с помощью олигомицина ($n=24$; $p<0,05$). Это свидетельствует о том, что в митохондриях покоящихся нейронов синтез АТФ происходит достаточно интенсивно. Это согласуется с данными работы [7], в которой было показано, что в покоящихся гранулярных нейронах мозжечка затраты кислорода на синтез АТФ составляют 51% от максимального уровня потребление кислорода. Отсутствие изменений $[Ca^{2+}]_i$ говорит о том, что 5-10мин ингибирование дыхательной цепи не изменяет равновесия между входящими в цитозоль и выходящими из него потоками Ca^{2+}.

При добавлении Glu (100мкМ) сначала происходило небольшое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ (рис.1), которое всегда сопровождалось небольшой МД (не показано, однако, см. [2] и ссылки там). При продолжительном воздействии Glu нейроны теряли способность удерживать $[Ca^{2+}]_i$ на относительно низком уровне и возникала ОКД и сильная МД, которые переходили в устойчивое $[Ca^{2+}]_i$ плато и МД. Как отмечалось выше, характерной особенностью ОКД является то, что рост $[Ca^{2+}]_i$ и

наступление сильной МД всегда происходят синхронно [2]. Изменения NADH имели более сложный характер и не всегда были синхронны с изменениями $[Ca^{2+}]_i$ (рис.1). Клетки, в которых ОКД наступала через 15-20 и более минут после добавления Glu, демонстрировали сначала подъем флуоресценции NAD(P)H, связанный, по-видимому, с Ca^{2+}-зависимой активацией митохондриальных дегидрогеназ [8]. Затем наступало относительно плавное снижение NAD(P)H, причем вторичный подъем $[Ca^{2+}]_i$ наступал только тогда, когда уровень NAD(P)H опускался до минимального или близкого к нему (рис.1А). Нейроны, в которых Glu сразу же вызывал снижение NAD(P)H, имели более короткий латентный период ОКД, и в них вторичное снижение флуоресценции NADH незначительно опережало ОКД либо совпадало с ее началом (рис.1В). Во время $[Ca^{2+}]_i$ плато концентрация восстановленного динуклеотида находилась на самом низком уровне, поскольку добавление протонофора FCCP после отмывки Glu не вызывало дальнейшего снижения автофлуоресценции (не показано). Суммарно доли нейронов, которые можно подразделить по подтипам, представленным на рис.1А и 1В, составили, соответственно, 30% и 70% (n=211, 18 экспериментов).

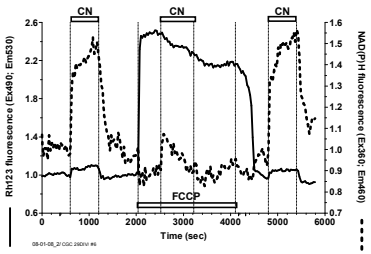


Рис.2. Изменения митохондриального потенциала (левая ось, сплошная линия) и внутриклеточного NAD(P)H (правая ось, пунктир) при блокаде дыхания цианидом (CN, 3мМ) и разобщении окислительного фосфорилирования протонофором (FCCP, 1мкМ) в гранулярной клетке мозжечка. Аналогичные изменения наблюдались в 7 других нейронах. Увеличение флуоресценции зонда Rh123 соответствует деполяризации.

Снижение флуоресценции NAD(P)H в период, предшествующий началу ОКД, или в момент возникновения ОКД может быть вызвано усилением потребления NADH и/или снижением скорости восстановления NAD^+ до NADH. Известно, что активность ферментов цикла трикарбоновых кислот, восстанавливающих NAD^+ до NADH, резко падает при pH матрикса митохондрий ($pH_м$) ниже 7 [9]. При действии нейротоксических доз Glu в нейронах достаточно быстро возникает закисление цитозоля [10-13] и митохондрий [13], причем во время ОКД $pH_м$ падает до 6,2-6,5 [13]. Это снижение $pH_м$ сопоставимо с тем, которое вызывают протонофоры [12,13], что позволило в настоящей работе применить FCCP для закисления митохондрий до уровня, который вызывает Glu, избежав, однако, поступления Ca^{2+} в нейроны [2,4].

Изменения NAD(P)H, индуцированные CN в покоящихся нейронах в нормальном буфере и в таком же буфере, но содержащем FCCP показаны на рис.2. Протонофор вызывал резкое падение автофлуоресценции нейронов и коллапс ΔVm, проявляющийся в 2,5-кратном увеличении интенсивности флуоресценции Rh123. Добавка CN в буфер, содержащий FCCP, уже не приводила увеличению сигнала Rh123. В то же время, CN все еще увеличивал флуоресценцию NAD(P)H в присутствии FCCP, но до уровня, гораздо меньшего, чем в отсутствии протонофора. Отмывка FCCP вернула CN способность увеличивать NAD(P)H до уровня, предшествующего добавлению протонофора, подтверждая тем самым, что эффект FCCP был вызван закислением матрикса митохондрий.

Обсуждение. Полученные в данной работе результаты показывают, что в гранулярных нейронах мозжечка крысы, токсические дозы Glu, способные вызвать ОКД, индуцируют также довольно сложные изменения уровня NAD(P)H. В 30% нейронов было выявлено плавное снижение NAD(P)H, предшествующее ОКД (рис.1А). Начало ОКД совпадало или было очень близким к предельно низкому уровню NAD(P)H, который наблюдался при действии FCCP. Падение NAD(P)H, подобное этому типу ответов на Glu, было отмечено в культивируемых нейронах гиппокампа [3] и объяснено истощением запасов NAD^+/NADH в результате активации поли(АДФ-рибозил)-полимеразы-1 (PARP-1) и, возможно, PARP-2. Однако, как показали наши исследования, в 70% зернистых клеток мозжечка синхронно с ОКД происходило вторичное снижение NAD(P)H. Это говорит о том, что помимо исчерпания NAD^+, вызванного гиперактивацией PARP-1, существуют и другие механизмы, ведущие к дефициту NAD(P)H. Одним из факторов, препятствующих восстановлению NAD^+ до NADH, может быть снижение $pH_м$, которое происходит во время воздействия нейротоксических доз Glu, и усиливается при наступлении ОКД [12,14]. В число ферментов, поставляющих NADH для дыхательной цепи, входит α-кетоглутарат дегидрогеназа, активность которой резко падает при pH<7 [9]. Более того, этот фермент регулируется Ca^{2+} [8], концентрация которого в митохондриях может увеличиваться на 2-3 порядка при закислении матрикса [1].

Изложенные данные позволяет предположить, что уменьшение NAD(P)H, наблюдаемое при гиперстимуляции глутаматных рецепторов, зависит от $pH_м$ и вносит вклад в развитие ОКД, по крайней мере, в тех 30% гранулярных нейронов мозжечка, в которых падение NAD(P)H предшествовало ОКД. В тех 70% нейронов, в которых начало вторичного падения NAD(P)H было неотличимо от начала ОКД и сильной МД, вопрос о причинно-следственных отношениях требует дальнейших исследований.

Работа поддержана РФФИ 08-04-01802 и 07-04-13606-офи_ц.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nicholls D.G. et al.* //Cell Calcium (2003) 34(4-5): 407-24;
2. *Khodorov B.* //Prog. Biophys. Mol. Biol. (2004) 86(2): 279-351;
3. *Abramov A.Y., Duchen M.R.* //Biochim. Biophys. Acta (2008) 1777 (7-8): 953-64;
4. *Ходоров Б.И. и др.* //Биол. Мембр. (2001) 18(6): 421-32;
5. *Сурин А.М. и др.* //Биохимия (2006) 71(8): 1066-7;
6. *Duchen M.R., Surin A.M., Jacobson J.* //Meth. Enzym. (2003) 361: 353-89;
7. *Jekabsons M.B., Nicholls D.G.* //J. Biol. Chem. (2004) 279(31): 32989-3000;
8. *McCormack J.G., Denton R.M.* //Dev. Neurosci. (1993) 15(3-5): 165-73;
9. *Lai J.C., Cooper A.J.* //J. Neurochem. (1986) 47(5): 1376-86;
10. *Hartley Z., Dubinsky J.M.* //J. Neurosci. (1993); 13(11): 4690-9;
11. *Wang G.J., Randall R.D., Thayer S.A.* //J. Neurophysiol. (1994) 72 (6)**:** 2563-9;
12. *Kiedrowski L.* //Mol. Pharmacol. (1999) 56(3): 619-32;
13. *Bolshakov A.P. et al.* //Cell Calcium (2008) 43(6): 602-14;
14. *Сторожевых Т.П. и др.* // Материалы конф. «Рецеп. и внутрикл. сигнал.» Пущино (2007): 100-2.

***

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В ЭЛЕКТРОВОЗБУДИМЫХ КЛЕТКАХ

Сигнализация в синапсе

СВИДЕТЕЛЬСТВА В ПОЛЬЗУ НАЛИЧИЯ НЕКВАНТОВОЙ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В МИОКАРДЕ

Абрамочкин Д.В.[1]*, Нуруллин Л.Ф.*[2]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[2]Казанский Институт биохимии и биофизики РАН

Парасимпатическая регуляция сердца чрезвычайно важна для его нормальной работы. Она осуществляется за счет выброса ацетилхолина (АХ) из окончаний парасимпатических постганглионарных нейронов, располагающихся в интрамуральных парасимпатических ганглиях сердца. Хорошо известно, что секреция АХ связана с импульсной активностью постганглионарных нейронов, которая возникает в ответ на сигналы, приходящие по аксонам преганглионарных нейронов, находящимся в составе вагуса. Вместе с тем известно, что в холинергических нервно-мышечных синапсах помимо вызванной секреции АХ, связанной с активностью мотонейрона, существует и спонтанная, которая может осуществляться как квантовым, так и неквантовым способом. В отношении интрамуральных парасимпатических нейронов миокарда подобных сведений нет. Поэтому мы провели работу, в которой был получен ряд свидетельств в пользу наличия спонтанной неквантовой секреции АХ в миокарде.

Для исследования мы применили стандартный метод внутриклеточной регистрации биоэлектрической активности с помощью микроэлектродов в препарате изолированного правого предсердия крысы. Оценивали действие необратимого фосфорорганического ингибитора ацетилхолинэстеразы (АХЭ) армина и обратимого карбаматного ингибитора прозерина на конфигурацию потенциала действия (ПД) и длительность сердечного цикла.

В контроле, то есть до действия ингибиторов АХЭ, длительность ПД на уровне 50% реполяризации составляла 25,3±2,7мс, на уровне 90% реполяризации – 58,2±6,2мс, ритм следования ПД – 314±11мин$^{-1}$ (n=35).

На рис.1 представлены оригинальные записи ПД в одном из экспериментов с арминоном. Рис.2 показывает усредненные эффекты армина и прозерина в различных концентрациях на длительность ПД и сердечного цикла. Армин (100нМ, 1 и 10мкМ) и прозерин (100нМ, 1 и

5мкМ) снижали длительность ПД и вызывали замедление синусового ритма, то есть вызывали эффекты, типичные для АХ. Атропин (1мкМ), антагонист мускариновых холинорецепторов, устранял укорочение ПД на уровне 90% реполяризации (рис.1I-Г, рис.2) и замедление ритма (рис.2), а также сильно снижал величину укорочения ПД на уровне 50% реполяризации (рис.1I-Г, рис.2).

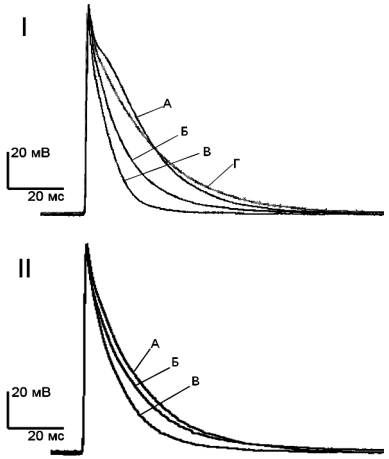


Рис.1. Оригинальные записи, демонстрирующие изменение конфигурации ПД под действием армина (I) и прозерина (II) (приведены записи из двух отдельных экспериментов). I : А–ПД в контроле, Б–ПД при действии 100нМ армина (13-я мин записи), В–ПД при действии 1мкМ армина (13-я мин), Г–восстановление исходной длительности ПД под действием 1мкМ атропина (после обработки 1мкМ армина). II: А–ПД в контроле, Б–ПД при действии 100нМ прозерина (13-я мин), В–ПД при действии 1мкМ прозерина (13-я мин).

Это заставляет предположить, что описанные эффекты обусловлены АХ, накапливающимся в миокарде в результате подавления активности АХЭ, а не какими-либо побочными эффектами армина и прозерина. Ясно, что уменьшение длительности ПД обусловлено накоплением АХ в месте регистрации, то есть в рабочем миокарде предсердия, а замедление ритма – накоплением АХ в области пейсмекера – синоатриального узла.

С чем же связано накопление АХ в миокарде в условиях ингибирования АХЭ? Известно, что парасимпатические постганглионарные нейроны не обладают спонтанной электрической активностью [1]. Поэтому в условиях работы на изолированном предсердии, где импульсная активность вагуса отсутствует, представляется маловероятным наличие вызванной секреции АХ. Таким образом, есть основания полагать, что АХ в таких условиях выделяется спонтанно. Известно, что АХ спонтанно может выделяться двумя способами: квантовым [2] (выброс содержимого отдельных везикул, содержащих АХ), приводящим к появлению МВПСП и в неквантовой форме. Неквантовая секреция АХ была показана Б.Катцем и Р.Миледи в нервно-мышечном синапсе лягушки [3], а позже была обнаружена в синапсах насекомых [4] и подробно изучена у млекопитающих [5,6]. Так,

при изучении неквантовой секреции из моторных нервных окончаний были получены данные, свидетельствующие, что данная форма секреции реализуется с участием системы захвата холина высокого сродства (СЗХВС). Одним из доказательств этого является тот факт, что гемихолиний III, селективный ингибитор СЗХВС, эффективно подавляет неквантовую секрецию в нервно-мышечном синапсе [7].

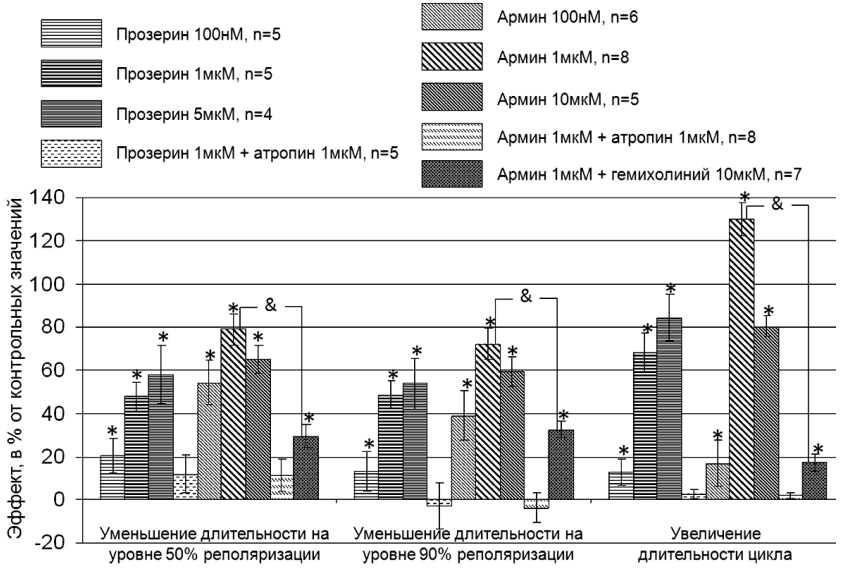


Рис.2. Сравнение эффектов прозерина и армина, а также эффектов обеих ингибиторов в присутствие 1мкМ атропина и 10мкМ гемихолиния III. По оси ординат: соответственно величина **уменьшения** длительности ПД в % от длительности в контроле и степень **увеличения** длительности сердечного цикла в % от длительности цикла в контроле. *-достоверность эффекта по сравнению с контролем, тест Вилкоксона, $p<0,05$. &-достоверность подавления эффектов 1мкМ армина гемихолинием III, тест Манна-Уитни, $p<0,05$.

За счет какого способа секреции происходит накопление АХ в условиях ингибирования АХЭ? Известно, что в нервно-мышечном синапсе количество АХ, выделяющееся неквантовым способом, в 100 раз превосходит выделяющееся за счет квантовой секреции [6,8]. В наших экспериментах эффекты, наблюдаемые при ингибировании АХЭ, сравнимы по величине с эффектами экзогенного АХ в очень больших концентрациях (100-500мкМ). По-видимому, эндогенный АХ в нашем случае накапливается также в весьма большой концентрации. Представляется более вероятным накопление такого количества АХ именно за счет неквантового выделения.

Для проверки гипотезы о неквантовом выделении АХ мы провели серию опытов с блокатором С3ХВС гемихолинием III. Для этого сперва 5 минут перфузировали препарат раствором гемихолиния III, а сразу вслед за этим – раствором, содержащий и гемихолиний III и армин. Гемихолиний III (10мкМ) достоверно подавлял все эффекты 1мкМ армина: укорочение ПД(90%) – на 61,4%, укорочение ПД(50%) – на 59,7%, замедление ритма – на 86,7% (рис.2). Таким образом, препарат, который блокирует неквантовый выброс в нервно-мышечном синапсе, по всей видимости снижает накопление АХ в миокарде.

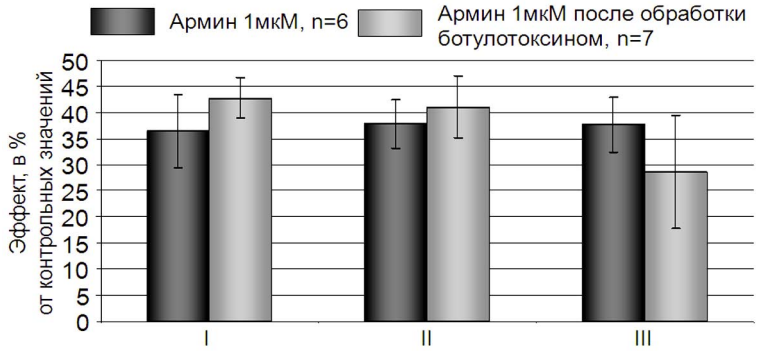


Рис.3. Сопоставление эффектов 1мкМ армина в препаратах правого предсердия, инкубированных в присутствие ботулинического токсина типа А и без него. I–уменьшение длительности ПД на уровне 50% реполяризации, II–уменьшение длительности ПД на уровне 90% реполяризации, III–увеличение длительности сердечного цикла.

В отдельной серии экспериментов мы исследовали эффекты армина после обработки препарата ботулиническим токсином типа А. Известно, что ботулотоксин обладает способностью расщеплять белки экзоцитоза и благодаря этому подавлять квантовую секрецию медиаторов [9]. По некоторым данным обработка ботулотоксином снижает и неквантовое выделение АХ, но в гораздо меньшей степени [10]. Таким образом, в нашем случае сохранение эффектов ингибиторов АХЭ после устранения квантовой секреции с помощью ботулотоксина означало бы, что АХ накапливается в миокарде за счет неквантового выделения. Обработку ботулотоксином проводили согласно ранее описанной схеме [11]. Сперва препарат инкубировали в оксигенируемом растворе, содержащем ботулотоксин типа А (препарат Диспорт, Ipsen, Франция) в концентрации 50ЕД/мл при температуре 32ºС в течении 4 часов. В контрольной серии препараты инкубировали в таких же условиях, но без ботулотоксина. На рис.3 представлены величины эффектов 1мкМ армина в контрольной и опытной сериях. Ни по одному из анализируемых

параметров не было обнаружено достоверного различия между эффектами армина после инкубирования с ботулотоксином и без (критерий Манна-Уитни, $p<0,05$). Таким образом, подавление квантовой секреции ботулотоксином не влияет на эффект армина, а следовательно – на интенсивность накопления АХ. Можно предположить, что накопление АХ действительно обусловлено неквантовой секрецией.

Итак, наши результаты являются свидетельством в пользу того, что АХ может выделяться в миокард из окончаний парасимпатических постганглионаров не только в составе везикул, но и неквантовым способом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Topchieva E.P.* //Fed. Proc. Transl. Suppl. (1966) 25(2): 739-42;
2. *Fatt P., Katz B.* //J. Physiol. (1952) 117: 109-28;
3. *Katz B., Miledi R.* //Proc. Roy. Soc. Lond. (1977) 196: 59-72;
4. *Antonov S.M., Magazanik L.G.* //Neurosc. Let. (1988) 93: 204-08;
5. *Vyskocil F., Illes P.* //Pflugers Arch. (1977) 370: 295-97;
6. *Vyscocil F., Nikolsky E., Edwards C.* //Neurosci. (1983) 9: 429-35;
7. *Nikolsky E.E. et al.* //Pflugers Arch. (1991) 418(1-2): 74-8;
8. *Fletcher P., Forrester T.* //J. Physiol. (1975) 251: 131-44;
9. *Foster K.A., Bigalke H., Aoki K.R.* //Neurotox. Res. (2006) 9(2,3): 133-40;
10. *Dolezal V., Vyskocil F., Tucek S.* //Pflugers Arch. (1983) 397(4): 319-22;
11. *Bullens R.W.M. et al.* //J. Neurosc. (2002) 22(16): 6876-84.

ПОДАВЛЕНИЕ СЕКРЕЦИИ МЕДИАТОРА В НОВООБРАЗОВАННЫХ СИНАПСАХ МЫШИ С УЧАСТИЕМ Ca^{2+}-ЗАВИСИМЫХ КИНАЗ

Богачева П.О., Ежова Е.В., Балезина О.П.

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение. Механизмы образования и перестройки синаптических контактов – актуальный вопрос современной синаптологии, ключ к пониманию пластичности нейронов. Классической моделью синаптогенеза являются процессы формирования и удаления нервно-мышечных синапсов, происходящие на мышечных волокнах скелетной мышцы в период ее реиннервации прорастающим нервом. Известно, что подрастающие моторные аксоны образуют на мышечном волокне избыточное число контактов, большинство из которых вскоре «замолкают», то есть перестают секретировать медиатор и обеспечивать передачу импульса. Подавление активности является обязательным

шагом для их дальнейшего отторжения с поверхности волокна [2,4,10]. В настоящее время мало известно о том, какие механизмы обеспечивают подавление активности новообразованных избыточных синапсов как необходимое условие их дальнейшей элиминации.

В новообразованных моторных нервных терминалях, наряду с Ca^{2+}-каналами P/Q-типа, запускающими секрецию ацетилхолина, имеются и потенциал-активируемые медленные Ca^{2+}-каналы L-типа. Недавно установлено, что ток через эти каналы вызывает подавление секреции, а их блокада нифедипином, верапамилом и другими специфическими блокаторами, напротив, приводит к облегчению передачи в новообразуемых моторных синапсах [1]. Каким образом входящий в терминали Ca^{2+}-ток может вызывать столь необычный, тормозный эффект в отношении секреции медиатора – остается неясным. Проведенный ранее нами и другими авторами анализ показал, что это не является результатом активации Ca^{2+}-зависимых K^{+}-каналов BK- или SK-типа [9,1]. В связи с этим сделано предположение, что следствием входящего по каналам L-типа тока может быть активация Ca^{2+}-зависимых киназ терминали, ингибирующих процессы секреции медиатора в новообразованных синапсах. Для проверки этой гипотезы в данной работе исследованы эффекты избирательных блокаторов кальмодулина, кальмодулинкиназы II типа и Ca^{2+}-зависимой протеинкиназы C на секрецию медиатора в новообразованных моторных синапсах в сравнении с эффектами блокаторов Ca^{2+}-каналов L-типа.

Методика. Объектом исследования служили новообразованные нервно-мышечные синапсы скелетной мышцы длинного разгибателя пальцев (*m. EDL*) на 11 сутки после передавливания моторного нерва (за которые происходит прорастание нерва к мышце и ее реиннервация). Постсинаптические потенциалы концевой пластинки (ПКП) новообразованных моторных синапсов регистрировали внутриклеточно, используя стандартную микроэлектродную технику отведения и режим одиночных ответов (ПКП) на раздражение нерва с частотой 0,5Гц. Для предотвращения мышечных сокращений в ответ на стимуляцию нерва проводили рассечение мышечных волокон изолированного нервно-мышечного препарата [3]. Данные регистрировали на компьютере и обрабатывали с помощью программы Minianalysis. Сравнение выборок производили по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Все данные приведены в виде средних значений±стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение. В предварительной серии экспериментов мы установили, что разные по химическому строению блокаторы Ca^{2+}-каналов L-типа верапамил (5мкМ) и нифедипин (10мкМ) действительно облегчают передачу – увеличивают в среднем на 50% амплитуду и квантовый состав ПКП. Так, например, под действием

нифедипина квантовый состав изменялся от 10±1 (в контроле) до 16±2. Эффект развивался сразу после нанесения препаратов и сохранялся на протяжении 40-60 минут инкубации. Облегчающее действие блокаторов Ca^{2+}-каналов L-типа наблюдалось в ограниченный период времени - в течение 7 суток от начала повторной иннервации, что соответствует данным литературы о периоде элиминации избыточных контактов на данной модели [10]. Полученные данные позволяли предположить, что в новообразованных синапсах вход кальция в терминаль по Ca^{2+}-каналам L-типа оказывает тормозное действие на процессы выброса медиатора. Нельзя было исключить, что в таком Ca^{2+}-зависимом торможении секреции ацетилхолина в период элиминации синапсов участвует кальмодулин. Недавно была показана способность кальмодулина участвовать в инактивации Ca^{2+}-каналов P/Q-типа в условиях избыточного поступления кальция в терминаль [7,5]. В таком случае, блокада активности кальмодулина должна была бы вызывать растормаживание активности синапсов и прирост квантового состава ПКП, как это наблюдалось на фоне действия нифедипина и верапамила.

На рис.1 видно, что квантовый состав ПКП не претерпевает достоверных изменений на фоне аппликации на мышцу избирательного блокатора кальмодулина R 24571 (2мкМ) и инкубации в течение 60-90 минут.

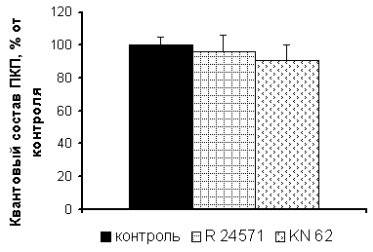


Рис.1. Изменение квантового состава ПКП под действием блокатора кальмодулина (R 24571, 2мкМ) и блокатора кальмодулинкиназы II (KN 62, 3мкМ). Данные приведены в процентах от контрольных значений квантового состава, принятых за 100%. Различия между средними значениями квантового состава ПКП недостоверны ($p>0,05$).

Так, в контроле квантовый состав достигал значения 12±1, а под действием R 24571 – 11±1. Это может указывать на то, что в новообразованных синапсах кальмодулин не принимает участия в Ca^{2+}-зависимом торможении секреции.

В настоящее время хорошо известно, что не только сам кальмодулин, но и кальмодулинзависимая киназа II играет важную роль в модуляции пресинаптических процессов [6]. Поэтому в качестве следующего шага в нашей работе было исследовано возможное участие кальмодулинкиназы II-го типа в Ca^{2+}-зависимом торможении секреции ацетилхолина. Мы установили, что воздействие на мышцу в течение 60-90 минут блокатора CaMKII KN 62 (3мкМ.) никак не отразилось на

амплитуде и квантовом составе ПКП в новообразованных синапсах: значение квантового состава в контроле – 12±1, на фоне KN 62 – 11±1 (рис.1). Таким образом, активация CaMKII тоже, по видимому, не является той мишенью, на которую нацелен кальций, входящий по Ca^{2+}-каналам L-типа и приводящий к подавлению секреции ацетилхолина в новообразованных синапсах.

В следующей серии экспериментов мы исследовали возможное участие еще одного Ca^{2+}-зависимого фермента – протеинкиназы С в Ca^{2+}-зависимом торможении секреции медиатора в реиннервированных синапсах. Для этого мы проводили аппликацию на мышцу двух разных блокаторов – хелеритрина (4мкМ) и бисиндолилмалейимида (BIM, 1мкМ).

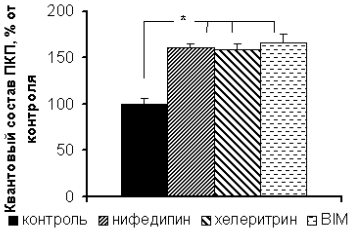


Рис.2. Изменение квантового состава ПКП на фоне действия блокатора кальциевых каналов L-типа нифедипина (10мкМ) и блокаторов протеинкиназы С (хелеритрина, 4мкМ и BIM, 1мкМ). Данные приведены в процентах от контроля. *-p<0,05

Инкубация с хелеритрином приводила к достоверному возрастанию квантового состава ПКП от 12±1 до 18±2. Эффект развивался в течение 10-15 минут после нанесения вещества и сохранялся на стабильном уровне последующие 40-60 минут. На фоне действия BIM наблюдали быстрое увеличение средней амплитуды одиночных ПКП, а квантовый состав менялся от 12±2 (в контроле) до 20±2. Как и в случае хелеритрина, облегчающий эффект BIM регистрировался уже через 10-15 минут после начала инкубации. На рис.2 видно, что прирост квантового состава ПКП под действием обоих блокаторов протеинкиназы С сопоставим с облегчающими эффектами нифедипина.

Если Ca^{2+}-зависимая активация протеинкиназы С действительно обусловлена входом кальция через Ca^{2+}-каналы L-типа, то на фоне инактивации протеинкиназы С хелеритрином прирост квантового состава ПКП должен оставаться неизменным при последующей блокаде Ca^{2+}-каналов L-типа. Проверка этого предположения показала, что квантовый состав ПКП под действием хелеритрина достоверно возрастает с 12±1 до 18±2, а при дальнейшей аппликации на этом фоне нифедипина достоверно не изменяется и составляет 17±2 (рис.3).

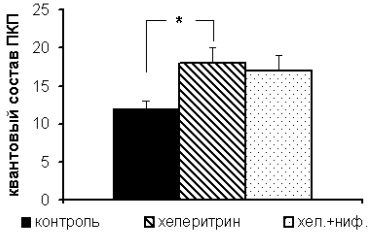


Рис.3. Изменение квантового состава ПКП при действии хелеритрина (4мкМ) и нифедипина (10мкМ) на фоне хелеритрина. Данные приведены в абсолютных значениях. *-p<0,05.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в новообразованных терминалях нервно-мышечных синапсов мыши протеинкиназа С (в отличие от кальмодулина и кальмодулинкиназы II), по-видимому, принимает непосредственное участие в механизме Ca^{2+}-зависимого подавления секреции ацетилхолина. Эти результаты созвучны данным Сантафе и соавторов, показавшим облегчающее влияние хелеритрина на процесс выброса медиатора в новообразованных синапсах [8]. В нашей работе впервые показано, что активация протеинкиназы С может быть связана со входом кальция по каналам L-типа. Какие именно из потенциально возможных субстратов активированной кальцием протеинкиназы С (ионные каналы, белки экзоцитоза и т.п.) вовлечены в торможение выброса медиатора в новообразованных синапсах, предстоит выяснить в дальнейших экспериментах.

Работа поддержана грантом РФФИ №07-04-00920-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балезина О.П. и др.* //Бюлл. Эксп. Биол. Мед. (2007) 143(2): 128-32;
2. *Barber M.J., Lichtman J.W.* //J. Neurosci. (1999) 19(22): 9975-85;
3. *Barstad J.A., Lilleheil G.* //Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. (1968) 175(2): 373-90;
4. *Buffelli M. et al.* //News. Physiol. Sci. (2004) 19: 85-91;
5. *Chaudhuri D. et al.* //J. Gen. Physiol. (2007) 129(5): 385-401;
6. *Jiang X. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2008) 105(1): 341-6;
7. *Lee A. et al.* //Nat. Neurosci. (2002) 5(3): 210-17;
8. *Santafe et al.* //J. Neurosci. Res. (2007) 85(7): 1449-57;
9. *Sugiura Y., Ko C.P.* //J. Neurosci. (1997) 17(3): 1101-11;
10. *Wyatt R.M., Balice-Gordon R.J.* //J. Neurocytol. (2003) 32(5-8): 777-94.

КАЛЬЦИЕВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СИНХРОННОГО И АСИНХРОННОГО ОСВОБОЖДЕНИЯ КВАНТОВ МЕДИАТОРА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ

Васин А.Л.[1], Самигуллин Д.В.[1], Бухараева Э.А.[1,2]

[1]Казанский институт биохимии и биофизики
[2]Казанский государственный медицинский университет

Введение. В быстрых синапсах химического типа, к которым относится и нервно-мышечное соединение теплокровных, основным событием, обеспечивающим процесс электро-секреторного сопряжения, является вход в аксоплазму ионов кальция из внеклеточной среды и их взаимодействие с комплексом синаптических белков, составляющих «машину экзоцитоза» [1]. Для инициации процесса слияния синаптической везикулы с участком освобождения в области активной зоны секреции необходимо повышение концентрации ионов кальция до нескольких десятков микромолей, которое реализуется благодаря входу кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы мембраны нервной терминали [2]. Для освобождения одного кванта необходимо связывание с кальциевым сенсором от 3 до 5 ионов кальция, что обусловливает нелинейную зависимость количества выделяемых квантов медиатора ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе от внеклеточной концентрации кальция [3]. После развития потенциала действия нервного окончания в течение нескольких миллисекунд наблюдается относительно синхронное фазное освобождение квантов медиатора, максимальная скорость которого в сотни раз превышает скорость спонтанной секреции квантов [4]. Продолжающееся в течение последующих десятков и сотен миллисекунд после потенциала действия освобождение квантов со скоростью, составляющей всего 0.01-1% от скорости фазной секреции, известно как задержанное асинхронное освобождение [5,6]. Выделяют также и переходный компонент освобождения, скорость которого составляет 1-10% от скорости фазной секреции наблюдаемый в течение 3-8мс после развития пресинаптического потенциала действия [7]. Этот компонент можно рассматривать как поздний компонент вызванного фазного синхронного освобождения квантов [8], поскольку выделяющиеся в этот промежуток времени кванты способны принимать участие в формировании постсинаптического ответа [9]. Экспериментальные и модельные исследования [10] показали, что изменение степени синхронности секреции квантов медиатора вносит вклад в амплитудно-временные характеристики постсинаптического ответа. При асинхронном выделении квантов с сильно флуктуирующими латентными периодами, амплитуда интегрального постсинаптического

ответа снижается, что не позволяет ему достичь уровня критической деполяризации и инициировать развитие потенциала действия постсинаптической клетки. Таким образом, временной ход секреции квантов медиатора является одним из важных факторов, способных модулировать надежность синаптической передачи. Несмотря на то, что ранняя и поздняя фазы синхронного вызванного освобождения квантов, а также задержанное асинхронное выделение квантов изучались во многих типах синапсов [6,11,12], механизмы, определяющие временные параметры этих компонентов процесса секреции, и характер их зависимости от кальция остаются нераскрытыми. В настоящем исследовании проведен анализ кинетики выделения квантов ацетилхолина при модуляции внутриклеточного кальциевого метаболизма в нервно-мышечном соединении мыши. Этот объект является хорошей моделью для изучения особенностей процесса экзоцитоза, поскольку позволяет стабильно регистрировать синаптическую активность на протяжении длительного периода времени и анализировать моменты освобождения отдельных квантов в ограниченном участке контакта при стимуляции двигательного нерва. Основной задачей данного исследования было изучение соотношения между параметрами синхронного и асинхронного освобождения квантов при различном состоянии внутриклеточного кальциевого метаболизма.

Методы. В экспериментах на диафрагмальном нервно-мышечном препарате мыши с помощью стандартной микроэлектродной техники экстраклеточно регистрировали токи действия нервного окончания и одноквантовые токи концевой пластинки (ТКП), вызванные стимуляцией двигательного нерва с частотой 0.5имп/с при изменении концентрации ионов кальция, магния, кадмия, стронция и проникающих кальциевых хелаторов BAPTA-AM и EGTA-AM. В исходных условиях в перфузирующем нервно-мышечный препарат растворе содержание ионов кальция составляло 0.5ммоль/л и 5ммоль/л магния, что позволяло наблюдать одноквантовые ТКП. Оценивали значения истинной синаптической задержки – временного интервала между пиком натриевой компоненты тока действия нервного окончания и началом одноквантового ТКП на уровне 20% от максимального значения амплитуды ответа. ТКП регистрировали на протяжении 50мс после нервного импульса. Анализировали гистограммы распределения синаптических задержек и аппроксимировали их спад экспонентами, для того, чтобы оценить количество ответов, относящихся к синхронной и асинхронной фазам секреции.

Результаты и обсуждение. В исходных условиях спад гистограммы распределения аппроксимировался тремя экспонентами, первая из которых формировалась ТКП, имеющими синаптические задержки длительностью до 3мс. В этот временной интервал выделялось

наибольшее количество квантов, которое составляло 78.6±1.5% (n=32) от общего количества зарегистрированных ТКП и представляло ранний наиболее синхронный компонент фазного освобождения квантов, средняя скорость секреции во время которого составила 123±21квант/с (n=32). Вторая экспонента, аппроксимирующая спад гистограммы распределения синаптических задержек, заканчивалась в интервале до 8мс. Количество ответов, синаптические задержки которых укладывались в этот интервал (от 3 до 5мс) составило 4.2±0.3% (n=32) и представляло поздний компонент синхронного выделения квантов ацетилхолина со средней скоростью секреции 3.7±1.2 квант/с (n=32). В интервале от 8 до 50мс выделялись оставшиеся 17.2±1.3% квантов (n=32), формирующие третью экспоненту и представляющие задержанное асинхронное освобождение квантов медиатора, скорость которого была равна 1.8±0.9квант/с (n=32).

При снижении содержания ионов кальция (Ca^{2+}) во внеклеточной среде до 0.3 и 0.2ммоль/л наблюдалось уменьшение абсолютного количества ответов, возникающих в ответ на стимуляцию двигательного нерва, что указывает на снижение числа освобождающихся квантов, т.е. уменьшение среднего квантового состава потенциалов концевой пластинки. При этом наблюдалось перераспределение числа ответов, синаптические задержки, которых соответствовали синхронному и асинхронному компонентам секреции: уменьшалось число квантов, формирующих синхронный компонент, и возрастало количество квантов, освободившихся в асинхронной фазе. Так, в растворе, содержащем Ca^{2+} 0.3ммоль/л и 0.2ммоль/л, количество квантов, выделившихся в раннюю синхронную фазу, составило 54.8±5.1% (n=7) и 38.7±6.3% (n=8), соответственно, в позднюю синхронную 7.4±1.0% (n=7) и 8.8±1.4% (n=8) и задержанное асинхронное освобождение составило 37.8±4.2% (n=7) и 52.5±5.6% (n=8) квантов, соответственно. Таким образом, при снижении входа кальция в нервное окончание из-за уменьшения электрохимического градиента наблюдалось уменьшение доли синхронно освобождающихся квантов, сопровождающееся возрастанием вклада асинхронной фазы секреции. Такое перераспределение связано с тем, что скорость выделения квантов в ранний синхронный период освобождения существенно уменьшилась до 12±6квант/с (n=8 для Ca^{2+} 0.2ммоль/л) и 42±11квант/с (n=7 для Ca^{2+} 0.3ммоль/л), тогда как скорость позднего синхронного освобождения снизилась не столь значительно по сравнению с исходной: до 1.6±1квант/с (n=7 для Ca^{2+} 0.2ммоль/л) и 2.2±1квант/с (n=8 для Ca^{2+} 0.3ммоль/л), а скорость задержанного асинхронного – достоверно не изменилась: 1.1±1квант/с (n=7 Ca^{2+} 0.2ммоль/л) и 1.4±1 (n=8 для Ca^{2+} 0.3ммоль/л). Следовательно, фазное синхронное и асинхронное освобождение квантов ацетилхолина проявляют различную зависимость от концентрации ионов кальция.

Снижения внутриклеточного содержания ионов кальция можно достичь, уменьшая его вход через потенциал-зависимые кальциевые каналы, с помощью добавления двухвалентных катионов, которые неспецифически блокируют эти каналы. Повышение концентрации ионов магния до 8ммоль/л, также как и снижение внеклеточной концентрации кальция, приводило к уменьшению числа квантов, освободившихся в ответ на стимул в синхронную фазу секреции и возрастанию числа асинхронно выделившихся квантов. Доля синхронно выделившихся квантов составила 69.8±4.5% (n=6), в позднюю синхронную фазу освободилось 4.2±0.8% (n=6) и задержанное асинхронное освобождение представлено 25.9±4.4% (n=6) ответов. При этом скорость выделения квантов составила для раннего синхронного, позднего синхронного и задержанного асинхронного освобождения, соответственно, 78±4.5квант/с, 2.4±1.5квант/с и 1.7±1.0квант/с (для всех n=6).

Ионы кадмия, также как и магния, являются неспецифическими блокаторами практически всех типов потенциал-зависимых кальциевых каналов пресинаптической мембраны. При добавлении ионов кадмия в концентрации 2.5мкмоль/л доля синхронно выделившихся квантов составила 59.2±3%, поздняя синхронная фаза представлена 8.0±0.1%, задержанное асинхронное освобождение 32.7±2% (n=7). Скорость выделения квантов в ранний синхронный период была равна 49±7квант/с, в поздний синхронный - 2.6±0.6квант/с и в задержанный асинхронный 1.2±0.3квант/с (для всех n=7). Таким образом, снижение входа ионов кальция в нервное окончание за счет прореживания кальциевых потенциал-зависимых каналов, подобно уменьшению его входа при понижении электрохимического градиента, также приводило к перераспределению квантов, за счет резкого падения скорости выделения квантов, освобождающихся в синхронную фазу и незначительного изменения ее в асинхронную фазу секреции.

Ионы стронция способны заменить ионы кальция для обеспечения вызванной секреции квантов в ответ на нервный стимул, однако степень синхронности выделения квантов в таком случае существенно изменяется [13]. Эквимолярная замена 0.5ммоль/л Ca^{2+} на 0.5ммоль/л стронция в перфузирующем нервно-мышечный препарат привела к существенному снижению количества квантов, выделившихся в синхронную фазу секреции до 41.4±2.2% и увеличению асинхронно возникших ответов до 7.8±0.8% в позднюю синхронную фазу и 50.5±1.6% (для всех n=7) в фазу задержанного асинхронного освобождения. Скорость синхронного выделения квантов в ранний период составила всего 21±3квант/с, в поздний период 2.2±1.2квант/с в задержанный асинхронный 1.8±1.0квант/с (для всех n=7).

В качестве одного из возможных механизмов, обеспечивающих появление асинхронного освобождения квантов медиатора, обсуждается

возможность активации кальциевых каналов, которые удалены от участка секреции. Предполагается, что, связывание кальциевыми буферами кальция, входящего в нервное окончание через каналы, удаленные от участков секреции квантов, может предотвращать появление квантов, выделившихся с большими синаптическими задержками, т.е. уменьшать проявление асинхронности секреции [14]. Использование BAPTA-AM в концентрации 25мкмоль/л в качестве хелатора ионов кальция с быстрой кинетикой связывания показало, что несмотря на то, что абсолютное количество квантов, освободившееся в синхронную фазу снизилось, но перераспределение ответов произошло в противоположном направлении: количество квантов, освободившихся в синхронную фазу увеличилось до 87.6±0.8%, в позднюю синхронную уменьшилось до 2.2±0.3%, а в период задержанного асинхронного снизилось до 10.2±0.8% (для всех n=6), т.е. уменьшился вклад асинхронно освободившихся квантов медиатора. При этом скорость раннего периода синхронного освобождения несколько снизилась до 70±4квант/с, позднего синхронного – до 1.0±0.3квант/с, а задержанного асинхронного резко упала до 0.6±0.4квант/с (для всех n=6).

Другой проникающий через пресинаптическую мембрану кальциевый буфер, но имеющий более медленную кинетику связывания с кальцием, EGTA-AM (25мкмоль/л) не проявлял эффекта, подобного BAPTA-AM, и достоверно не менял соотношение между числом синхронно и асинхронно выделившихся квантов ацетилхолина по сравнению с исходными параметрами, незначительно и пропорционально снижая скорость всех трех компонентов секреции. Количество квантов, выделившихся в ранний период синхронного освобождения, составило 77±3%, и скорость их секреции была равна 99±5квант/с (n=7). Доля квантов, выделившихся в поздний период синхронной секреции, составила 3.7±1%, и скорость этого компонента освобождения равнялась 2.1±0.9квант/с (n=7). Задержанное асинхронное освобождение было представлено 19.3±7% от общего числа квантов, и выделялись они со скоростью 1.2±0.8квант/с (n=7). Таким образом, буфер, связывающий ионы кальция с более медленной кинетикой, чем BAPTA-AM, не вызывал уменьшения асинхронности освобождения квантов медиатора.

В проведенном исследовании анализировались временные параметры вызванного стимуляцией двигательного нерва освобождения квантов ацетилхолина в нервно-мышечном соединении диафрагмальной мышцы мыши. В отличие от ранее выполненных работ, где синхронное и асинхронное освобождение квантов изучалось при высокочастотной стимуляции пресинаптического нервного окончания (выше 10имп/с) [11,12], осложняющей анализ роли кальция в регуляции разных компонентов секреторного процесса накоплением «остаточного» кальция после частотной пачки нервных импульсов, в данном исследовании использована редкая частота стимуляции двигательного нерва (0.5имп/с).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что процесс выделения квантов после нервного импульса не является однородным и представлен, по крайней мере, тремя компонентами – ранним синхронным, поздним синхронным и задержанным асинхронным. Вклад каждого из компонентов секреции в общее число выделившихся квантов зависит от состояния внутриклеточного кальциевого метаболизма, однако они имеют разную чувствительность к внутриклеточной концентрации ионов кальция, что может иметь значение для обеспечения пластических свойств синаптического контакта.

Поддержано грантами РФФИ 08-04-00923 и 09-04-01280, грантом «Ведущая научная школа» НШ-4177.2008.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Augustine G.J.* //Curr. Opi. Neurobiol. (2001) 11: 320-6;
2. *Catterall W.A., Few A.P.* //Neuron (2008) 59(6):882-901;
3. *Dodge J., Rahamimoff R.* //J. Physiol. (1967) 193: 419-32;
4. *Katz B.* //J. Physiol. (1968) 195: 481-92;
5. *Barrett E.F., Stevens C.F.* //J. Physiol. (1972) 227: 691-708;
6. *Rahamimoff R., Yaari Y.* //J. Physiol. (1973) 228: 241-57;
7. *Chen C., Regehr W.* //J. Neurosci. (1999) 19(15):6257-66;
8. *Bukharaeva E.* //J. Physiol. (2002) 538: 837-48;
9. *Van der Kloot W.* //J. Physiol. (1988) 402: 605-26;
10. *Bukharaeva E. et al.* //J. Physiol. (1999) 517: 879-88;
11. *Goda Y., Stevens C.F.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91: 12942-46;
12. *Atluri P.P., Regehr W.G.* //J. Neurosci. (1998) 18: 8214-27;
13. *Bukharaeva E. et al.* //J. Neurochem. (2007) 100: 939-49;
14. *Meinrenken C., Borst J., Sakmann B.* //J. Neurosci. (2002) 22: 1648-67.

АНАЛИЗ ПРЕСИНАПТИЧЕСКОГО ТОРМОЗНОГО ДЕЙСТВИЯ ХОЛИНА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

Гайдуков А.Е., Федорин В.В., Балезина О.П.

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение. В настоящее время не вызывает сомнения факт наличия на моторных нервных терминалах позвоночных пресинаптических никотиновых холинорецепторов (нХР) [5]. Однако фармакологические характеристики этих нХР и последствия их активации на уровне секреции ацетилхолина (АХ) остаются малоизученными. Проведенные нами ранее исследования пресинаптического действия никотина в

моторных синапсах мыши показали, что этот агонист в низких наномолярных концентрациях вызывает подавление вызванной секреции АХ, которое может быть предотвращено блокатором α7-нХР – метилликаконитином, а также апамином – блокатором Ca^{2+}-зависимых K^+-каналов SK-типа. Эти данные позволяли предполагать что на нервных терминалях существует популяция α7-нХР, активация которых сопровождается поступлением в терминаль ионов кальция, вызывающих активацию Ca^{2+}-зависимых K^+-каналов, что и приводит к торможению секреции [3,4]. В центральных синапсах активация пресинаптических α7-нХР их специфическим агонистом холином также приводит к входу кальция в терминали, который вызывает активацию рианодиновых рецепторов (RyR) и выброс депонированного кальция [9,10]. Вопрос о возможном участии RyR и выброса депонированного кальция при активации пресинаптических α7-нХР в моторных терминалях до сих пор не изучен. В связи с этим, целью данной работы было, во-первых, исследовать способность холина как высокоизбирательного агониста α7-нХР вызывать тормозное действие на секрецию АХ, аналогичное выявленному нами ранее у никотина [3,4], и, во-вторых, выяснить возможное участие пресинаптических RyR и выброса депонированного кальция в реализации пресинаптических эффектов холина.

Методика. Эксперименты проводили на «рассеченном» изолированном нервно-мышечном препарате *m. diaphragma–n. phrenicus* мыши при температуре 20°С. Для внутриклеточной регистрации синаптических потенциалов применяли заполненные 2.5М KCl стеклянные микроэлектроды сопротивлением 15МОм. Для регистрации одиночных потенциалов концевой пластинки (ПКП) стимулировали нерв сверхпороговыми импульсами длительностью 0.1мс с частотой 0.3Гц. При изучении ритмической активности синапса стимулировали нерв короткими пачками импульсов (50 стимулов, 50Гц). В контроле регистрировали миниатюрные потенциалы коцевой пластинки (МПКП) и ПКП в 5 или более разных синапсах, и далее в перфузирующий раствор добавляли исследуемые вещества. На их фоне проводили регистрацию синаптической активности от разных синапсов. Квантовый состав (КС) ПКП рассчитывали как отношение средней корректированной амплитуды ПКП к средней амплитуде МПКП в том же синапсе. При исследовании залпов из 50 ПКП с частотой 50Гц помимо амплитуды ПКП рассчитывали выраженность начального облегчения в залпе и уровень фазы «плато» ПКП (амплитуду первого ПКП в залпе принимали за 100%). Достоверность различий между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента (в случае нормального распределения) и критерию Манна-Уитни. Уровень значимости отличий между двумя выборками составлял 0.05 (n – количество обследованных синапсов).

Результаты и обсуждение. Для исследования пресинаптического действия холина нами была выбрана концентрация 100мкМ, близкая к имеющейся в синапсе при расщеплении ацетилхолина и незначительно превышающая EC_{50} для активации α7-нХР. Холин (100мкМ) не вызывал достоверных изменений мембранного потенциала мышечных волокон. Средняя амплитуда МПКП на фоне действия холина (0,80±0,07мВ) достоверно не изменялась по сравнению с контролем (0,82±0,06мВ, $p>0.05$), однако холин приводил к выраженному уменьшению средней частоты МПКП от 0,59±0,09Гц в контроле (n=16) до 0,37±0,04Гц ($p<0.05$, n=26). КС одиночных ПКП, также как и частота МПКП, уменьшался на фоне 15-30 минутного действия 100мкМ холина – от 17,41±1,17 в контроле (n=16) до 14,35±0,74 ($p<0.05$, n=26) (рис.1).

Совокупность полученных данных свидетельствует о пресинаптическом тормозном влиянии холина на спонтанную и одиночную вызванную секрецию медиатора. Необходимо было проверить вовлеченность пресинаптических α7-нХР в реализацию данного эффекта холина. Предварительная аппликация α-кобратоксина (5нМ) – оказывающего в этой концентрации избирательную блокаду только α7-нХР – никак не повлияла на характеристики спонтанной и одиночной вызванной секреции ацетилхолина. Однако в присутствии α-кобратоксина холин оказался не способен проявлять свое тормозное действие на спонтанную и вызванную секрецию АХ (рис.1).

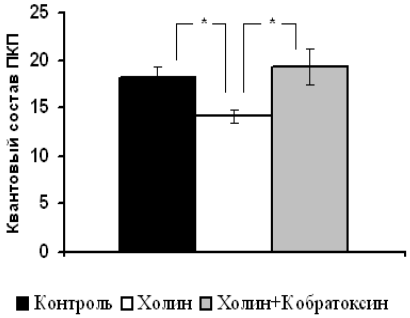


Рис.1. Квантовый состав одиночных вызванных ПКП в контроле, под действием холина (100мкМ) и при действии холина на фоне блокады α7-нХР α-кобратоксином (5нМ). *-$p<0.05$.

Далее мы решили исследовать, как будет изменяться амплитуда ПКП по ходу ритмического залпа при активации пресинаптических α7-нХР под действием 100мкМ холина. Стимуляция диафрагмального нерва короткими пачками из 50 импульсов с частотой 50Гц вызывала в контроле характерные изменения амплитуды ПКП по ходу залпа. Вслед за первым ПКП наблюдается начальное облегчение передачи – кратковременный прирост амплитуды ПКП (119.0±2.3% от амплитуды первого ПКП в залпе (n=24)), а затем – уменьшение амплитуды ПКП до стабильного, но сниженного уровня – фаза «плато» ПКП в залпе – 89.2±2.4% от амплитуды первого ПКП) (рис.2).

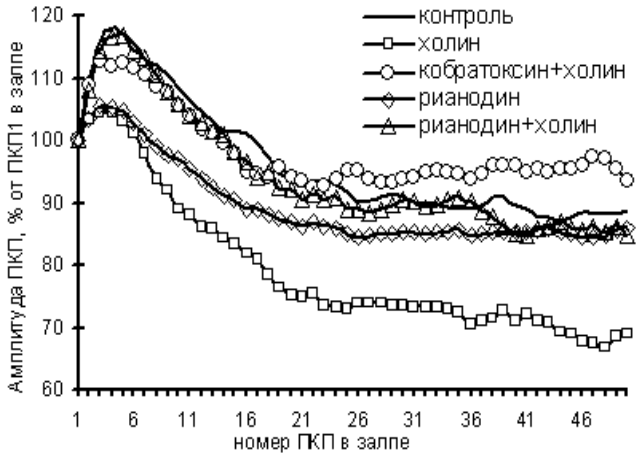


Рис.2. Ход залпа ПКП в контроле, на фоне действия холина (100мкМ), при действии холина на фоне α-кобратоксина (5нМ), при блокаде RyR рианодином (2мкМ) и при действии холина на фоне рианодина (2мкМ).

Изменение профиля залповой активности на фоне действия 100мкМ холина показано на рис.2. Видно, что холин вызывает подавление амплитуды ПКП по всему ходу залпа: достоверно снижаются относительные значения амплитуд ПКП по сравнению с контролем - до 71,6±5.9% от амплитуды первого ПКП в залпе на фазе плато ($p<0.05$, n=15) (рис.3). α-кобратоксин (5нМ) не вызывал достоверных отличий амплитуды и КС ПКП по ходу ритмического залпа. Вместе с тем, в присутствии α-кобратоксина полностью предотвращалось тормозное действие холина на секрецию ацетилхолина при ритмической (так же, как и при одиночной) стимуляции нерва (рис.2,3).

В последней серии экспериментов решался вопрос, участвует ли активация RyR и выброс депонированного кальция в реализации тормозного влияния холина на выброс АХ по ходу ритмического залпа ПКП? Для этого исследовали, во-первых – эффекты рианодина как блокатора RyR (2мкМ) в отношении рисунка залповой активности синапсов, и во-вторых – влияние рианодина на эффекты холина на фазе «плато» залпа ПКП. Оказалось, что на фоне рианодина наблюдается достоверное уменьшение начального облегчения передачи в залпе на 6,7% по сравнению с контролем ($p<0.05$, n=32) (рис.3), что явно свидетельствует в пользу возможной активации RyR и выброса кальция из депо при ритмической активности моторных синапсов. Холин в присутствии блокирующего RyR рианодина полностью утратил свою

способность уменьшать амплитуду ПКП на фазе плато ритмического залпа ($p>0.05$, n=16) (рис.3).

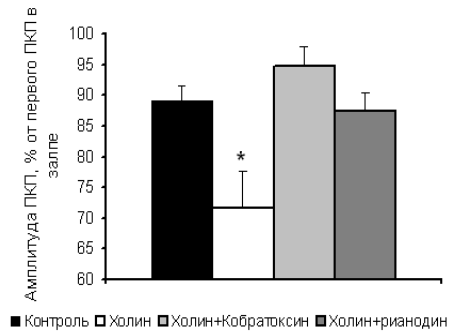


Рис.3. Изменение уровня фазы плато в залпе ПКП под действием холина (100мкМ) и влияние на эффект холина предварительной аппликации α-кобратоксина (5нМ) или рианодина (2мкМ). *-$p<0.05$.

Таким образом, проведенные исследования показали, что избирательный агонист α7-нХР холин вызывает широкий спектр пресинаптических тормозных эффектов, включая подавление спонтанной и вызванный (одиночной и ритмической) секреции АХ в моторных синапсах. Эти тормозные эффекты, развивающиеся на фоне продолжительного (30-60мин) действия холина, по-видимому, можно отнести за счет активации пресинаптических α7-нХР моторных нервных терминалей. Использованный нами тонический режим действия экзогенного холина, по-видимому, близок к естественному, характерному для эндогенного холина, постепенно накапливающемуся в синаптической щели при разрушении АХ в работающем синапсе [6].

Мы впервые показали, что торможение секреции АХ при активации холином α7-нХР может быть полностью предотвращено блокадой пресинаптических RyR. Известно, что входящий кальциевый ток по открытым α7-нХР представляет собой относительно «слабый» кальциевый вход в нервные терминали по сравнению с током по потенциал-зависимым Ca^{2+}-каналам [10]. Поэтому участие RyR и выброса депонированного кальция в реализацию эффектов холина представляется функционально обоснованным. Усиление внутритерминального Ca^{2+}-сигнала путем сочетанной активации α7-нХР и RyR известно и в центральных синапсах, где оно служит для облегчения секреции [7,8], тогда как в моторных синапсах, как оказалось – для торможения выброса медиатора. Описаны ситуации, когда выброс депонированного кальция сопровождается активацией Ca^{2+}-зависимых K^+-каналов [1,2] и торможением нейронов [8]. Ранее нами также было показано, что активация RyR может приводить к торможению спонтанной или вызванной секреции АХ через активацию низкопроводящих Ca^{2+}-зависимых K^+-каналов [1,2]. Вопрос о возможном

участии SK-каналов в торможения секреции АХ при сочетанной активации холином пресинаптических α7-нХР и RyR предстоит выяснить в дальнейших экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балезина О.П. и др*. //ДАН (2004) 397(2): 271-5;
2. *Балезина О.П. и др*. //Рос. Физиол. Жур. (2005) 91(1): 61-70;
3. *Балезина О.П. и др*. //Бюлл. Эксп. Биол. Мед. (2006) 142(1): 17-21;
4. *Федорин В.В., Балезина О.П.* //Нейрохимия (2008) 25(1-2): 99-104;
5. *Faria M. et al.* //Synapse (2003) 49(2): 77-88;
6. *Papke R.L. et al.* //Eur. J. Pharmacol. (2000) 393(1-3): 179-95;
7. *Sharma G., Vijayaraghavan S.* //Proc. Nat. Acad. Sci. USA (2001) 98(7): 4148-53;
8. *Sharma G.et al.* //J. Neurosci. (2008) 28(10): 2563-75;
9. *Tanaki H. et al.* //Eur. J. Neurosci. (2000) 12: 2475-85;
10. *Wonnacott S.* //Trends Neurosci. (1997) 20(2): 92-8.

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА ОСВОБОЖДЕНИЕ МЕДИАТОРА И ВЫЯВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТА ЦИСТАТИОНИН γ-ЛИАЗЫ В ОБЛАСТИ НЕРВНО-МЫШЕЧНОГО СИНАПСА МЫШИ

Герасимова Е.В.[1] Вологин С.Г.[2], Ситдикова Г.Ф.[1]

[1]Казанский государственный университет
[2]ТатНИИСХ Россельхозакадемия, Казань

Сероводород (H_2S) относится к новому классу газообразных посредников наряду с оксидом азота (NO) и монооксидом углерода. В тканях млекопитающих были обнаружены высокие концентрации H_2S, в плазме крови крыс содержание H_2S составляет 46мкМ, а в тканях мозга 50-100мкМ [1,2], что предположило возможную физиологическую роль этого газа. Также как NO и CO H_2S участвует в расслаблении гладкой мускулатуры [2,3], физиологические концентрации этого газа усиливают активность NMDA рецепторов и облегчают индукцию долговременной потенциации в гиппокампе [1]. Показано, что H_2S приводит к увеличению внутриклеточного кальция в астроцитах и вызывает кальциевые волны, опосредуя взаимодействие между нейронами и глией [4]. H_2S стимулирует капсаицин-чувствительные сенсорные нервные окончания, вызывая секрецию тахикининов, вещества Р и нейрокинина А, и вызывает дозозависимое сокращение мышц мочевого пузыря у крысы [5]. Ранее нами было показано, что H_2S усиливает спонтанное и вызванное

освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки, действуя на пресинаптическом уровне [6]. Эндогенно H_2S синтезируется из L-цистеина пиридоксаль-5'-фосфат-зависимыми ферментами – цистатионин β-синтазой (CBS) и цистатионин γ-лиазой (CSE). Экспрессия ферментов CBS и CSE является тканеспецифичной. CBS, являющийся основным ферментом синтеза H_2S в мозге, также экспрессируется в печени и почках [7,8,9]. Второй фермент, катализирующий синтез H_2S – CSE, обнаружен, в основном, в почках, печени, сердечно-сосудистой системе, гладких мышцах [1,2,10]. В скелетных мышцах теплокровных животных выявления ферментов синтеза H_2S не проводилось.

Целью работы являлось исследование эффектов H_2S на освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе и выявление мРНК цистатионин γ–лиазы в диафрагмальной мышце мыши.

Объект и методы исследования

Электрофизиологический метод. Эксперименты проводились на нервно-мышечном препарате диафрагмы мыши с использованием микроэлектродного внеклеточного отведения токов концевой пластинки (ТКП) – вызванной секреции медиатора и миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП) – спонтанной секреции медиатора в условиях постоянной перфузии препарата раствором Кребса для теплокровных животных (мМ): NaCl – 154; KCl – 5; $CaCl_2$ – 2; HEPES – 5 , $MgCl_2$ – 1, глюкоза – 11 (t=20±0.5°C, pH 7.2-7.4). Для устранения сокращения мышц в раствор добавляли d-тубокурарин (20-30мкМ).

Анализировали амплитуду, время нарастания (RT), время полуспада (τ) и частоту МТКП. В качестве донора H_2S использовали гидросудьфид натрия (NaHS) [1], так как в водных растворах он диссоциирует до иона натрия (Na^+) и гидросульфидного аниона (HS^-), который реагируя с протоном (H^+), образует H_2S. Известно, что в физиологическом растворе одна треть H_2S находится в недиссоциированной форме, а остальные две трети существуют в виде HS^- [1].

Проведение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для выявления экспрессии фермента цистатионин γ-лиазы (CSE), генерирующего H_2S в диафрагмальной мышце мыши использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для реакции ПЦР нами были сконструированы ген-специфичные праймеры с использованием информации о нуклеотидных последовательностях мРНК CSE, содержащейся в базе данных GenBank (локусы NM_145953). Разработанные пары праймеров получили название CSEm-f и CSEm-r. Данные праймеры являются гомологами олигонуклеотидов, описанных для выявления мРНК CSE у крысы *Rattus norvegicus* [2], и

модифицированы нами с учетом нуклеотидных последовательностей мРНК, выявленных для мыши [11]. Нуклеотидные последовательность праймеров приведены ниже: CSEm-f – 5'-aagcagtggctgcgttg-3', CSEm-r – 5'-tgtggtgtaatcgctgcc-3'. Ожидаемый размер амплифицируемых фрагментов ДНК, ограниченных праймерами CSEm-f и CSEm-r – 232 пар оснований (п.о.). Вычисление оптимальных термодинамических показателей для проведения реакции было проведено с помощью компьютерной программы «Oligo 6». На рисунке 1 представлены фрагменты мРНК CSE амплифицируемые в ОТ-ПЦР. Для проверки специфичности реакции полученные фрагменты кДНК обрабатывали рестриктазой HaeIII (СибЭнзим, Россия) в течение 2-х часов при температуре 37°С. Рестриктаза HaeIII разрезает полученные фрагменты в определенном месте с получением фрагментов известных размеров. Детекцию результатов проводили методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле, содержащим бромистый этидий (0.5мкг/мл). Для определения размеров амплифицированных фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярных размеров (СибЭнзим, Россия).

```
241 ttggaaaaag cagtggctgc gttggatggg gcaaagcaca gtttggcctt tgcatcgggt
301 cttgctgcca ccattacgat tacccatctt ttaaaagcag gagatgaaat catttgcatg
361 gatgaagtgt atggaggcac caacaggtac ttcaggaggg tggcatctga atttggactg
421 aagatttctt ttgtagattg ttccaaaacc aaattgctag aggcagcgat tacaccacaa
```

Рис.1. Последовательность мРНК CSE, амплифицируемая в ОТ-ПЦР (232п.о.). В прозрачной рамке – области посадки праймеров, в заштрихованной рамке – сайт распознавания рестриктазы HaeIII (разрезание на фрагменты 39 и 193п.о.).

Результаты исследования и их обсуждение. Аппликация донора H_2S - NaHS (100мкМ) в перфузируемый раствор Кребса приводила к быстрому и обратимому увеличению вызванной секреции медиатора. Наблюдалось увеличение амплитуды ТКП, которое к 10 минуте эксперимента достигло 145±10% (n=3; p<0.05) относительно контроля (рис.2А). При этом наблюдали увеличение частоты МТКП до 210±42% (n=4; p<0.05) относительно контроля к 15 минуте эксперимента. Амплитудно-временные характеристики МТКП в присутствии NaHS достоверно не изменялись: в контроле средняя амплитуда МТКП составила 0.432±0.012мВ, RT=0.5±0.06мс, τ=1.06±0.14мс, а после добавления NaHS средняя амплитуда МТКП составила 0.413±0.011мВ, RT=0.5±0.05мс, τ=1.01±0.1мс. Для блокирования фермента синтеза H_2S CSE использовали β-цианоаланин в концентрации 1мМ. Аппликация β-цианоаланина на нервно-мышечный препарат приводила к уменьшению амплитуды ТКП до 73±9% (n=5; p<0.05) (рис.2Б) по отношению к контролю.

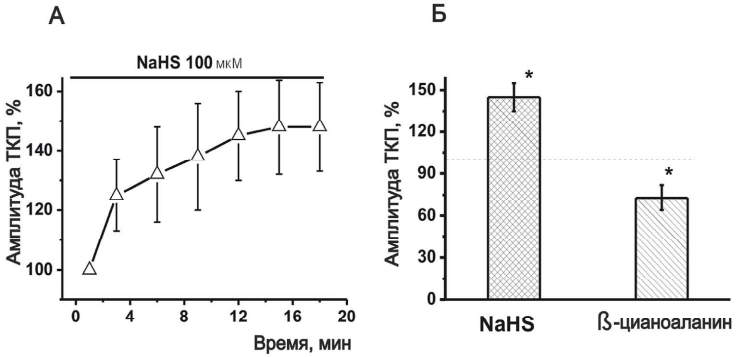


Рис.2. Эффекты донора H_2S – NaHS и блокатора фермента синтеза H_2S – β-цианоаланина на вызванную секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе мыши. А–Динамика амплитуды ТКП на фоне действия NaHS (100мкМ) при одиночной стимуляции. Б–Влияние NaHS (100мкМ) и β-цианоаланина на амплитуду ТКП.

Для выявления мРНК CSE в диафрагмальной мышце мыши использовали метод ОТ-ПЦР. При введении в реакцию ОТ-ПЦР препаратов мРНК, полученных из диафрагмы мыши, на электрофореграмме были выявлены фрагменты ДНК, лежащие в области 230-240п.о. Обнаруженные фрагменты по своему размеру соответствуют теоретически ожидаемым: 232п.о. – для мРНК CSE (рис.3, колонка 1).

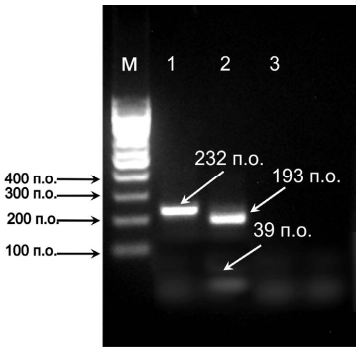


Рис.3 Выявление мРНК CSE в диафрагме мыши методом ОТ-ПЦР. М–маркер молекулярных размеров; 1– фрагмент ДНК, специфичный мРНК CSE; 2–амплифицированный фрагмент, обработанный рестриктазой HaeIII; 3–контроль (образец, обработанный рибонуклеазой А).

Амплификационный синтез ДНК отсутствовал в образцах, предварительно обработанных рибонуклеазой А, что свидетельствует о том, что молекулярной мишенью в реакции ОТ-ПЦР служила мРНК, а не геномная ДНК (рис.3, колонка 3). Для проверки специфичности реакции ОТ-ПЦР, образовавшиеся амплификоны были обработаны рестриктазой HaeIII, которая разрезает продукт реакции в строго определенном

участке. В дальнейшем полученные фрагменты были подвергнуты электрофоретическому разделению. При анализе размеров продуктов рестрикции фрагмента 232п.о. на электрофореграмме выявлены полосы, соответствующие фрагментам с массой 39 и 193п.о., что соответствует теоретически ожидаемым (рис.3, колонка 2). На основании полученных результатов можно сделать вывод об экспрессии мРНК CSE в изученных образцах.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что экзогенный H_2S в микромолярных концентрациях оказывает облегчающее влияние на спонтанное и вызванное освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе мыши. Анализ влияния сероводорода на спонтанную секрецию медиатора показал увеличение частоты МТКП без изменения их амплитудно-временных параметров, что свидетельствует об отсутствии влияния газа на чувствительность постсинаптических холинорецепторов. Увеличение освобождения медиатора может быть связано с изменением элекрогенеза двигательного нервного окончания и усилением входящего кальциевого тока, тем более, что из литературных данных известно, что гипералгезия, вызванная аппликацией NaHS, может быть связана с активацией Т-типа Ca^{2+}-каналов в первичных афферентных нейронах у крысы [12]. В нейрональных клетках H_2S сероводород вызывал повышение цитозольной концентрации ионов кальция путем активации L-тип Ca^{2+}-каналов [13]. Возможно также, что H_2S непосредственно вмешивается в механизмы экзоцитоза синаптических везикул, связанные с трансформацией белков SNARE-комплекса, о чем свидетельствует увеличение частоты МТКП. Известно, что в водных растворах H_2S обладает свойствами восстановителя [9] и способен восстанавливать дисульфидные связи белковых молекул [9,14]. Можно предположить, что H_2S приводит к изменению окислительно-восстановительного статуса SNARE комплекса, что влияет на стабильность белковых взаимосвязей [15,16]. Кроме того, H_2S может усиливать синтез цАМФ в нейрональных клетках [17]. Повышение внутриклеточной концентрации цАМФ приводит усилению секреции медиатора за счет активации протеинкиназы А и регуляции внутриклеточного уровня Ca^{2+} [18,19].

Для выявления возможности эндогенного синтеза H_2S в области нервно-мышечного синапса определяли фермент синтеза CSE и анализировали эффекты блокатора CSE на освобождение медиатора. С использованием метода ОТ-ПЦР была показана специфическая экспрессия мРНК CSE в диафрагмальной мышце мыши. Нельзя исключить также наличия фермента в нервных окончаниях, Шванновских клетках или гладкомышечных клетках сосудов, также присутствующих в исследуем образце, несмотря на преобладание массовой доли скелетно-мышечной ткани. В любом случае, наличие фермента предполагает синтез газа в области нервно-мышечного

синапса. На это указывают и эксперименты с блокированием CSE, который снижал вызванное освобождение медиатора, что противоположно эффектам H_2S. Синтез H_2S регулируется как на уровне экспрессии ферментов CSE и CBS в тканях, так и путем изменения их активности [20,21]. Так, например, в гладкомышечных клетках NO может регулировать уровень H_2S путем увеличения активности CSE через нитрозилирование цистеиновых остатков молекулы. Кроме того, NO увеличивает экспрессию фермента, поглощение цистеина и активность цГМФ-зависимой протеинкиназы, которая также является стимулятором фермента CSE [22].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствует о том, что сероводород может синтезироваться в области нервно-мышечного синапса в диафрагмальной мышце мыши и модулировать передачу сигнала в системе мотонейрон-скелетная мышца.

Работа поддержана грантами Министерства образования №2.1.1/786, РФФИ №09-04-00748а и «Ведущая научная школа» НШ-3368.2008.4

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abe K., Kimura H.* //J. Neurosci. (1996) 16: 1066-71;
2. *Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R.* //EMBO J. (2001) 20: 6008-16;
3. *Teague B., Asiedu S., Moor P.K.* //Br. J. Pharmacol. (2002) 137: 139-45;
4. *Nagai Y. et al.* //FASEB J. (2004) 18: 557-9;
5. *Patacchini R. et al.* //Br. J. Pharmacol. (2004) 142: 31-4;
6. *Герасимова Е.В., Ситдикова Г.Ф., Зефиров А.Л.* //Нейрохимия (2008) 25(1-2): 138-45;
7. *Hosoki R., Matsuki N., Kimura H.* //Biochem. Biophys. Res. Comm. (1997) 237: 527-31;
8. *Meier M. et al.* //EMBO J. (2001) 20: 3910-6;
9. *Wang R.* //FASEB J. (2002) 16: 1792-8;
10. *Lu Y. et al.* //Biochem. Biophys. Res. Comm. (1992) 189: 749-58;
11. *Ishii I. et al.* //Biochem. J. (2004) 381: 113-23;
12. *Kawabata A. et al.* //Pain (2007) 132: 74-81;
13. *Garcia-Bereguiain M.A. et al.* //Antiox. Redox Signal. (2008) 10: 31-41;
14. *Qu K. et al.* //Neurochem. Int. (2008) 52: 155-65;
15. *Duman J.G., Forte J.G.* //Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2003) 285: C237-49;
16. *LoPachin R.M., Barber D.S.* //Toxicol. Sci. (2006) 94(2): 240-55;
17. *Kimura M.* //Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 267: 129-33;
18. *Takasago T., Imagawa T., Shigekawa M.* //J. Biochem. (1989) 106(5): 872-7;
19. *Terrian D.M., Ways D.K.* //J. Neurochem. (1995) 64(1): 181-90;
20. *Eto K. et al.* //J. Neurosci. (2002) 22: 3386-91;
21. *Chaudhari K., Wisniewski N.H., Bearden S.E.* //FASEB J. (2007) 21: 577;
22. *Fiorucci S. et al.* //Gastroenterology (2006) 131: 259-71.

РОЛЬ АМИНОКИСЛОТ ОРНИТИНОВОГО ЦИКЛА В ЭФФЕКТАХ L-АРГИНИНА НА СЕКРЕЦИЮ МЕДИАТОРА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ ЛЯГУШКИ

Герасимова Е.В., Яковлев А.В., Яковлева О.В., Хаертдинов Н.Н., Ситдикова Г.Ф.

Казанский государственный университет

Аргинин относится к условно незаменимым аминокислотам, участвующим во многих физиологических процессах. L-аргинин в клетку поступает путем распада белков, из крови с помощью катионных транспортеров, а также рециклизуется в цикле Кребса-Гензелейта, в так называемом орнитиновом цикле [5]. L-аргинин является субстратом для всех изоформ NO-синтаз (NOS), синтезирующих оксид азота II (NO) и цитруллин. В орнитиновом цикле он является предшественником L-орнитина, L-цитруллина, полиаминов, мочевины, агматина [2,10]. В последнее время появляются данные о нейромодуляторной функции L-аргинина, независимой от синтеза оксида азота [7,11]. Так, например, показано, что L- и D-аргинин вовлечены в механизм ингибирования NO-синтазы в мозге крыс [3], связывают активные формы кислорода, предотвращая повреждения миокарда крысы [6]. Таким образом, эффекты L-аргинина в разных тканях могут опосредоваться как образованием NO, так и других его метаболитов, так например, показано, что L-цитруллин вызывает угнетение секреции медиатора из двигательного нервного окончания крысы [1]. В нервно-мышечном синапсе лягушки L-аргинин в концентрации 0.1мМ, являясь субстратом для NO-синтазы, угнетает вызванную секрецию медиатора и модифицирует работу потенциалзависимых калиевых каналов нервного окончания, что аналогично эффектам экзогенного NO [9,13,16]. L-аргинин в концентрации 1мМ оказывает противоположные эффекты, усиливая вызванную секрецию медиатора из нервного окончания лягушки, не изменяя кинетики выходящих калиевых токов [16].

Целью исследования было выявление роли аминокислот орнитинового цикла – L-цитруллина и L-орнитина в NO-независимых эффектах L-аргинина на освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки.

Объект и методы исследования. Эксперименты проводили на нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной мышцы озерной лягушки в осенне-зимний период в условиях постоянной перфузии препарата раствором Рингера для холоднокровных животных (мМ): NaCl – 118.0; KCl – 2.5; $CaCl_2$ – 0.3-0.4; $MgCl_2$ – 2.0; $NaHCO_3$ – 2.4 (t=20±0.5^{o}C, pH 7.2-7.4). Двигательный нерв раздражали одиночными

электрическими стимулами сверхпороговой амплитуды (частота – 0.3-0.4имп/с). Регистрацию биопотенциалов производили с помощью внеклеточных микроэлектродов с диаметром кончика 2-3мкм, заполненных раствором NaCl (2М) и имеющих сопротивление 2-5МΩ, подведенных к проксимальной части нервной терминали – 5-30мкм от последнего миелинизированного сегмента под визуальным контролем (с помощью поляризационно-интерференционного микроскопа, х400). Исследовали трехфазные ответы нервного окончания и токи концевой пластинки (ТКП), возникающие в ответ на раздражение двигательного нерва. Первая положительная фаза ответа представляет собой пассивный выходящий ток, генерируемый распространяющимся потенциалом действия, вторая фаза отражает входящие Na^+-токи в участке отведения, третья фаза отражает выходящие K^+-токи через мембрану нервного окончания [12]. В условиях низкой внеклеточной концентрации Ca^{2+} (0.2-0.4мМ) третья фаза ответа отражает калиевые токи в основном через потенциалзависимые K^+-каналы [14].

Ответы нервного окончания и ТКП усреднялись по 30 реализациям. Проводили анализ амплитуды ТКП, параметров второй и третьей фаз ответа нервного окончания. Квантовый состав ТКП рассчитывался по методу выпадений: $m=\ln N_0/N$, где N – число раздражений, N_0 – число раздражений, не вызвавших ТКП [15]. Для статистической обработки полученных данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента.

В опытах использовали следующие фармакологические препараты: L-аргинин – субстрат NO-синтазы, неспецифический ингибитор NO-синтазы – NG-nitro-L-arginine methylester (L-NAME), L-цитруллин, L-орнитин (Sigma, США).

Результаты исследования и их обсуждение. Аппликация L-аргинина в концентрации 1мМ в перфузируемый раствор приводила к быстрому изменению вызванной секреции медиатора, что подтверждает полученные ранее результаты [16]. Происходило увеличение квантового состава ТКП до 1012.6±156.2% (n=3 $p<0.05$) относительно контроля (рис.1). Параметры ответа нервного окончания не изменялись. Было предположено, что L-аргинин, являясь субстратом для синтеза NO, вовлечен в механизм ингибирования NO-синтазы. Поэтому была проведена серия экспериментов с предварительным блокированием NO-синтазы. Ингибитор NO-синтазы L-NAME в концентрации 0.1мМ увеличивал квантовый состав до 175.8±12.36% через 20мин перфузии относительно контроля и уменьшал амплитуду 3 фазы до 70.7±8.8% (n=8 $p<0.05$) (рис.1), что связано с угнетением тонического синтеза NO в нервно-мышечном синапсе [13]. В условиях ингибирования NO-синтазы (инкубация нервно-мышечного препарата в растворе Рингера, содержащем L-NAME) L-аргинин (1мМ) приводил к увеличению

квантового состава до 466.6±21.5% (n=6 p<0.05) (рис.1) через 10-15 минут эксперимента относительно контроля и не изменял 3 фазу ответа нервного окончания, то есть блокирование NO-синтазы снимает часть эффектов L-аргинина (1мМ) на секрецию медиатора.

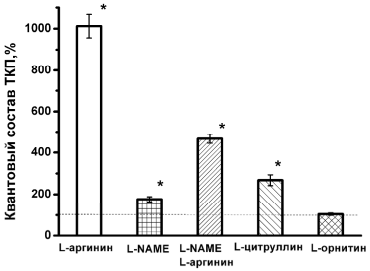


Рис.1. Влияние аминокислот орнитинового цикла и блокатора NO-синтазы L-NAME на секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. Квантовый состав ТКП (в %) при действии L-аргинина (1мМ), L-NAME (0.1мМ), L-аргинина (1мМ) на фоне L-NAME (0.1мМ), L-цитруллина (1мМ) L-орнитина (1мМ).

L-аргинин и его метаболиты могут иметь и собственные эффекты на секрецию медиатора, независимые от синтеза NO. Аппликация L-цитруллина в концентрациях 0.1-0.5мМ не приводила к достоверным изменениям амплитуды, квантового состава ТКП и параметров ответа нервного окончания. В концентрации 1мМ L-цитруллин повышал квантовый состав ТКП до 268±26.3% (n=4 p<0.05), не изменяя электрогенез нервного окончания (рис.1). Можно предположить, что повышение концентрации L-аргинина будет приводить к усилению образования L-цитруллина, который в высоких концентрациях вызывает увеличение освобождения медиатора. L-аргинин также используется ферментом аргиназой, которая превращает его в орнитин – предшественник полиаминов и мочевины [8]. Аппликация L-орнитина в концентрациях 0.1-1мМ не изменяла ни квантового состава ТКП, ни параметров ответа нервного окончания. Это указывает на то, что L-орнитин не вовлечен в реализацию эффектов L-аргинина в высоких концентрациях на вызванную секрецию медиатора из нервного окончания.

Таким образом, L-аргинин в высоких концентрациях повышает секрецию медиатора, что противоположно действию NO, и значит не связано с усилением синтеза газа. В условиях ингибирования NO-синтазы часть эффекта L-аргинина снималась. Это указывает на то, что L-аргинин в высоких концентрациях приводит к ингибированию NO-синтазы, например, в результате образования других его метаболитов: цитруллина, орнитина, агматина. Показано, например, что агматин, продукт декарбоксилирования L-аргинина ингибирует все изоформы NO-синтазы [3,4]. Одним из метаболитов L-аргинина в реакции синтеза NO является L-цитруллин, который также как и аргинин усиливал секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки в отличие от данных, полученных на нервно-мышечных синапсах

теплокровных животных [1]. Это указывает на то, что эффект аргинина может быть связан с продукцией L-цитруллина и не опосредуется другим его метаболитом – L-орнитином. Однако надо отметить, что эффект L-цитруллина был менее выраженным, чем собственное влияние L-аргинина, а, кроме того, быстро развивающийся во времени действие L-аргинина предполагает наличие собственных внутриклеточных мишеней в нервном окончании [6].

Работа поддержана грантами РНП №2.1.1/786, РФФИ №09-04-00748а и «Ведущая научная школа» – НШ-3368.2008.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Barroso A., Oliveira L. et al.* //Br. J. Pharmacol. (2007) 151(4): 541-50;
2. *Braissant O et al.* //Brain Res. Mol. (1999) 70(2): 231-41;
3. *Castellano M.A. et al.* //Neurosci. Lett. (2001) 314: 127-30;
4. *Galea E. et al.* //Biochem. J. (1996) 15(316): 247-9;
5. *Gilad G.M. et al.* //Neuroreport (1996) 29(11): 1730-2;
6. *Lass A. et al.* //Mol. Pharmacol. (2002) 61(5): 1081-8;
7. *Mori M., Gotoh T.* //Biochem. Biophys. Res. Comm. (2000) 275(3): 715-9;
8. *Que L.G. et al.* //Nitric Oxide: Biol. Chem. (2002) 6(1): 1-8;
9. *Thomas S., Robitaille R.* //J. Neurosci. (2001) 21(4): 1087-95;
10. *Wiesinger H.* //Prog. Nuerobiol. (2001) 64(4) 365-91;
11. *Дьяконова Т.Л.* //ДАН (2005) 400(4): 557-63;
12. *Зефиров А.Л., Халилов И.А.* //БЭБиМ (1985) 49(1): 7-10;
13. *Зефиров А.Л. и др.* //Рос. Физиол. Журнал (2001) 87(4): 499-506;
14. *Зефиров А.Л., Халилов И.А, Хамитов Х.С.* //Нейрофизиол. (1987) 19(4): 467-72;
15. *Каменская М.А.* //Успехи Физиол. Наук (1972) 3(3): 22-63;
16. *Ситдикова Г.Ф. и др.* //ДАН (2003) 393(5): 15-9.

АФК – ОПОСРЕДУЕМЫЙ МЕХАНИЗМ МОДУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУЖДЕНИЯ В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ ЛЯГУШКИ: РОЛЬ ХОЛЕСТЕРОЛЛА НЕРВНОГО ОКОНЧАНИЯ

Гиниатуллин А.Р.[1], Петров А.М.[1], Акулов А.Н.[2], Шаймуратов Р.И.[1], Зефиров А.Л.[1]

[1]Казанский государственный медицинский университет
[2]Казанский институт биологии и биофизики КНЦ РАН

Введение. Двигательные нервные окончания (НО) химических синапсов содержат большое количество везикул, заполненных

молекулами нейромедиатора. Часть синаптических везикул (СВ) прикреплена в специализированных участках пресинаптической мембраны (активных зонах), где происходит процесс экзоцитоза - слияние СВ с пресинаптической мембраной, в результате которого порции (кванты) медиатора секретируется в синаптическую щель. Затем в процессе эндоцитоза происходит захват мембранного фрагмента слившейся везикулы внутрь НО - образование новой везикулы, которая после заполнения нейромедиатором может повторно участвовать в его секреции. Эти два процесса формируют так называемый везикулярный цикл, который за счет рециклирования СВ, обеспечивает сохранение высокого уровня секреции медиатора при высокочастотной активности синапса [1].

Важную роль в координации процессов экзо- и эндоцитоза во времени играют липиды мембран: холестеролл, сфинголипиды и фосфотидилинозитолы [4,8], большое количество которых обнаружено и в мембранах СВ, и в плазматической (пресинаптической) мембране. Ранее в экспериментах на нервно-мышечных препаратах лягушки нами было показано что удаление холестеролла из поверхностных плазматических мембран с помощью метил-β-циклодекстрина (МЦД) приводит к изменениям в кругообороте СВ, выраженным в ослаблении как экзоцитоза СВ, так и угнетение процессов, приводящих к восстановлению популяции СВ немедленно готовых к освобождению медиатора. С чем же могут быть связаны эти эффекты? Исходя из литературных данных, вытеснение холестеролла может изменять кинетику работы ионных каналов НО, а так же активность систем вторичных посредников контролирующих процесс рециклирования СВ [3,10]. Имеются данные и о том, что присутствие холестеролла в цитоплазматической мембране необходимо для ограничения активности мембранно-связанной NADH-оксидазы, одного из главных в клетке ферментов синтезирующих активные формы кислорода (АФК) [9]. Ранее нами было показано, что перекись водорода в нервно-мышечном синапсе лягушки угнетает секрецию ацетилхолина, определяя активность белков SNARE комплекса, играющих ключевую роль в процессе секреции медиатора из НО [5,6]. В данном исследовании анализируется возможность участия АФК – перекиси водорода в изменении кругооборота СВ вызванного удалением холестеролла из мембраны НО.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на изолированных нервно-мышечных препаратах портняжных и кожно-грудинных мышц лягушек (*Rana Ridibunda*) в осенне-зимний период. Мышцу фиксировали в стеклянной ванночке и в течение всего эксперимента перфузировали стандартным раствором Рингера (pH 7.2-7.4; 20-23^{o}C) для холоднокровных [5]. Раздражение двигательного нерва осуществляли прямоугольными электрическими

импульсами длительностью 0,1мс сверхпороговой амплитуды. Все использованные вещества фирмы «SIGMA» (США).

Электрофизиология. Для предотвращения сокращения мышцу рассекали. Отведение токов концевой пластинки (ТКП) производили в условиях двух-электродной фиксации мембранного потенциала мышечных волокон с использованием стеклянных микроэлектродов, имеющих сопротивление 3-5МОм и заполненных 2.5М KCl. Подробнее метод описан в [7]. При регистрации ТКП двигательный нерв раздражали либо одиночными импульсами (1 раздражение в 20с), либо высокочастотной серией импульсов (20Гц, 3мин). Сигналы оцифровывались и анализировались с использованием АЦП LA-2, совмещенной с компьютером.

Флуоресцентная микроскопия. В экспериментах использовали флуоресцентный маркер – FM1-43 («Biotium» США), который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся синаптических везикул («загружается» в НО). А так же был использован АФК чувствительный маркер 5-(и 6)-карбокси-2`,7`-дихлородигидрофлуоресцин диацетат (карбокси H_2DCFDA) («Invitrogen» США). Подробнее методика описана в [2,6].

Спектрофотометрия. Для определения количества перекиси водорода в исследуемой ткани использовали метод окисления железа в ксиленовом оранжевом (FOX) подробнее описанный в [6].

Результаты. Ранее нами было показано, что инкубация нервно-мышечных препаратов после загрузки нервных терминалей красителем FM 1-43 (2-3мкмоль/л) в течение 20мин в растворе Рингера содержащего 1ммоль/л метил-β-циклодекстрина (МЦД), заметно замедляла выгрузку красителя особенно вначале высокочастотной стимуляции. Так через 15с стимуляции яркость свечения снижалась только до 89±2% (до 82-78% в контроле), а через 3мин до 57±3% (42±2% в контроле) (n=7) (рис.1А). Регистрируя токи концевой пластинки (ТКП) и анализируя динамику изменения амплитуды ТКП в ходе длительной высокочастотной стимуляции двигательного нерва (20Гц, 3мин) препаратов, предварительно инкубированных в растворе, содержащим 1ммоль/л МЦД, было показано, что в отличие от контроля снижение амплитуды ТКП наблюдалось сразу после начала высокочастотной стимуляции, а депрессия амплитуды ТКП была более выраженной. Так, через 30с раздражения амплитуда ТКП снизилась до 49±3% (n=5) (72±2% в контроле; n=6), а через 3мин – составила – 14±2% (n=5) (16±4% в контроле; n=6) (рис.1Б). Восстановление амплитуды ТКП (стимуляция нерва редкими импульсами с частотой 0.05Гц) происходило в течение 1-4мин (время полувосстановления 28±6с), что не отличалось от контрольных значений. Обнаруженный эффект МЦД имел

пресинаптическую природу, на что указывало отсутствие эффектов на амплитудно-временны параметры спонтанной секреции медиатора (не показанные данные).

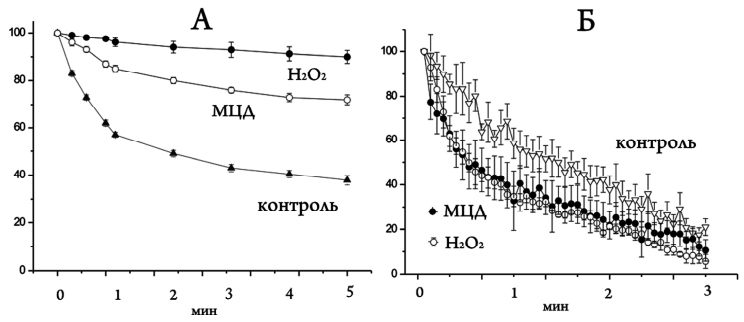


Рис.1. Эффект метил-β-циклодекстрина и перекиси водорода: А–выгрузку маркера FM 1-43; Б–на амплитуду ТКП при длительном высокочастотном раздражении. А–По оси ординат–интенсивность свечения в процентах от исходного уровня до начала раздражения; по оси абсцисс–время раздражения в минутах; Б–по оси ординат–амплитуда ТКП в процентах от амплитуды первого ТКП в серии; по оси абсцисс–время раздражения в мин.

Интересно, что при инкубации нервно-мышечных препаратов в растворе Рингера содержащим МЦД, происходило увеличение уровня эндогенных АФК. На это указывают результаты экспериментов с предварительно загруженными АФК-чувствительным красителем H2DCFDA (10мкмоль/л) нервно-мышечными препаратами. Аппликация МЦД привела к обратимому увеличению интенсивности флуоресценции как нервных терминалей (в большей степени), так и мышечных волокон, что указывало на увеличение количества АФК в исследуемом образце. Так к 20мин аппликации агента интенсивность флуоресценции увеличилась на 29±2,3% (n=6, $p<0.05$) от исходных значений. Однако, при использовании блокатора NADH-оксидазы дифениленйодониума (DPI) в концентрации 1мкмоль/л, достоверных изменений интенсивности флуоресценции при аппликации МЦД не наблюдалось. Об увеличение уровня эндогенных АФК, так же говорят результаты полученные при применении спектрофотометрического метода определения количества перекиси водорода. Уровень эндогенной перекиси водорода в отличие от контроля был в два раза выше (n=4, $p<0.05$) в тех препаратах, которые инкубировали в присутствии МЦД в омывающем растворе.

В следующих сериях экспериментов исследовали влияние экзогенной перекиси водорода на процесс секреции медиатора при длительной высокочастотной стимуляции двигательного нерва с применением флуоресцентного красителя FM 1-43 (оценка

интенсивности процесса экзоцитоза) и регистрируя ТКП в условиях двухэлектродной фиксации потенциала (оценка динамики изменения амплитуды ТКП).

Инкубация нервно-мышечного препарата в течение 20мин в растворе Рингера содержащим H_2O_2 (300мкмоль/л) после загрузки терминалей красителем FM 1-43, так же как в случае МЦД, но более значительно замедляла выгрузку красителя в ходе высокочастотной стимуляции двигательного нерва. К 15с стимуляции яркость свечения снижалась только до 97±0,09%, а через 3мин до 92±3% (n=4) (рис.1 А).

В другой серии экспериментов эффекты H_2O_2 на процесс секреции медиатора оценивали по динамики изменения амплитуды ТКП в ходе длительной высоко частотной стимуляции двигательного нерва. После окончания такого протокола стимуляции двигательный нерв раздражали редкими импульсами (0.05Гц) для определения динамики восстановления амплитуды ТКП. В контрольных экспериментах вслед за коротким периодом облегчения наблюдалось постепенное, почти линейное, уменьшение амплитуды ТКП. Через 30с стимуляции амплитуда ТКП составляла 72±2%, а через 3 минуты – 16±4% (n=6) от исходной величины. Восстановление амплитуды ТКП до исходного уровня наблюдалось в течение 1-4мин (время полувосстановления ~27±7 с, n=6) (рис.1Б). В отличие от контроля в препаратах выдержанных в H_2O_2 (300мкмоль/л) снижение амплитуды ТКП наблюдалось сразу после начала высокочастотной стимуляции с более выраженной депрессией амплитуды ТКП. Так, через 30с раздражения амплитуда ТКП снизилась до 51±5,5%, а через 3 минуты составила 9±3,6% (n=5) (рис.1Б). Причем восстановление амплитуды ТКП до исходного уровня не наблюдалось, а так же резко замедлялась динамика восстановления (время полувосстановления 50±5с). Обнаруженный эффект был сопоставим с тем что наблюдался при действии МЦД. Предварительная инкубация препаратов с растворе Рингера содержащим неспецифический антиоксидант N-ацетилцистеин (NAC) в концентрации 1ммоль/л, полностью устраняла обнаруженный эффект перекиси водорода на динамику изменения амплитуды ТКП в ходе высокочастотной стимуляции двигательного нерва. Через 30с стимуляции амплитуда ТКП составляла 70±3%, а через 3 минуты – 14±4% (n=4) от исходной величины. Однако, применение NAC в экспериментах с МЦД приводило лишь к частичному снижению выраженности депрессии амплитуды ТКП, указывая на сложность и многокомпонентность последствий удаления холестеролла при действии МЦД.

Обсуждение. Полученные результаты позволяют говорить о том, что как метил-β-циклодекстрин так и перекись водорода угнетают процесс экзоцитоза СВ, что сопровождается более выраженной депрессией секреции медиатора при высокочастотной активности, в

результате чего за три мин высокочастотного раздражения освобождается меньше медиатора, чем в контроле. Об этом так же свидетельствует существенное замедление выгрузки красителя. Однако этот результат в случае МЦД не всегда можно рассматривать как следствие угнетения эндоцитоза СВ. Уменьшение захвата красителя (не показанные данные) можно объяснить снижением на 50% экзоцитоза СВ (количества освобожденных квантов медиатора) при высокочастотной активности. Другими словами, эндоцитоз не нарушен, и полностью возвращает встроившийся в ходе экзоцитоза мембранный материал СВ обратно в НО, восстанавливая популяцию СВ до исходного уровня. Это положение подтверждается тем, что время восстановления амплитуды ТКП не меняется. Однако в случае перекиси водорода быстрая депрессия амплитуды ТКП и неполное ее восстановление после стимуляции с увеличением времени восстановления может указывать так же и на нарушение процесса эндоцитоза СВ. Исследования в этом направлении ведутся нами в данный момент. Эти данные, а так же результаты спектрофотометрических исследований и экспериментов с АФК-чувствительным красителем H2DCFDA, позволяют предположить, что одним из результатов удаления холестеролла из мембраны НО при помощи МЦД, может быть образование АФК – в частности, H_2O_2. Возможно, экстракция холестеролла опосредует образование АФК мембранно-связанной NADH-оксидазой нервной терминали и/или мышечных волокон [9], что требует дальнейшего исследования. С этим согласуются данные, полученные при работе с блокатором этой систем – DPI, результаты экспериментов с применением неспецифического антиоксиданта – N-ацетилцистеина.

Полученные данные свидетельствуют об участии эндогенных АФК в реализации сложного и многокомпонентного эффекта на процесс секреции СВ, вызванного уменьшением количества мембранного холестеролла НО. Известно что, при снижении содержания этого липида в мембранах НО, может происходить «распад» липидных плотиков структурирующих мембрану и выполняющих функцию платформ для локализации и активизации белков экзоцитоза – SNARE комплекса, что в итоге может опосредовать нарушение экзоцитоза СВ. Однако, SNARE белки, в частности SNAP25, являются высоко чувствительными к действию перекиси водорода [6], что так же может иметь большое значение и вносить вклад в нарушение секреции медиатора из НО вызванное уменьшением количества мембранного холестеролла НО.

Работа поддержана РФФИ №08-04-00203 и НШ №3368.2008.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зефиров А.Л.* //Рос. Физиол. Журнал (2007) 93(5): 554-63;
2. *Зефиров А.Л. и др.* //Цитология (2003) 45(12): 1163-71;
3. *Петров А.М., Гиниатуллин А.Р., Зефиров А.Л.* //Нейрохимия (2008) 25(3): 202-10;
4. *Di Paolo G., De Cailli P.* //Nature (2006) 443: 651-7;
5. *Giniatullin A. et al.* //J. Neurochem. (2006) 98: 1789-97;
6. *Giniatullin A.R. et al.* //J. Physiol. (2005) 565 (1): 229-42;
7. *Glavinovi'c M.I.* //J. Physiol. (1979) 290: 467-80;
8. *Rohrbough J., Broadie K.* //Nature Rev. Neurosci. (2005) 6: 139-50;
9. *Weixing H. et al.* //Hypertension (2008) 51(2): 481-7;
10. *Zamir O., Charlton M.P.* //J. Physiol. (2006) 571(1): 83-99.

О МЕХАНИЗМАХ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ И ДИСРЕГУЛЯЦИИ

Гончаров Н.В.[1], Прокофьева Д.С.[1], Войтенко Н.Г.[1], Авдонин П.В.[2], Кузнецов С.В.[3], Зинченко В.П.[4], Миндукшев И.В.[3], Авдонин П.П.[2], Бабаков В.Н.[1], Глашкина Л.М.[1]

[1]НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, СПб
[2]Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Москва
[3]Институт эволюционной физиологии и биохимии им.И.М.Сеченова РАН, СПб
[4] Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Химическое вещество можно назвать медиатором (трансмиттером), если оно удовлетворяет ряду критериев. В клетках должны содержаться ферменты, необходимые для синтеза этого вещества. При действии сигнальных агентов это вещество должно выделяться, реагировать со специфическим рецептором и вызывать биологическую реакцию. Должны существовать механизмы, прекращающие действие этого вещества. Всем этим критериям удовлетворяет ацетилхолин (АХ). АХ представляет собой сложный эфир уксусной кислоты и холина. Он синтезируется в клетке из холина и активной формы ацетата – ацетилкоэнзима А (АцКоА) – при помощи фермента холинацетилтрансферазы (ХАТ, K_D для холина ~1мМ и K_D для АцКоА ~10мкМ), после чего депонируется в пузырьках (везикулах) диаметром 40-60нм [1]. Транспорт АХ в везикулы осуществляется благодаря протонному градиенту между внутренней средой везикулы и цитоплазмой. В каждом пузырьке содержится от 6000 до 20000 молекул

АХ [2,3]. Нервный импульс, достигший пресинаптической мембраны, вызывает ее деполяризацию, в результате чего открываются потенциал-зависимые кальциевые каналы. Концентрация Ca^{2+} в цитоплазме нервного окончания повышается, белок синаптического пузырька синаптотагмин связывается с Ca^{2+} и тем самым принимает участие в регуляции экзоцитоза (в том числе путём реорганизации примембранного цитоскелета). Для выброса содержимого одного пузырька требуется примерно 4 иона Ca^{2+}. Предшествующий слиянию синаптических пузырьков и плазмолеммы процесс узнавания синаптическим пузырьком пресинаптической мембраны происходит при взаимодействии мембранных белков (синаптобревин, SNAP-25, синтаксин и другие). Высвобождение медиатора происходит «квантами», т.е. путем полного опорожнения каждого отдельного пузырька. В нормальных условиях под влиянием сильного импульса выделяется примерно 100-200 квантов медиатора – количество, достаточное для инициирования потенциала действия в постсинаптическом нейроне. Незначительное количество квантов нейромедиатора постоянно (спонтанно) секретируется в синаптическую щель и в других сегментах нервного волокна [1]. Выделенный в синаптическую щель АХ вступает во взаимодействие с рецептором, входящим в состав постсинаптической мембраны. В зависимости от чувствительности к той или иной группе химических соединений рецепторы АХ делятся на М-рецепторы (метаботропные, активируемые мускарином) и Н-рецепторы (ионотропные, активируемые никотином). М-рецепторы имеются во многих нейронах автономной нервной системы, Н-рецепторы присутствуют в ганглиях и скелетных мышцах. Н-рецепторы - это ионотропные каналы, проницаемые для Na^+ и K^+. Вход Na^+ вызывает сокращение мышц. В то же время, сократимость кардиомиоцитов снижается. Эти различия обусловлены разными типами рецепторов АХ. Существует 5 типов М-рецепторов [4]. За исключением M_5, они имеют фармакологическую специфичность: так, холинергический антагонист пирензипин имеет наибольшее сродство для M_1-рецептора, сопряженного главным образом с G_q-белком и обнаруженного в ганглиях, экзокринных железах и ЦНС. M_2-рецептор, обнаруженный в сердце, сопряжен с G_i-белком. M_3-рецептор сопряжен с G_q-белком, имеется в разных органах и тканях: так, воздействие АХ на гладкую мускулатуру бронхов и кровеносных сосудов обусловливает бронхоконстрикцию и вазоконстрикцию, соответственно. M_4-рецептор сопряжен с G_i-белком и обнаружен в ЦНС.

Н-рецептор имеет массу 290кДа и состоит из 5 субъединиц, расположенных симметрично вокруг центральной поры [5,6]. Различают 2 подтипа Н-рецепторов, мышечный и нейрональный. Нейрональные Н-рецепторы не чувствительны к α-бунгаротоксину, в отличие от мышечных.

После выделения медиатора должна наступить фаза его быстрой инактивации, или удаления, чтобы подготовить синапс к восприятию нового импульса. В холинергических синапсах это происходит двумя путями. Первый путь заключается в том, что АХ подвергается ферментативному гидролизу с образованием неактивных метаболитов холина и ацетата. Второй путь – это энергозависимый активный транспорт АХ в нейрон, где он накапливается для последующего повторного использования. В большинстве отделов головного мозга гидролитический распад АХ на уксусную кислоту и холин катализируется ацетилхолинэстеразой (АХЭ, или истинная холинэстераза, КФ 3.1.1.7, которая гидролизует АХ быстрее, чем иные эфиры холина). Этим ферментом богаты пре- и постсинаптические мембраны. Каталитическая активность АХЭ очень высока: одна молекула АХЭ расщепляет около 5000 молекул АХ в секунду. Существуют и другие эстеразы, которые способны гидролизовать АХ, но значительно медленнее по сравнению с АХЭ. Одна из таких эстераз называется бутирилхолинэстераза (ложная холинэстераза, псевдохолинэстераза, КФ 3.1.1.8). Захват холина осуществляется посредством высокоаффинного переносчика с K_m ~1-5мкМ. Большая часть холина рециркулирует, возникая в результате гидролиза АХ и являясь источником АХ. Однако часть холина образуется из фосфатидилхолина [1].

Нервные клетки (волокна, синапсы), содержащие АХ, называются холинергическими. К ним относятся соматические мотонейроны в скелетных мышцах, преганглионарные нейроны автономной нервной системы, все постганглионарные нейроны парасимпатической нервной системы и некоторые постганглионарные симпатические нейроны (например, в потовых железах). Кроме того, холинергические синапсы имеются во внутренних органах, в вегетативных ганглиях, мозговом слое надпочечников, каротидных клубочках. В центральной нервной системе АХ выполняет функцию нейромодулятора: холинергические нейроны достаточно широко представлены в мозге, главным образом в коре (лобная, теменная, височная доли), гиппокампе, хвостатом тело и базальном ядре Мейнерта. Функции этих нейронов имеют отношение к когнитивным процессам.

На передачу возбуждения в холинергических синапсах могут воздействовать вещества, которые оказывают влияние на следующие процессы: синтез АХ и его депонирование в везикулах; высвобождение АХ; взаимодействие АХ с холинорецепторами; гидролиз АХ в синаптической щели; обратный нейрональный захват холина пресинаптическими окончаниями. Аминогликозидные антибиотики снижают поступление Ca^{2+} в цитоплазму нервных окончаний и блокируют высвобождение АХ (неомицин>стрептомицин>гентамицин)

[7]. Депонирование АХ в везикулах уменьшает везамикол, который неконкурентно и обратимо блокирует транспорт ацетилхолина из цитоплазмы в везикулы пресинаптических терминалей [8]. Процесс слияния везикулярной и пресинаптической мембран, а, следовательно, экзоцитоз везикул и выделение АХ блокирует ботулиновый токсин - самый токсичный белок, существующий в природе ($ЛД_{50}$ 0,005-0,05мкг/кг), продуцируемый бактериями *Clostridium botulinum* [9,10]. Синтаксин, SNAP-25 и синаптобревин – мишени ботулинического токсина. Мишень столбнячного токсина – синаптобревин. Высвобождение АХ в синаптическую щель из окончаний двигательных нервов стимулирует холиномиметик 4-аминопиридин (пимадин) [11]. М-рецепторы специфически блокируются атропином. Ингибиторами Н-рецепторов являются кураре и активный компонент этого яда D-тубокурарин. Частичная десенситизация Н-рецепторов ведет к ослаблению функции – эффект, вызываемый курением. Обратный нейрональный захват холина ингибирует гемихолиний [12]. Токсины бледной поганки *Amanita phalloides* ингибируют активность АХЭ и блокируют холинорецепторы.

Механизмы обратного захвата ацетатной группы и возможные источники ацетата для синтеза АХ не воспринимаются в качестве проблемы, заслуживающей внимания при изучении механизмов холинергической регуляции. Мы полагаем, что есть основания для изменения такого отношения. Скорость метаболизма ацетата в астроцитах примерно в 18 раз выше скорости его метаболизма в синаптосомах мозга. В то же время активность ацетил-КоА-синтазы, первого фермента на пути утилизации ацетата, почти в два раза выше в синаптосомах по сравнению с астроцитами [53]. Принципиальная разница в скорости метаболизма ацетата обусловлена различиями транспортных функций: захват ацетата астроцитами обеспечивает монокарбоксилатный переносчик-1 (МКП1), имеющий высокое сродство к внешнему ацетату и внутриклеточному лактату; он также преимущественно экспрессирован в скелетных мышцах и эндотелиальных клетках, тогда как МКП2 экспрессирован главным образом в нейронах, а также в клетках сердца и печени [54-56]. Можно предположить, что нарушение функции МКП1 или метаболизма астроцитов изменит холинергическую регуляцию мозга и всего организма. Известным глиальным ядом является фторацетат, поскольку он ингибирует митохондриальную аконитазу астроцитов [57]. Мы показали, что действие фторацетата (или его аналога фторацетамида) действительно вызывает рост парасимпатических влияний на фоне вагосимпатического дисбаланса [58,59]. При этом мы не обнаружили нарушений эндотелий-зависимой релаксации аорты крыс, что свидетельствует о первичности и важности именно центральных

механизмов холинергической дисрегуляции при интоксикации фторацетатом, а также указывает на активизацию альтернативных метаболических путей в эндотелиальных клетках.

Нарушение холинергической трансмиссии головного мозга связывают с болезнью Альцгеймера, признаками которой являются возрастные ослабления памяти и когнитивных процессов. У больных паркинсонизмом, помимо патологического уменьшения количества нейронов в чёрном веществе и других областях мозга, уменьшения уровня дофамина и метионин–энкефалина, - обнаружено снижение активности ХАТ и количества нейронов в ядре Мейнерта, а также менее значительное снижение АХЭ во всех долях коры головного мозга; эти нарушения также коррелируют с ослаблением когнитивных процессов [13,14]. Миастения гравис – приобретенное аутоиммунное заболевание, при котором образующиеся в организме антитела повреждают ацетилхолиновые рецепторы, через которые передается нервный импульс к мышце, в результате чего развивается мышечная слабость [15]. Терапия включает в себя применение антихолинэстеразных препаратов (неостигмин, пиридостигмин), иммунодепрессантов, иногда тимэктомию. Синдром Ламберта-Итона (Lambert-Eaton) также является аутоиммунным заболеванием, которое обусловлено нарушением пресинаптического проведения импульса в результате воздействия антител на пресинаптические потенциал-зависимые кальциевые каналы [16].

Фосфорорганические соединения (ФОС) ингибируют АХЭ, что приводит к увеличению количества АХ в синаптической щели, избыточной стимуляции М- и Н-рецепторов и холинэргическому кризису [17]. Некоторые ФОС способны вызывать иной тип нейротоксичности – центрально-периферическую дистальную сенсорномоторную аксонопатию, известную как отставленный нейротоксический эффект или ФОС-индуцированная отставленная полинейропатия (ОПН) [18,19]. Симптомы ОПН проявляются через 1-4 недели после единичной дозы ФОС, после того как холинэргические симптомы уже прошли, и включают в себя спазматические мышечные боли в ногах, прогрессирующую слабость в ногах вслед за истощением и ослаблением дистальных лимбических мышц. Кроме того, существует третий, менее охарактеризованный синдром, известный как промежуточный синдром, вызванный действием ФОС. Он имеет место в 20-50% случаев отравления ФОС через 1-4 дня после острой холинэргической фазы и характеризуется мышечной слабостью и затруднением дыхания. Полагают, что механизм этого синдрома обусловлен модификацией никотиновых рецепторов в нейромышечном соединении [20,21]. Считается, что развитие ОПН не связано с ингибированием АХЭ, а обусловлено фосфорилированием т.н. нейротоксической эстеразы (НТЭ) в нервной системе [22,23,24]. Однако в действительности все намного

сложней. Отставленные последствия острой интоксикации ФОС весьма разнообразны, а развитие ОПН и других последствий не сводятся к ингибированию НТЭ или нейрональной АХЭ. Эти последствия, а также клинику холинергического кризиса невозможно понять без представлений о не-нейрональных холинергических системах.

К настоящему времени все или отдельные холинергические компоненты (АХ, ХАТ, АХЭ, М- и Н-рецепторы) обнаружены во многих не-нейрональных клетках и тканях: эритроцитах, кератиноцитах, раковых клетках, в клетках иммунной системы, мочевого пузыря и репродуктивных органов, в клетках бронхиального эпителия, сосудистого эндотелия и др. [25]. В связи с проблемой интоксикации ФОС интерес представляют главным образом две системы клеток – эритроциты и эндотелий сосудов, учитывая количество этих клеток в организме млекопитающих. Нетрудно подсчитать, что в организме взрослого человека находится примерно 2×10^{13} эритроцитов и 2×10^{12} эндотелиальных клеток. Для сравнения: в мозге взрослого человека примерно 10^{11} нейронов и 10^{14} синапсов [26].

Эритроциты давно известны как носители холинэстеразной активности [27], хотя биологический смысл данного факта все еще остается предметом дискуссий. Несмотря на то, что АХЭ кодируется одним геном, она существует в разных молекулярных формах, имеющих примерно одинаковую каталитическую активность, но отличающихся своей олигомерной последовательностью и характером прикрепления к клеточным мембранам. АХЭ эритроцитов имеет важный с иммунологической точки зрения эпитоп – антиген группы крови Yt, который представлен двумя аллелями: Yt(a) и Yt(b). Наличие антител к данному эпитопу приводит к гемолитической анемии [28]. Известно, что кроме системы АВ0 и резус-фактора эритроциты имеют еще 28 других антигенных систем [29]. В норме в капиллярах эритроциты движутся со скоростью около 2 сантиметра в минуту, что дает им время передать кислород тканям. При изменении кислотно-щелочного баланса крови в сторону закисления (от 7,43 до 7,33) происходит склеивание эритроцитов в виде монетных столбиков. Этому способствует уменьшение поверхностного отрицательного заряда эритроцитов, что может быть обусловлено адсорбцией таких положительно заряженных белков, как фибриноген, γ-глобулины, парапротеины и др. В результате снижается электростатический «барьер» или «распор» между эритроцитами, что приводит к нарушению микроциркуляции, ишемии. Вероятность этого резко возрастает при острой интоксикации ФОС, когда ингибирование эритроцитарной АХЭ обусловливает повышение концентрации АХ в органах и крови более чем в 2 раза [30], с последующей гиперстимуляцией M_3-рецепторов эндотелиальных клеток, мобилизацией внутриклеточного кальция и генерацией NO.

Холинорецепторы на эндотелиоцитах были открыты в 1976 году [31], в том же году гистохимическим методом была впервые показана холинэстеразная активность эндотелия [32], которая была подтверждена биохимическим анализом почти через 30 лет [33,34]. В 1980 году Фуршготт и Завадский описали явление эндотелий-зависимой релаксации [35], опосредованное M_3-рецептором и генерацией окиси азота [36-38]. Помимо М-рецепторов, на эндотелии имеются Н-рецепторы [39]. Наконец, в эндотелиальных клетках было показано наличие ХАТ и везикулярной системы переноса АХ [40,41,42]. Все это свидетельствует о том, что эндотелий является самостоятельной холинергической структурой, в составе кровеносных сосудов пронизывающей все органы и части тела. При этом эндотелий можно представить как орган весом 1,5-1,8кг (сопоставимо с весом печени или мозга), занимающий площадь футбольного поля [43].

Для формирования отставленных последствий острой интоксикации ФОС важен момент инициации, так как повреждение целостности гистогематического барьера обеспечивает возможность аутоиммунизации забарьерными антигенами нервной ткани [44]. Морфологические исследования показали, что формирование ОПН ассоциируется с развитием васкулита с ангиодистоническими явлениями и повышенным тромбообразованием, а также с активацией тканевых базофилов [45]. Что касается отставленных последствий субхронической интоксикации ФОС, они могут развиваться в условиях отсутствия ингибирования холинэстераз; при этом они связаны с нарушением эндотелий-зависимой релаксации сосудов, нарушением нервно-мышечной проводимости, изменением кинетических параметров агрегации тромбоцитов, которые являются чувствительными индикаторами состояния сосудистого русла и возможными участниками патогенеза [46-49]. Возможное развитие аутоиммунного процесса и нейропатии обусловлено воздействием на не-нейрональные мишени (эндотелий), а поражение нервных волокон обусловлено зависимостью их трофики от целостности сосудистого русла. Учитывая малый «удельный вес» эндоневральных капилляров (2-4% от объема нервного волокна [50]) и отсутствие лимфатического дренажа, можно понять легкость развития отеков в периферических нервных волокнах, в том числе при развитии нейропатий различного генеза [51,52]. Возможное нарушение холинергической регуляции в данном случае имеет характер эпифеномена, т.е. исключительно вторичной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Vizi E.S., Lendvai B.* //Handbook Neurochem. Mol. Neurobiol.: Neurotransmitter Systems (2008): 102-11;

2. *Fletcher P., Forrester T.* //J. Physiol. (1975) 251(1): 131-44;
3. *Coggan J.S. et al.* //Science (2005) 309(5733): 446-51;
4. *Caulfield M.P., Birdsall N.J.* //Pharmacol. Rev. (1998) 50(2): 279-90;
5. *Unwin N.* //J. Mol. Biol. (2005) 346(4): 967-89;
6. *Purves D. et al*. //Neuroscience (2008) 4: 122-6;
7. *Redman R.S., Silinsky E.M.* //Br. J. Pharmacol. (1994) 113(2): 375-8;
8. *Salin-Pascual R.J., Jimenez-Anguiano A.* //Psychopharmacol. (1995) 121(4): 485-7
9. *Montecucco C., Molgó J.* //Curr. Op. Pharmacol. (2005) 5(3): 274-9;
10. *Kukreja R., Singh B.R.* //«Botulinum Neurotoxins: Struc. Mechan. Action» Microbial Toxins: Curr. Res. Future Trends (2009)
11. *Cabado A.G. et al.* //Cell Signal (2000) 12(8): 573-81;
12. *Carlson N.R.* //Physiol. Behavior, 9th ed. Boston (2007): 117;
13. *Perry E.K. et al.* //J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry (1985) 48(5): 413-21;
14. *Kuhl D.E. et al*. //Ann. Neurol. (1996) 40(3): 399-410;
15. *Conti-Fine B.M. J*. //Clin. Invest. (2006) 116(11): 2843-54;
16. *Newsom-Davis J.* //Rev. Neurol. Paris (2004) 160(2): 177-80;
17. *Glynn P*. //Prog. Neurobiol. (2000) 61(1): 61-74;
18. *Lotti M., Moretto A*. //Muscle Nerve (2006) 34(4): 499-502;
19. *Ray D.E.* //Organophosphorus esters: An evaluation of chronic neurotoxic effects Leicester (1998) 62 pp.;
20. *Senanayake N, Karalliedde L*. //N. Engl. J. Med. (1987) 316(13): 761-3;
21. *Sedgwick EM, Senanayake N.* //J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry (1997) 62(2): 201-2;
22. *Махаева Г.Ф. и др.* //ДАН (2001) 377(1): 125-8;
23. *Johnson M.K*. //Arch. Toxicol. (1975) 34(4): 259-288;
24. *Johnson M.K*. //Reviews in Biochem. Toxicol. Elsevier (1982): 141-212;
25. *Kawashima K., Fujii T.* //J. Pharmacol. Sci. (2008) 106: 167-73;
26. *Drachman D.* //Neurology (2005) 64(12): 2004-5;
27. *Cline J.K. et al*. //South Med. J. (1948) 41(4): 374-6;
28. *Bartels C.F. et al*. //Am J. Hum. Genet. (1993) 52(5): 928-36;
29. *Chiaroni J.* //Transfus. Clin. Biol. (1998) 5(5):366-71;
30. *Hallak M, Giacobini E*. //Neurochem. Res. (1986) 11(7): 1037-48;
31. *Buonassisi V, Venter JC*. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1976) 73(5): 1612-6;
32. *Tervo T*. //Histochemistry (1976) 47(2): 133-43;
33. *Carvalho F.A. et al*. //FEBS J. (2005) 272(21): 5584-94;
34. *Santos S.C. et al.* //J. Biol. Chem. (2007) 282(35): 25597-603;
35. *Furchgott R.F., Zawadzki J.V*. //Nature (1980) 288(5789): 373-6;
36. *Palmer R.M. et al*. //Nature (1987) 327(6122):524-6;
37. *Jaiswal N. et al.* //J. Pharmacol. Exp. Ther. (1991) 258(3):842-50;
38. *Boulanger C.M. et al.* //Br. J. Pharmacol. (1994) 112(2): 519-24;
39. *Hsu S.H. et al.* //Toxicol. Lett. (2005) 159(1): 47-59;
40. *Parnavelas J.G. et al*. //Nature (1985) 316(6030): 724-5;

41. *Kirkpatrick C.J. et al.* //Jpn. J. Pharmacol. (2001) 85(1): 24-28;
42. *Kirkpatrick C.J. et al*. //Life Sci. (2003) 72(18-19): 2111-6;
43. *Vane J.R. et al*. //New Eng. J. Med. (1990) 323: 27-36;
44. *Прозоровский В.Б., Чепур С.В*. //Токсикол. вестник (2001) 4: 2-7;
45. *Чепур С.В. и др.* //Морфология (2006) 129(2): 106;
46. *Гончаров Н.В. и др*. //«Мед. аспекты радиац. и химической безопасности» СПб (2001): 281-4;
47. *Гончаров Н.В. и др*. //Труды науч.-практич. конф., посв. 40-лет НИИГПЭЧ. СПб (2002): 209-15;
48. *Goncharov N.V. et al*. //Econom., Logis., Ecol. Arm. Forces III. Int. Sci. Conf. Brno (2003): 63-70;
49. *Mindukshev I.V. et al.* //Spectroscopy Int. J. (2005) 19: 247-57;
50. *Odman S. et al*. //Am. J. Physiol. (1987) 252: C335-41;
51. *Low P.A*. //Peripheral Neuropathy (P.J. Dyck Ed.) (1984): 599-617;
52. *Olsson Y.* //Peripheral Neuropathy (P.J. Dyck Ed.) (1984): 579-97;
53. *Waniewski R.A., Martin D.L*. //J. Neurosci. (1998) 18(14): 5225-33;
54. *Jackson V.N., Halestrap A.P*. //J. Biol. Chem. (1996) 271: 861-8;
55. *Gerhart et al*. //Am. J. Physiol. (1997) 273: E207-13;
56. *Bonen A. et al*. //Appl. Physiol. Nutr. Metab. (2006) 31(1): 31-9;
57. *Goncharov et al*. //J. Appl. Toxicol. (2006) 26(2): 148-61;
58. *Гончаров Н.В*. //Автореф. дис. д.б.н. Пущино (2008);
59. *Kuznetsov S.V. et al*. //J. Appl. Toxicol. (2007) 27(6): 561-72.

НЕКВАНТОВАЯ СЕКРЕЦИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА ИЗ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ИОНОВ МАГНИЯ И КАЛЬЦИЯ

Маломуж А.И.[1], *Никольский Е.Е.*[1,2]

[1]Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра РАН
[2]Государственный медицинский университет, Казань

Общепризнанно, что в синапсах химического типа сигнал передается за счет выделения относительно стабильных порций химического посредника – квантов медиатора. При этом имеет место как самопроизвольное (спонтанное) выделение одиночных квантов, так и синхронное (вызванное) выделение большого количества квантов медиатора, индуцированное потенциалом действия. Прогресс в современной нейробиологии значительно расширил наши представления о механизмах квантовой нейросекреции [1-4]. Вместе с тем, начиная с конца 70-х годов, стали появляться данные, позволяющие говорить о

наличии альтернативного способа выделения медиатора из цитоплазматического пула – неквантовой секреции [5,6]. Однако к настоящему времени количество работ, посвященных изучению этой формы выделения медиатора, значимо меньше, чем работ по квантово-везикулярному освобождению. Тем не менее, установлено, что неквантовая секреция медиатора способна выполнять целый спектр нейротрофических функций [7], а это, в свою очередь, определяет актуальность изучения механизма данного процесса.

Один из наиболее интригующих вопросов, касающихся неквантового выделения медиатора – это вопрос зависимости механизма секреции от внеклеточного содержания ионов кальция и магния. Так, показано, что устранение ионов кальция из внеклеточной среды ведет к отставленному во времени медленному снижению интенсивности неквантового выделения медиатора до нуля за 45-60мин., тогда как квантовая секреция реагирует на удаление ионов значительно быстрее [8,9]. Введение ионов кальция в раствор вызывает медленное и плавное восстановление уровня неквантовой секреции до контрольной величины в течение тех же 45-60мин., тогда как квантовая секреция восстанавливается полностью в течение нескольких минут [9]. В добавлении к этому, имеются данные о чувствительности неквантового выделения медиатора к ионам магния [10], способными конкурировать с ионами кальция за участки связывания и выступать в роли неспецифического ингибитора кальциевых каналов. В связи с этим возникает ряд вопросов: (1) участвуют ли кальциевые каналы в реализации эффекта внеклеточного кальция на неквантовое выделение медиатора, и если да, то какие это типы каналов? (2) связан ли угнетающий эффект ионов магния на данный вид секреции медиатора с их способностью блокировать кальциевые каналы? и (3) можно ли говорить о наличии конкуренции между ионами магния и кальция за какой-либо сайт связывания, необходимый для реализации процесса неквантовой секреции медиатора? Поиску ответов на эти вопросы и посвящено настоящее исследование.

Эксперименты проводили на диафрагмальном нервно-мышечном препарате белых лабораторных крыс. Мышцу, выделенную из декапитированных под эфирным наркозом животных, фиксировали на дне экспериментальной ванночки, через которую протекал предварительно аэрированный раствор Рингера-Кребса стандартного (NaCl – 120мМ; KCl – 5мМ; $CaCl_2$ – 2мМ; $MgCl_2$ – 1мМ; $NaHCO_3$ – 23мМ; NaH_2PO_4 – 1мМ; глюкоза – 11мМ) или модифицированного составов. Измерение мембранного потенциала покоя (МПП) мышечных волокон производили с помощью внутриклеточных микроэлектродов, заполненных раствором KCl (2,5М) и имеющих сопротивление 5-10МОм.

Интенсивность неквантовой секреции оценивали по величине Н-эффекта – степени гиперполяризации постсинаптической мембраны после блокирования холинорецепторов концевой пластинки d-тубокурарином в условиях необратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы армином [8,11]. Для этого фрагмент диафрагмы предварительно инкубировали (30мин) в присутствии армина (10мкМ), после чего измеряли МПП в синаптической зоне 25 поверхностно расположенных мышечных волокон. Далее, в ванночку добавляли d-тубокурарин (10мкМ) и через 5 минут вновь измеряли МПП 25 мышечных волокон. Затем эти значения усредняли, и по их разнице определяли величину Н-эффекта. Для статистической обработки данных использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента.

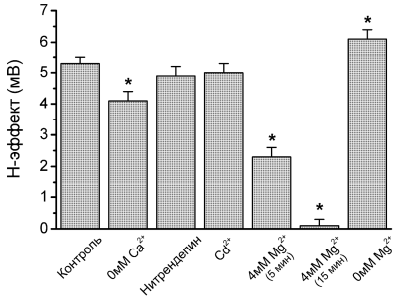


Рис.1. Величина Н-эффекта после 15мин инкубации в контрольном растворе Рингера-Кребса, в растворе с измененным ионным составом (0мМ Ca^{2+}, 0мМ Mg^{2+} и 4мМ Mg^{2+}) и растворе, содержащем нитрендепин (5мкМ) и $CdCl_2$ (50мкМ). *-достоверное отличие значения, по сравнению с контролем ($p<0.05$).

Величина МПП мышечных волокон в синаптической зоне диафрагмального нервно-мышечного препарата, инкубированного после ингибирования ацетилхолинэстеразы, составила –70.2±0.2мВ (n=200). Добавление в раствор d-тубокурарина привело к смещению потенциала покоя в сторону гиперполяризации до –75.5±0.2мВ (n=200). Таким образом, контрольная величина Н-эффекта составила 5.3±0.2мВ (рис.1). В бескальциевом растворе Н-эффект в течение 15 минут снижался до 4.1±0.3мВ ($p<0.05$). Введение в раствор как специфического блокатора кальциевых каналов L-типа нитрендепина (5мкМ), так и неселективного блокатора всех типов кальциевых каналов ионов кадмия (50мкМ) ни коим образом не влияло на величину Н-эффекта, которая оставалась на контрольном уровне (рис.1). Следовательно, интенсивность неквантового выделения ацетилхолина действительно зависит от наличия ионов кальция во внеклеточной среде, однако влияние этих ионов на процесс секреции не опосредуется входом через кальциевые каналы.

При изучении зависимости неквантовой секреции ацетилхолина от Анализируя полученные данные, в купе с данными литературы [7,8,12], можно заключить, что механизм неквантового выделения ацетилхолина из двигательных нервных окончаний представляет собой не пассивный выход медиатора через поры или каналы, а активный процесс переноса нейропередатчика через пресинаптическую мембрану. Этот процесс

реализуется при наличии ионов кальция в экстраклеточном пространстве и не зависит от работы кальциевых каналов. Судя по всему, транспортеры, ответственные за неквантовое выделение медиатора имеют обращенные во внеклеточное пространство кальций- и магний-чувствительные сайты. Вероятно, что это один и тот же участок белка, который в случае связывания с ионом кальция создает необходимые условия для функционирования переносчика, а в случае связывания с ионом магния приводит к остановке трансмембранного переноса молекул медиатора. Однако, мы не исключаем и возможность того, что переносчик имеет отдельный селективный магний-чувствительный сайт, поскольку зависимость неквантовой секреции медиатора от наружного Ca^{2+} имеет колоколообразный характер [8], тогда как зависимость от концентрации Mg^{2+} - линейный.

Работа поддержана грантами РФФИ (№07-04-01656, №08-04-00923 и №09-04-01280), Президента РФ (НШ-4177.2008.4 и МК-1238.2008.4) и Фонда содействия отечественной науки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Van der Kloot W., Molgo J.* //Physiol. Rev. (1994) 74: 899-991;
2. *Van der Kloot W.* //Prog. Neurobiol. (2003) 71: 269-303;
3. *Schwarz T.L.* //Int. Rev. Neurobiol. (2006) 75: 105-44;
4. *Edwards R.H.* //Neuron. (2007) 55: 835-58;
5. *Katz B., Miledi R.* //Proc. R. Soc. London Ser. B. (1977) 196: 59-72;
6. *Vyskocil F., Illés P.* //Pflugers Arch. (1977) 370: 295-7;
7. *Маломуж А.И., Никольский Е.Е.* //Нейрофизиол. (2007) 39(4/5): 352-63;
8. *Vyskocil F., Nikolsky E., Edwards C.* //Neuroscience (1983) 9: 429-35;
9. *Nikolsky E.E., Voronin V.A., Vyskočil F.* //Neurosci. Lett. (1991) 123: 192-4;
10. *Zemková H., Vyskocil F.* //Neurosci. Lett. (1989) 103: 293-7;
11. *Malomouzh A.I. et al.* //J. Neurochem. (2005) 94: 257-67;
12. *Никольский Е.Е., Воронин В.А.* //Нейрофизиол. (1986) 18: 361-7.

ВЛИЯНИЕ цАМФ И цГМФ СИГНАЛИЗАЦИИ НА МОБИЛИЗАЦИЮ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ

Петров А.М., Гиниатуллин А.Р.

Казанский государственный медицинский университет

В пресинаптических нервных окончаниях химических синапсов содержится большое количество синаптических везикул, заполненных медиатором. В ответ на вход Ca^{2+} через потенциал управляемые Ca^{2+}-каналы в специализированных участках (активных зонах) происходит слияние (экзоцитоз) везикул с пресинаптической мембраной. В результате везикулярная мембрана встраивается в поверхностную и перемещается к сайтам эндоцитоза, где происходит захват мембранного фрагмента в нервное окончание, приводящий к образованию новой везикулы. Затем везикула транспортируется вглубь нервной терминали, заполняется медиатором и может повторно сливаться с мембраной активной зоны, освобождая порцию медиатора. Таким образом протекает кругооборот (цикл) синаптических пузырьков в нервном окончании, который обозначается как рециклирование везикул [1,3]. Вариабельность времени кругооборота везикул, по современным представлениям, лежит в основе многих форм пресинаптической пластичности [2,4,6]. В пресинаптической области присутствуют несколько популяций везикул. Везикулы, непосредственно прикрепленные в активной зоне, а также везикулы, способные быстро перемещаться из цитозоля к сайтам экзоцитоза, формируют рециклирующий пул. При высокочастотной стимуляции в секрецию медиатора вовлекаются везикулы резервного пула, которые медленно транспортируются в активную зону [5].

Многие белки, обеспечивающие везикулярный транспорт, являются субстратами для фосфорилирования цАМФ- и цГМФ- зависимыми протеинкиназами А и G типов. В ранее проведенных исследованиях показано, что основные этапы везикулярного цикла (транспортировка везикул рециклирующего пула, экзоцитоз, эндоцитоз с последующим возвращением везикулы в определенный пул) находятся под постоянным контролем со стороны внутриклеточных сигнальных каскадов циклических нуклеотидов [2,6]. Однако этап перемещения (мобилизации) везикул, входящих в состав резервного пула, в сайт экзоцитоза остался, недостаточно точно, охарактеризован.

Для исследования влияния сигнальных каскадов циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) на транспортировку везикул резервного пула в активную зону была применена прерывистая высокочастотная стимуляция. Высокочастотное раздражение вызывает быстрое истощение запасов везикул рециклирующего пула, в течение последующего короткого периода «покоя» везикулы из «резерва» с определенной интенсивностью доставляются в сайты экзоцитоза, следующая серия высокочастотного раздражения приводит к освобождению нейромедиатора из вновь поступивших везикул. Следовательно, чем больше восстановилась секреция нейромедиатора после кратковременной «передышки», тем интенсивнее протекает транспортировка везикул резервного пула.

Материалы. Эксперименты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной и портняжной мышц лягушек (*Rana Ridibunda*) в осенне-зимний период. Мышцу фиксировали в

стеклянной ванночке заполненной раствором Рингера (pH 7,2-7,4; T_r) для холоднокровных (мМ): NaCl – 115,0; KCl – 2,5; $CaCl_2$ – 1,8; $NaHCO_3$ – 2,4. Применяли мембранопроникающие негидролизуемые аналоги цАМФ (100мкМ 8-bromo-cyclic AMP, 50мкМ $N^6,0^2$-dibutyryl-cyclic AMP) и цГМФ (100мкМ 8-bromo-cyclic GMP, 50мкМ 8-para-chlorophenylthio-cyclic GMP); селективные ингибиторы аденилатциклазы (1мкМ *cis*-N-(2-Phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine), цитозольной гуанилатциклазы (0,5-1мкМ 1H-(1,2,4)-oxidazole-(4,3-a)-quinoxalin-1-one) и протеин киназы G1 (0,5мкМ Rp-8-bromo-β-phenyl-1,N^2-etheno-guanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate). Все использованные вещества фирмы «SIGMA» (США).

Электрофизиология. Для анализа секреции медиатора из двигательных нервных окончаний в условиях двухэлектродной фиксации мембранного потенциала мышечных волокон (с использованием стеклянных микроэлектродов, имеющих сопротивление 3-5МΩ и заполненных 2,5М KCl) регистрировали токи концевой пластинки (ТКП) при раздражении двигательного нерва прямоугольными импульсами длительностью 0,5мс сверхпороговой силы. Сигналы усиливались и с использованием АЦП LA-2 определялись их амплитудно-временные параметры. Для предотвращения сокращения мышцу рассекали. Высокочастотное раздражение проводили сериями импульсов с частотой 20 Гц длительностью по 10с следующими друг за другом с секундным интервалом. В целом стимуляция состояла из 18 десятисекундных эпизодов высокочастотного раздражения. При этом определяли динамику изменения амплитуды ТКП. Высокочастотное раздражение осуществляли в контроле (нормальный раствор Рингера) и через 40мин действия исследуемого химического агента.

Межпачечное восстановление при прерывистом режиме стимуляции. Динамика амплитуды ТКП при прерывистой стимуляции практически идентична той, какую можно увидеть, если стимуляция идет непрерывно [2,6]. Однако кривая изменения амплитуды ТКП при прерывистой стимуляции имеет пилообразный характер: вначале каждого нового отрезка стимуляции амплитуда ТКП в среднем на 7,7±0,5% (n=6) выше амплитуды ТКП, завершающих предшествующий залп стимулов. Интересен тот факт, что разность между амплитудами последних и первых ТКП в смежных пачках оставалась практически постоянной величиной на протяжении всего периода раздражения, состоящего из 18 отрезков. Если эту разницу считать каждый раз заново, полагая амплитуду последних ТКП за 100%, то получиться, что она в среднем составляла 19,0±1,2%. Этот параметр указывает на соотношение между степенью синаптической депрессии и скоростью приобретения везикулой способности к освобождению нейромедиатора, которая зависит в основном от перемещения везикулы в область активной зоны.

Поскольку межпачечное восстановление амплитуды ТКП описывает события, происходящие после первых десяти секунд высокочастотного раздражения, то эта величина характеризует транспортировку везикул резервного пула.

Влияние внутриклеточной концентрации цАМФ на уровень межпачечного восстановления ТКП при прерывистой ритмической стимуляции. После обработки аналогами цАМФ возрастание амплитуды ТКП после предшествующей десяти секундной серии стимулов происходило в среднем на 7,8±0,5% (n=6, p>0,05), что достоверно не отличается от значения в контроле. Если считать это восстановление относительно амплитуды последних ТКП в предшествующей пачке, то получиться 29,0±1,5% (n=6, p<0,05), что превышает значение в контроле примерно на 10,0%.

Ингибирование аденилатциклазы приводило к уменьшению межпачечного восстановления до 6±0,15% (n=6). Подсчет восстановления относительно амплитуд последних ПКП в предшествующей пачке раздражения давал величину 14±1,0% (p<0,05). При этом максимальная амплитуда ТКП после секундного периода покоя регистрировалась только на 7-ой стимул новой серии раздражений, тогда как в контроле и после обработки аналогами цАМФ – на 3-й стимул.

Влияние активности цГМФ системы на уровень межпачечного восстановления ТКП при прерывистой ритмической. При действия аналогов цГМФ уровень межпачечного восстановления был в среднем 6,0±0,2% (n=6, p<0,05). При подсчете этой разницы относительно амплитуды последних ПКП, она составила 10±2% (p<0,05). Кроме того, в отличие от контроля, где после повторного включения раздражения максимальный подъем амплитуды ТКП наблюдался на 3 стимул, в опытах с аналогами цГМФ - лишь спустя на 7-ой стимул.

Ингибирование гуанилатциклазы или протеинкиназы G1 после секундного «покоя» хватало для восстановления амплитуды ТКП в начале каждой новой пачки стимулов на 8,5±0,2% (n=6). Подсчет этой разности относительно амплитуды последних сигналов в предшествующей пачке дает величину – 31±2,5% (n=6, p<0,05), что существенно больше, чем в контроле или при увеличении концентрации цГМФ. Причем максимальное восстановление амплитуды ТКП происходило практически сразу в ответ на первый стимул после секундного перерыва.

Анализ восстановления секреции медиатора между высокочастотными сериями раздражения указывает на значительную роль циклических нуклеотидов в транспортировке везикул в активную зону. Стимулирование цАМФ-зависимых энзимов, равно как ингибирование цГМФ-протеинкиназа G1 пути, способствуют перемещению синаптических везикул резервного пула в сайты

экзоцитоза, тогда как активация цГМФ управляемых ферментов или уменьшение продукции цАМФ угнетают доставку везикул из резервного пула в активную зону.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зефиров А.Л. и др.* //Ж. Эвол. Биохим. Физиол. (2008) 44(6): 603-12;
2. *Петров А.М., Гиниатуллин А.Р., Зефиров А.Л.* //Нейрохимия (2008) 25(3): 202-10;
3. *Betz W.J., Bewick G.S.* //J. Physiol. Lond. (1993) 460: 287-309;
4. *Kavalali E.T.* //Neuroscientist (2006) 12(1): 57-66;
5. *Rizzoli S.O., Betz W.J.* //Nature Rev. Neurosci. (2005) 6: 57-69;
6. *Petrov A.M. et al.* //J. Neurosci. (2008) 28 (49): 13216-22.

РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ И КАЛЬЦИЕВЫХ БУФЕРОВ В РЕГУЛЯЦИИ РАЗМЕРОВ КВАНТА МЕДИАТОРА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ

Скитева О.И., Лаптева В.И., Балезина О.П.

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение. Механизмы регуляции размеров кванта медиатора – актуальный и малоизученный вопрос современной синаптологии. В литературе описаны факты, когда амплитуда миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) возрастает при усилении выброса депонированного кальция через рианодиновые рецепторы в терминалях центральных синапсов [2]. Проведенные нами ранее исследования на нервно-мышечных синапсах мыши также показали, что рианодин – активатор рианодиновых рецепторов (RyR) и выброса депонированного кальция, приводит к возрастанию амплитуды МПКП вследствие увеличения размеров квантов ацетилхолина (АХ) [1]. Целью данной работы было понять, оказывает ли другой, более эффективный активатор RyR – кофеин аналогичное влияние на размеры спонтанно секретируемых квантов АХ и проследить зависимость этих эффектов от присутствия в терминалях быстрого или медленного Ca^{2+}-буферов, способных избирательно, с разной динамикой, редуцировать возникающие в терминали локальные кальциевые сигналы.

Методика. Работу проводили на взрослых нелинейных мышах весом 20-25г Обьектом исследования служил изолированный рассеченный нервно-мышечный препарат диафрагмы (*m. diaphragma n. phrenicus*). С помощью стандартной микроэлектродной техники проводили внутриклеточную регистрацию МПКП. Оценивали амплитуду, амплитудное распределение и вариабельность (дисперсию) амплитуд МПКП. В работе использовали кофеин в концентрации 2,5мМ, везамикол в концентрации 1мкМ. и проникающие через клеточную мембрану ацетометокси-производные кальциевых буферов – BAPTA-AM и ЭГТА-АМ в концентрации 50мкМ (фирма Sigma). Загрузку в терминали Ca^{2+} буферов проводили путем инкубации препарата в бескальциевом растворе Лайли (Ca^{2+} 0мМ, Mg^{2+} 3,0мМ), содержащим 50мкМ BAPTA-AM или ЭГТА-АМ [5].

Данные записывали на жесткий диск компьютера при помощи АЦП DigiLine с интерфейсом Digiscope, затем обрабатывали с использованием программного обеспечения MiniAnalysis (Synaptosoft, USA) и Microsoft Excel. Статистическая обработка полученных результатов проводилась в программе Microsoft Exel и пакете Statistica по критерию Стьюдента (t-тест) и непараметрическому критерию Манна-Уитни (U-тест).

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов установили, что аппликация на мышцу кофеина в концентрации 2,5мМ не влияет на величину потенциала покоя мышечных волокон (МП=47,82±2,36). Инкубация в течение 15-30 минут в растворе кофеина вызывает в достоверное увеличение средней амплитуды МПКП от 1,05±0,04мВ (в контроле) (n=28) до 1,64±0,14мВ (n=17, $p<0,05$). Одновременно кофеин вызывает возрастание дисперсии амплитуд МПКП от 0,08±0,01 до 0,24±0,05. На гистограмме амплитудных распределений МПКП (рис.1) видно, что под действием кофеина происходит не только существенный сдвиг основной моды распределения в сторону высокоамплитудных значений, но и расширение спектра значений МПКП, в особенности выражена популяция высокоамплитудных МПКП, более чем в 2 раза превышающих среднее значение амплитуды МПКП. Мы предположили, что наблюдаемое под действием кофеина увеличение средней амплитуды МПКП есть отражение роста размеров секретируемых кантов АХ. Для проверки этого предположения мы использовали везамикол – специфический блокатор транспорта АХ в везикулы [3].

На рис.1 видно, что воздействие везамикола на интактный нервно-мышечный препарат не вызывает достоверных изменений в гистограммах амплитудных распределений МПКП в течение 30-60 минут действия. При этом аппликация кофеина (2,5мМ) на фоне действия везамикола не вызвала достоверного увеличения средней амплитуды МПКП и сдвига гистограмм амплитудных распределений МПКП, как это имело место при действии кофеина в отсутствие везамикола (рис.1). Если средняя амплитуда МПКП в контроле составила 1,05±0,04мВ, на фоне действия везамикола – 0,92±0,03мВ (n=30), то на фоне везамикола с

кофеином – 0,94±0,043мВ (n=31). Дисперсия амплитуд МПКП при действии кофеина на фоне везамикола так же не отличалась ни от контрольной ни после аппликации на препарат одного везамикола. Поскольку в присутствии блокатора накачки АХ в везикулу кофеин терял способность вызвать увеличение амплитуды МКПП и ее дисперсии, можно предполагать, что индуцируемый действием кофеина прирост средней амплитуды МПКП есть результат увеличения размера квантов АХ, связанный, возможно с более интенсивной накачкой медиатора в везикулу под действием кофеина.

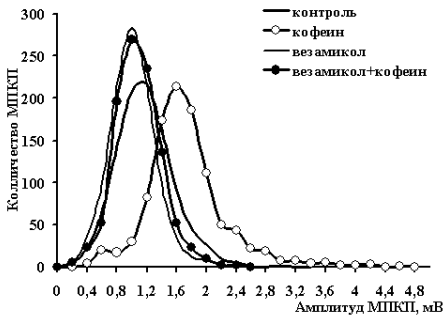


Рис.1. Огибающие гистограмм амплитудного распределения МПКП в контроле, при действии 2,5мМ кофеина, 1мкМ везамикола и кофеина на фоне везамикола.

Важно было понять, является ли обнаруженное увеличение размеров кванта АХ под действием кофеина – Ca^{2+}-зависимым процессом, обусловленным выбросом депонированного кальция через рианодиновые рецепторы. Для выяснения этого вопроса мы использовали нагрузку нервных терминалей двумя Ca^{2+}-буферами, BAPTA-AM и ЭГТА-АМ, обладающими одинаковой емкостью, но разной кинетикой связывания ионов Ca^{2+}. Известно, что BAPTA более чем в 100 раз быстрее связывает кальций по сравнению в ЭГТА [4]. Мы установили что нагрузка нервно-мышечного препарата Ca^{2+}-буферами не влияет на величину МП мышечных волокон. Не наблюдалось изменений средней частоты МПКП на фоне буферов. Амплитуда МПКП и характер гистограмм амплитудных распределений МПКП также остались неизменными в присутствии Ca^{2+}-буферов в терминалях (рис.2 и 3). Таким образом, ни EGTA-AM, ни BAPTA-AM не влияют на параметры спонтанного выброса медиатора. Это соответствует данным, полученным на нейронах гиппокампа крысы [6]

Аппликация кофеина на фоне загрузки в терминали быстрого Ca^{2+}-буфера BAPTA (50мкМ) привела к приросту средней амплитуды МПКП на 34% (до 1,44± 0,113мВ) (n=27), и сдвигу всей гистограммы распределения в область высокоамплитудных значений. Дисперсия амплитуд увеличилась на 71% (до 0,147±0,020). Полученные данные достоверно выше контроля ($p<0,001$), но достоверно не отличаются от

значений, полученных при изучении действия кофеина без предварительной инкубации с буфером ($p>0,05$) (рис.2).

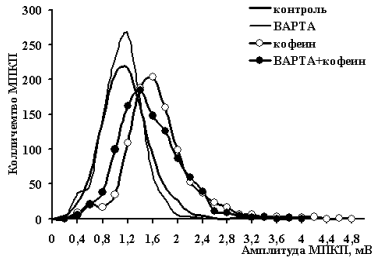


Рис.2. Огибающие гистограмм амплитудного распределения МПКП в контроле, при действии 2,5мМ кофеина, 50мкМ BAPTA-AM и кофеина на фоне нагрузки терминали BAPTA-AM.

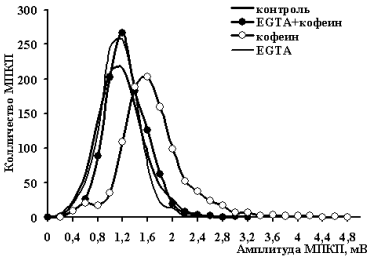


Рис.3. Огибающие гистограмм амплитудного распределения МПКП в контроле, при действии 2,5мМ кофеина, 50мкМ EGTA-AM и кофеина на фоне нагрузки терминали EGTA –AM.

Вместе с тем, аппликация кофеина на фоне загрузки медленного буфера ЭГТА (50мкМ) практически полностью предотвратила индуцируемое кофеином увеличение средней амплитуды МПКП. Инкубация терминали в растворе ЭГТА не вызывала изменения средней амплитуды МПКП по сравнению с контролем и составила 1,05±0,04мВ (n=25), а на фоне 30 минутного дополнительного действия 2,5мМ кофеина – 1,14±0,03мВ (n=22) (рис.3).

Таким образом, нами впервые показано что выброс депонированного кальция, индуцированный активацией RyR под действием кофеина, вызывает Ca^{2+}-зависимый прирост размеров кванта АХ в моторных нервных терминалях мыши. Эти и полученные нами ранее данные свидетельствуют о том, что независимо от характера агониста RyR – рианодина либо кофеина – происходит выброс депонированного Ca^{2+} в терминалях, который отражается на размере спонтанно секретируемых квантов АХ. Каковы возможные механизмы действия выброса депонированного кальция на размер кванта медиатора? Было высказано предположение, что увеличение средней амплитуды МПКП в таких условиях может быть обусловлено синхронизацией выброса везикул, заполненных АХ [2]. В этом случае следовало бы ожидать кратного увеличения средней амплитуды МПКП, однако в наших экспериментах этого не наблюдалось. Также предполагается, что под действием депонированного кальция может происходить слияние везикул, заполненных медиатором до экзоцитоза или же увеличение или же увеличение закачки АХ в везикулы [7]. Наши данные демонстрируют,

что под действием селективного блокатора транспорта АХ в везикулы везамикола предотвращается увеличение средней амплитуды и дисперсии амплитуд МПКП. Исходя из этого, можно сказать, что изменения, вызываемые кофеином, связаны именно с увеличением накачки везикул, т.е. увеличением размера кванта. Тот факт что Ca^{2+} зависимый прирост кванта АХ эффективно предотвращается ЭГТА, но не ВАРТА свидетельствует об участии в этом процессе локального медленно нарастающего подъема уровня Ca^{2+} в терминали, воздействующего на высокочувствительный Ca^{2+}-сайт. Вопрос о том, что собой представляет этот сайт, и как его активация приводит к увеличению размера кванта АХ, предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Работа поддержана грантом РФФИ №07-04-00920-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балезина О.П., Букия А.Н.* //Нейрофизиол. (2001) 33(2): 90-7;
2. *Llano I. et al.* //Nat. Neurosci. (2000) 3: 1256-65;
3. *Maeno T, Shibuya Y.* //J. Physiol. (1988) Jul 401:671-85;
4. *Tsien R.Y.* //Biochem. (1980) 19: 2396-404;
5. *Urbano F.J., Uchitel O.D.* //Pflugers Arch. (1999) 437(4): 523-8;
6. *Gordon G.R., Bains J.S.* //J. Neurosci. (2005) 25(49): 11385-95;
7. *Liu Q. et al.* //J. Neurosci. (2005) 25(29): 6745-54.

***

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В ЭЛЕКТРОНЕВОЗБУДИМЫХ КЛЕТКАХ

УГНЕТЕНИЕ ФАГОЦИТОЗА У КЛЕТОК IC-21 В ПРИСУТСТВИИ СЫВОРОТКИ

Головкина М.С.[1], Скачков И.В.[3], Метелев М.В.[1], Кузеванов А.В.[1], Вишнякова Х.С.[2], Киреев И.И.[1,3], Дунина-Барковская А.Я.[3]

[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[2]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
[3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Фагоцитоз – это процесс поглощения клеткой частиц определенного размера (более 0.5мкм), который происходит в результате реорганизации мембраны, запускаемой с момента контакта клетки с частицей (обз. [1,2]). Одним из ранних событий, происходящих после контакта частицы с клеткой, является образование в мембране липидных микродоменов, богатых холестерином и сфингомиелином (рафтов). Сегрегация в этих доменах мембранных рецепторов и других интегральных белков (ионных каналов, ферментов и т.д.) является необходимым условием для запуска дальнейшего биохимического каскада, обеспечивающего протекание фагоцитозного процесса [3,4]. Однако целостной картины реакций пока не существует.

В ходе исследований роли интегральных холестерин-зависимых белков в механизме фагоцитоза [5,6] мы обнаружили значительное угнетение активности фагоцитоза культивируемыми макрофагами мыши IC-21 в присутствии эмбриональной сыворотки. Хотя в экспериментах сыворотку в ряде случаев не добавляют, при фагоцитозе *in vivo* естественно присутствие сыворотки. В данном сообщении описаны эффекты эмбриональной сыворотки на активность фагоцитоза у клеток IC-21.

Параметры фагоцитоза определяли с помощью флуоресцентной микроскопии (Zeiss Axiovert 200M с охлаждаемой цифровой камерой ORCAII-ERG2, Hamamatsu) по количеству ассоциированных с клетками 2-микронных неопсонизированных флуоресцентных латексных частиц (Molecular Probes, США) после 90-мин инкубации в тестируемой среде и последующей фиксации 2.5% глутаровым альдегидом (рис.1). Подсчет частиц проводили по микрофотографиям с помощью программы ImageJ и

собственных макросов, обеспечивающих количественный анализ изображений в полуавтоматическом режиме.

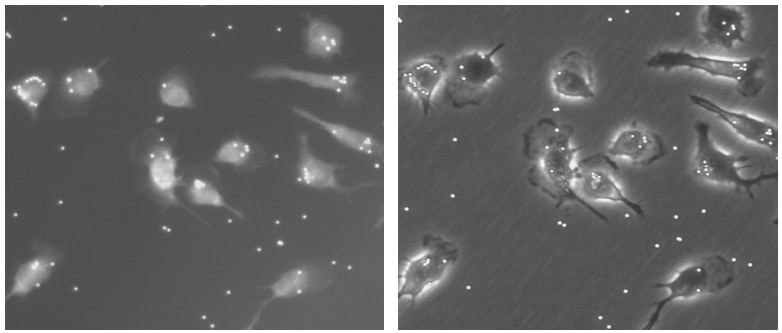


Рис.1. Определение фагоцитозной активности у клеток IC-21. Справа фазовый контраст, слева флуоресценция (спектр Cy3)

Доля фагоцитирующих клеток (phagocytosis percent, PP) и среднее число частиц в фагоцитирующих клетках (phagocytosis index, PI) в стандартной культуральной среде Дульбекко (DMEM), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, HyClone, США), составляли, соответственно, 55±5% и 2.0±0.2 частиц/клетку (среднее±SE по 8 эксп.). В среде DMEM без сыворотки показатели PP и PI были почти в 2 раза выше и составляли, соответственно, 92±1% и 4.3±0.2 частиц/клетку (12 эксп.). Угнетающий эффект сыворотки зависел от концентрации (рис.2).

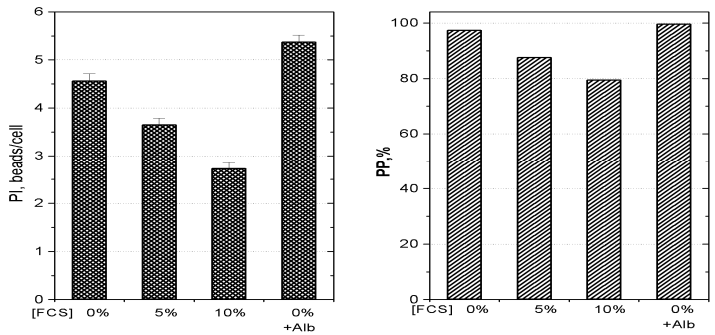


Рис.2. Сыворотка дозо-зависимо угнетает фагоцитоз. Альбумин (10мг/мл) не имитирует эффект сыворотки.

Поскольку одним из основных белковых компонентов сыворотки является сывороточный альбумин, способный экстрагировать из мембраны жирные кислоты, можно предположить, что действие

сыворотки обусловлено именно этим эффектом. Для проверки этого предположения клетки инкубировали в среде DMEM без сыворотки в присутствии 10мг/мл сывороточного альбумина. В этих условиях активность фагоцитоза была даже несколько выше контроля (DMEM), т.е. угнетающий эффект сыворотки не имитировался альбумином (рис.2).

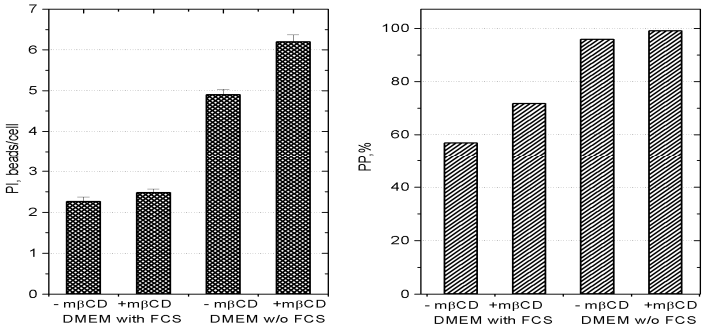


Рис.3. Стимуляция фагоцитоза метил-β-циклодекстрином (mβCD). В среде без сыворотки эффект выражен сильнее: фагоцитозный индекс (PI) в присутствии 7мМ mβCD увеличен на 26% в среде без сыворотки, и на 10% – в среде с сывороткой.

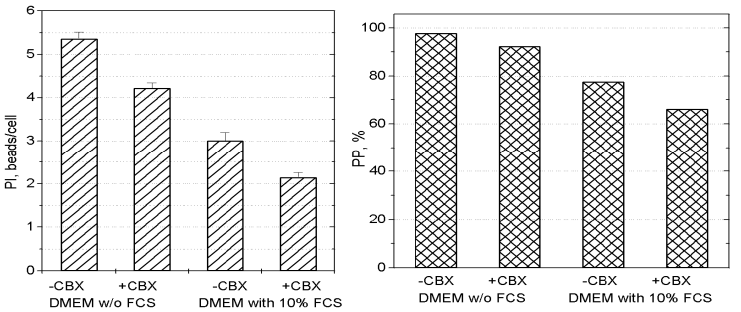


Рис.4. Угнетающий эффект карбеноксолона (300мкМ) в присутствии сыворотки сильнее, чем без сыворотки (на 15 и 5%, соотв.).

Сыворотка является также основным источником экзогенного холестерина. Известно, что фагоцитоз является холестерин-зависимым процессом, и удаление холестерина препятствует фагоцитозу ([7], обз. [1]). Чтобы проверить, может ли удаление холестерина быть фактором, стимулирующим фагоцитоз, мы использовали холестерин-секвестрирующий агент метил-β-циклодекстрин (mβCD). Оказалось, что в концентрации 5-7мМ mβCD стимулировал фагоцитоз; в среде без

сыворотки этот эффект был выражен слабее, чем в присутствии сыворотки (рис.3). При более высоких концентрациях mβCD оказывал угнетающее действие, описанное в литературе [7]. Это позволяет предположить, что активирующее действие удаления сыворотки может быть связано с удалением холестерина.

Одним из предполагаемых участников фагоцитозного процесса являются коннексиновые каналы [8,9], функционирование которых холестерин-зависимо [10]. Мы обнаружили, что блокатор коннексиновых каналов карбеноксолон (CBX) в концентрации 250-500мкМ снижает активность фагоцитоза (рис.4). Присутствие сыворотки модулировало этот эффект: CBX вызывал более выраженное угнетение фагоцитоза в присутствии сыворотки, чем в среде без сыворотки (рис.4).

Полученные результаты, а также литературные данные [11,12] свидетельствуют о важной роли сыворотки в механизме фагоцитоза. Наши результаты позволяют предположить, что подавление фагоцитоза в присутствии сыворотки не связано с экстракцией альбумином жирных кислот из мембраны и что активирующее действие удаления сыворотки может быть отчасти связано с удалением холестерина, что в свою очередь влияет на функционирование интегральных холестерин-зависимых белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tjelle T.E., Levdal T., Berg T.* //BioEssays (2000) 22: 255-63;
2. *Дунина-Барковская А.Я.* //Биол. Мембр. (2004) 21: 243-70;
3. *Kono H. et al.* //J. Immunol. (2002) 169: 193-203;
4. *Kwiatkowska K., Frey J., Sobota A.* //J. Cell Sci. (2003) 116(3): 537-50;
5. *Чешев Д.А., Чеканов Н.Н., Дунина-Барковская А.Я.* //Биол. Мембр. (2006) 23(1): 69-73;
6. *Дунина-Барковская А.Я. и др.* //Биол. Мембр. (2007) 24(7): 451-6;
7. *Peyron P. et al.* //J. Immunol. (2000) 165: 5186-91;
8. *Beyer E.C., Steinberg T.H.* //J. Biol. Chem. (1991) 266(13): 7971-4;
9. *Fortes F.S.A. et al.* //J. Cell Sci. (2004) 117(20): 4717-26;
10. *Дунина-Барковская А.Я.* //Биол. Мембр. (2005) 22: 27-33;
11. *Roilides E. et al.* //Antimicrob. Agents Chemotherapy (1993) 37(3): 495-500;
12. *Edwards R.B.* //Exp. Eye Res. (1991) 53: 229-32.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА ГЛАВНЫХ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ СОБИРАТЕЛЬНЫХ ТРУБОК ПОЧКИ

Иляскин А.В.[1,2], Батурина Г.С.[1], Каткова Л.Е.[1], Соленов Е.И.[1,2]

[1]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
[2]Новосибирский государственный университет

Главные клетки собирательных трубок почки подвергаются значительным колебаниям осмотического давления канальцевой жидкости. Для сохранения жизнеспособности в гипотонической среде данные клетки должны обладать эффективным механизмом регуляторного снижения объема (RVD). Реакция RVD осуществляется благодаря выходу из клетки осмолитов, по мнению многих авторов, K^+ и Cl^- [1-3]. Изменение концентраций ионов снаружи и внутри клетки может приводить к изменению трансмембранного потенциала.

В настоящей работе исследовалась зависимость между набуханием клетки при действии гипотонической среды и изменением трансмембранного потенциала.

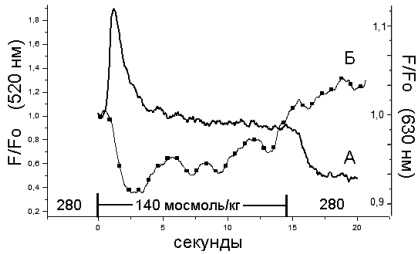


Рис.1. Изменение объема клетки и электрического потенциала мембраны в гипотонической среде.
А –относительная флуоресценция Calcein (520нм); Б–относительная флуоресценция di-4-ANNEPS (630нм).

Для изучения изменения объема клетки в процессе реакции на осмотический шок применяли метод, основанный на эффекте гашения флуоресцентного красителя Calcein белками цитоплазмы, разработанный нами ранее [4]. Детекция изменения трансмембранного потенциала осуществлялась с помощью электрохромного красителя di-4-ANNEPS [5]. Гипоосмотический шок создавался физиологическим раствором (PBS), разведенным дистиллированной водой в два раза. Установлено, что гипотонический шок сопровождается значительной деполяризацией мембраны (рис.1). Деполяризацию плазматической мембраны при гипоосмотическом воздействии отмечали ряд авторов [6,7]. В процессе набухания клеток происходит активация механочувствительных каналов, что приводит к увеличению интенсивности трансмембранных потоков ионов [8,9]. В связи с этим исследовали изменение концентрации Na^+ внутри клетки. Измерения проводились с использованием

флуоресцентного красителя Na^+-green, чувствительного к концентрации Na^+. Расчетные данные содержания Na^+ при синхронном измерении объема клетки выявили, что в начале набухания присутствует пик увеличения концентрации Na^+ в клетке, после которого внутриклеточная концентрация Na^+ стремительно падает [10]. Расчетные результаты подтверждены прямым измерением содержания Na^+ в клетке в условиях, когда внешняя концентрация Na^+ не зависит от разбавления раствора (рис.2).

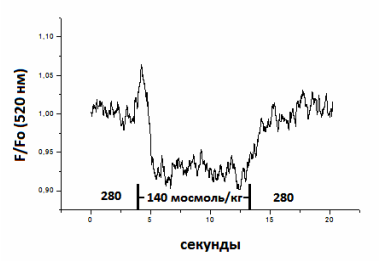


Рис.2. Изменение внутриклеточной концентрации Na^+ в гипотонической среде. Относительная флуоресценция Na^+-green (520нм).

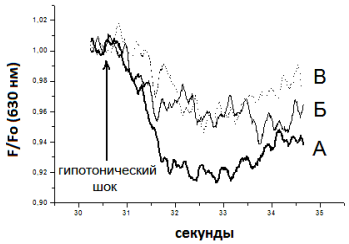


Рис.3. Влияние блокаторов механочувствительных каналов на развитие деполяризации клетки. А –контроль; Б–в присутствии стрептомицина; В–в присутствии Gd^{3+}.

Для выяснения роли механочувствительных каналов в развитии деполяризации клетки проводились измерения трансмембранного потенциала в присутствии блокаторов: Gd^{3+} и стрептомицина [11-13] (рис.3). Регрессионный и корреляционный анализ начальных участков кривых трансмембранного потенциала выявил ослабление деполяризации в присутствии данных агентов (коэффициент линейной регрессии контроль: -0,07 (r=-0,84), Gd^{3+}: -0,03 (r=-0,54), стрептомицин: -0,02 (r=-0,46)). В то же время ингибиторы не оказывают существенного влияния на развитие реакции RVD и снижение объема клеток.

Анализ видеоизображений поведения клеток при шоке и уровня флуоресценции Calcein при возвращении в изотоническую среду показал, что объем клетки снижается по сравнению с начальным. Поэтому можно предположить, что в процессе RVD клетка теряет значительную часть осмолитов. По мнению ряда авторов, объем клетки определяется, главным образом, концентрацией белков в клетке [14]. В наших экспериментах показано, что реакция RVD сопровождается значительным выходом белка из клетки (превышение в 2.4 раза, по сравнению с контрольным образцом).

Таким образом, деполяризация клеток, происходящая во время гипотонического шока, может быть вызвана активацией механочувствительных ионных каналов и повышенным входом Na^+ внутрь клетки. Процесс деполяризации ингибируется блокаторами механочувствительных каналов, Gd^{3+} и стрептомицином. Деполяризация клеток может облегчать выход ионов K^+ из клетки и способствовать реакции RVD. Однако отсутствие выраженного влияния блокаторов механочувствительных каналов на реакцию RVD указывает на существование механизмов поддержания объема клеток, независимых от деполяризации. В частности, это может быть электронейтральный выход ионов K^+ вместе с белками, которые являются крупными органическими полианионами. Выход белков (и ионов K^+) может быть обусловлен открытием низкоселективных каналов во время резкого увеличения объема клетки при действии гипотонической среды.

Работа выполнена при поддержке: РФФИ (гранты №08-04-00541, №09-04-00197), «Ведущие научные школы» НШ-1647.2008.4

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lang F., Busch G.L., Völkl H.* //Cell Physiol. Biochem. (1998) 8: 145;
2. *Fu.W., Kuwahara M., Marumo F.* //Japan. J. Physiol. (1995) 45: 97-109;
3. *Hoffmann E.K., Simonsen L.O.* //Physiol. Rev. (1989) 69(2): 315-82;
4. *Solenov E., Watanabe H., Verkman A. S.* //Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2004) 286: 426-32;
5. *Loew L.M. et al.* //J. Membr. Biol. (1992) 130(1): 1-10;
6. *Hoffmann E.K., Lambert I.H., Pedersen S.F.* //Physiol. Rev. (2009) 89: 193-277;
7. *Paulmichl M. et al.* //Pflugers Arch. (1989) 413(5): 456-62;
8. *Sachs F.* //Mol. Cell. Biochem. (1991) 104: 57-60;
9. *Taniguchi J., Guggino W.* //Am. J. Physiol. Renal Fluid Electr. Physiol. (1989) 257: 347-52;
10. *Solenov E.I.* //J. Biophys. (2008) 1: 1-5;
11. *Gannier F., White E., Lacampagne A.* //Cardiovas. Res. (1994) 28(8): 1193-8;
12. *Suleymanian M., Clemo H.* //J. Mol. Cell Cardiol. (1995) 27: 721-8;
13. *Yeung E., Whitehead N.* //J. Physiol. (2005) 562(2): 367-80;
14. *Fraser J., Huang C.* //J. Physiol. (2004) 559: 459-78.

ОБРАЗОВАНИЕ ПЕПТИДОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭНДОГЕННОГО И ЭКЗОГЕННОГО цАМФ

Кленов Р.О.

Самарский государственный университет

Введение. Многие биологические активные соединения имеют пептидную природу. Пептидная биорегуляция является одной из самых сложных и многофункциональных систем регуляции в живых организмах. Изучение механизмов пептидной регуляции стало основой появления концепции существования в организме непрерывной совокупности регуляторных пептидов – континуума пептидов, обеспечивающих стимуляцию или подавление любых процессов жизнедеятельности [7]. Пути их регуляторных эффектов исследуются и анализируются, предлагаются физико-химические модели межмолекулярных взаимодействий пептидов с клетками, однако в литературе мало освещаются возможные молекулярные механизмы их внутриклеточного производства. Существует гипотеза В.Т. Иванова о специфическом пептидном пуле, который происходит из функционально активных высокомолекулярных белков путем тканеспецифичного ферментативного гидролиза этих белков до пептидов определенного размера [8]. Одним из таких белков-предшественников служит гемоглобин. Известно более 200 эндогенных пептидных соединений, которые являются фрагментами цепей гемоглобина. Образующиеся пептидные молекулы обладают широким спектром биологической активности – опиоидной, рилизинговой, антипролиферативной, эритропоэтиновой [4]. По данным А.А. Карелина и соавторов [4] лизис гемоглобина осуществляется комплексом высокоспецифических протеаз, локализованных на внутренней стороне мембраны эритроцита. Механизмы активации данного комплекса ферментов в настоящее время неизвестны. Раскрытие механизма генерации пептидных соединений поможет не только понять природу этого процесса, но и позволит регулировать выработку биологически активных пептидов. Возможно, активация протеаз осуществляется через фосфорилирование специфическими протеинкиназами, которые в свою очередь активируются цАМФ.

Материалы и методы. Работа проводилась на эритроцитах крови человека, предоставленной Областной станцией переливания крови. Объектом исследования служила чистая фракция эритроцитов человека, разделенная по возрасту на молодые и старые клетки [2]. Чистоту фракций определяли по индексу фильтруемости эритроцитов [9] и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [10].

Фракции эритроцитов помещали в среду Рингера-Локка в отношении 1:1. Добавляли растворы адреналина и обзидана, в конечной концентрации 2мкг/мл, близкой к физиологической, и 10мкг/мл, превышающей физиологическую в 5-10 раз. Сразу после внесения сигнальных молекул в пробы добавляли холодный 0,154М раствор NaCl в двухкратном объеме (для прекращения их воздействия) и центрифугировали при 600g 10мин.

В пробы, содержавшие фракции эритроцитов добавляли растворы цАМФ в конечных концентрациях 60мкг/мл, 100мкг/мл и 200мкг/мл с 400мкг/мл тритона.

Белки осаждали 10% ТХУ, добавляя к суспензии эритроцитов в отношении 1:2, и центрифугировали при 1000g в течение 10 минут. В 0,2мл надосадочной жидкости (ТХУ-экстракта) каждой пробы определяли содержание пептидных соединений по методу Лоури [1], и при длине волны 254нм. Измерение оптической плотности производили на спектрофотометре СФ-26.

1мл ТХУ-экстракта проб фракции молодых эритроцитов при воздействии повышенных концентраций сигнальных веществ исследовали с помощью ионообменной хроматографии (колонка 8×190мм, заполненная диэтиламиноэтилцеллюлозой; 0,1М трис-буфер рН 8,0 в качестве подвижной фазы, скорость элюции 0,5мл/мин). А 0,5мл экстракта каждой пробы молодых эритроцитов с экзогенным цАМФ, исследовали с помощью гель-хроматографии (колонка 8×190мм, заполненная сефадексом G-10; 0,1М фосфатный буфер рН 6,86 в качестве подвижной фазы, скорость элюции 0,5мл/мин). Детекцию проводили на СФ-26 при длине волны 254нм. Результаты выражали в усл.ед. - ОП×1000.

Для статистической обработки результатов использовали критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Индекс фильтруемости во фракции старых эритроцитов отличался у большинства клеток в два раза, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы была ниже на 26-27%, что свидетельствовало о качественном разделении исходной популяции эритроцитов на фракцию, содержащую преимущественно молодые и преимущественно старые клетки.

Фракция молодых эритроцитов отличалась более высоким фоновым содержанием пептидных соединений в клетках. Превышение составляло более чем 100% (табл.1).

Действие высоких концентраций адреналина (10мкг/мл) сопровождалось увеличением содержания пептидов внутри клеток на 42%. При совместном действии лиганда и антагониста эффект действия лиганда достоверно не выявляется (табл.1).

Табл.1.Содержание пептидных соединений в ТХУ-экстрактах фракций эритроцитов в условиях активации и блокады β-адренорецепции (мкг/мл).

	Контроль	Адреналин	Обзидан	Адреналин +Обзидан
повыш. конц. (10мкг/мл), (n=8)				
Фракция молодых эритроцитов	196,3±17,4	279,3±16,5**	197,7±26,1	239,7±25,9
Фракция старых эритроцитов	88,6±10,1	96,3±13,9	81,3±19,9	95,6±10,7
физиол. конц. (2мкг/мл), (n=10)				
Фракция молодых эритроцитов	190,4±11,6	253,9±14,9*	179,1±8,3	228,1±4,6**
Фракция старых эритроцитов	94,1±10,4	97,7±8,8	80,4±6,3	98,1±9,3

*-достоверность различия p<0,05; **-достоверность различия p<0,01.

Фракция старых эритроцитов в ответ на действие высоких концентраций адреналина не дает достоверного повышения содержания пептидов, хотя сравнение всех изученных проб позволяет зафиксировать сходную с молодыми клетками тенденцию в наблюдаемых изменениях.

При добавлении в среду адреналина в физиологической концентрации (2мкг/мл) наблюдалось достоверное увеличение содержания пептидов во фракции молодых эритроцитов на 33%. При совместном действии лиганда и антагониста, увеличение содержания пептидов составило 20% от контроля и 27% от обзидановой пробы, что показывает конкуренцию этих молекул за рецептор. Таким образом, ответная реакция на адреналин не имела четко выраженного дозозависимого эффекта, физиологические концентрации оказываются также эффективными во фракции молодых клеток, как и повышенные. Старые эритроциты не реагировали на физиологические концентрации адреналина увеличением пептидных соединений внутри клеток. Увеличение количества пептидов в ответ на кратковременное действие адреналина свидетельствует о сигнальном механизме регуляции скорости их образования и наличии активации протеолитических ферментов через цАМФ-зависимые протеинкиназы. Невозможность достоверной регистрации данного механизма в старых клетках обусловлена ухудшением состояния рецепции, увеличением проницаемости эритроцитарных мембран при старении и возможным более быстрым выходом пептидов в среду [3].

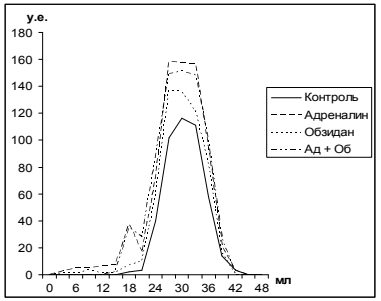


Рис.1. Ионообменная хроматография пептидных соединений, выделенных из фракции молодых эритроцитов в условиях повышенной активации и блокады адренорецепторов (у.е.).

Активация адренорецепции не только увеличивает производство пептидов внутри клеток, но и, как показали данные ионообменной хроматографии, изменяет их спектр (рис.1). При действии адреналина удается обнаружить дополнительный пик, который присутствует во всех пробах содержавших адреналин. Второй пик, характерный для всех проб, показал достоверное увеличение содержания пептидных соединений в пробах с воздействием адреналина на клетки по сравнению с контрольными пробами (рис.1). Проведенные нами исследования сравнения хроматограмм пептидов, выделенных из эритроцитов, с хроматограммами пептидов полученных инкубацией гемоглобина с пепсином доказывают гемоглобиновое происхождение эритроцитарных пептидных соединений [5,6]. Внесение во фракцию молодых эритроцитов раствора цАМФ концентрациях 100 и 200мкг/мл вызывало достоверное увеличение УФ-поглощения на 37% и 85% соответственно (табл.2).

Табл.2. Содержание пептидных соединений в ТХУ-экстрактах фракций эритроцитов при действии цАМФ (у.е., n=7).

	Контроль	60мкг/мл	100мкг/мл	200мкг/мл
Фракция молодых эритроцитов	582±27	664±36	798±45*	1078±110*
Фракция старых эритроцитов	596±51	688±58	786±43*	978±72*

*-достоверность различия p<0,05.

Подобные результаты были получены на фракции старых эритроцитов. Это свидетельствует об участии цАМФ и аденилатциклазной системы в активации примембранного комплекса протеолитических ферментов. Однако достоверного увеличения концентрации пептидных соединений по методу Лоури не наблюдалось. Видимо, образующиеся в результате действия экзогенного цАМФ пептиды, в отсутствие внешнего сигнала, имели сравнительно малую длину или их концентрация была слишком мала (количество пептидных связей) для достоверной регистрации по методу Лоури, что может

свидетельствовать о расщеплении гемоглобиновых фрагментов другими протеазами, расположенными ближе к мембране.

Из результатов следует, что генерация пептидных соединений зависит от количества цАМФ и не зависит в данном случае от возраста клетки, что определяется непосредственной активацией комплекса протеаз, экзогенно поступающим вторичным посредником через ПКА.

Исследование спектров пептидных соединений с помощью хроматографии также показало достоверное увеличение пептидных соединений во фракции молодых эритроцитов при добавлении 200 мкг/мл цАМФ на 87% (рис.2). Если рассматривать спектр полученных пептидных соединений по массам, то в пробах, содержавших адреналин, имелся пик, свидетельствующий о наличии пептидных соединений предположительно массой 700-1000Да, тогда как общий пептидный фон, представленный во всех других пробах (блокировании рецепции обзиданом, при действии цАМФ), вероятно, принадлежит пептидам массой от 1000Да.

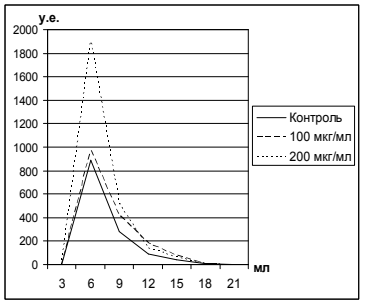


Рис.2. Гель-хроматография пептидных соединений, выделенных из фракции молодых эритроцитов при воздействии экзогенного цАМФ (у.е.).

Ускорение производства пептидных соединений эритроцитами в условиях активации адренорецепции, а также изменение их спектра, вероятно, имеет важное регуляторное значение. Дальнейшее изучение этого явления, анализ спектра пептидов эритроцитов и их биологической активности представляет, на наш взгляд, существенный теоретический и практический интерес.

Выводы.

1. Количество пептидных соединений в эритроцитах человека увеличивается в условиях активации адренорецепции.
2. Величина генерации и спектр пептидных соединений зависит от состояния рецепции клетки.
3. Добавление цАМФ экзогенно сопровождается сужением спектра образующихся пептидов и не зависит от возраста эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Доусон Р. и др.* //Справочник биохимика. М. (1991): 466-7.;
2. *Варламова С.В.* //Лаб. дело (1989) 9: 32-5;
3. *Выборнова И.И. и др.* //Физиол. человека (1997) 23(1): 70-80;
4. *Карелин А.А., Филиппов М.М., Яцкин О.Н.* //Биоорган. Химия (1998) 24 (4) 271-81;
5. *Кленова Н.А., Кленов Р.О.* //Естествозн. Гуманизм (2006) 3(4): 16-7;
6. *Кленова Н.А., Кленов Р.О.* //Вест. СамГУ, Биология (2006) 7(47): 75-9;
7. *Шатаева, Л.К.* //Пептидн. саморег. жив. сист. СПб (2003) 222с.;
8. *Ivanov,V.T.* //Biopolimers (Peptide Sci.) (1997) 43 (2): 171-88;
9. *Tannert T.C., Lux K.* //Acta Biol. Med. Germ. (1981): 739-42;
10. *Beutler E.* //Am. J. Clin. Pathol. Clin. Med. (1963) 63(3): 203.

СЕКРЕЦИЯ И ГИДРОЛИЗ АТР КЛЕТКАМИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА ПРИ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИИ

Красный А.М.[1], Долгачева Л.П.[2], Никифоров Е.Л.[2], ЗинченкоВ.П.[2]

[1]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
[2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино;

АТР является многофункциональной биологической молекулой, которая не только является источником энергии, но и агонистом семейства пуринорецепторов, регулирующих синаптическую трансмиссию, болевые ощущения, ионный транспорт, апоптоз и секрецию. Клетки большинства видов тканей могут секретировать молекулы АТР во внеклеточную среду. Секреция АТР клетками активируется при действии различных гормонов, гипоксии/ишемии [1], механических раздражениях, [2,3,4] и центрифугировании [5]. Сложный механизм регуляции жизнедеятельности клетки при помощи экстраклеточного АТФ и его метаболитов требует быстрого удаления их из внеклеточного пространства. Поэтому метаболизм этих сигнальных молекул является решающим фактором для правильной передачи сигнала и избегания токсического действия молекул АТФ и АДФ. Удаление экстраклеточного АТР осуществляется рядом белков, содержащих каталитические сайты на внешней стороне плазматической мембраны [6]. Наиболее широко распространены представители семейства экто-нуклеотидаз 5-трифосфат дифосфогидролаз (экто-АТРаз). Семейство экто-АТРаз являются ферментами, которые во время каталитического цикла не формируют фосфорилированный интермедиат. В настоящее время идентифицировано 8 членов этого семейства. NTPDase 1, 2, 3 и 8

локализованы в плазматической мембране, и их каталитический сайт обращен в экстраклеточную среду. Наиболее часто встречаются в клетках два типа ферментов этого класса: NTPDase1, которая гидролизует АТФ и АДФ до АМФ, и NTPDase2 которая гидролизует АТФ до АДФ.

Длительность и интенсивность воздействия АТР на клетки определяется его концентрацией, которая зависит от соотношения скоростей секреции и гидролиза. В настоящей работе исследованы температурные зависимости кинетических характеристик процессов секреции и гидролиза внеклеточного АТР клетками асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) при центрифугировании и хранении.

Материалы и методы. Клетки АКЭ изолировали из мышей на 7-й день трансплантации, как описано [7]. После центрифугирования и ресуспендирования клетки хранили при 2°С и 22°С. Клетки хранили в растворе Хенкса (мМ): NaCl – 140, KCl – 5.4, $CaCl_2$ – 1.3, $MgSO_4$ – 1, KH_2PO_4 – 1, Na_2HPO_4, $NaHCO_3$ – 1, глюкозу – 6, ХЕПЕС – 20, pH 7.2.

Для измерения АТР, использовали метод, основанный на окислении D-люциферина в люциферин/люциферазной реакции. В работе использовали люциферин/люциферазный реагент фирмы Boithema, Финляндия и реагент 1243-200 ATP Monitoring Reagent (BioOrbit). Хемилюминесценцию люциферина регистрировали с помощью люминометра (Luminometer 1250) в термостатируемой ячейке с перемешиванием. Амплитуда хемилюминесцентного сигнала линейно зависит от концентрации АТР в измеряемом диапазоне.

Результаты

Зависимость хемилюминесценции люциферина от температуры. При измерении концентрации АТР необходимо учитывать зависимости хемилюминесценции от температуры и скорость спонтанного гидролиза. Для определения этих зависимостей были проведены специальные эксперименты. На рисунке 1 приведены кинетики хемилюминесцентных ответов на добавление 1мкМ АТР при различных температурах.

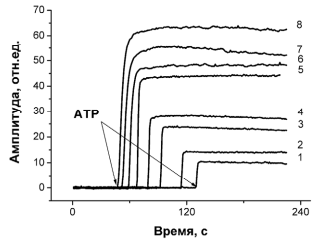


Рис.1. Изменение хемилюминесценции в ответ на 1мкМ АТР при различных температурах: 1-8: 38, 34, 31, 28, 19, 18, 12, 7°С.

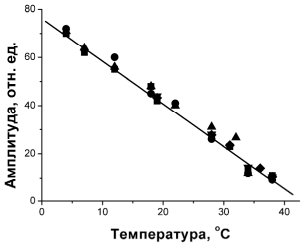


Рис.2. Зависимость амплитуды хемилюминесцентного ответа на 1мкМ АТР от температуры. 5 серий экспериментов.

Из рисунка следует, что реагент дает стабильное свечение во времени в диапазоне температур от 7 до 38°С, и спонтанный гидролиз АТР идет с незначительной скоростью. На рисунке 2 показано, что интенсивность хемилюминесценции в присутствии 1мкМ АТР линейно возрастает при уменьшении температуры. Последний факт упрощает учет этой зависимости при измерениях скоростей гидролиза и секреции АТР.

Изменение концентрации внеклеточного АТР во время хранения клеток после центрифугирования. Было замечено, что помещение клеток в измерительную ячейку сразу после центрифугирования (600g, 5мин) вызывает активацию клеток, обусловленную взаимодействием экстраклеточного АТР с P2Y рецепторами. Для более детального исследования этого явления клетки после центрифугирования ресуспендировали и регистрировали содержание экстраклеточного АТР в зависимости от времени хранения при температуре 2°С. Кинетика изменения концентрации экстраклеточного АТР в суспензии клеток, помещенных в измерительную ячейку через 0, 12, 22, 42, 92 и 180мин после центрифугирования, приведены на рис.3. Показано, что концентрация АТР в образцах различается (максимальный сигнал наблюдается в образце, взятом через 12мин после центрифугирования) и уменьшается в процессе инкубации, обнаруживая процесс гидролиза АТР поверхностными АТРазами. Таким образом, во время центрифугирования происходит активация секреции АТР клетками. Секреция продолжается длительное время (минуты) после центрифугирования во время хранения клеток при низкой температуре. Длительное (от 1,5 до 3-х часов) хранение суспензии клеток приводит к уменьшению концентрации экстраклеточного АТР до уровня ≤100нМ, который является недостаточным для активации пуринорецепторов.

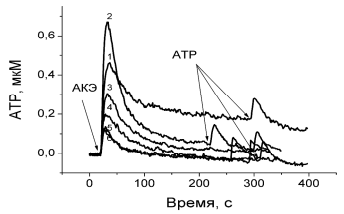


Рис.3. Кинетика изменений концентрации экстраклеточного АТР в суспензии клеток АКЭ, взятых через: (1)–0; (2)–12; (3)–22; (4)–42; (5)–92; (6)–180мин после центрифугирования. Контрольная добавка АТР–0,1мкМ.

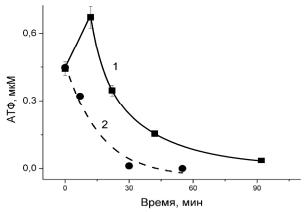


Рис.4. Зависимость концентрации экстраклеточного АТР в суспензии клеток АКЭ от времени хранения после центрифугирования при 2°С (1) и 22 °С (2).

Вторая часть клеток в той же концентрации хранилась после центрифугирования при температуре 22°С. В этой суспензии клеток также регистрировали содержание экстраклеточного АТР в зависимости от времени хранения. Результаты экспериментов по измерению концентрации экстраклеточного АТР в суспензии клеток в зависимости от времени хранения после центрифугирования при 2°С и 22°С представлены на рисунке 4. Показано, что при 2°С в первые 12 минут хранения наблюдается повышение уровня экстраклеточного АТР (скорость секреции АТР превышает скорость ее гидролиза). При дальнейшем хранении клеток концентрация АТР уменьшается.

Зависимость скорости гидролиза АТР от температуры. На рис.5 представлены кинетики гидролиза 1мкМ АТР клетками при разных температурах. Максимум хемилюминесценции в присутствии АТР при каждой температуре принят за 1. Зависимость начальных скоростей гидролиза АТР от температуры показана на рисунке 6. Скорость гидролиза АТР максимальна при 36°С и экспоненциально падает при уменьшении температуры.

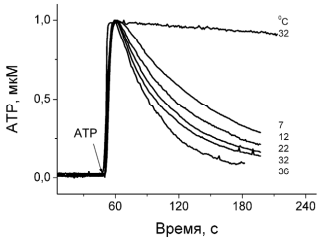


Рис.5. Уменьшение концентрации АТР в суспензии клеток АКЭ после добавления 1мкМ АТР при разных температурах: 7, 12, 22, 32, 36°С. Концентрация клеток 7×10^6/мл. Верхняя кривая–АТР без клеток при 32°С

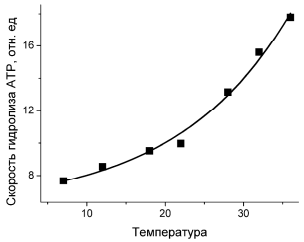


Рис.6. Зависимость скорости гидролиза 1мкМ АТР от температуры. Концентрация клеток 7×10^6/мл. Скорость гидролиза АТР измеряли на уровне 0.75мкМ АТР. Аппроксимировано экспонентой первого порядка.

Определение фермента, гидролизующего АТР. Тип экто-АТРазы, гидролизующей экстраклеточную АТР, был установлен ингибиторным анализом. На рисунке 7 представлены кинетики гидролиза АТР клетками АКЭ при температуре 18°С в присутствии различных концентраций селективного ингибитора экто-АТРазы1 ARL67156. Видно, что ингибитор эффективно подавляет гидролиз АТР. Из зависимости скорости гидролиза АТР от концентрации ARL67156, приведенной на рис.8, видно, что EC_{50} подавления скорости гидролиза АТР составляет 62±3мкМ. Коэффициент Хилла равен 1.7±0.2. Таким образом, гидролиз

экстраклеточного АТР клетками АКЭ осуществляется главным образом экто-АТРазой1.

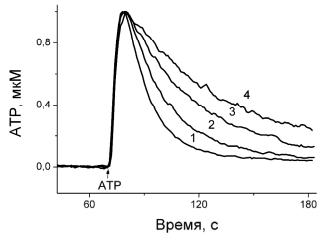


Рис.7. Изменение хемилюминесценции в ответ на 1,3мкМ АТР при различных концентрациях ингибитора экто-АТРазы1 (ARL67156): (1-4) – 0, 60, 120, 220мкМ, соответственно.

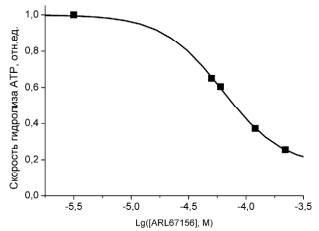


Рис.8. Зависимость скорости гидролиза АТР от концентрации ингибитора экто-АТРазы 1 (ARL67156).

Заключение. В процессе центрифугирования клетки подвергаются механическим воздействиям, гипоксии и глюкозной депривации. Показано, что центрифугирование приводит к повышению секреции клетками АТР. Этот АТР взаимодействует с P2Y рецепторами и быстро гидролизуется экто-АТРазой1. Секреция продолжается длительное время после центрифугирования в условиях хранения клеток при низкой температуре. Во время хранении клеток при комнатной температуре секреция прекращается раньше, что сопровождается более быстрым понижением концентрации Ca^{2+} в цитозоле за счет откачки Ca^{2+}-АТРазой плазмалеммы. Длительное (до 3-х часов) хранение суспензии клеток при низкой температуре приводит к прекращению секреции и уменьшению концентрации экстраклеточного АТР за счет его гидролиза экто-АТРазой1 до уровня, при котором она уже не активирует пуринорецепторы.

Работа поддержана грантом РФФИ №07-04-00704.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schubert P. et al.* //Int. J. Biochem. (1994) 26(10-11): 1227-36;
2. *Stout C.E. et al.* //J. Biol. Chem. (2002) 277(12): 10482-8;
3. *Patel A.S. et al.* //Am J. Physiol. (2005) 289(3): L489-96;
4. *Du S.et al.* //Urology (2007) 69(3): 590-5;
5. *Pedersen S. et al.* //Biochim. Biophys. Acta (1999) 1416(1-2): 271-84;
6. *Zimmermann H.* //Arch. Pharmacol. (2000) 362(4-5): 299-309;
7. *Arslan P. et al.* //J. Biol. Chem. (1985) 260(5):2719-27.

НЕЙРО-ИММУННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ: АГОНИСТЫ И АНТАГОНИСТЫ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ МОДИФИЦИРУЮТ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Мальцева В.Н.[1],Сафронова В.Г.[1], Вульфиус Е.А.[1], Жмак М.Н.[2], Цетлин В.И.[2]

[1]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва

Введение. Согласно современным представлениям нервная и иммунная системы имеют высокую степень автономии и характеризуются тесным и сложным взаимным влиянием. Взаимодействие между нервной и иммунной системами, опосредуется различными механизмами, которые включают действие нейротрансмиттеров и цитокинов [1].

Показано, что нервная система участвует в регуляции процесса воспаления. Возможно, рецепторы нейротрансмиттеров, идентифицированные на иммунных клетках, участвуют в регуляции иммунного ответа со стороны нервной системы. Так гомомерные никотиновые рецепторы ацетилхолина (нАХР) подтипа α7 обнаружены на моноцитах/макрофагах, лимфоцитах [2,3], дендритных клетках; гетеромерные нАХР α4β2 – на макрофагах и лимфоцитах [4]. Следующие факты говорят о значимости нАХР в иммунной системе: в макрофагах α7 нАХР регулирует продукцию провоспалительных цитокинов [5]; нАХР подтипов α4β2 и α7 регулируют активацию В-лимфоцитов и иммунный ответ, зависящий от CD40 [6]. Дальнейшие исследования привели к формированию представлений о «холинергическом воспалительном пути», который регулирует продукцию цитокинов иммунными клетками. Патогены, ишемия и разные формы повреждения создают очаг воспаления и активируют продукцию цитокинов, избыточная продукция которых приводит к заболеваниям. Эфферентный сигнал от блуждающего нерва (выброс ацетилхолина), который может контролироваться из мозга, ингибирует продукцию цитокинов через пути, зависящие от α7 нАХР на макрофагах и других клетках. Афферентные сигналы, передаваемые блуждающим нервом, могут активировать эфферентный ответ, который ингибирует выброс противоспалительных цитокинов, что было названо «воспалительным рефлексом» [7]. Использование агонистов α7 нАХР позволяет фармакологически модифицировать холинергический противовоспалительный путь, что обеспечивает значительную защиту в моделях острого и тяжелого воспаления на животных [8,9].

Экзогенным фармакологическим агонистом нАХР является никотин. Он подавляет развитие воспалительного ответа на грам-положительные бактерии путем ингибирования продукции цитокинов (ФНО-α, интерлейкины-1β, -6) моноцитами. Это явление было названо «антивоспалительным феноменом табака» [10]. Ингибиторное действие никотина через α7 нАХР опосредуется через сигнальный путь ядерного фактора NF-kB, который является критическим для активации макрофагов и секреции провоспалительных цитокинов [11,12]. Никотин может вызывать экспрессию мРНК MIP-1α (воспалительный белок макрофагов-1α) и синтез белка в альвеолярных макрофагах [13]. Таким образом, агонисты нАХР (ацетилхолин и никотин) модулируют реакции врожденного и адаптивного иммунитета посредством регуляции выброса цитокинов, которые играют критическую роль в контроле воспалительных реакций.

Одними из ключевых и критических участников воспалительного процесса являются полиморфноядерные гранулоциты (нейтрофилы). Нейтрофилы вовлечены в реакции врожденного иммунитета [14] и установление адаптивного [15]. Нейтрофилы обеспечивают наиболее быстрые реакции иммунной системы [16] и реализуют свои функции через выброс лизосомальных ферментов, генерацию активных форм кислорода и синтез цитокинов. Нейтрофилы активно вовлекаются в нейроиммунные взаимодействия в норме и при патологии. Одним из звеньев, обеспечивающих такое взаимодействие, может быть нАХР.

На нейтрофилах человека показано наличие трех подтипов нАХР: α4β2 [17,18], α3β4 [17], α7 [18]. Данных о роли этих рецепторов в функционировании нейтрофилов практически нет. Показано лишь, что действие никотина приводит к изменению связывания хемотаксического пептида [19] и изменяет экспрессию адгезивных молекул [20]. Таким образом, сведения по действию агонистов никотиновых рецепторов на функции нейтрофилов весьма незначительны, действие антагонистов этих рецепторов ранее не исследовано. Задача данной работы заключалась в исследовании действия агонистов и антагонистов никотиновых рецепторов на функциональную активность нейтрофилов.

Метод. Использованы перитонеальные нейтрофилы самцов и самок мышей линии NMRI. Генерацию активных форм кислорода (АФК) оценивали по люминол-зависимой хемилюминесценции. Клетки инкубировали с агонистами нАХР (никотином или эпибатидином) и/или специфическими антагонистами нАХР разных подтипов: αCTX – α7; [A10L]PnIA – α7; MII – α3β2), затем активировали хемотаксическим пептидом N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) в концентрации 5мкМ.

Результаты. Никотин в низких концентрациях (0,5нМ-1мкМ) усиливал активированную fMLF генерацию АФК, а в высоких (более 1мкМ) – подавлял. Значительное действие никотина наблюдалось при

инкубации клеток в течение короткого промежутка времени (1-3мин), далее происходило постепенное понижение усиливающего действия никотина, на длительных временах (20-30мин) действие никотина не наблюдалось. Усиливающее действие никотина наблюдалось преимущественно на нейтрофилах самцов, в то время как клетки самок реагировали на никотин только в 28% случаев.

Табл.1. Действие агонистов и/или антагонистов на активированную 5мкМ fMLF продукцию АФК периферическими нейтрофилами мыши

Агонист/антагонист	Действие на продукцию АФК
Никотин, 1мкМ	1,15± 0,05
Эпибатидин, 1нМ	0,95± 0,07
αCTX, 5мкМ	1,05± 0,05
αCTX+никотин	0,93± 0,03
[A10L]PnIA, 1мкМ	0,89± 0,05
[A10L]PnIA+никотин	0,94± 0,06
MII, 0.2мкМ	0,99± 0,04
MII+никотин	1,01± 0,04

Данные приведены как среднее значение±средняя квадратическая ошибка по 20-25 независимым экспериментам, каждый из которых выполнен на клетках одного животного.

Эпибатидин, преимущественно возбуждающий α4β2 нАХР, не влиял на продукцию АФК. Антагонисты действовали на продукцию АФК нейтрофилами концентрационно-зависимым образом: не влияли в низких концентрациях (1нМ-10мкМ) и подавляли в высоких (10-100мкМ). Инкубация клеток в присутствии одновременно никотина и одного из антагонистов нАХР приводила к подавлению усиливающего действия никотина (табл.1).

Полученные результаты дают основание предполагать, что нейтрофилы экспрессируют никотиновые рецепторы разных подтипов, которые участвуют в регуляции такой цитотоксической функции нейтрофилов, как генерация АФК.

Заключение. Дальнейшие исследования позволят разработать способы контроля активности врожденного иммунитета посредством воздействия на нервную систему, а также создать новые терапевтические средства для лечения и предупреждения инфекционных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Brogden K.A. et al.* //Nat. Immunol. (2005) 6(6): 558-64;
2. *Sato K.Z. et al.* //Neurosci. Lett. (1999) 266: 17-20;
3. *Skok M.V. et al.* //Mol. Pharmacol. (2003) 64(4): 885-9;
4. *Skok M.V. et al.* //Life Sci. (2007) 80(24-25): 2334-6;
5. *Borovikova L.V. et al.* //Nature (2000) 405: 458-62;
6. *Skok M.V. et al.* //Eur. J. Pharmacol. (2005) 517: 246-51;
7. *Oke S.L., Tracey K.J.* //J. Leukoc. Biol. (2008) 83(3): 512-7;
8. *Blanchet M.R. et al.* //Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. (2006) 291(4): L757-632004;
9. *Van Westerloo D.J. et al.* //J. Thromb. Haemost. (2006) 4(9): 1997-2002;
10. Rehani K. et al. //Biochim. Biophys. Acta (2008) 1783(3): 375-82;
11. *Iho S. et al.* //J. Leukoc. Biol. (2003) 74(5): 942-51 2003;
12. *Saeed R.W. et al.* //J. Exp. Med. (2005) 201(7): 1113-23;
13. *Chong I.W. et al*. //Eur. Cytokine Network (2002) 13(2): 242-9;
14. *Маянский А.Н., Маянский Д.Н.* //Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск (1989) 341 с.;
15. *Ishikawa F. Miyzaki S.* //Arch. Immunol. Ther. Exp. (2005) 53: 226–33;
16. *Segal A.W.* //Annu. Rev. Immunol. (2005) 23: 197-223;
17. *Benhammou K. et al.* //Neuropharmacol. (2000) 39(13):2818-29;
18. *Cormier A. et al.* //Mol. Pharmacol. (2004) 66: 1712-18;
19. *Codd E.E., Bridges R.B.* //Regul. Pept. (1986) 14(3): 243-51;
20. *Ryder M.I. et al.* //J. Periodontal Res. (1998) 33(6): 359-68.

***

МЕХАНИЗМЫ СИГНАЛИЗАЦИИ В СЕНСОРНЫХ КЛЕТКАХ

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ФАКТОРОВ FGF2, PAX6, OTX2 В ХОДЕ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ ВЗРОСЛОГО ТРИТОНА

Авдонин П.П., Маркитантова Ю.В.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва

Введение. Регенерация сетчатки у взрослых тритонов происходит в результате трансдифференцировки клеток пигментного эпителия. После удаления сетчатки, клетки пигментного эпителия дедифференцируются, пролиферируют, формируя популяцию нейробластов, из которых образуются все типы клеток регенерирующей сетчатки [1]. В восстановлении сетчатки также участвуют мультипотентные клетки, локализованные в периферической цилиарной зоне, которые в онтогенезе обеспечивают рост сетчатки. Известно, что пролиферация и дифференцировка клеток пигментного эпителия и сетчатки в ходе нормального развития глаза находится под контролем эволюционно-консервативной сети транскрипционных факторов PAX6, SIX3, RX, CHX, OTX2, MITF и сигнальных белков FGF2, TGFb2, SHH, WNT, BMP4, координирующих экспрессию регуляторных генов [2]. Задача наших исследований состоит в идентификации и изучении экспрессии генов, которые могут запускать и контролировать процесс регенерации сетчатки. В предыдущей работе, с использованием метода ПЦР, мы выявили возрастание уровня экспрессии генов, кодирующих сигнальные молекулы FGF2 и транскрипционные факторы Pax6, Six3 на ранней стадии регенерации сетчатки – стадии пролиферирующих нейробластов. Активация генов *Pax6, Six3, FGF2* происходит на фоне снижения уровня экспрессии регуляторного гена *Otx2*, контролирующего исходную меланогенную дифференцировку клеток пигментного эпителия, а также гена-маркера пигментного эпителия *RPE65* [3]. Цель настоящей работы состоит в изучении локализации сигнального белка FGF2 и транскрипционных факторов PAX6 и OTX2 в ходе регенерации сетчатки.

Материалы и методы. Объектом исследования служили взрослые тритоны Pleurodeles waltl. Животных наркотизировали в растворе MS-222 на 6.5% NaCl, удаляли хрусталик и сетчатку через разрез в дорсальной области глаза. Анализировали глаза на 25-е и 45-е сутки после удаления сетчатки, а также нативные глаза. Для гистологического исследования глаза фиксировали в растворе Буэна, отмывали в 70% спирте, обезвоживали по стандартной методике и заключали в парафин. Полученные серийные поперечные срезы толщиной 5мкм окрашивали гематоксилином-эозином.

Для иммунохимического исследования глаза фиксировали в 4% нейтральном формалине, приготовленном на PBS (pH 7.4) с 5% сахарозой. Затем глаза последовательно отмывали в нескольких сменах PBS с 5% сахарозой, с 10% сахарозой, оставляли на ночь в растворе PBS с 20% сахарозой при 4^{o}C**.** С помощью криостата Leica M1900 (Leica, Германия) были получены срезы толщиной 10мкм. В работе использовали поликлональные антитела к FGF2 (Sigma, США, 1:200), OTX2 (Abcam, Великобритания, 1:300), моноклональные антитела к PAX6 (Abcam, Великобритания, 1:200). Вторичные антитела ALEXA 488 (green) и ALEXA 546 (red) (MolecularProbes, США) были разведены 1:1000. В качестве контроля специфичности связывания антител параллельно проводили реакцию в отсутствие первичных антител. После отмывания в фосфатном буфере, срезы заключали в среду Vectashield (Vector, США). Иммунофлуоресценцию анализировали с использованием микроскопа Leica DM RXA2 (Германия), оснащенного набором светофильтров и фотокамерой Olimpus DP70 (Германия).

Результаты и обсуждение. В нативной сетчатке тритона выявлена экспрессия всех трех исследуемых регуляторных факторов FGF2, PAX6, OTX2, однако имеются региональные отличия в локализации (рис.1). Белок FGF2 детектируется – во внутреннем ядерном слое сетчатки, сетчатых слоях сетчатки, в слое ганглиозных клеток, PAX6 – в клетках внутреннего ядерного слоя и в ганглиозных клетках, а OTX2 – в наружном ядерном слое, представленном телами фоторецепторов, ганглиозных клетках и отдельных клетках внутреннего ядерного слоя. Иммунопозитивная реакция на окрашивание антителами к PAX6 наиболее выражена в клетках периферической части сетчатки, где локализуются малодифференцированные клетки, что согласуется с данными об участии PAX6 в поддержании мультипотентного статуса этих клеток [4]. В клетках пигментного эпителия обнаружен иммунопозитивный сигнал для OTX2 (рис.1). Белки FGF2 и PAX6 в пигментном эпителии не выявлены.

Регенерат сетчатки на 25сут. после операции представляет собой депигментированный слой нейробластов, толщиной в 2-3 клетки. В этот период в центре глаза в нейробластах регенерирующей сетчатки еще обнаруживаются отдельные гранулы пигмента меланина. На 25 сутки восстановления сетчатки интенсивный иммунопозитивный сигнал для FGF2 выявлен в цитоплазме, а для транскрипционного фактора PAX6 – в ядрах депигментированных, пролиферирующих нейробластов (рис.2). В клетках пигментного эпителия на данной стадии регенерации сетчатки иммунопозитивный сигнал для белка PAX6 не обнаружен. В пигментном

эпителии на стадии раннего зачатка сетчатки выявлен иммунопозитивный сигнал для OTX2 (рис.2).

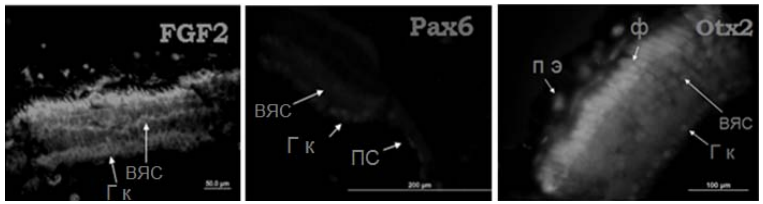


Рис.1. Локализация белков FGF2, PAX6, OTX2 в нативной сетчатке. ВЯС – внутренний ядерный слой, Гк – ганглиозные клетки, ПС – периферия сетчатки, Ф – фоторецепторы.

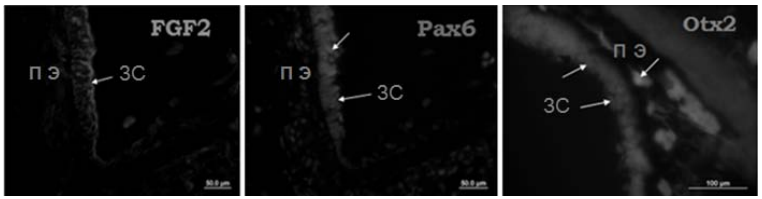


Рис.2. Локализация белков FGF2, PAX6, OTX2 на стадии нейробластов регенерирующей сетчатки. ЗС – зачаток сетчатки, ПЭ – пигментный эпителий.

По данным, полученным нами методом ПЦР [3], и данным литературы [5] на ранней стадии регенерации сетчатки наблюдается снижение уровня экспрессии не только гена *OTX2*, но и маркеров меланогенеза – RPE65, CRBP, являющихся мишенями для *OTX2*. Полученные результаты свидетельствуют о дедифференцировке клеток пигментного эпителия сетчатки тритона. Обнаружен иммунопозитивный сигнал для OTX2 в нейробластах раннего регенерата сетчатки. Таким образом, по мере регенерации сетчатки, характер экспрессии OTX2 изменяется. Наши результаты согласуются с данными об изменении уровня экспрессии ключевых регуляторных генов PAX6, MITF, OTX2 на ранних стадиях развития глаза позвоночных. Показано, что в основе формирования нейробластов развивающейся сетчатки лежат антагонистические взаимодействия между этими генами [6]. Одним из сигнальных факторов, который принимает участие в запуске регенерации сетчатки, является FGF2. Основным источником сигналов FGF может служить сосудистая оболочка глаза [7,8]. В системе *in vitro* показано, что трансдифференцировка клеток пигментного эпителия сетчатки куриного эмбриона в клетки нейрального типа происходит на фоне снижения уровня экспрессии гена *Mitf* и возрастания уровня экспрессии гена *Pax6,* активация которого может осуществляться через сигнальный путь FGF/FGFR/MEK/ErK [9]. Обсуждается участие этого сигнального пути в

индукции трансдифференцировки в системе *in vitro* клеток пигментного эпителия в клетки нейрального фенотипа при регенерации сетчатки тритона *Cynnops pyrhogaster* [10]. Наблюдаемая активация FGF2 в раннем регенерате сетчатки, представленном слоем нейробластов, коррелирует с ранним формированием клеток Мюллеровской глии при регенерации сетчатки [5], которая возможно является еще одним источником этого фактора.

На исследуемой нами поздней стадии регенерации (45 суток) в зачатке сетчатки происходит дифференцировка клеток нейрального и глиального типов. В регенерате морфологически различимы основные типы клеток сетчатки (ганглиозные, клетки внутреннего и наружного ядерных слоев).

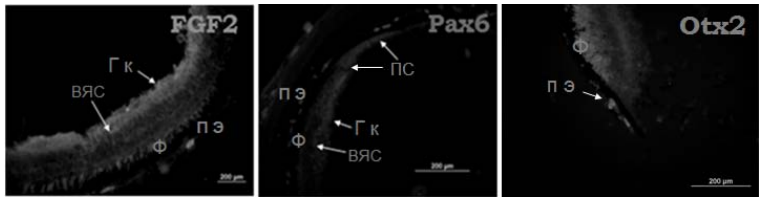


Рис.3. Локализация белков FGF2, PAX6, OTX2 на поздней стадии регенерации сетчатки. ВЯС – внутренний ядерный слой, ПЭ – пигментный эпителий, Ф – фоторецепторы, Гк –ганглиозные клетки, ПС – периферия сетчатки.

Дифференцировка внутреннего и наружного сетчатых слоев, формирующих синаптические связи между клетками сетчатки, близка к завершению. Иммунопозитивная реакция на окрашивание антителами к FGF2 наблюдается в клетках внутреннего ядерного слоя и в ганглиозных клетках (рис.3). Белок PAX6 также детектируется в ганглиозных клетках и клетках внутреннего ядерного слоя (рис.3). Сходство локализации белков FGF2 и PAX6 на стадии нейробластов сетчатки и на стадиях активной дифференцировки клеток сетчатки в ходе ее регенерации согласуется с данными о принадлежности этих генов к одному сигнальному пути [9]. Интенсивная иммунопозитивная реакция для OTX2 в клетках пигментного эпителия, выявленная на 45 сутки регенерации сетчатки, свидетельствует о процессе восстановления пигментного эпителия – накоплении пигмента меланина (рис.3). На этой стадии иммунофлуоресцентный сигнал для OTX2 выявлен и в регенерате сетчатки – белок локализуется в фоторецепторах, дифференцировка которых близка к завершению, а также в некоторых клетках внутреннего ядерного слоя сетчатки, предположительно, в биполярах.

Полученные нами результаты согласуются с данными [5,11] о том, что транскрипционный фактор OTX2, контролирующий меланогенную дифференцировку клеток пигментного эпителия и дифференцировку

клеток сетчатки в ходе развития, выполняет сходную функцию при регенерации сетчатки.

Выводы. При регенерации сетчатки взрослых тритонов экспрессируются транскрипционные факторы PAX6, OTX2 и сигнальные молекулы FGF2, координированная работа которых инициирует нормальное развитие тканей глаза. Согласно нашим данным и данным литературы, взаимодействия между этими генами являются ключевыми в процессе индукции трансдифференцировки клеток пигментного эпителия. Полученные нами результаты подтверждают многофункциональную роль транскрипционных факторов FGF2, PAX6, OTX2. Исследуемые регуляторные гены могут быть вовлечены в контроль трансдифференцировки клеток пигментного эпителия, а также участвовать в контроле пролиферации и дифференцировки клеток в ходе последовательных стадий восстановления сетчатки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №08-04-00462 и программы президиума РАН «Биоразнообразие».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Миташов В.И.* //Онтогенез (1976) 7(5): 495-501;
2. *Martinez-Morales J. R. et al.* //Bioassays (2004) 26(7): 766-77;
3. *Авдонин П.П. и др.* //Известия РАН. Биол. 2008 (4): 414-21;
4. *Marquardt T., Gruss P.* //Trends Neurosci. (2002) 25(1): 32-7;
5. *Sakami S. et al.* //Dev. Brain Res. (2005) 155: 49-59;
6. *Baumer N. et al.* //Development (2003) 121(1): 2903-15;
7. *Azuma N. et al.* //Hum. Mol. Genet. (2005) 14(8): 1059-68;
8. *Araki M.* //Strategies for Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: From fish to Human. (2007): 77-95;
9. *Spence J.R. et al.* //Dev Dyn. (2007) 236(5): 1161-74;
10. *Susaki K., Chiba C.* //Pigment Cell Res. (2007) 20(5): 364-79;
11. *Koike Ch. et al.* //Mol. Cell. Biol. (2007): 8318-29.

МЕДЛЕННЫЙ КОМПОНЕНТ КАЛЬЦИЕВОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ В ПАЛОЧКАХ СЕТЧАТКИ ЛЯГУШКИ *R. RIDIBUNDA*

Астахова Л.А., Фирсов М.Л.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН, СПб

Активация светом одной молекулы родопсина при посредстве каскада реакций фототрансдукции приводит к гиперполяризации клетки.

Темноадаптированная палочка лягушки способна реагировать на одиночные кванты (*Baylor et al.*, 1979a), однако при повышении уровня фоновой засветки чувствительность фоторецептора снижается, что позволяет избежать насыщения фоторецептора. Изменение чувствительности фоторецептора в зависимости от уровня фонового освещения регулируется внутриклеточной концентрацией кальция, которая изменяется во время развития фотоответа и в результате световой адаптации фоторецептора (для обзора см. *Fain et al.*, 2001; *Фирсов и Говардовский*, 2001). В соответствии с современными представлениями, концентрация свободного кальция в цитоплазме определяется балансом входящего и выходящего потоков, а также хелатирующими свойствами одного или нескольких кальциевых буферов, имеющихся в фоторецепторе. Кальций входит в фоторецептор через светоуправляемые каналы цитоплазматической мембраны наружного сегмента, движимый направленным внутрь клетки электрохимическим градиентом. Обратная откачка кальция из цитоплазмы наружу осуществляется специализированным Na^+/Ca^{2+}, K^+ обменником с затратой энергии АТФ. Баланс этих двух потоков в темноте приводит к стабилизации внутриклеточной концентрации свободного кальция на уровне приблизительно 0.6мкМ (*Korenbrot and Miller*, 1989; *Lagnado et al.*, 1992; *Sampath et al.*, 1998)

Постоянный световой фон, закрывающий часть каналов в наружной мембране фоторецептора, устанавливает концентрацию свободного внутриклеточного кальция на новом, более низком уровне. При этом скорость стабилизации концентрации кальция на новом уровне очевидно должна зависеть как от скорости закачки и откачки кальция, так и от концентрации и сродства буферов к кальцию. В электрофизиологических экспериментах на одиночных палочках амбистомы было найдено, что при умеренных засветках кальций стабилизируется на новом уровне с постоянной времени 0.4с (*Hodgkin et al.*, 1987). Эксперименты с внутриклеточным кальций-чувствительным красителем показали, что как минимум два кальциевых буфера, один с высоким и один с низким сродством, присутствуют в палочке (*Lagnado et al.*, 1992). Эти два буфера формируют двухэкспоненциальную кинетику изменения внутриклеточного кальция, с постоянными времени 200мс и 5.7 секунд (*Matthews et al.*, 2002). Существуют однако свидетельства в пользу того, что светоиндуцированный выход кальция из наружного сегмента фоторецептора может занимать существенно бóльшие времена с характерной постоянной времени 44сек (*Говардовский и Кузьмин*, 1999). В настоящей работе нами показано, что переходные процессы в каскаде фототрансдукции, вызванные мгновенным уменьшением концентрации наружного кальция, имеют в своем составе ранее не описанный медленный компонент, который проявляется как медленное уменьшение

чувствительности клетки, описываемое приблизительно экспоненциальным законом с постоянной времени 110 секунд. Механизм или механизмы, лежащие в основе этих эффектов, неясны и требуют дальнейшего изучения.

Материалы и методы. Исследование проводили на изолированных палочках лягушки *R. ridibunda*. Ток одиночных палочек регистрировали при помощи всасывающей микропипетки (*Baylor et al.*, 1979b). Палочки перемещали в растворы с измененной концентрацией $[Ca^{2+}]_{free}$ при помощи системы быстрой смены омывающего раствора. Исходно палочки находились в нормальном растворе Рингера для холоднокровных (90мМ NaCl, 2.5мМ KCl, 1.4мМ $MgCl_2$, 10мМ глюкозы, 1.05мМ $CaCl_2$, 5мМ $NaHCO_3$, 5мМ HEPES, 0,05мМ ЕДТА; 50мг/л БСА). Из нормального раствора Рингера палочки перемещались в раствор, содержащий номинально либо 50нМ $[Ca^{2+}]_{out}$ (концентрация свободных ионов), либо 3.4нМ $[Ca^{2+}]_{out}$. Необходимые концентрации $[Ca^{2+}]_{out}$ достигались за счет добавления ЭГТА. Также в одной экспериментальной серии палочки исходно инкубировались в растворе Рингера, содержащем 50нМ $[Ca^{2+}]_{out}$, и перемещались в раствор, содержавший 5нМ $[Ca^{2+}]_{out}$.

Результаты и обсуждение. Клетки для экспериментальных манипуляций выбирались в результате визуальной инспекции большого количества одиночных палочек, выстилающих дно проточной камеры. Основным критерием для выбора клетки служил размер сохранившейся у клетки части внутреннего сегмента. После фиксации клетки в пипетке, палочка тестировалась насыщающей вспышкой для определения размера темнового тока. Затем клетка стимулировалась несколькими ненасыщенными стимулами разной интенсивности для получения более детального представления о чувствительности клетки.

После перемещения клетки в раствор с низким содержанием кальция ($[Ca^{2+}]_{outlow}$) фототок как правило демонстрирует переходной процесс, иногда сопровождающийся существенным увеличением тока, за которым следует возврат к уровню, примерно равному тому, который был до изменения внешнего кальция. Для определения размера темнового Imax тока сразу после перемещения в $[Ca^{2+}]_{outlow}$, клетка стимулировалась насыщающими вспышками (рис.1); отношение величин насыщенных ответов палочки до (I_{norm}) и сразу после изменения $[Ca^{2+}]_{out}$ (I_{max}) служило критерием изменения тока. Средняя величина быстрого увеличения тока составила I_{max}/I_{norm}=1.3±0.4 раз (N=10) для $[Ca^{2+}]_{out}$=50нМ и 1.0±0.07 раз (N=4) для $[Ca^{2+}]_{out}$=3.4нМ, при этом у трех клеток увеличение тока составило более 10 раз (не включены в данную статистику). После стабилизации, размер темнового тока палочки в растворе с низким кальцием (I_{stab}) был несколько меньше тока палочки в растворе с нормальным содержанием кальция. Средняя величина конечного изменения темнового тока составила I_{stab}/I_{norm}=0.6±0.09 раз

(N=11) для $[Ca^{2+}]_{out}$=50нМ и 0.6±0.06 раз (N=4) для $[Ca^{2+}]_{out}$=3.4нМ Релаксация темнового тока обратно к условно-стабильному состоянию у большинства клеток могла быть достаточно хорошо описана одноэкспоненциальным процессом с постоянной времени τ_{relax}=8.3±4.2с (N=10) для $[Ca^{2+}]_{out}$=50нМ и 8.5±1.3с (N=4) для $[Ca^{2+}]_{out}$=3.4нМ.

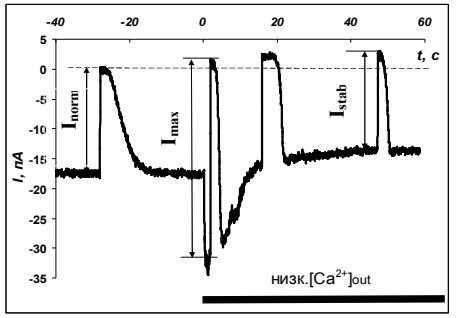


Рис.1. Реакция фототока палочки лягушки на мгновенное изменение уровня кальция в наружном растворе от 1мМ до 50нМ. Обозначения см. в тексте.

После стабилизации темнового тока палочки в растворе с низким кальцием, ее чувствительность сравнивалась с до-тестовым уровнем. Для этого несколько серий ответов на стимулы различной яркости были записаны и усреднены. Сдвиг между двумя кривыми в координатах «относительный ответ – интенсивность» характеризует изменение чувствительности клетки при понижении $[Ca^{2+}]_{out}$. Усредненные значения показывают, что чувствительность клетки, измеренная после стабилизации уровня темнового тока, оказывается существенно ниже, чем до-тестовый уровень (2.2±0.3лог.ед. (N=11)) для $[Ca^{2+}]_{out=}$50нМ и 2.1±0.4лог.ед. (N=4)) для $[Ca^{2+}]_{out}$=3.4нМ.

Сравнение чувствительности палочки при помощи измерения кривых ответ-интенсивность в среде с нормальным и низким кальцием позволяет достаточно точно оценить величину его изменения, однако не отвечает на вопрос, по какому закону изменяется чувствительность. Для изучения временного хода изменения чувствительности во время развития переходных процессов, вызванных быстрым понижением наружного кальция, мы периодически стимулировали палочку ненасыщающими стимулами в течение 200-300с после перемещения клетку в среду с низким кальцием. Полученные результаты позволяют разделить палочки на две категории. Примерно у трети клеток чувствительность после значительного первоначального падения, по-видимому, коррелирующего по времени с начальным ростом и последующей релаксацией темнового тока, более не меняется. Это видно из стабильного размера ответов палочки на ненасыщающие стимулы после первых приблизительно 50с, и в течение последующих по крайней мере 200с записи.

У остальных клеток падение чувствительности носит двухфазный характер. После значительного первоначального падения чувствительности, происходящего в течение первых 20-30с, чувствительность продолжает уменьшаться на протяжении нескольких сотен секунд. Об этом свидетельствует монотонное падение амплитуды ненасыщенного ответа палочки (рис.2).

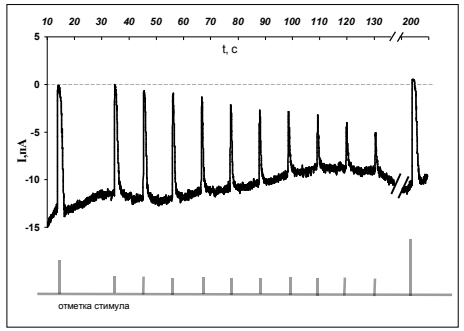


Рис.2. Ответы палочки лягушки на серию ненасыщающих стимулов в растворе с низким (50нМ) содержанием кальция. До и после серии клетка стимулировалась насыщающими стимулами для определения величины фототока. За время стимуляции фототок изменился на 18%.

Амплитуда насыщенного ответа при этом (то есть темновой ток) оставалась стабильной. Для того, чтобы количественно охарактеризовать скорость изменения чувствительности клетки во время медленной фазы, зависимость амплитуды ненасыщенного ответа от времени описывалась одиночной экспоненциальной функцией. Результат описания показывает, что постоянная времени медленного падения чувствительности характеризуется большим разбросом величин (110±79с (N=8)) для $[Ca^{2+}]_{out}$=50нМ и 60±7с (N=3)) для $[Ca^{2+}]_{out}$=3.4нМ. Из-за значительного перекрытия областей ошибки, невозможно оценить, есть ли разница в этом параметре при перемещении клетки в раствор с 50 и 3.4нМ кальция. При переходе из раствора $[Ca^{2+}]_{out}$=50нМ в 3.4нМ начальное быстрое уменьшение чувствительности практически отсутствует; у всех измеренных по такой схеме палочек чувствительность обратимо уменьшается только по медленной кинетике со средней постоянной времени 33±15с (N=9). Приведенные выше цифры позволяют предположить, что скорость уменьшения чувствительности монотонно увеличивается с уменьшением содержания кальция в наружном растворе.

Полученные нами данные не позволяют пока сделать какие-либо определенные выводы о природе механизма, обеспечивающего выявленное нами медленное падение чувствительности фоторецептора при длительном пребывании его в растворе с низким содержанием кальция. Две альтернативные возможности могут быть рассмотрены в качестве наиболее вероятного объяснения наблюдаемого эффекта. Первая – после начального быстрого уменьшения, концентрация кальция

продолжает медленно уменьшаться, высвобождаясь с медленно-обмениваемого буфера в наружном сегмента палочки. В пользу этого предположения говорят данные Говардовского и Кузьмина (1999), зарегистрировавших светоиндуцированный выход кальция из палочки лягушки *R. ridibunda* с постоянной времени 44с. Другим объяснением могла бы быть медленная модификация сродства к кальцию одного из кальций-зависимых белков каскада фототрансдукции – рековерина, кальмодулина или GCAP.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Говардовский В.И., Кузьмин Д.Г.* //Сенсор. Сист. (1999) 13(3): 206-15;
2. *Фирсов М.Л., Говардовский В.И.* //Сенсор. Сист. (2001) 15(2): 102-15;
3. *Baylor D.A., Lamb T.D. and Yau K.W.*//J. Physiol. (1979a) 288: 613-34;
4. *Baylor D.A., Lamb T.D. and Yau K.W.*//J. Physiol. (1979a) 288: 589-611;
5. *Fain G.L. et al.* //Physiol. Rev. (2001) 81: 117-51;
6. *Hodgkin A.L., McNaughton P.A., Nunn B.J.* //J. Physiol. (1987) 391: 347-70;
7. *Korenbrot J.I. and Miller D.L.*//Vision Res. (1989) 29(8): 939-48;
8. *Lagnado L., Cervetto L., McNaughton P.A.* //J. Physiol. (1992) 455: 111-42;
9. *Matthews H.R., Fain G.L.* //J. Physiol. (2002) 542: 829-41;
10. *Sampath A.P. et al.* //J. Gen. Physiol. (1998). 111: 53-64.

ВЫЯВЛЕНИЕ ОБОНЯТЕЛЬНОГО МАРКЕРНОГО БЕЛКА В ТКАНЯХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Буданова Е.Н., Быстрова М.Ф.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Обонятельный маркерный белок (OMP) является маркером зрелых обонятельных рецепторных нейронов – клеток, которые специализируются на детекции молекул запахов, усилении сигнала, его кодировании в форме электрических импульсов и пересылке информации в обонятельную луковицу для дальнейшей обработки [1]. OMP – мажорный цитозольный белок с относительной молекулярной массой 19кДа, который синтезируется только в зрелых обонятельных нейронах и путем аксонального транспорта попадает в обонятельную луковицу. Зрелыми считаются нейроны, аксоны которых установили контакты с мишенями в обонятельной луковице. Этот белок локализован во всех частях обонятельного нейрона, в цилиях, в соме, в аксоне, и по количеству по количеству мРНК транскриптов в этих клетках OMP лидирует. OMP был впервые выделен и охарактеризован биохимически

более тридцати лет назад, однако его физиологическая роль в обонятельной системе до сих пор остается неизвестной. Предполагается, что OMP может быть вовлечен в модуляцию процесса трансдукции обонятельного сигнала. У мышей с нокаутированным геном OMP наблюдалось выраженное уменьшение амплитуды элекороольфактограммы, а также измененные поведенческие реакции, связанные с детекцией и различением запахов [2-4]. Кроме того, существует гипотиза, что OMP может участвовать в контроле нейрогенеза обонятельных нейронов, которые обновляются даже при нормальных физиологических условиях в течение всей жизни животного за счет популяци базальных прогениторных клеток обонятельного эпителия [5]. Интересно, что экспрессия генов обонятельных рецепторов была обнаружена в тканях, не связанных с обонятельной функцией, а именно в семенниках и во вкусовой ткани [6-8]. Каково функциональное значение этого феномена пока неизвестно. Поскольку OMP локализован в клетках, экспрессирующих гены обонятельных рецепторов, мы решили проверить наличие этого белка в семенниках и вкусовой ткани крысы с применением методов иммуногистохимии.

Методы исследования. Полноразмерная последовательность кДНК, кодирующая OMP крысы, была наработана с помощью одноступенчатой ОТ-ПЦР (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями производителя и с использованием ген-специфических праймеров. В качестве матрицы использовалась тотальная РНК, выделенная из ткани обонятельного эпителия с применением RNeasy RNA isolation kit (Qiagen, Германия). ПЦР-продукт клонировали в вектор pET28b(+) (Novagen, США). Рекомбинантной плазмидой трансформировали клетки E.coli Rosetta TM. Синтез рекомбинантного белка индуцировали добавлением β-изопропилтиогалактозида (ИПТГ). Очистку рекомбинантного белка проводили с помощью металлоаффинной хроматографии. Для получения поликлональных антител кролика иммунизировали подкожно 300мкг рекомбинантного OMP крысы в полном адъюванте Фрейнда. Антитела выделяли из антисыворотки с помощью хроматографии на сефарозе T-Gel (Affiland).

Результаты. Рекомбинантный OMP крысы, содержащий N-концевой полигистидиновый кластер, был получен путем экспрессии в *E. coli* и очищен с помощью металлохелатной аффинной хроматографии в нативных условиях на Ni-NTA агарозе. Полученный препарат рекомбинантного белка в денатурирующем электрофорезе ПААГ с Ds-Na при окрашивании Кумасси был гомогенен (рис.1А). Препаратом белка был иммунизирован кролик и получена антисыворотка с высоким титром антител (1:80000) по данным иммунно-ферментного анализа. На Вестерн-блоте тотальных белков ткани обонятельного эпителия крысы (рис.1Б) антисыворотка проявляла иммунореактивность к единственному белку, который мигрировал на денатурирующем ПААГ с Ds-Na как полоса с молекулярной массой 19кДа, что соответствует эндогенному OMP.

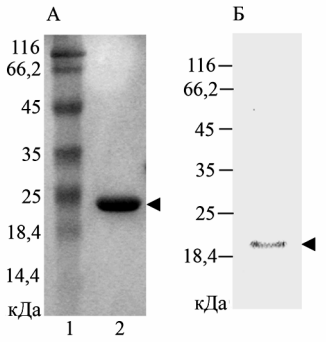


Рис.1. Электрофоретический анализ чистоты препарата рекомбинантного OMP. А – Na-ДС ПААГ анализ чистоты препарата рекомбинантного OMP, использованного для иммунизации кролика с целью получения сыворотки: 1–маркеры молекулярного веса; 2–рекомбинантный очищенный OMP; Б–Вестерн-блот тотальных белков обонятельного эпителия, разделенных Na-ДС ПААГ; стрелками отмечено местоположение OMP.

Таким образом, была показана высокая чувствительность и специфичность полученных антител, которые затем были использованы для иммунногистохимической детекции OMP на гистологических срезах обонятельного эпителия, вкусового эпителия и семенников (рис.2). В качестве вторичных использовали конъюгат анти-кроличьих Ig козы и Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) в разведении 1:1000. Препараты анализировались с использованием флуоресцентного микроскопа Axioscop2 и камеры Axiocam (Zeiss). На срезах обонятельного эпителия с помощью антисыворотки была показана классическая локализация OMP в биполярных обонятельных нейронах, включая дендриты и аксоны. На срезах семенников иммунореактивности не было обнаружено. На срезах вкусовой ткани была показана специфическая локализация OMP во вкусовых почках желобоватых вкусовых сосочков.

Заключение. Впервые было обнаружено присутствие OMP во вкусовых клетках млекопитающих. Этот факт свидетельствует о том, что OMP может играть роль не только в трансдукции обонятельного сигнала, но и каким-то образом участвовать в восприятии вкусовых сигналов. Однако какую именно роль исполняет OMP во вкусовой ткани, пока остается неизвестным.

Работа поддержана РФФИ (грант №07-04-01389а) и программы президиума РАН «Биоразнообразие».

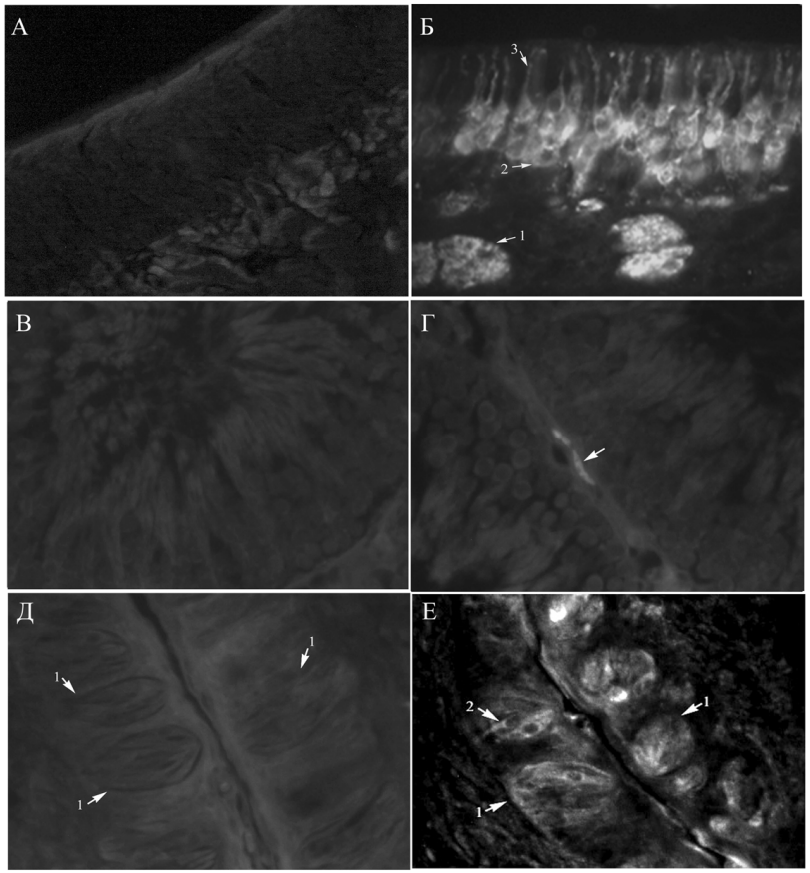


Рис.2. Гистологическое исследование. А–срез ткани обонятельного эпителия, контроль метода, окрашивание ткани с помощью преиммунной сыворотки; Б–иммуногистохимическое окрашивание обонятельного эпителия с помощью сыворотки к OMP: 1–нервные волокна, содержащие OMP, 2–тела обонятельных нейронов, 3–дендриты обонятельных нейронов; В–срез ткани семенников, контроль метода, окрашивание с помощью преиммунной сыворотки; Г–иммуногистохимическое окрашивание ткани семенников сывороткой к OMP, иммунореактивность наблюдается только в нервных волокнах; Д–срезы ткани языка, контроль метода, окрашивание с помошью преиммунной сыворотки; Е–иммуногистохимическое окрашивание ткани языка с помощью сыворотки к OMP, наблюдается иммунореактивность в клетках вкусовых почек желобоватых сосочков языка: 1–вкусовая почка, 2–клетки вкусовых почек.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Farbman A., Margolis F.* //Dev. Biol. (1980) 74: 205-15;
2. *Buiakova O.I. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93: 9858-63;
3. *Youngentob S.L., Margolis F.L.* //Neuroreport (1999) 10: 15-9;
4. *Youngentob S.L., Margolis F.L., Youngentob L.M.* //Behav. Neurosci. (2001) 115: 626-31;
5. *Carr V.M.et al.* //J. Neurobiol. (1998) 34: 377-90;
6. *Parmentier M. et al.* //Nature (1992) 355: 453-5;
7. *Thomas M.B., Haines S.L., Akeson R.A.* //Gene (1996) 178(1-2): 1-5;
8. *Steiger S.S., Fidler A.E., Kempenaers B.* //J. Hered. (2008) 99(6): 624-288.

ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ОБОНЯНИЯ С УЧАСТИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Ганшин В.М., Лабас Ю.А., Зинкевич Э.П.

Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН, Москва

Предлагается механизм функционирования обонятельного рецепторного белка (ОРБ) – ***как молекулярной машины периодического действия***, активируемой перестройками липидной фазы сенсорной мембраны в результате периодических изменений окислительно-восстановительного статуса обонятельной рецепторной клетки. Повышение или снижение внутриклеточной (внутримембранной) концентрации окислителей/восстановителей (изменение редокс-статуса) индуцирует функционально значимые изменения клеточной активности.

Исследование превращений молекул пахучих веществ на поверхности обонятельного эпителия показало их мгновенное преобразование в более полярные производные, что должно быть связано с окислением [1] и предполагает окисление пахучих молекул в акте обонятельной рецепции с участием экзогенного кислорода [2]. Данные об обратимом уменьшении содержания АТФ в условиях кратковременной аноксии поверхности обонятельного эпителия и быстрого восстановления уровня макроэрга при возвращении в кислородную среду также свидетельствуют о важной роли присутствия кислорода для реализации сенсорной функции [3].

В качестве наиболее общего показателя активности радикалов клеток могут служить такие активные формы кислорода (АФК) как супероксид-анион радикал ($O_2^{-\bullet}$) и конъюгированный с протоном продукт – кислота $HO_2^{\bullet}$. Эти радикальные частицы в процессах обонятельной

трансдукции выступают как регуляторы изменения окислительно-восстановительного статуса и мембранной механики (микровязкости), что в конечном итоге проявляется в изменении конформации обонятельного рецепторного белка т.е. переход клетки из состояния «***off***» в состояние «***on***», что сопровождается активацией G-белка и передачей сигнала в плазмолемму обонятельного нейрона. Представленная обобщенная картина предполагает, что $O_2^{-\bullet}/HO_2^{\bullet}$ радикалы, изменяя структуру мембран клетки, облегчают другим биологическим участникам процесса обонятельного восприятия доступ к гидрофобной области фосфолипидного двойного слоя сенсорной мембраны и, следовательно, вносят свой вклад в зависимые от пахучих молекул каскады передачи сигналов.

У живых организмов с развитой системой легочного дыхания рассматриваемые механизмы должны работать циклическим образом. В процессе дыхания периодические изменения концентрации кислорода в воздухе, окружающем обонятельную выстилку, приводят к соответствующим изменениям в концентрации АФК. За этим следует изменение окислительно-восстановительного статуса обонятельной сенсорной мембраны и, соответственно – состояния ОРБ. Углекислый газ, содержащийся в выдыхаемом воздухе, также должен вносить функционально значимые изменения в окислительно-восстановительный статус обонятельной рецепторной клетки: молекулы CO_2 обладают большой подвижностью и проницаемостью, а также характеризуются выраженной антиоксидантной активностью [4]. Т.о. изменение при дыхании концентрации CO_2 будет производить изменения статуса сенсорной мембраны, противоположное действию O_2. Так как процесс вдыхания пахучих веществ приходится на фазу повышенного содержания O_2 при минимальном содержании CO_2 в окружающем выстилку воздухе, то в этой фазе должна возрастать концентрация АФК и соответственно увеличиваться концентрация окисленных липидов. Сенсорная мембрана при этом должна становиться более жесткой.

Повышение концентрации перекисей липидов приводит к повышению проницаемости мембраны для посторонних включений, и т.о. вдох воздуха с пахучими веществами совпадает по фазе с повышенной доступностью сайтов связывания ОРБ для молекул пахучих веществ. Этот процесс проходит также на фоне повышенной окислительной активности обонятельной слизи, что должно инициировать повышение эффективности окислительной трансформации самих пахучих веществ.

Повышенная проницаемость сенсорной мембраны в процессе вдоха также способствует проникновению липид-трансформирующих ферментов в активные зоны. Это влечет за собой качественное изменение липидного состава сенсорной мембраны и соответственно облегчает

переход ОРБ из состояния «***off***» в состояние «***on***» за счет повышения доступности центров связывания ОРБ с G-белком, мембранными и внутриклеточными антиоксидантами. При наличии во вдыхаемом воздухе серосодержащих пахучих веществ они могут непосредственно участвовать в обменных процессах с инициированием разрыва дисульфидной связи между ОРБ и G-белком. В фазе выдоха концентрация O_2 в воздухе падает, при повышении концентрации CO_2. Окислительно-восстановительные процессы в сенсорной мембране развиваются в обратной последовательности, приводя сенсорную мембрану в первоначальное состояние. Этот этап в целом характеризуется восстановлением окисленных на фазе вдоха полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) сенсорной мембраны, что способствует восстановлению связи ОРБ с G-белком. Цикл функционирования обонятельной клетки завершается и сенсорная система вновь готова к принятию сигнала.

В связи с рассматриваемой гипотезой о роли редокс-статуса рецепторной клетки в реализации первичных процессов обонятельной трансдукции интерес представляют данные о возможной роли тиол-дисульфидного обмена в поддержании редокс-статуса сенсорной мембраны обонятельной рецепторной клетки. Также становится легко предсказуемой интенсивность запаха соединений, характеризующихся экстремально низкими порогами обонятельного восприятия, например, у человека. К числу таких соединений в первую очередь относятся меркаптаны и другие соединения двухвалентной серы, а также амины и азотсодержащие вещества, обладающие в достаточно выраженной степени антиоксидантными свойствами. Внедрение таких соединений в сенсорную мембрану в фазе окисления ПНЖК липидов сенсорной должно привести к функционально значимому изменению редокс-статуса нейрона и повлечь за собой изменение характера фоновой импульсной активности, что будет воспринято распознающими структурами обонятельного мозга в качестве сильного запаха.

В связи с возможной активной ролью O_2 и CO_2 в процессах обонятельной рецепции важно отметить, что они не обладают запахом или иначе говоря могут восприниматься организмом в качестве «белого запаха» аналогичного «белому шуму». Причина этого явления может быть связана с тем, что как кислород, так и углекислый газ модулируют активность всех обонятельных нейронов в максимальной степени, вследствие чего могут восприниматься распознающими отделами центральной нервной системы как объекты, не несущие запаха.

В целом, гипотеза участия АФК в механизмах обоняния предоставляет широкие возможности для объяснения силы и качества запаха с позиции влияния пахучих веществ на окислительно-восстановительного статус сенсорной мембраны.

Исходя из энергетических соображений, взаимодействия ОРБ с одной молекулой пахучего вещества явно недостаточно, чтобы вызвать функциональный отклик, заключающийся в разрыве, по крайней мере, трех связей ОРБ с G-белком [5]. Центральным звеном предлагаемой концепции является представление о том, что активация ОРБ – его конформационный переход из состояния «***off***» в состояние «***on***» определяется конкурентным замещением множественных связей гидрофобных аминокислот мембранных доменов ОРБ с сайтами «одотопами» липидного матрикса, определяющего взаимное расположение доменов ОРБ в сенсорной мембране.

Важным для выдвигаемого представления является то, что в составе ОРБ связывающий центр может фактически отсутствовать, он как бы размазан по поверхности мембранных доменов.

Поскольку связи аминокислот доменов ОРБ с липидным матриксом определяются в основном слабыми гидрофобными взаимодействиями, процесс конкурентного воздействия ПВ является быстрым и обратимым. Переход доменов ОРБ из состояния связанности с «одотопами» липидного матрикса является вероятностным. Разрыв связанности ОРБ с G-белком происходит при условии одномоментного разрыва достаточно большого количества связей ОРБ с липидным матриксом, суммарная энергия которых равна (или превышает) суммарную энергию связей внутриклеточных петель ОРБ G-белком.

Глубина конкурентных отношений и динамика восстановления антиоксидантного статуса сенсорной мембраны определяются как структурным соответствием пахучего вещества связывающему центру ОРБ, так и окислительно-восстановительным потенциалом («внутренней активностью») пахучего вещества и его концентрацией. Т.о., ОРБ рассматривается в качестве молекулярной машины, преобразующей энергию окисляемых АФК мембранных липидов в механическое перемещение (разрыв связи) относительно G-белка, передающего обонятельный сигнал в плазмолемму рецепторной клетки.

В данном процессе активную роль могут играть ионы металлов, находящиеся в координационной сфере рецептора. По аналогии с электрохимическим окислением иона металла, находящегося в координационной сфере, когда изменяется его координационное число, в результате чего катион сдвигается к более «удобному» фрагменту молекулярной системы, электрохимическое стимулирование может обеспечивать обратимое механическое движение молекулярных фрагментов комплексной системы трансдукции обонятельного сигнала (ОРБ и G-белка) в процессе восприятия запаха.

В рамках рассматриваемой гипотезы ОРБ может рассматриваться либо как молекулярная машина, или как особый молекулярный инструмент (например, молекулярный преобразователь). Если ОРБ – молекулярный инструмент, то он работает без потребления топлива. Если ОРБ – молекулярная машина, то он, как и положено машинам, потребляет конкретный вид топлива. Какое топливо данная машина потребляет? Этот вопрос представляется принципиально важным. Во-первых, в публикациях по механизмам функционирования ОРБ молчаливо допускается, что топлива для ОРБ как такового нет. Иначе говоря, единственной причиной, побуждающей ОРБ изменить конформацию, является его взаимодействие с молекулой ПВ. Согласно гипотезе топливом для молекулярной машины «обонятельный рецептор» могут быть ненасыщенные жирные кислоты мембранных липидов, расположенные в непосредственной близости от активных сайтов трансмембранного рецепторного белка. Эти жирные кислоты окисляются АФК, что приводит к изменению окислительно-восстановительного потенциала рецепторной мембраны, который в свою очередь играет роль движущей силы процесса трансдукции обонятельного сигнала

Приемником обонятельного сигнала следует рассматривать сложный комплекс, включающий: 1) одорант, связывающий белок; 2) генератор АФК; 3) ОРБ, связанный в сенорной мембране множественными гидрофобными связями с липидным матриксом, ПНЖК липидного матрикса, как элемент регуляции окислительно-восстановительного статуса ОРБ; 4) оконечный каскад трансдукции – G-белок.

Предложенная схема достаточно универсальным образом объясняет высокую чувствительность восприятия, например, феромонных сигналов. Идея, заложенная в восприятие феромонов, заключается в следующем: молекула феромона, достигая с помощью белка-переносчика (феромон связывающего белка) рецепторной мембраны, за счет перепада pH (в кислую сторону) становится свободной и либо непосредственно прерывает ценную реакцию, реагируя с супероксидом, либо входит в фосфолипидный бислой и там в силу выраженной антиоксидантной активности прерывает цепную реакцию окисления ПНЖК и тем самым с большим коэффициентом усиления влияет на окислительно-восстановительный статус мембраны в непосредственном окружении чувствительных сайтов ОРБ. Участие ферментов-генераторов активных форм кислорода (металлсодержащих NADPH-оксидазы и супероксиддисмутазы (СОД)) в реализации первичных процессов обонятельной рецепции фактически легализует идею функционирования металлсодержащих комплексов в первичных процессах обонятельной рецепции [6]. И, наконец, участие АФК, генерируемых металлсодержащими ферментами, дает рациональное объяснение результатам окисления пахучих веществ на обонятельной выстилке.

В соответствии с выдвигаемой гипотезой в качестве наиболее общего показателя клеточной радикальной активности могут служить $O_2^{-\bullet}$, H_2O_2 и $HO_2^{\bullet}$. Эти радикальные продукты в процессах обонятельной трансдукции выступают как регуляторы изменение окислительно-восстановительного статуса и мембранной микровязкости, что в конечном итоге проявляется в изменении конформации обонятельного рецепторного белка, сопровождающейся активацией G-белка и передачей сигнала в плазмлолемму обонятельного нейрона. Представленная обобщенная картина предполагает, что $O_2^{-\bullet}/HO_2^{\bullet}$ радикалы, изменяя структуру мембран клетки, также облегчают другим биологическим участникам процесса обонятельного восприятия доступ к гидрофобной области фосфолипидного двойного слоя сенсорной мембраны и, следовательно, вносят свой вклад в зависимые от пахучих молекул каскады передачи сигналов.

Наряду с ОРБ важную функциональную роль в данных процессах могут играть ферменты, связанные с преобразованием АФК. Показано наличие и распределение Cu, Zn и Mn СОД, каталазы, глутатионпероксидазы и DT-диафоразы в обонятельном эпителии. Также измерены концентрации аскорбата и α-токоферола и активности СОД, каталазы GSH-пероксидазы, GSH-редуктазы и показано, что обонятельная поверхность имеет высокий антиоксидантный статус [7]. Учитывая, что проявление полиморфизма характерно для СОД, можно предположить, что изменение аминокислотного состава вблизи активного металлсодержащего центра обеспечивает специфичность связывания с молекулами пахучих веществ. Таким образом, СОД может являться первичной мишенью для пахучих веществ различных классов; при этом их взаимодействие будет проявляться в изменении функционального состояния ОРБ через посредство изменения редокс-статуса мембранных липидов в непосредственном окружении рецептора.

Рассматриваемая в настоящем сообщении гипотеза о функционально значимой роли АФК в процессах обонятельной рецепции позволяет создавать нетрадиционные аналитические системы, основанные на применении свободных радикалов и других термодинамически неустойчивых интермедиатов в качестве высокочувствительных аналитических реагентов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ №09-04-00701.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зинкевич Э.П.* //Химические сигналы животных. М. (1982): 209-14;
2. *Зинкевич Э.П.* //II Съезд биофизиков России. М. (1999) 3: 996-7;
3. *Гладышева О.С. и др.* //Ж. Эвол. Биох. Физиол. (1985) 2: 201-3;
4. *Коган и др.* //Модулирующая роль CO_2 в действии активных форм кислорода. М. (2006) 222 с.;
5. *Ганшин В.М., Зинкевич Э.П.* //Материалы конф. «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» Пущино (2005): 202-5;
6. *Wang J. et al.* //PNAS (2003) 100(6): 3035-9;
7. *Reed C.J. et al.* //Free Rad. Biol. Med. (2003) 34(5): 607-5.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ ЭКТО-АТФазы В ОБОНЯТЕЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ НЕКОТОРЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Гладышева О.С., Кашникова Т.В.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Введение. В ряде работ нами были представлены доказательства присутствия эктофосфатаз в поверхностных структурах обонятельного эпителия у различных позвоночных животных [1]. С большой долей вероятности было установлено, что фосфогидролазную активность на поверхности обонятельного эпителия лягушки можно отнести только за счет работы АТФазы [3], которая на основании биохимического изучения её свойств была причислена нами к классу эктоферментов [4,6,11]. Предварительные цитохимические исследования продемонстрировали её присутствие в структурах внешней мембраны обонятельных жгутиков лягушки [7]. В настоящее время существует неослабевающий интерес к этой группе ферментов в других объектах исследования, обладающих, способностью к хемотаксису: Т-лимфоциты [10], фибробласты [11], нейробласты, мигрирующие в обонятельную луковицу [9]. Обсуждается участие этого фермента в реализации различных физиологических функций, в том числе и сенсорных [13]. Эти обстоятельства побудили нас провести специальные исследования по идентификации молекулярных форм этого фермента в препаратах обонятельного эпителия.

Материалы и методы исследования. В экспериментах использовали препараты обонятельной слизи, собранной с поверхности обонятельного эпителия различных животных, по методике, описанной нами ранее [4]. В составе такого препарата присутствует обонятельная слизь, собранная с поверхности эпителия и фрагменты обонятельных жгутиков. В качестве изучаемых объектов был использован обонятельный эпителий коров (10), взятый в условиях бойни и транспортируемый в лабораторию во влажной камере при охлаждении (t^o=4^{o}C). Кроме этого, исследования проводились на обонятельном эпителии беспородных белых мышей (150) и травяных лягушек (120). Для этих целей обонятельный эпителий изолировали в условиях наркоза.

Полученные препараты обонятельной слизи подвергали кратковременному осмотическому шоку путем 30мин обработки дистиллированной водой, для извлечения мембранносвязанных и примембраннолокализованных форм фермента [1]. Электрофоретическое исследование экто-АТФазы в ПААГ проводили в течении 3,5ч при силе тока 25мА и t^o=4^{o}С. Обнаружение активности молекулярных форм фермента осуществляли свинцовым методом. Инвариантной частью инкубационной смеси служил 3мМ трисHCl буфер (pH=7,5). В качестве субстратов были использованы для выявления активности экто-АТФазы – 2,5мМ АТФ, а в качестве контроля на присутствие неспецифической эктофосфатазной активности – 2,5мМ β-глицерофосфата натрия. В качестве активаторов использовали 10мМ раствор $MgCl_2$ или 3мМ раствор $CaCl_2$, либо в инкубационную смесь добавляли оба катиона вместе в оптимальных для активации фермента концентрациях [6]. Источником ионов свинца служил раствор Рейнольдса, который в целях уменьшения ингибирующего эффекта ионов свинца добавляли в среду инкубации за 15мин до её окончания. Визуализацию солей свинца проводили в слабом растворе сульфида натрия (0,1%). Для выявления гликопротеинов использовали цветные реакции с реактивом Шиффа и 0,2% раствором альцианового синего . По окончанию эксперимента окрашенные акриламидные блоки подвергали денситометрированию на приборе марки ERI-65. Оценивали количество выявляемых фракций, а также их электрофоретическую подвижность, измеряемую расстоянием, пройденным фракцией от начала старта электрофореза в см, и интенсивность реакции с субстратом в различных вариантах электрофореза по площади пиков денситограмм. Количественные данные обрабатывали статистически, достоверность отличий оценивали по t-критерию.

Результаты исследования. Электрофоретическое исследование поверхностных препаратов обонятельного эпителия коров и мышей позволило выявить в обоих случаях 5 молекулярных форм сходных между собой по электрофоретической подвижности. Самая малоподвижная от начала старта обозначена нами как фракция 1, а наиболее электрофоретически подвижный фермент – как фракция 5 (табл.1).

Активность, которую можно соотнести с молекулярными формами щелочной фосфатазы (ЩФ)**,** обнаруживалась во фракциях 1,4 и 5, тогда как фракции 2 и 3 при таких условиях инкубации не были выявлены. Таким образом, в препаратах обонятельной слизи этих животных присутствует смешанная активность, но только молекулярные формы фермента, идентифицированные как фракции 2 и 3 соотносятся с АТФазной активностью. Использование для электрофоретического исследования в ПААГ препаратов поверхности обонятельного эпителия

лягушки, на которых выполнены основные биохимические исследования [5,6], позволило выявить только наличие АТФазной активности, которая была сосредоточена во фракциях, сходных по подвижности с фракциями 2 и 3, выявленными в предыдущих препаратах теплокровных животных. По этой причине эти реакции были обозначены нами аналогичными номерами. Однако, в отличии от них контроли с использованием в качестве субстрата β-глицерофосфата натрия не выявляли в препаратах лягушки активности молекулярных форм ЩФ. Для обнаружения во фракциях поверхностных АТФаз из обонятельного эпителия лягушки гликопротеиновых субъединиц проводили дополнительное окрашивание. Последующее сопоставление подвижности окрашенных на гликопротеины фракций с таковой для выявленных фракций экто-АТФазы позволило говорить об их сходной электрофоретической подвижности, а следовательно, предполагать, что речь идет об одних и тех же молекулах. Такое совпадение между окрашиванием на нейтральные гликопротеины и АТФазной активностью наблюдалось и для фракции 2, и для фракции 3. Окрашивание на кислые гликопротеины этих фракций было безрезультатным. Ранее нами было установлено, что на активность экто-АТФазы обонятельного эпителия лягушки существенное влияние оказывают двухвалентные катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} [6]. Поскольку электрофорез в ПААГ позволил идентифицировать две молекулярные формы фермента, то была предпринята попытка в условиях этого эксперимента исследовать специфику отношения этих двух форм фермента к ионам Ca^{2+} и Mg^{2+}. Как показали результаты (табл.2) АТФазная активность фракций 2 и 3 в безкатионной среде практически не выявлялась. Присутствие в инкубационной среде только 3мМ Ca^{2+} в значительной степени активировало фракцию 2, по сравнению с фракцией 3.

Табл.1. Электрофоретическая подвижность фракций эктофосфатаз обонятельного эпителия различных экспериментальных животных.

Номер фракции	Электрофоретическая подвижность фракций, см					
	корова		мышь		лягушка	
	1	2	1	2	1	2
1	1,0±0,17	1,0±0,15	1,1±0,15	1,1±0,16	-	-
2	1,7±0,13	-	1,68±0,14	-	1,57±0,14	-
3	6,0±0,57	-	6,1±0,54	-	5,7±0,49	-
4	7,5±0,68	7,5±0,59	7,4±0,62	7,4±0,64	-	-
5	8,0±0,65	8,0±0,64	8,0±0,68	8,0±0,69	-	-

1–субстратом является 2,5мМ АТФ; 2–2,5мМ β-глицерофосфата натрия. (P>0,01)–достоверные различия между аналогичными фракциями в препаратах различных животных отсутствуют.

Если в инкубационную среду добавляли только 10мМ Mg^{2+} , то более значительно была выражена активность фракции 3, тогда как интенсивность окрашивания во фракции 2 была значительно снижена. Суммарное использование в инкубационной среде обоих катионов в оптимальных для активности экто-АТФазы концентрациях увеличивал активность обеих фракций. Причем ионы Ca^{2+} в этом случае были по воздействию более эффективны для фракции 3, активность которой возрастала в 1,5 раза, чем ионы Mg^{2+} для фракции 2, активность которой увеличивалась только в 1,1 раза по сравнению с той активацией, которая наблюдалась в этих фракциях в случае раздельного влияния ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}.

Табл.2. Влияние катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на активность молекулярных форм экто-АТФазы обонятельного эпителия лягушки.

Концентрация катионов в инкубационной среде	Площадь фракций электрофореграмм экто-АТФазы, мм^2	
	2	3
без катионов	0,5±0,01	0,8±0,04
3мМ Ca^{2+}	7,2±0,63	3,1±0,27
10мМ Mg^{2+}	1,5±0,12	9,7±0,86
3мМ Ca^{2+}+10мМ Mg^{2+}	8,1±0,75	14,2±1,26

2, 3–фракции экто-АТФазы.

Обсуждение результатов. Электрофоретическое исследование экто-АТФазы обонятельного эпителия показало, что во всех поверхностных препаратах у изученных животных активность этого фермента представлена двумя молекулярными формами со сходной электрофоретической подвижностью. Сравнение полученных данных со сведениями из литературных источников подтверждают наличие множественных форм экто-АТФаз в целом ряде объектов исследования [13]. На поверхности обонятельного эпителия млекопитающих (коровы, мыши) кроме того присутствует активность неспецифических фосфатаз, представленных тремя молекулярными формами ЩФ. Эти данные вполне согласуются с нашими предшествующими исследованиями [1]. Достаточно неожиданным оказался тот факт, что активность ЩФ не обнаруживается на поверхности обонятельного эпителия лягушки, хотя эти результаты совпадают с данными предшествующих биохимических и гистохимических исследований [12]. Неожиданность этого феномена была связана с тем, что активность ЩФ была выявлена в цитохимических исследованиях на поверхности обонятельного эпителия как у представителей млекопитающих, так и у более низкоорганизованных, например, у рыб [2]. В этом случае высокая активность ЩФ обнаруживается как в содержимом малых секреторных клеток, так и на поверхности эпителия в обонятельной слизи и вблизи обонятельных

волосков. Таким образом, обонятельный эпителий амфибий занимает в этом смысле особое положение, отличаясь по присутствию на обонятельной поверхности экто-АТФаз от других видов животных, у которых представлена активность и АТФазы, и ЩФ. Гликопротеиновые субъединицы, имеющие нейтральную реакцию, были выявлены в обоих молекулярных формах экто-АТФазы лягушки. В молекулах ЩФ также обнаруживаются гликопротеиновые составляющие, но они всегда имеют кислую природу [1]. Хорошо известно, что на активность экто-АТФаз влияют двухвалентные катионы [13]. Экто-АТФаза из обонятельного эпителия лягушки в этом смысле не является исключением. Как показали предшествующие исследования, выполненные на суммарном препарате обонятельной слизи лягушки, влияние на активность фермента оказывают как ионы Ca^{2+}, так и ионы Mg^{2+} [6]. Эти результаты косвенным образом могли свидетельствовать о двух центрах активности экто-АТФазы, либо о наличии в обонятельном эпителии лягушки двух молекулярных форм этого фермента, последнее было подтверждено нами с помощью электрофореза в ПААГ. Изучение влияния двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на обе молекулярные формы фермента позволило установить их определенную специфику. Более «тяжелая» и электрофоретически малоподвижная фракция фермента имеет большее сродство к ионам Ca^{2+}, тогда как другая – более подвижная и к ионам Ca^{2+} и Mg^{2+}. Обсуждение функциональной роли экто-АТфаз в обонятельном эпителии может пока носить только предварительный характер. Эта тема достаточно подробно разбиралась в наших предшествующих публикациях [7] и требует специальных исследований, посвященных этому вопросу. Необходимо отметить, что несмотря на значительное количество публикаций, посвященных обнаружению и изучению свойств этого фермента в других объектах исследования его функциональное назначение пока также остается малоизученным. Хотя среди возможных функций согласно с данными, приводимыми в литературных источниках [13] для экто-АТФаз обонятельного эпителия можно назвать следующие: участвуют в механизмах трансдукции сенсорного сигнала через работу с ионами Ca^{2+}; сам фермент является частью молекулярных рецепторов, идентифицирующих пуриновые сигналы; регулируют концентрацию субстрата для эктокиназы; защищают от цитолитического воздействия внеклеточного АТФ на поверхностные мембраны клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гладышева О.С.* //Сенсор. Сист. (2002) 16(4): 343-8;
2. *Гладышева О.С., Мартынова Г.И., Дмитриева Т.М.* //Цитология (1982) 24: 92-4;

3. *Гладышева О.С. и др.* //I Всесоюзн. биофиз. съезд (1982) 4: 58-9;
4. *Гладышева О.С., Семка Т.В.* //Сенсор. Сист. (1998) 12(3): 263-70;
5. *Гладышева О.С., Семка Т.В.* //Сенсор. Сист. (1999) 13(3): 208-12;
6. *Гладышева О.С., Семка Т.В.* //Сенсор. Сист. (2003) 17(1): 3-6;
7. *Гладышева О.С., Семка Т.В.* //Сенсор. Сист. (2005) 19(2): 106-11;
8. *Betto R. et al.* //J. Biol. Chem. (1999) 274(12): 7907-12;
9. *Braun N. et al.* //Eur. J. Neurosci. (2003) 17: 1355-64;
10. *Filippini A. et al.* //J. Biol. Chem. (1990) 265(I): 334-40;
11. *Gerasimovkaya E. et al.* //J. Biol. Chem. (2002) 272(47): 44638-50;
12. *Gladysheva O.S.* //Chem. signals vertebr. Philadelphia USA. (1991): 166;
13. *Meyer-Fernandes R.* //Parasitol. Int. (2002) 51(3): 299-303.

МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ КОММУНИКАЦИИ ВО ВКУСОВОЙ ПОЧКЕ МЫШИ. АЦЕТИЛХОЛИН КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПОСРЕДНИК

Рогачевская О.А., Романов Р.А., Яценко Ю.Е., Колесников С.С.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Вкусовая почка млекопитающих представляет собой ассоциат нескольких десятков клеток, принадлежащих к различным морфотипам (тип I, тип II, тип III) и выполняющим различные физиологические функции. Физиологические данные и данные молекулярной биологии свидетельствуют о том, что во вкусовой почке функционирует несколько сигнальных систем. В частности, во вкусовой ткани идентифицированы рецепторы к таким классическим нейротрансмиттерам/ нейромодуляторам, как глутамат, серотонин, ГАМК, АТР, норадреналин, холектокинин, нейропептид Y. Все эти рецепторы и их агонисты могут быть вовлечены в межклеточные коммуникации во вкусовой почке, хотя окончательно не установлено, какие физиологические процессы протекают при участии конкретной сигнальной системы, и почему периферическая вкусовая система нуждается в столь большом количестве разных сигнальных молекул. Недавно в экспериментах на неидентифицированных вкусовых клетках крысы было показано, что ацетилхолин (ACh) может мобилизовать внутриклеточный кальций в субпопуляции этих клеток, и как свидетельствовали данные иммуногистохимии, Ca^{2+} ответы на экстраклеточный ACh преимущественно при участии мускариновых рецепторов M_1 типа [1]. В данной работе нами выяснялось, функционирует ли холинергическая система во вкусовых почках мыши, и если да, то какие типы вкусовых клеток функционально экспрессируют рецепторы ACh.

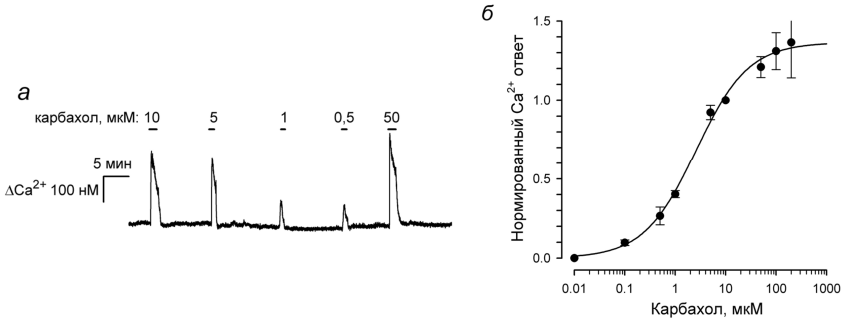


Рис.1. Изменение концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме вкусовых клеток в ответ на аппликацию карбахола. (а)–Ca^{2+}-ответы, полученные на одной клетке при разных концентрациях карбахола в экстраклеточной среде. Начало и длительность аппликации агониста указаны горизонтальными линиями над экспериментальной кривой. (б)–зависимость амплитуды ответа (●) от концентрации агониста. За величину ответа принималась разность между $[Ca^{2+}]_i$ в пике и $[Ca^{2+}]_i$ непосредственно перед аппликацией карбахола. Данные представлены как среднее±среднеквадратичная ошибка. Для усреднения данных, полученных в различных экспериментах (n=27), величина Ca^{2+}-ответа на аппликацию 10мкМ карбахола (~EC_{70}) принималась за единицу, а остальные ответы должным образом нормировались. Непрерывная кривая соответствует уравнению: $-R/Rmax=[Carb]^n/([Carb]^n+[Carb]^n_{1/2})$ при R_{max}=1.36, n=0.87 и $[Carb]_{1/2}$=2.51мкМ

Вкусовые клетки стимулировались негидролизуемым аналогом ACh – карбохолом, и их чувствительность к агонисту оценивалась по вызываемым Ca^{2+} сигналам. Для мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} клетки загружались Ca^{2+}-зондом (Fura-2 или Fluo-4), и Ca^{2+}-зависимая флуоресценция регистрировалась либо фотометрически, либо с использованием CCD камеры. В наших экспериментах карбахол мобилизовал Ca^{2+} в цитоплазме вкусовых клеток в микромолярном диапазоне концентраций при пороге порядка 0,1мкМ и насыщении около 100мкМ (рис.1а,б). Характерной особенностью Ca^{2+}-сигналов, индуцируемых карбахолом, был первоначальный быстрый пикообразный подъем Ca^{2+} с последующим относительно медленным снижением и выходом на плато. Ca^{2+}ответы вкусовых клеток на карбахол наблюдались в отсутствии наружного Ca^{2+} и обратимо ингибировались 1мкМ атропина – блокатором мускариновых рецепторов. Специфический блокатор M_1-рецепторов телензепин подавлял ответы на карбахол лишь частично, а ответы на специфический агонист M_1-рецепторов McN-A-343 были существенно меньше Ca^{2+}ответов на карбахол. Это свидетельствовало о том, во вкусовых клетках мыши не M_1-рецептор, а M_3 и/или M_5-рецепторы вносят основной вклад в генерацию Ca^{2+}ответа на карбахол. Анализ экспрессии генов, кодирующих мускариновые

рецепторы, методом RT-PCR выявил во вкусовой ткани транскрипты M_1 и M_3-рецепторов. В ряде экспериментов вкусовые клетки идентифицировались электрофизиологически [2,3] и их ответы на карбахол регистрировались методом patch clamp. При одновременной регистрации внутриклеточного Ca^{2+} и ионных токов было показано, что карбахол мобилизует Ca^{2+} в клетках типа I и стимулирует входящий ток. В клетках других типов ответы на карбахол не детектировались. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что вкусовые клетки типа I экспрессируют мускариновые рецепторы, которые сопряжены с фосфоинозитидным каскадом.

Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ (МК-783.2007, МК-1332.2008.4), РФФИ (№08-04-00033-а) и Фонда содействия отечественной науке.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ogura T.* //J. Neurophysiol. (2002) 87: 2643-9;
2. *Romanov R.A., Kolesnikov S.S.* //Neurosci. Lett. (2006) 395: 249-54;
3. *Romanov R.A. et al*. //EMBO J. (2007) 26: 657-67.

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ СЕТЧАТКИ

Рогачевский В.[1], Shirao T.[2], Hartmann E.[3], Duden R.[3], Majoul I.[3]

[1]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[2]Высшая школа медицины, Университет Ганма, Маибаши, Япония
[3]Центр структурной и клеточной биологии в медицине,
Институт биологии, Университет Любека, Германия

Не смотря на то, что в эмбриональном периоде новообразованная сетчатка представлена группой неспециализированных клеток (рис.1a), вскоре после рождения сетчатка быстро развивается в высшей степени организованную структуру нервной системы, состоящую из нескольких основных слоев (рис.1b). При этом распределенные по слоям клетки остаются специфично связанными межклеточными щелевыми контактами, которые различаются по проницаемости к ионам, включая Ca^{2+}, к цАМФ, IP3 и другим вторичным посредникам. Функциональная значимость такой организации в том, что она обеспечивает проведение мощного потока зрительной информации в мозг. Сигналы от фоторецепторных клеток (ФК), расположенных во внешнем слое сетчатки, через биполярные клетки (БК) среднего слоя сетчатки проходят

напрямую к ганглионарным клеткам (ГК), расположенных во внутреннем слое сетчатки. Количественное соотношение этих типов клеток ФК:БК:ГК в сетчатке взрослых животных соотносится почти как 10:5:1, что в геометрическом смысле представляет строгую пирамидную иерархию с вершиной на ганглионарных клетках.

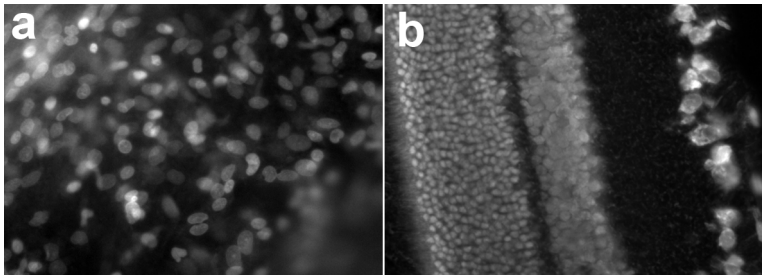


Рис.1. a) недифференцированная сетчатка эмбриона крысы (E19); b) постнатальная дифференцировка клеток сетчатки крысы (P30). Три слоя клеток: ФК, БК и ГК, слева направо.

Интересно, что перед тем как вся эта пирамидная структура вступит в действие, появляются два других типа клеток, которые разделяют пул митотических и постмитотических клеток (рис.1a). Эти слои сетчатки содержат также горизонтальные клетки, которые практически четко разделяют всю массу нейронов на две части, отделяя, таким образом, фоторецепторные клетки от клеток биполярных. Почти в это же время амакринные клетки (АК) начинают контролировать область, в которой БК клетки образуют основные входы на клетках ганглионарных.

Эти два внутренних слоя менее исследованы и, возможно, являются наиболее интересными для изучения сигнализации и контроля проведения потока информации. Ключевым аспектом и наиболее интригующей особенностью в регуляции сигнализации между этими клетками и в регуляции пространственной организации их контактов является способность этих контактов к тонкой подстройке, во-первых, в период развития, и, во-вторых, при светоадаптации.

Недавно мы показали, что в новообразованных слоях горизонтальных и амакринных клеток наблюдается высокий уровень экспрессии дребрина – белка, экспрессия которого изменяется в онтогенезе [1]. Мы также показали, что коннексин Cx43 непосредственно связывается с дребрином; детально это проанализировано в наших предыдущих работах [2,3]. Здесь мы представляем результаты *in vivo* и *in vitro* исследований роли дребрина, который экспрессируется в двух сплайс-вариантах: дребрин E (embryonic) – в эмбриональном периоде, и

дребрин A (adult) – у взрослых. Наша идея заключается в том, что дребрин может быть необходим в межклеточной сигнализации посредством коннексинов в ходе быстрой реструктуризации межклеточных контактов и при установлении спецификации слоев сетчатки. Также известно, что как горизонтальные клетки, так и АК экспрессируют целый спектр нейрональных коннексинов: Cx36, Cx45, Cx57 [4]. Функциональная роль взаимодействия дребрина и коннексинов остается неясной. Щелевые контакты, по-видимому, участвуют в регуляции диффузионного сопряжения в новообразующемся слое сетчатки, между близлежащими горизонтальными клетками и между АК, но не между ГК. Несмотря на то, что на наиболее ранних стадиях диффузионное сопряжение в слое горизонтальных и в слое амакринных клеток не показано, это может быть связано реструктуризацией контактов между клетками в ходе их миграции при созревании сетчатки. В этот эмбриональный период (E15-20), различные комбинации антагонистов глутамата, или $ГАМК_A$-рецепторов не влияют на межклеточное сопряжение. Конкретную роль коннексинов в слоях горизонтальных и амакринных клеток более детально пока лишь предстоит исследовать. Одна из идей состоит в том, что сопряжение между горизонтальными и между амакринными клетками (возможно холинэргическими АК) посредством щелевых контактов является переходной – ранней фазой нейротрансмиссии, которая предшествует формированию химических синапсов.

Интересно то, что полностью сформированная нейротрансмиссия и генерация электрических волн возбуждения в сетчатке у млекопитающих могут происходить посредством щелевых контактов, до того как сформирована химическая нейропередача. Известно, что коннексины проницаемы для цАМФ [5,6]. Этот вторичный посредник может модулировать цитоплазматические волны цАМФ в кластерах смежных клеток и существенно влиять на распространение волн ионов Ca^{2+}. Таким образом, щелевые контакты играют очень важную роль в распределении слоев, до того как вступит в действие химическая нейротрансмиссия.

Для того чтобы лучше понять роль ранней экспрессии дребрина мы совместили внутриутробную электропорацию иРНК дребрина в мозг эмбрионов с клеточными *in vitro* методами и экспрессировали дребрин с нейрональными коннексинами в нейронах и других клетках (рис.2). Наши *in vitro* эксперименты по реконструкции проявили удивительную роль дребрина в стабилизации нейрональных коннексинов в областях контактов между клетками (рис.2b). Для проверки полученных данных мы также использовали иРНК дребрина и показали, что в отсутствие дребрина нейрональные коннексины не транспортируются к плазмамембране (рис.2a) и клетки не образуют контактов друг с другом.

Наблюдение за одиночными фибробластами, несущими иРНК дребрина, с использованием высокоразрешающей прижизненной микроскопии проявляет то, каким образом в отсутствие дребрина нарушаются как доставка Cx36 к плазмамембране, так и образование межклеточных контактов. Согласно данным иммунофлуоресцентнного анализа, наблюдается колокализация Cx36 с лизосомными маркерами, а на вестерн-блоттах проявляются дополнительные полосы деградации коннексина. Таким образом, вместо того чтобы двигаться к плазмамембране несвязанный с субмембранными скаффолд-белками Cx36 подвергается деградации.

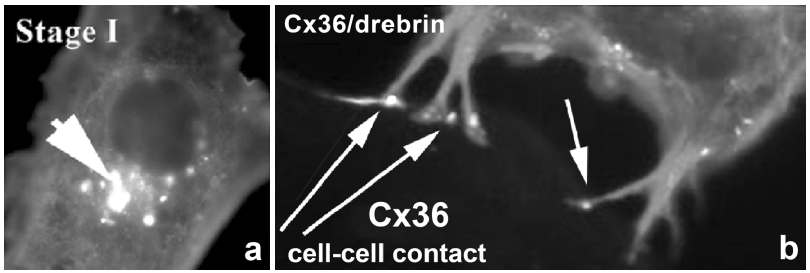


Рис.2. a) деградация коннексина Cx36 в лизосомах клеток трансфицированных иРНК дребрина; b) экспрессия дребрина значительно увеличивает количество Cx36 в области контактов между клетками, и предотвращает его деградацию.

Полученные результаты подтверждают способность высоко морфогенетически активного белка дребрина стабилизировать и пространственно регулировать перестройку межклеточных контактов обеспечивая, таким образом, быструю настройку межклеточной сигнализации. Эти неожиданные результаты не просто углубляют понимание сложности регуляции процессов протекающих в ходе развития, но показывают (рис.3) как двустороннее взаимодействие между цитоскелетом и межклеточными контактами может влиять на комплексные процессы сигнализации и передачи зрительной информации, как в сетчатке, так и в мозге в целом. Известно, что среди других коннексинов Cx36 наиболее проницаем для цАМФ, при этом он экспрессируется в самых различных тормозных ГАМК-эргических интернейронах. Таким образом, индуцируемая дребрином реструктуризация межклеточных контактов может регулировать не только возбуждающие связи идущие от ФК, но также обеспечивать комплексную тормозную регуляцию ганглионарных клеток. Остается открытым вопрос о том, как регулируется экспрессия самого дребрина в ходе развития и при каких локальных условиях.

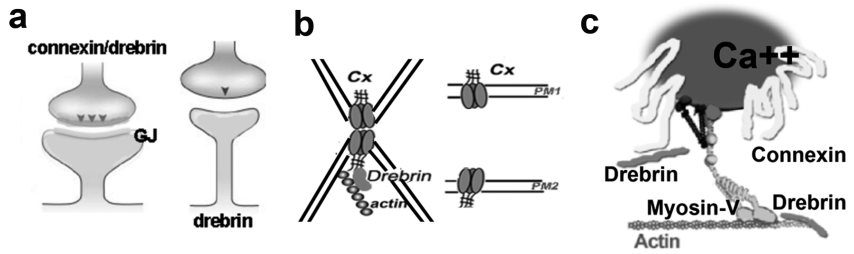


Рис.3. a) дребрин – высоко морфогенетически активный белок способен изменять форму дендритных шипиков; b) опосредованная коннексинами стабилизация синапса придает ему большую пластичность, и в критических случаях (напр. болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и т.д.) не позволяет терять раз образованного контакта между пре- и постсинапсом; без дребрина в ходе миграции или при других пластических процессах клетки не могут поддерживать установленного взаимодействия; c) возможные молекулярные механизмы лежащие в основе формирования межклеточных контактов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Majoul I. et al.* //Limiting transport steps and novel interactions of Connexin-43 along the secretory pathway (submitted) (2009);
2. *Butkevich E. et al.* //Curr. Biol. (2004) 14: 650-8;
3. *Majoul I. et al.* //Histochem. Cell Biol. (2007) 127: 355-61;
4. *Söhl G., Maxeiner S., Willecke K.* //Nat. Rev. Neurosci. (2005) 6(3): 191-200;
5. *Hampson E.C., Vaney D.I., Weiler R.* //J. Neurosci. (1992) 12(12): 4911-22;
6. *Mills S.L., Massey S.C.* //Nature (1995) 377(6551): 676-7.

***

ВЛИЯНИЕ ТЕСТОСТЕРОНА НА ФЛУКТУАЦИЮ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЕЗЫ СВИНЕЙ

Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, СПб

Механизм негеномного действия андрогенов зависит от типа клеток. В murine Т-клетках рецепторы к андрогенам опосредуют вход Ca^{2+} через потенциалнезависимые, блокируемые Ni^{2+} кальциевые каналы [1]. В остеобластах крысы тестостерон индуцирует вход внеклеточного Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+}-каналы, а также освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо путем активации фосфолипазы С [2]. На ооцитах свиней было показано, что тестостерон при определенных условиях ингибирует их спонтанное созревание [3]. Так, при добавлении одного тестостерона отмечен эффект ингибирования созревания ооцитов, при совместном же действии тестостерона и дбцАМФ эффект ингибирования усиливался. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния тестостерона на флуктуацию цитоплазматического кальция в соматических клетках антральных овариальных фолликулов (клетках гранулезы) свиньи.

Материал и методика. В экспериментах использовали яичники свиньи на стадии фолликулярного роста, без признаков видимой патологии. Клетки гранулезы аспирировали из антральных фолликулов диаметром 3-6мм. Ресуспендирование гранулезы осуществляли в модифицированной среде Дюльбеко, содержащей 36мг/л пирувата Na и 1г/л глюкозы, в присутствии 1% бычьего сывороточного альбумина. Осаждение клеток после 30мин инкубации проводили центрифугированием при 250g в течение 10мин и затем ресуспендировали в инкубационной среде с бычьим сывороточным альбумином в концентрации, уменьшенной до 0.1%.

Цитозольный кальций в клетках гранулезы измеряли с помощью зонда Fura-2AM. Клетки гранулезы инкубировали в течение 30мин в инкубационной среде, содержащей 5мкМ Fura-2AM при температуре 37°С. Окрашенные клетки отмывали в инкубационной среде и затем центрифугировали при 250g в течение 10мин. Процедуру отмывания повторяли трижды. Концентрация клеток в пробе составляла – 5×10^5кл/мл. Измерение цитозольного кальция в клетках гранулезы проводили на спектрофлуориметре Hitachi. Длины волн возбуждения для

Fura-2AM составляли 340нм в присутствии кальция и 380нм в отсутствии Ca^{2+}, а излучения – 510нм.

Реактивы – теофиллин, H-89, Ro 31-8220 и Fura-2AM были производства фирмы «Sigma», бычий пролактин получен в институте Эндокринологии (Москва).

Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4-5 независимых экспериментов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты. Все клетки гранулезы в экспериментах предварительно обрабатывали тестостероном в концентрации 1мкг/мл. Так как для работы использовалась инкубационная среда без кальция, увеличение концентрации цитозольного кальция в клетках происходило только при освобождении его из внутриклеточных депо. Обработка контрольных клеток пролактином в концентрации 50нг/мл или теофиллином в концентрации 1мМ приводила к повышению концентрации цитозольного кальция (рис. а). Совместное действие пролактина и теофиллина вызывало дополнительное освобождение кальция из внутриклеточных депо и соответственно, дополнительное увеличение концентрации цитозольного кальция, которое было выше, чем при действии отдельно каждого из этих соединений.

Инкубация клеток гранулезы в присутствии ингибитора протеинкиназы С соединения Ro 31-8220 в концентрации 10нг/мл стимулировала увеличение концентрации цитоплазматического кальция (рис. б). Воздействие пролактина или теофиллина на клетки в присутствии ингибитора протеинкиназы С не приводило к изменению концентрации цитоплазматического кальция, по сравнению с контрольными клетками. Совместное действие пролактина и теофиллина также не стимулировало дополнительного увеличения концентрации цитоплазматического кальция в обработанных ингибитором клетках гранулезы.

Обработка клеток гранулезы ингибитором протеинкиназы А соединением H-89 в концентрации 20мкМ активировала рост концентрации цитоплазматического кальция (рис. в). Действие пролактина или теофиллина на цитоплазматический кальций в присутствии ингибитора протеинкиназы А не отличалось от действия этих соединений на клетки в отсутствие данного ингибитора. Также не оказывал влияния ингибитор протеинкиназы А на совместное действие пролактина и теофиллина, как и в контрольных клетках, совместное действие пролактина и теофиллина стимулировало дополнительное увеличение концентрации цитоплазматического кальция.

Обсуждение. Ранее на ооцитах свиней было показано, что в присутствии тестостерона отмечается дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии пролактина и теофиллина. Использование ингибиторов протеинкиназы С и А показало, что ограничение освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии пролактина и теофиллина происходит только при использовании ингибитора протеинкиназы А [4]. В клетках гранулезы свиньи тестостерон также стимулирует изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} при совместном действии пролактина и теофиллина, однако, в отличие от ооцитов свиньи, в клетках гранулезы дополнительное увеличение концентрации цитоплазматического кальция снижалось в присутствии ингибитора протеинкиназы С. Возникает вопрос, чем могут быть вызваны различия в флуктуации содержания кальция в цитозоле фолликулярных клеток разных типов в ответ на гормональное воздействие (тестостерона)? Прежде всего, следует отметить функциональные различиях исследуемых клеток, которые характерны для ооцита (процесс мейотического деления) и клеток гранулезы (митоз).

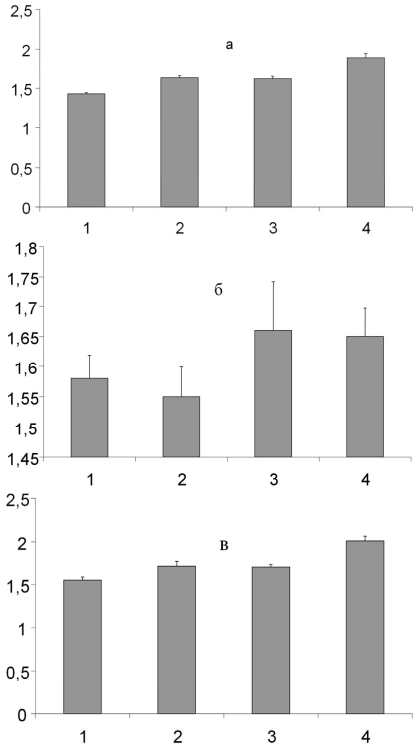


Рис. Влияние ингибиторов протеинкиназы С и А на стимулированное пролактином и теофиллином изменение концентрации цитоплазматического кальция в клетках гранулезы свиней. По горизонтали: 1–контрольные клетки гранулезы; 2–активация пролактином в концентрации 50нг/мл; 3–10мМ теофиллина; 4–совместное действие пролактина и теофиллина. По вертикали – интенсивность флуоресценции Fura-2AM, усл. ед. а–в отсутствии ингибиторов протеинкиназ, б–в присутствии ингибитора протеинкиназы С, в–в присутствии ингибитора протеинкиназы А. Различия достоверны при: *а* – $P<0.001$ (1 и 2; 1 и 3; 2 и 4; 3 и 4); *в* – $P<0.001$ (1 и 3), $P<0.05$ (1 и 2; 2 и 4; 3 и 4). Здесь и далее представлены изменения кальция, полученные в 4-5 экспериментах.

В процессе мейоза имеет место стадия ингибирования реинициации мейоза, в митозе аналогичной стадии нет. Известна

гипотеза, согласно которой ГТФ образует связь между двумя внутриклеточными депо – рианодин- и IP_3-чувствительными и обеспечивает переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3-чувствительные. При взаимодействии ГТФ и инозитол-1,4,5-трифосфата в клетках происходит дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо [5,6]. В ооцитах свиней пролактин стимулирует освобождение Ca^{2+} из IP_3-чувствительных внутриклеточных депо и при его совместном действии с ГТФ, которое освобождает Ca^{2+} из рианодин-чувствительных внутриклеточных депо, отмечается дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо [7]. Это дополнительное освобождение Ca^{2+} стимулировалось протеинкиназой С.

Таким образом, для перехода Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо необходима активация этих внутриклеточных депо, а также присутствие фактора, обеспечивающего связь между этими внутриклеточными депо. В определенных условиях (присутствие фактора, обеспечивающего связь между внутриклеточными депо) дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо может свидетельствовать о переходе Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо.

В ооцитах и клетках гранулезы свиньи пролактин стимулирует освобождение Ca^{2+} из IP_3-чувствительных депо, а теофиллин – из рианодин-чувствительных. В отсутствие тестостерона в этих обоих типах клеток не отмечается дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо, в то время как добавление тестостерона приводит к увеличению выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо. По-видимому, в данном случае тестостерон является фактором, обеспечивающим связь между различными (рианодин- и IP_3-чувствительными) внутриклеточными депо.

Ранее, при изучении взаимодействия ГТФ и пролактина в ооцитах свиней было показано, что использование ингибитора протеинкиназы С ограничивает дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Согласно гипотезе [5,6], при таком типе взаимодействия происходит переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3-чувствительные внутриклеточные депо, и по-видимому, протеинкиназа С регулирует переход Ca^{2+} в этом направлении. Однако, кроме перехода из рианодин- в IP_3-чувствительные внутриклеточные депо, также, вероятно, существует переход Ca^{2+} из IP_3- в рианодин-чувствительные внутриклеточные депо. На основе анализа данных было предположено, что переход Ca^{2+} между внутриклеточными депо в этом направлении регулируется протеинкиназой А [8].

Таким образом, можно предположить, что переход Ca^{2+} в направлении из рианодин- в IP_3-чувствительные внутриклеточные депо

регулируется протеинкиназой С, а в обратном направлении – протеинкиназой А.

В присутствии тестостерона дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, стимулированное совместным действием пролактина и теофиллина, в различных типах клеток (ооциты и гранулеза) по-разному регулируется протеинкиназами С и А. В клетках гранулезы дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо стимулируется протеинкиназой С, и по-видимому, переход Ca^{2+} происходит в направлении из рианодин- в IP_3-чувствительные внутриклеточные депо. В ооцитах свиньи в присутствии тестостерона дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо активируется в присутствии протеинкиназ А.

Если учесть, что тестостерон оказывает ингибирующее влияние на созревание ооцитов [3], то можно предположить, что ингибирование мейоза в ооцитах (в частности, свиней) связано с переходом Ca^{2+} из IP_3- в рианодин-чувствительные внутриклеточные депо, а реинициация мейоза – с переходом Ca^{2+} в обратном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Benten W.P. et al.* //FASEB J. (1999) 13: 123-33;
2. *Lieberherr M., Grosse B.* //J. Biol. Chem. (1994) 269: 7217-23;
3. *Rice C., McGaughey R.W.* //J. Reprod. Fertil. (1981) 62: 245-56;
4. *Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И.* //Тез. конф. М. (2008) 152-5;
5. *Mullaney J.M. et al.* //J. Biol. Chem. (1987) 262: 13865-72;
6. *Ghosh T.K. et al.* //Nature (1989) 340: 236-9;
7. *Денисенко В. Ю., Кузьмина Т.И.* //Онтогенез (2005) 36(3): 1-6;
8. *Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И.* //Цитология (2005) 47(4): 344-7.

ЛОКАЛЬНЫЕ И ПЕРИОДИЧЕСКИЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ СИГНАЛЫ. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ, РЕГУЛЯЦИЯ И ФУНКЦИИ

Зинченко В.П.[1], Бережнов А.В.[1], Федотова Е.И.[1,2]

[1]Институт биофзики клетки РАН, Пущино
[2]Пущинский государственный университет

Колебания. Рецептор-зависимая активация клеток часто сопровождается колебаниями концентрации внутриклеточного кальция. Из рис.1 видно, что Ca^{2+}-колебания в клетках карциномы HEp-2, вызванные агонистом пуринорецепторов (АТФ) имеют разную частоту, амплитуду и запускаются с различной лаг-фазой. Именно эти параметры

Ca^{2+}-колебаний «читаются» клеткой и через экспрессию соответствующих генов определяют дальнейший путь ее развития [1]. По-видимому, в настоящих условиях взаимодействие лиганда с рецептором является лишь триггером активации, параметры которой, зависят индивидуального состояния клетки.

Аналогичные результаты получены на культуре астроцитов. На рис.2 показано, что механическая стимуляция одной клетки, приводящая к секреции АТР и к распространению межклеточной АТР-волны, индуцирует собственные колебания Ca^{2+} в каждой клетке. Эти колебания подобны представленным на рис.1 и имеют различную частоту и амплитуду в отдельных клетках.

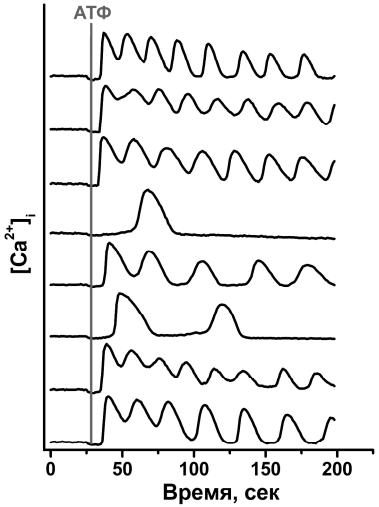


Рис.1. Колебания $[Ca^{2+}]_i$ в отдельных клетках карциномы HEp-2 в ответ на добавление 10мкМ АТР. Исходный уровень $[Ca^{2+}]_i$ одинаков, но произвольно смещен для наглядности.

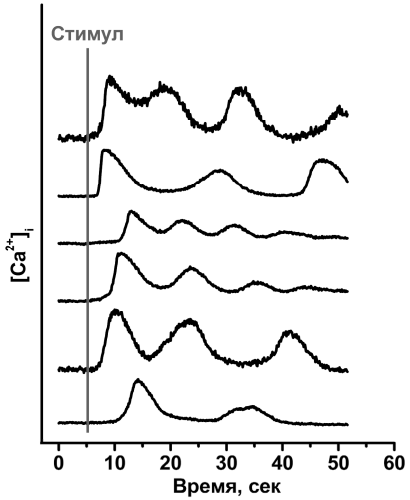


Рис.2. Колебания $[Ca^{2+}]_i$ в отдельных клетках в культуре астроцитов при механической стимуляция одной из клеток. Исходный уровень $[Ca^{2+}]_i$ одинаков, но произвольно смещен для наглядности.

Если провести эксперимент с улучшенным пространственным и временным разрешением, то можно продемонстрировать, что наблюдаемые колебания – не что иное, как распространение Ca^{2+}-волны. Эта волна, как правило, имеет одну точку генерации и вполне определенное направление распространения внутри клетки по поверхности эндоплазматического ретикулума (рис.3). На рисунке показано распространение Ca^{2+}-волны по одиночной глиальной клетке в культуре гиппокампа крысы в ответ на добавление 10мкМ АТР. Из-за

малого размера клетки, по сравнению со скоростью распространения волны (около 30мкм/с), и медленной скорости откачки кальция из цитозоля, волна воспринимается как одноверменное по всей клетке изменение концентрации Ca^{2+}.

Механизмы локального повышения концентрации кальция в клетке. Концентрация ионов кальция в цитозоле не является однородной. Первый тип неоднородности – это кальциевые «пуфы» (или «спарки», в случае возбудимых клеток) [для обзора см. 2], представляющие собой локальные Ca^{2+}-сигналы кластеров IP_3- и рианодиновых рецепторов. В соматических клетках эти всплески Ca^{2+} расположены преимущественно в перинуклеарной области и могут посылать сигнал в ядро без глобального увеличения концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Наоборот, скопление митохондрий или даже одна митохондрия может локально подавлять активность спарков, защищая определенные мишени в клетке от активации кальцием. Локальное повышение концентрации Ca^{2+} могут создавать не только IP_3- и рианодиновые рецепторы, но и каналы плазмалеммы. Причем, физиологический эффект такого локального входа Ca^{2+} зависит от месторасположения канала на поверхности клетки. В синапсах нейронов гиппокампа вход Ca^{2+} через NMDA рецепторы вызывает локальную активацию ERK1/2 [3] и ведет к выживанию клеток. При гипоксии вход Ca^{2+} через несинаптические NMDA рецепторы приводит к гибели клеток. Таким образом, пространственная локализация всплесков кальция может переключать клетку от жизни к гибели.

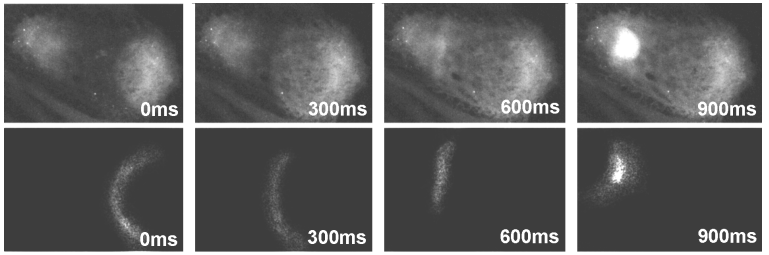


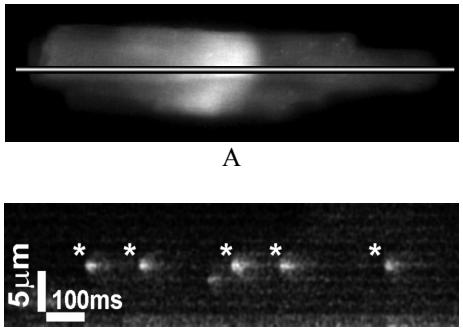
Рис.3. Внутриклеточная кальциевая волна в одиночной глиальной клетке, окрашенной Fluo-4. Вверху – изображения клетки, полученные с интервалом 300мс; внизу – фронт кальциевой волны (разность между двумя последовательными кадрами), Видно, что активация АТР-рецептора вызывает локальное повышение Ca^{2+} в клетке, которое далее распространяется по клетке в виде Ca^{2+} волны. Время экспозиции кадра – 20мс.

Кальциевая волна, распространяясь по поверхности эндоплазматического ретикулума (ЭР), может менять локально как скорость, так и амплитуду в зависимости от пространственной

организации ЭР и митохондриального окружения. Чем более развит ЭР в данном месте клетки, например, вокруг ядра, тем больше амплитуда волны в данном месте. Чем больше митохондрий в данном месте, тем меньше амплитуда волны [4]. На рисунке (рис.3, вверху) можно видеть, что в области ядра амплитуда проходящей Ca^{2+}-волны увеличивается, обеспечивая таким образом, локальное повышение Ca^{2+}, необходимое для передачи сигнала в ядро и инициации экспрессии генов. Таким образом, архитектура ЭР и митохондрий модулируют такие параметры волны как амплитуда и скорость распространения (изменение формы фронта волны на рис.3 при прохождении ядра) и дают возможность создавать различные локальные концентрации Ca^{2+} в один и тот же момент времени в различных участках клетки.

Динамика внутриклеточного Ca^{2+} в клетках, выявляемая с помощью сканирующей конфокальной микроскопии с высоким временным разрешением. Известно, что спонтанный выброс Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР) начинается локально с возникновения спарков, а триггерный выброс Ca^{2+} из СР является результатом деполяризации плазматической мембраны. Продолжительность развития таких сигналов составляет несколько десятков миллисекунд, а размеры кальциевых спарков – 2-5мкм.

При исследовании таких быстрых и локализованных кальциевых сигналов используют возможность конфокального микроскопа работать в режиме XT. В этом режиме сканирование происходит непрерывно вдоль линии интереса, проведенной вдоль клетки, как на рис.4А. Изображение, полученное в режиме сканирования XT с частотой 400линий/сек представлено на рис.4Б. Временная развертка слева направо выявляет кальциевые спарки с одинаковой пространственной координатой и довольно стабильной частотой. Таким образом, спарки могут быть пейсмейкером.



А

Б

Рис.4. А – кардиомиоцит, прокрашенный Fluo-4. Вдоль продольной оси клетки обозначена линия, по которой производится сканирование в режиме XT; Б – изображение, полученное в режиме сканирования XT. По горизонтальной оси – время t, по вертикальной – координата X по линии сканирования. Звездочками обозначены спарки, периодически возникающие в одном и том же месте.

Помимо спарков и распространяющихся Ca^{2+}-волн (рис.4А) в кардиомиоцитах можно наблюдать спонтанное глобальное скачкообразное и дискретное увеличение уровня цитозольного кальция, сопровождающееся сокращением клетки (рис.5). По-видимому, в кардиомиоците существует механизм генерации потенциала действия, связанный со спарком и Ca^{2+}-волной, поскольку распространение Ca^{2+}-волны также может сопровождаться дискретными глобальными скачками роста концентрации Ca^{2+} (не показано).

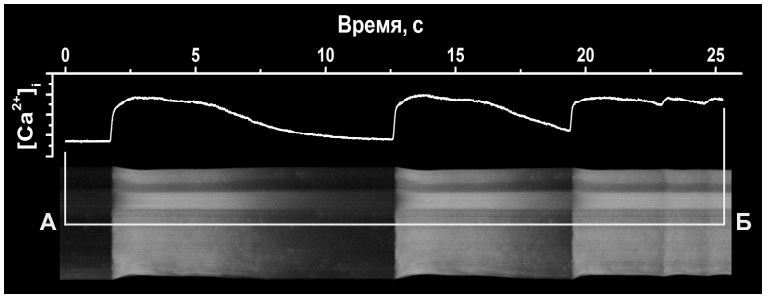


Рис.5. Скачкообразное спонтанное увеличение уровня цитозольного кальция в кардиомиоците. Внизу – оригинальная запись флуоресценции Fluo-4 в режиме XT; вверху – профиль линии АБ, проведенной вдоль временной оси на рисунке.

В культивируемых нейронах и срезах мозга также выявляются акты спонтанной синхронной генерации колебаний уровня внутриклеточного кальция. Такие колебания представляют собой результат периодического возникновения потенциала действия, охватывающего множество клеток в культуре и возникают после формирования синаптических контактов [5]. Показано, что спонтанные колебания кальция в нейронах предотвращают развитие апоптоза и обусловлены активностью ионотропных рецепторов глутамата [6].

На основании проведенных экспериментов можно выдвинуть гипотезу о наличие положительной обратной связи от спарка и Ca^{2+}-волны на генерацию потенциала действия или, по крайней мере, на импульс деполяризации плазмалеммы в одиночном кардиомиоците. Можно также предположить, что схожий механизм отвечает за периодические синхронные колебания уровня цитозольного кальция, возникающие в культурах нейронов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dolmetsch R.E. et al.* //Nature (1997) 386: 855-8;
2. *Niggli E, Shirokova N.* //Cell Calcium (2007) 42(4-5): 379-87;
3. *Hardingham G.E., Arnold F.J., Bading H.* //Nat. Neurosci. (2001) 4: 565-6;

4. *Boitier E., Rea R., Duchen M.R.* //J. Cell Biol. (1999) 145: 795-808;
5. *Opitz T, De Lima AD, Voigt T.* //J. Neurophysiol. (2002) 88(5): 2196-206;
6. *Heck N. et al.* //Cereb. Cortex. (2008) 18(6): 1335-49.

СРАВНЕНИЕ Ca^{2+}-ОТВЕТОВ ПРЕАДИПОЦИТОВ МЫШЕЙ И СУСЛИКОВ (*SPERMOPHILLUS UNDULATUS*) ПРИ АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Конаков М.В., Долгачева Л.П., Туровский Е.А., Агафонова Т.А., Бронников Г.Е.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Функция бурой жировой ткани - производить тепло, окисляя жирные кислоты, и поддерживать нужную температуру тела в условиях холодового стресса. При выполнении термогенной функции бурая жировая ткань (БЖТ) способна утилизировать запасы триглицеридов не только бурых, но и белых адипоцитов, рассеивая энергию в виде тепла. При исследовании состояния тканей человека не только достоверно показано присутствие БЖТ у взрослых людей, но и сделаны выводы, что наличие активной БЖТ способно предохранять от ожирения [1,2]. Активность БЖТ регулируется, главным образом, норадреналином и симпатической нервной системой. Секреция этого нейротрансмиттера вызывает экстренное увеличение теплопродукции зрелыми адипоцитами, а также стимулирует пролиферацию преадипоцитов при хроническом воздействии [3,4,5]. Хорошо известно, что основным вторичным мессенджером, обеспечивающим гиперплазию БЖТ под действием НА, является cAMP [6]. На самом деле этот процесс достаточно сложен, и в индукции гиперплазии БЖТ участвует не только НА, но и целый ряд ростовых факторов и пептидов, продуцируемых растущими клетками [7,8,9,10]. При изучении эффектов нейропептидов, выделенных из сусликов, нами было показано, что рост культивируемых преадипоцитов мышей сопровождается увеличением $[Ca^{2+}]_i$, тогда как увеличения уровня cAMP при этом не было зарегистрировано [11]. Нами показано, что кальциевая сигнальная система бурых преадипоцитов мышей и сусликов (*Spermophillus undulatus*) редуцирована, и Ca^{2+}-ответы молодых клеток очень сильно отличаются от ответов зрелых клеток [11,6,12,13]. Поскольку именно у гибернаторов потенциал бурой жировой ткани реализуется в полной мере, в данной работе мы сравнили кинетики Ca^{2+}-ответов преадипоцитов мышей и сусликов на агонисты α_1- и β-адренорецепторов и форсколин.

Методы. Суслики *(Spermophillus undulatus)* были отловлены в Якутии и содержались в специальном помещении, обеспеченные пищей и водой *ad libitum* при естественной длине светового дня и температуре окружающей среды, следующей за сезонными её изменениями, от 20÷23°C летом и до -3°C зимой.

Мышей, самцов линии NMRI возрастом 3-5 недель, содержали в отсутствие холодового стресса (температура в помещении 20-23°C). Эксперименты проводили на суспензии бурых преадипоцитов, выделенных из бурой жировой ткани сусликов и мышей. Ранее метод выделения был подробно описан [14]. Для измерения внутриклеточного кальция суспензию свежевыделенных преадипоцитов (1×10^7клеток/мл) инкубировали с 2мкМ флуоресцентного красителя Fura-2/AM в течение 40мин при 37°C. Окрашенные клетки отмывали от внешнего красителя и ресуспендировали в среде (Хенкс+HEPES), pH=7,2 при 37°C. Эксперименты проводили на спектрофлуориметре с термостатированной (37°C) ячейкой, сигналы регистрировали на компьютере при помощи программы Record 4. Длина волны возбуждения флуоресценции – 337нМ, регистрации – 520нМ. $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по формуле: $[Ca^{2+}]_i=K_d(F-F_{min})/(F_{max}-F)$, где F – наблюдаемая интенсивность флуоресценции, F_{max} – флуоресценция красителя, насыщенного Ca^{2+}, F_{min} – флуоресценция красителя, свободного от Ca^{2+}, K_d=224нМ при 37°C. F_{max} измеряли после добавления 6мкМ дигитонина к клеткам в среде с Ca^{2+}, F_{min} измеряли после добавления 4мМ ЭГТА. Уровень собственной флуоресценции вычитали после добавления 100мкМ Mn^{2+}. Для обработки результатов использовали программы Excel и Origin 7.0.

Результаты и их обсуждение. Нейротрансмиттер норадреналин (НА), взаимодействуя с α_1- и β-адренорецепторами, индуцирует две сигнальные системы. Селективным агонистом α_1-адренорецепторов является циразолин, а селективным агонистом β-адренорецепторов – изопротеренол. На зрелых клетках мышей циразолин через соответствующий рецептор активирует фосфоинозитидный путь, вызывая транзитное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, до 600-900нМ, которое является весьма типичным по амплитуде и длительности для невозбудимых клеток. Добавление 0.1-10мкМ циразолина является оптимальными для регистрации Ca^{2+}-ответов зрелых адипоцитов мышей и крыс. Однако эти концентрации вызывали лишь низкоамплитудные Ca^{2+}-ответы в преадипоцитах мышей и не вызывали заметных Ca^{2+}-ответов в преадипоцитах сусликов.

На рис.1 (А и Б) представлены кинетики Ca^{2+}-ответов преадипоцитов мышей и сусликов.на циразолин. Высокие концентрации циразолина (≥50мкМ) инициировали более сложные Ca^{2+}-ответы преадипоцитов сусликов (рис.1Б, кинетики 4-7). Эти ответы содержали не только монотонный участок, как у мышей, но и экспоненциальный

участок с ускорением. Из рисунка видно, что $[Ca^{2+}]_i$ на 20-й минуте достигал уровня в ~130нМ у мышей и ~350нМ у сусликов.

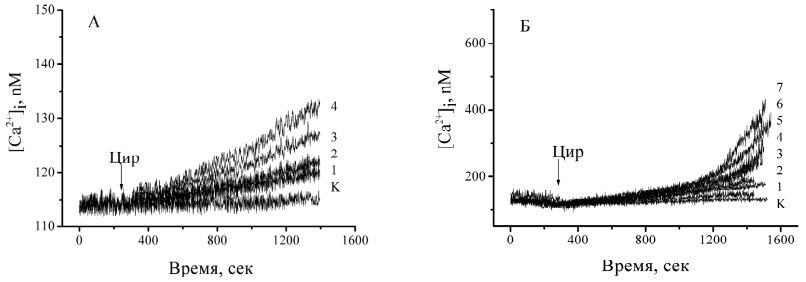


Рис.1. Кинетика Ca^{2+}-ответов преадипоцитов бурого жира мышей (**А**) и сусликов (**Б**), индуцированная циразолином. (**А**), в мкМ: (1) – 10; (2) – 0,1; (3) – 3; (4) – 1; (**Б**), в мкМ: (1) – 10; (2) – 50; (3) – 600; (4) – 100; (5) – 500; (6) – 200; (7) – 300. К – контроль. Приведены кинетики одного из 3-х экспериментов.

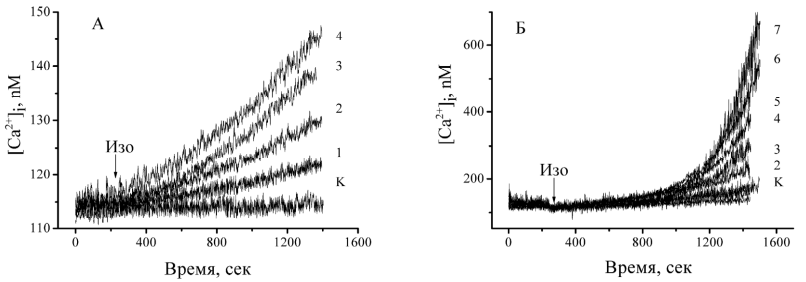


Рис.2. Кинетика Ca^{2+}-ответов преадипоцитов бурого жира мышей (**А**) и сусликов (**Б**) под действием изопротеренола. (**А**) в мкМ: (1)-10; (2)-0,1; (3)–1; (4)-3; (**Б**) в мкМ:(1)-10; (2)-50; (3)-100; (4)-600; (5)-500; (6)-200; (7)-300. К-контроль. Приведены кинетики одного из 4-х экспериментов.

Изопротеренол в таких же концентрациях, 0.1-10мкМ, инициировал в клетках мышей большее увеличение $[Ca^{2+}]_i$, (по сравнению с циразолином), но в преадипоцитах сусликов Ca^{2+}-ответы опять отсутствовали в этом диапазоне концентраций агониста. Высокие концентрации изопротеренола (≥50мкМ) инициировали в преадипоцитах сусликов также сложные и высокоамплитудные Ca^{2+}-ответы (рис.2Б, кинетики 4-7). $[Ca^{2+}]_i$ на 20-й мин достигал уровня ~150нМ у мышей и ~600нМ у сусликов. Следует отметить, что воздействие на β-адренорецепторы, активирующие аденилатциклазный путь, вызывает больший Ca^{2+}-ответ и у мышей и у сусликов по сравнению с ответом на циразолин, агонист α_1-адренорецепторов. В связи с тем, что β-адренергический путь играет доминантную роль в формировании

Ca^{2+}-ответа и у мышей и у сусликов, был изучен эффект форсколина как индуктора cAMP-зависимой Ca^{2+}-сигнализации. Форсколин способен стимулировать продукцию cAMP в клетке напрямую, минуя рецепторы.

Из рисунка 3 видно, что скорость увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в преадипоцитах мыши достигала максимума при 10÷16мкМ форсколина, а затем уменьшалась более чем в два раза и оставалась постоянной вплоть до весьма высокой концентрации (100мкМ). Скорость увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в преадипоцитах сусликов выходила на плато при 6÷10мкМ форсколина, и поднималась на второе, более высокое плато, при увеличении концентрации форсколина до 50мкМ и более. Оба процесса, приводящих как к существенному увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в преадипоцитах сусликов, так и значительному замедлению роста $[Ca^{2+}]_i$ в преадипоцитах мышей, оказались высоко кооперативными, коэффициенты Хилла были равны 5 и 2.5, соответственно. Предполагаем, что высокий уровень cAMP способствует активации быстрой Ca^{2+}-системы, имеющейся в клетках сусликов, но отсутствующей в клетках мышей.

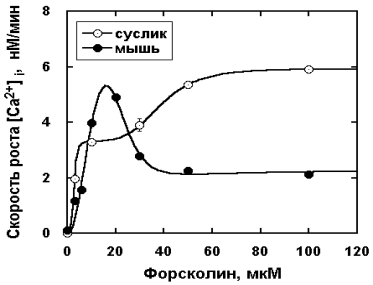


Рис.3. Зависимость скорости входа ионов Ca^{2+} в бурые преадипоциты сусликов и мышей в зависимости от концентрации форсколина – активатора аденилатциклазы (n=2).

Ранее нами было показано, что кальциевая сигнальная система как преадипоцитов сусликов, так и мышей, редуцирована [*Долгачева и др.*, 2007]. Ca^{2+}-ответы бурых преадипоцитов сусликов и мышей имеют как сходства так и различия. Сходство состоит в том, что Ca^{2+}-ответы и тех и других клеток под действием низких концентраций адренергических агонистов (1-20мкМ) содержат ~5-ти минутные лаг-периоды, после чего происходит монотонное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ с главенствующей ролью в этом процессе β-адренорецепторов и cAMP.

Значительные отличия между клетками сусликов и мышей появляются тогда, когда для инициации клеточных ответов используются высокие концентрации адренергических агонистов. Агонисты в концентрации 20-50мкМ полностью подавляют Ca^{2+}-ответы в преадипоцитах мышей, тогда как в преадипоцитах сусликов эти концентрации индуцируют процесс накопления $[Ca^{2+}]_i$, от линейного в первые минуты и далее переходящего в экспоненциальный рост с широким диапазоном амплитуд и скоростей. Ещё более высокие

концентрации агонистов, вплоть до 200-600мкМ, способны вызывать ингибирование и в преадипоцитах сусликов. Можно спорить, являются ли эти концентрации агонистов физиологическими, но, скорее всего, ответ будет положительным. В ранних работах с гибернаторами было показано [15], что при выходе из спячки в тканях сусликов уровень адреналина и норадреналина увеличивается в 30 и 100 раз, соответственно.

Как ранее нами показано, для превращения медленной Ca^{2+}-сигнализации, характерной для преадипоцитов мышей, в быструю Ca^{2+}-сигнализацию, сравнимую с той, что присутствует в преадипоцитах сусликов, требуется хладоадаптация мышей в течение 2-3 недель. У сусликов гиперплазия и инволюция бурого и белого жира находятся под внутренним контролем и практически не зависят от температуры окружающей среды. Изучение этой замечательной природной модели позволит найти подходы для разработки метода инициации гиперплазии БЖТ, достоверно существующей у взрослых людей, с последующей утилизацией белого жира. Найденные нами различия в Ca^{2+}-ответах позволяют надеяться на открытие ключевых ступеней в Ca^{2+}-сигнализации у сусликов, позволяющих применять искусственную стимуляцию гиперплазии БЖТ в медицинских целях .

Работа поддержана РФФИ №2-04-48747 и №05-04-48942.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Astrup A. et al.* //Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. (1985) 248: E507-15;
2. *Elgazzar A.H. et al.* //Clin. Nucl. Med. (1995) 20: 147-52;
3. *Bronnikov G., Houstek J., Nedergaard J.* //J. Biol. Chem (1992) 267(3): 2006-13;
4. *Nicholls D.G.,Locke R.M.* //Physiol. Rev. (1984) 64: 1-64;
5. *Geloen, A., Collet, A.J., Bukowiecki, L.J.* //Am. J. Phys. (1992) 263: R1176-81;
6. *Bronnikov G. et al.* //Endocrinology (1999) 140(9): 4185-97;
7. *Norman D. et al.* //J. Neurocyt. (1988) 17(3): 305-11;
8. *Yamashita H. et al.* //Pflugers. Arch. (1994) 428(3-4): 352-6.;
9. *Yamashita H. et al.* //Cell Growth Differ. (1995) 6(11): 1457-62;
10. *Nisoli E. et al.* //Endocrinology (1996) 137(2): 495-503;
11. *Bronnikov G.E. et al.* //FEBS Lett. (1997) 407: 73-7;
12. *Долгачева Л.П. и др.* //Биол. Мембраны (1999) 16(4): 410-5;
13. *Долгачева Л.П. и др.* //Цитология (2007) 49(12): 1032-8;
14. *Долгачева Л.П. и др.* //Цитология (2002) 44(1): 56-61;
15. *Florant G.* //Cryobiology (1981) 18: 95.

СРАВНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ Ca^{2+}-СИГНАЛИЗАЦИИ В ДЕЛЯЩИХСЯ И ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ МИОБЛАСТАХ МЫШИ

Красный А.М., Озернюк Н.Д.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Исследованы некоторые особенности Ca^{2+} сигнализации в мышиных миобластах линии C2C12, находящихся в состоянии пролиферации, а также при их переходе к дифференцировке. В пролиферирующих миобластах система Ca^{2+}-сигнализации практически не функционирует (редуцирована): внутриклеточные запасы Ca^{2+}, регулируемые АТФ, незначительны, отсутствует или содержится в минимальных количествах буферный белок в эндоплазматическом ретикулуме, не регистрируется вход Ca^{2+} при истощении его внутриклеточных запасов. Формирование системы Ca^{2+} сигнализации происходит в процессе дифференцировки в течение 8-10ч, после переноса клеток в среду дифференцировки. В этот период накапливается буферный белок и появляется емкостной вход кальция. В ходе дифференцировки миобластов появляется также потенциал-зависимый вход Ca^{2+}.

Миобласты – клетки-предшественники мышечной системы, в ходе дифференцировки сливаются в многоядерные миотубы, из которых формируются впоследствии мышечные волокна. Этот процесс сопровождается экспрессией миоспецифических генов и репрессией генов, контролирующих клеточную пролиферацию. При переходе от пролиферации клеток к дифференцировке меняются также некоторые метаболические параметры и в частности, могут меняться особенности Ca^{2+} сигнализации. В связи с этим следует отметить, что в клетках-предшественниках преадипоцитах бурого жира мыши и суслика система Ca^{2+} сигнализации практически не функционирует [1], а в процессе холодовой адаптации и превращения преадипоцитов в адипоциты наблюдается перестройка этой системы и приобретение ее сходства с таковой в зрелых адипоцитах бурого жира [2].

В ряде работ показана взаимосвязь процессов дифференцировки и динамики внутриклеточного Ca^{2+}. Так блокирование ретикулярных Ca^{2+}-АТФаз тапсигаргином и, следовательно, понижение внутриклеточных запасов Ca^{2+} останавливает процесс дифференцировки миобластов [3]. Известно также, что понижение внеклеточной концентрации Ca^{2+} останавливает дифференцировку миобластов [4,5].

Миобласты в культуре служат удобной моделью для изучения дифференцировки клеток и, в частности, перехода от их пролиферации к дифференцировке. Однако роль Ca^{2+} в процессах дифференцировки

клеток изучена недостаточно. В нашей работе были изучены особенности Ca^{2+}-сигнализации в мышиных миобластах C2C12 при переходе этих клеток от пролиферации к дифференцировке.

Материалы и мотоды. Работу проводили на мышиных миобластах линии C2C12. Миобласты культивировались в среде ДМЕМ – (Dulbecco Modified Eagle's Medium) (Sigma, USA) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. При этом клетки находились в состоянии постоянной пролиферации. Дифференцироку клеток инициировали средой, содержащей ДМЕМ и 2% лошадиной сыворотки. Состояние системы Ca^{2+}-сигнализации оценивали оценивали в пролиферирующих миобластах и в клетках, находящихся в среде дифференцировки в течение 8-10ч. Следует отметить, что миобласты мыши в данных условиях культивирования формируют многоядерные миотубы примерно через трое суток.

Измерения проводили при 37^{o}C в среде PSS, содержащей 145мМ NaCl, 5мМ KCl, 1мМ $CaCl_2$, 1мМ $MgCl_2$, 10мМ глюкозы, 5мМ HEPES, pH 7.4. Деполяризацию вызывали средой, содержащей: 65мМ NaCl, 85мМ KCl, 1мМ $CaCl_2$, 10мМ глюкозы, 5мМ HEPES, pH 7.4. В бескальциевой среде $CaCl_2$ был заменен на 1мМ ЭГТА. Активацию кальциевой системы вызывали добавлением 50мкМ АТФ.

Изменение концентрации Ca^{2+} в цитозоле оценивали на единичных клетках при помощи конфокального микроскопа LEICA DM IRBE (Германия) при использовании флуоресцентного красителя Fluo-3. Концентрация Ca^{2+} была рассчитана по формуле $[Ca^{2+}]=K_d(F-F_{min})/(F_{max}-F)$, где константа диссоциации K_d для Fluo-3 составляет 809нМ при 37^{o}C [7]. Для измерения максимальной флуоресценции красителя, насыщенного Ca^{2+} (F_{max}), была использована добавка 100мкМ иономицина, который, являясь ионофором, в этой концентрации приводил к заполнению цитозоля Ca^{2+} более активно, чем его выведение клеточными системами. Минимальное значение красителя, не связанного с Ca^{2+} в цитозоле (F_{min}), было получено после добавления АТФ в бескальциевой среде.

Результаты. Для анализа особенностей Ca^{2+}-сигнализации проводили измерение динамики ионов Ca^{2+} в пролиферирующих и дифференцирующихся миобластах C2C12. Делящиеся миобласты, нагруженные кальциевым флуоресцентным зондом Fluo-3, показывают увеличение интенсивности флуоресценции при добавлении АТФ (рис.1а), что свидетельствует о входе Ca^{2+} при активации пуринорецепторов. Отсутствие кальциевого ответа, вызванного деполяризацией мембраны при добавлении KCl, указывает на то, что потенциал-зависимые каналы еще не сформированы.

В дифференцирующихся миобластах (находящихся в среде дифференцировки более 8 часов), присутствует кальциевый ответ, вызванный деполяризацией мембраны при добавлении KCl, что свидетельствует о наличии потенциал-зависимых каналов. На рис.2 показана кинетика удаления Ca^{2+} из цитозоля у миобластов в состоянии пролиферации (а) и в состоянии дифференцировки (б). Скорость удаления кальция можно описать уравнением прямой, где константы скорости соответственно составляют 0.0176сек$^{-1}$ и 0.0297сек$^{-1}$. Почти двукратное увеличение скорости позволяет предположить, что в процессе дифференцировки формируется буферная емкость эндоплазматического ретикулума и активируются ретикулярные АТФ-азы, действие которых суммируются с АТФ-азами плазмолеммы, что дает увеличение скорости удаления Ca^{2+} из цитозоля.

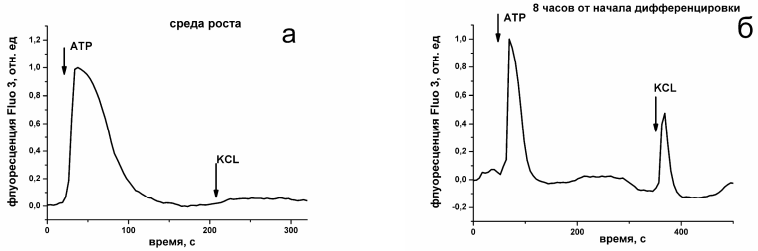


Рис.1. Зависимость флуоресценции кальциевого зонда Fluo-3 в миобластах мыши от добавления АТФ и KCl; а–пролиферирующие миобласты, б–дифференцирующиеся миобласты.

Чтобы оценить внутриклеточные запасы Ca^{2+} и вход Ca^{2+} при опустошении внутриклеточных запасов, было исследовано изменение концентрации кальция при добавлении АТФ в бескальциевой среде, с последующей сменой ее на кальциевую среду (рис.3а и 3б). Бескальциевая среда была использована для того, чтобы исключить вклад ионотропных рецепторов. На рис.3а показано, что АТФ вызывает у миобластов, находящихся в состоянии дифференцировки, только незначительное повышение концентрации Ca^{2+}, (примерно 70нМ). Также отсутствует вход Ca^{2+}, вызываемый опустошением внутриклеточных запасов. Данный вывод основывается на том, что при смене бескальциевой среды на кальциевую концентрация Ca^{2+} в цитозоле не меняется. Таким образом, в эндоплазматическом ретикулуме делящихся миобластов Ca^{2+} практически отсутствует.

В миобластах, находящихся на начальных этапах дифференцировки, показано значительное изменение концентрации Ca^{2+} (рис.3б). Добавление АТФ к клеткам сразу вызывает незначительный ответ: концентрация Ca^{2+} составляет примерно 70нМ; далее, примерно через 100сек наблюдается многократное повышение его концентрации (до 1.5мкМ), что вызвано неполным опустошением эдоплазматического ретикулума, а еще через 50сек появляется третий максимум

концентрации, равный примерно 1мкМ; при этом, видимо, происходит полное опустошение ретикулума. При смене бескальциевой среды на кальциевую концентрация Ca^{2+} в цитозоле увеличивается на 120нМ (пик 4 на рис.3б). Это значение соответствует входу кальция через каналы емкостного входа.

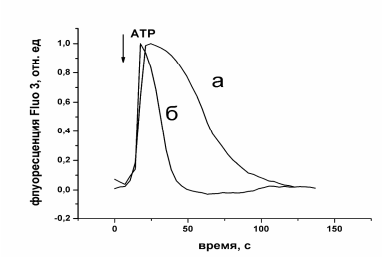


Рис.2. Зависимость скорости удаления Ca^{2+} из цитозоля; а–пролиферирующие миобласты, б–дифференцирующиеся миобласты.

Обсуждение результатов. Представленные нами результаты указывают на то, что в делящихся миобластах мыши система Ca^{2+} сигнализации практически не функционирует. Это наблюдение согласуется с данными о Ca^{2+} сигнализации в других клетках-предшественниках – преадипоцитах бурого жира [1]. В этих клетках практически отсутствуют внутриклеточные запасы Ca^{2+}.

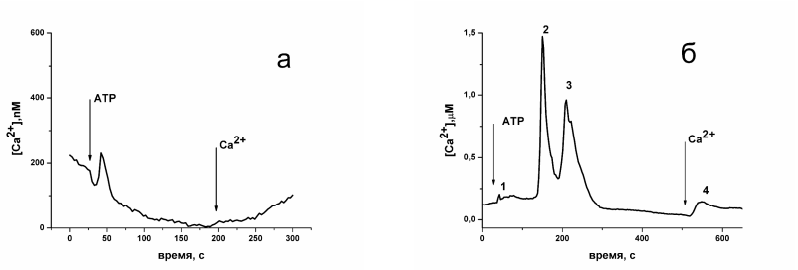


Рис.3. Изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в миобластах в зависимости от добавки АТФ в бескальциевой среде: а–пролиферирующие миобласты, б–дифференцирующиеся миобласты.

В нашей работе показано, что формирование системы внутриклеточной Ca^{2+} сигнализации происходит в процессе начального этапа дифференцировки клеток. Эти данные свидетельствуют о взаимосвязи дифференцировки миобластов и формирующейся Ca^{2+} сигнализации. Появление потенциал-зависимых каналов в первые часы дифференцировки дает основание предполагать, что эти каналы необходимы для дифференцировки клеток. Поскольку потенциал-зависимые кальциевые каналы характерны только для возбудимых клеток, можно предполагать, что механизмы начальных этапов дифференцировки возбудимых и невозбудимых клеток отличаются.

Таким образом, полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что в пролиферирующих миобластах внутриклеточная система Ca^{2+} сигнализации практически не функционирует и формирование этой системы происходит в ходе начальных этапов дифференцировки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Долгачева Л.П. и др.* //Цитология (2007) 49(12):1032-8;
2. *Баумуратов А. С. и др.* //Бюл. Эксп. Биол. Мед. (2004) 138(7): 59-62;
3. *Porter G.A., Makuck R.F., Rivkees S.A.* //J. Biol. Chem. (2002) 277(32): 28942-7;
4. *Naro F. et al.* //Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2003) 284(4): 969-76;
5. *Балан О.В. и др.* //Изв. РАН. Биология (2008) 2: 151-5;
6. *Banachewicz W. et al.* //Purinergic Signal (2005) 1(3):249-57;
7. *Arkle S. et al.* //Exp. Physiol. (1994) 79(6): 975-82.

КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМАЯ СЕКРЕЦИЯ АТР В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Красный А.М.[1], Сергеев А.И.[2,3], Долгачева Л.П.[2], Никифоров Е.Л.[2], Зинченко В.П.[2]

[1]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
[2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[3]Пущинский государственный университет

Известна большая роль химической межклеточной коммуникации в процессах дифференцировки, модуляции функциональной активности и активации защитных механизмов клетки от окислительного стресса, обусловленного ишемией и гиперактивацией. Одним из основных механизмов появления межклеточных трансмиттеров является Ca^{2+}-зависимая секреция. Клетки большинства видов тканей могут секретировать молекулы АТР во внеклеточную среду. Низкий уровень экстраклеточного АТР в покое, быстрое увеличение концентрации под действием различных стимулов, быстрая деградация в экстраклеточном пространстве, присутствие специфических рецепторов – все это позволяет отнести АТР к идеальным межклеточным трансмиттерам ближнего действия. В настоящее время известно несколько механизмов секреции АТР. Секреция АТР по механизму везикулярного экзоцитоза

считается общепринятой для нейронов, астроцитов, хромаффинных клеток, тромбоцитов и других клеток. Во многих типах клеток секреция медиатора или гормона экзоцитозом активируется увеличением внутриклеточного Ca^{2+}. Низкая аффинность Ca^{2+}-связывающих белков, участвующих в экзоцитозе, предполагает, что Ca^{2+}-зависимая секреция не должна активироваться при тотальном повышении концентрации Ca^{2+} за счет мобилизации ионов из эндоплазматического ретикулума (ЭР) ввиду наличия систем отрицательной обратной связи, ограничивающих амплитуду Ca^{2+} сигнала, а отвечать лишь на большие локальные изменения концентрации Ca^{2+}, наблюдаемые вблизи Ca^{2+} каналов плазматической мембраны.

С целью установления корреляции между секрецией и активностью Ca^{2+}-транспортирующих систем клетки в настоящей работе исследованы зависимости процессов секреции АТР и изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) при действии Ca^{2+}-зависимых индукторов секреции АТФ.

Клетки АКЭ изолировали из мышей на 7-й день трансплантации. Измерения проводили в среде Хенкса с 20мМ ХЕПЕС, pH 7.2. Измерения флуоресценции суспензии клеток проводили в термостатируемой ячейке с перемешиванием. Концентрацию ионов кальция в цитозоле ($[Ca^{2+}]_i$) измеряли по флуоресценции зонда Indo-1. Чтобы учесть зависимость интенсивности флуоресценции красителя от температуры, интенсивность флуоресценции при насыщающих концентрациях Ca^{2+} и данной температуре принимали за 1. Транспорт Mn^{2+} оценивали по тушению флуоресценции клеток, окрашенных Indo-1. Для регистрации сигналов использовали компьютерную программу Record 4, а для обработки результатов и построения графиков программу Origin-7. Для измерения АТР использовали метод, основанный на окислении D-люциферина в люциферин/люциферазной реакции. В работе использовали люциферин/люциферазный реагент фирмы Boithema, Финляндия и реагент 1243-200 (ATP Monitoring Reagent, BioOrbit). В процессе измерения концентрации АТР при разных температурах учитывали зависимости хемилюминесценции от температуры и скорость спонтанного гидролиза АТР.

Результаты

Секреция АТР при действии иономицина. Основной причиной активации секреции АТР клетками АКЭ является повышение $[Ca^{2+}]_i$. Стандартное изменение $[Ca^{2+}]_i$ можно достичь применением высокоселективного Ca^{2+} ионофора иономицина. Известно, что в низких концентрациях ионофор вызывает фосфолипаза С-зависимое повышение $[Ca^{2+}]_i$, обусловленное активацией природных Ca^{2+}-транспортирующих систем клетки – кальциевых каналов плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума (ЭР) [1]. При этом в цитоплазме

наблюдается кратковременное повышение $[Ca^{2+}]_i$ (рис.1), первый пик которого является результатом выброса Ca^{2+} из ЭР, а менее выраженный второй максимум – следствием активации входа Ca^{2+} в клетки снаружи. Оба процесса разделены во времени, легко регулируются по скоростям и амплитуде, что дает возможность оценить роль различных Ca^{2+}-транспортирующих систем в процессе секреции АТР. Также как изменение $[Ca^{2+}]_i$, изменение концентрации АТР (кривая 2, рис.1) носит кратковременный характер. Изменение экстраклеточной концентрации АТР является результатом суперпозиции двух процессов – секреции и гидролиза. Сопоставление изменений $[Ca^{2+}]_i$ и секреции АТР (рис.1) показывает, что интенсивность секреции АТР не коррелирует напрямую с $[Ca^{2+}]_i$ и мобилизацией Ca^{2+} из ЭР, а скорее коррелирует со второй фазой Ca^{2+}-сигнала, обусловленной активацией входа Ca^{2+} в клетку. Известно, что фосфолипаза С-зависимый вход Ca^{2+} в клетки через SOC-каналы сильно подавляется при понижении температуры [2]. В случае зависимости от активности SOC-каналов, секреция должна зависеть от температуры аналогичным образом.

На рисунке 2 приведены кинетики изменения концентрации АТР во внешней среде при действии 0,5мкМ Ca^{2+}-ионофора иономицина при разной температуре. При понижении температуры уменьшается как скорость секреции, так и скорость гидролиза АТР.

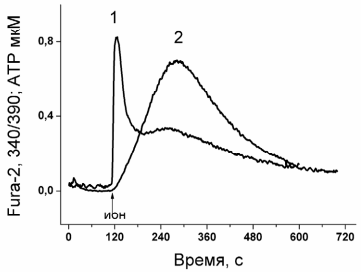


Рис.1. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ (1) и концентрации экстраклеточного АТР (2) в суспензии клеток АКЭ при действии 0,5мкМ иономицина при температуре 32°С.

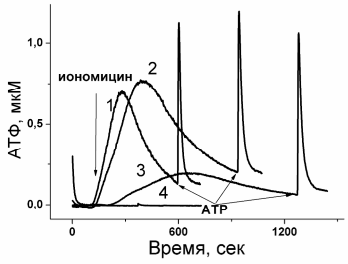


Рис.2. Изменение концентрации АТР в суспензии клеток АКЭ (2×10^7клеток/мл) под действием 0,5мкМ иономицина при различной температуре (1-4) – 37, 32, 25 и 17°С, соответственно. В конце каждого эксперимента добавлено 1мкМ АТР

На рисунке 3 зависимости от температуры амплитуды первой и второй фазы Ca^{2+}-сигнала, пропорциональные скорости мобилизации Ca^{2+} из ЭР и скорости входа Ca^{2+} снаружи при действии иономицина, сопоставлены с максимальной скоростью секреции АТР. Видно, что зависимость максимальной скорости секреции от температуры коррелирует с

зависимостью скорости входа Ca^{2+} в клетку, но не с амплитудой Ca^{2+}-сигнала, который определяется мобилизацией Ca^{2+} из ЭР. К тому же, при температуре ниже 23°С градусов секреция клетками АТР и вход Ca^{2+} в клетки под действием иономицина прекращаются, хотя мобилизация Ca^{2+} из ЭР уменьшается лишь наполовину.

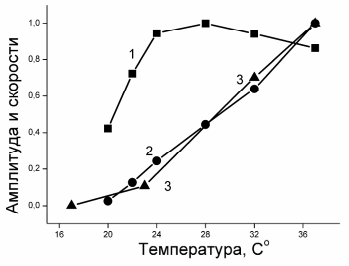


Рис.3. Зависимости от температуры амплитуды первой фазы кальциевого сигнала (1), скорости входа Ca^{2+} в клетки (2) и скорости секреции АТР (3) при действии 0,5мкМ иономицина.

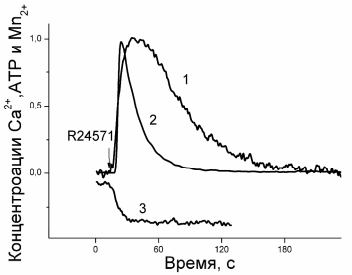


Рис.4. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ (1), концентрации АТР (2), вход Mn^{2+} (3) при действии 3мкМ калмидазолия. Величины $[Ca^{2+}]_i$ и концентрации АТР нормализованы на максимальный сигнал. 3×10^6клеток/мл клеток и температура 36°С.

Активация входа Ca^{2+} и секреции АТР при действии ингибитора кальмодулина калмидазолия. Известно, что активатор Ca^{2+}-независимой фосфолипазы А2 калмидазолий (R24571) в отличие от иономицина в микромолярных концентрациях вызывает кратковременный вход Ca^{2+} в клетки, независимо от опустошения эндоплазматического ретикулума [3,4]. Изменяя концентрацию калмидазолия, можно в широких пределах менять скорость входа Ca^{2+} в клетки. На рисунке 4 приведены изменения $[Ca^{2+}]_i$, входа Mn^{2+} в клетки и секреции АТР при действии 3мкМ калмидазолия. Из рисунка видно, что интенсивность секреции не коррелирует с $[Ca^{2+}]_i$. Более того, при достижении определенного уровня $[Ca^{2+}]_i$ секреция АТР резко подавляется.

Таким образом, интенсивность секреции АТР не коррелирует с $[Ca^{2+}]_i$ и мобилизацией Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, но коррелирует с интенсивностью входа Ca^{2+} в клетки и ингибируется большими концентрациями кальция, что служит основой формирования импульсной секреции АТР клетками. Температурная зависимость секреции совпадает с температурной зависимостью входа Ca^{2+} в клетки.

Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-00704.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дедкова Е.Н., Сигова А.А., Зинченко В.П.* //Биол. Мембр. (1999) 16(3): 292-301;
2. *Зинченко В.П. и др.* //Биофизика (2005) 50: 1055-69;
3. *Касымов В.А. и др.* //Биол. Мембр. (2006) 23(2): 182-9;
4. *Ефремова А.С., Зинченко В.П.* //Биол. Мембр. (2008) 25(4): 313-21.

ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОЗИДОВ ИНОЗИНА И ГУАНОЗИНА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И.

Санкт-Петербургский государственный университет

Введение. Нуклеозиды являются нормальными компонентами в клетке, однако в настоящее время широко рассматривается применение экзогенных нуклеозидов в медицине. Обнаружено, что пуриновые нуклеозиды (аденозин, инозин и гуанозин) имеют широкий спектр биологической активности [1,2].

Инозин – эндогенный нуклеозид, образующийся путем деаминирования аденозина. В последние годы установлено, что инозин, подобно аденозину, обладает иммуномодулирующим, противовоспалительным и нейропротекторным действием [3] и образуется в местах метаболического стресса, связанного с гипоксией, ишемией, повреждением или воспалением [4]. Как лекарственный препарат рибоксин, инозин используется при комплексной терапии ишемической болезни сердца, перенесенного инфаркта миокарда, миокардиодистрофии, нарушениях ритма, связанных с применением сердечных гликозидов, а также при заболеваниях печени.

Другой пуриновый нуклеозид гуанозин, также обладает широким спектром биологической активности и является сигнальной молекулой, играющей важную роль в физиологии и патофизиологии ряда нейродегенеративных заболеваний [5]. Так, в последнее время показано, что гуанозин оказывает нейропротекторное действие [6] и может использоваться для лечения заболеваний, связанных с глутаматэргической эксайтотоксичностью (инсульт, нейродегенеративные заболевания, эпилепсия, тревожные состояния) [1,2]. На основе гуанозина созданы и широко используются такие противовирусные препараты, как ацикловир, валацикловир, фамцикловир, рибавирин и т.д. Существуют данные о том, что аналог

гуанозина энтекавир может подавлять вирус гепатита В и даже вирус иммунодефицита человека типа I [7].

Пуриновые нуклеозиды могут проникать в клетку путем облегченной диффузии с участием специфических нуклеозидных переносчиков, осуществляющих также перенос через мембрану лекарственных аналогов нуклеозидов, используемых для лечения сердечно-сосудистых и вирусных заболеваний, а также рака [8]. Кроме того, известно, что инозин может связываться с аденозиновыми рецепторами A_1, A_{2A} и A_3 типов и запускать внутриклеточные сигнальные каскады [3].

Таким образом, введение экзогенных нуклеозидов является перспективным направлением в биологии и медицине, и, тем не менее, механизмы их действия на компоненты путей внутриклеточной сигнализации практически не изучены. Кроме того, известно, что моноциты и макрофаги экспрессируют все 4 типа аденозиновых рецепторов [3], которые могут являться мишенью для экзогенного инозина. Аденозиновые рецепторы относятся к суперсемейству рецепторов, связанных с G-белками, и их активация приводит к активации фосфолипазы С [9], что может запускать внутриклеточный сигнальный каскад, вызывающий опустошение внутриклеточных Ca^{2+}-депо. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать влияние пуриновых нуклеозидов инозина и гуанозина на процессы Ca^{2+}-сигнализации в таких важных иммунокомпетентных клетках, как макрофаги.

Методика. Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крысы при комнатной температуре (22-24^{o}C) на 2-3-и сутки культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов, а также автоматизированная установка для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM описаны ранее [10].

В исследованиях использовали два экспериментальных подхода. В первом, клетки обрабатывали исследуемыми агентами в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе. Во втором варианте опытов для выявления и усиления входа Ca^{2+} в клетки использовали следующую схему эксперимента (Ca^{2+}-free/Ca^{2+}-reintroduction protocol). Макрофаги стимулировали одним из агонистов в номинально бескальциевой среде, затем в наружную среду добавляли 2мМ Ca^{2+} и после восстановления физиологического градиента концентрации Ca^{2+}, наблюдали повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее вход Ca^{2+} в клетку.

Результаты и обсуждение. Исследовано влияние на $[Ca^{2+}]_i$ инозина и гуанозина в концентрациях 10, 20, 40 и 50мкг/мл. Действие

нуклеозидов наблюдалось в концентрациях 40 и 50мкг/мл. В концентрациях 10 и 20мкг/мл нуклеозиды были неэффективны.

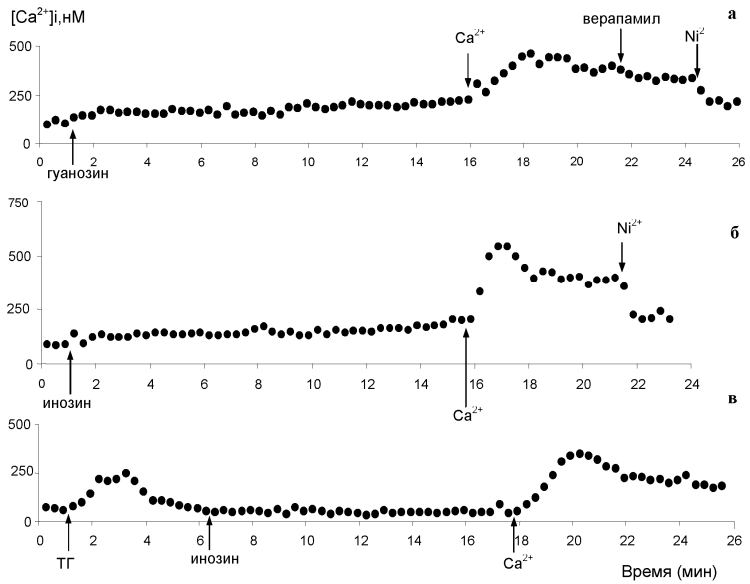


Рис.1. Влияние инозина и гуанозина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. По вертикали–внутриклеточная концентрация Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, нМ, по горизонтали–время, мин. а, б–клетки инкубировали в течение 15мин в присутствии 50мкг/мл гуанозина (а) или 50мкг/мл инозина (б) в бескальциевой среде, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2мМ Ca^{2+}; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавлено 80мкМ верапамила, а затем 2мМ Ni^{2+} (а) или 2мМ Ni^{2+} (б); в–клетки стимулировали 0,5мкМ тапсигаргина (ТГ) в номинально бескальциевой среде, затем добавляли 50мкг/мл инозина, через 11,5мин вход Ca^{2+} индуцировали введением в наружную среду 2мМ Ca^{2+}.

Показано, что в нормальном физиологическом растворе инозин и гуанозин в концентрации 40 или 50мкг/мл вызывают повышение базального уровня Ca^{2+}. Приложение к макрофагам 50мкг/мл гуанозина (рис.1а) или инозина (рис.1б) приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ и в номинально бескальциевой среде, что свидетельствует о том, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое инозином или гуанозином, связано с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+}-депо. Добавление в наружную среду 2мМ Ca^{2+} после обработки клеток гуанозином или инозином приводит к активации депо-зависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (рис.1а, 1б). После опустошения Ca^{2+}-депо при действии 0,5мкМ тапсигаргина, инозин (рис.1в) или гуанозин не вызывают увеличения

$[Ca^{2+}]_i$, что свидетельствует о том, что гуанозин или инозин вызывают мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+}-депо. Полученные результаты согласуются с данными, полученными на клетках других типов. Так, обнаружено, что инозин и аденозин вызывают увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в гепатоцитах крысы [11,12]. При действии аденозина аналогичные данные получены на клетках каротидного тела крысы [13], гладкомышечных клетках линии DDT_1MF2 [14] и бронхов человека [15]. Данных по влиянию гуанозина на $[Ca^{2+}]_i$ в доступной нам литературе не обнаружено.

Исследовано также влияние инозина и гуанозина на Ca^{2+}-сигналы, индуцированные пуринергическим агонистом АТФ, в макрофагах. Добавление к перитонеальным макрофагам 200мкМ АТФ вызывает двухфазный Ca^{2+}-сигнал: кратковременный пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и выраженное длительное «плато», отражающее вход Ca^{2+} из наружной среды. В нормальном физиологическом растворе, инозин и гуанозин в концентрации 40 или 50мкг/мл вызывают повышение базального уровня Ca^{2+} и уменьшение фазы мобилизации Ca^{2+}-сигнала, индуцированного АТФ. Вход Ca^{2+}, вызванный АТФ, практически не изменяется. Аналогичные данные получены в опытах с использованием бескальциевой среды.

Ранее нами было показано, что окисленный глутатион (GSSG) и его синтетический аналог препарат глутоксим (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой платины, ФАРМА-ВАМ, Москва) также увеличивают $[Ca^{2+}]_i$ вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+}-депо и последующий вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [16-18]. Глутоксим используется как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний [19], псориаза [20], лучевой и химиотерапии в онкологии. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать сочетанное действие нуклеозидов и GSSG или глутоксима на Ca^{2+}-сигналы в макрофагах, что может быть полезным для клинической практики, поскольку препараты на основе нуклеозидов нередко применяют сочетано с иммуномодулирующими агентами. Показано, что совместное приложение 100мкг/мл глутоксима и нуклеозидов или 100мкг/мл GSSG и нуклеозидов к макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, также вызывает увеличение базального уровня $[Ca^{2+}]_i$ и уменьшение фазы мобилизации Ca^{2+}-сигналов, вызванных 200мкМ АТФ или 0,5мкМ тапсигаргина. Аддитивности в действии агентов не наблюдается. После стимуляции макрофагов, находящихся в бескальциевой среде, тапсигаргином, вызывающим полное опустошение Ca^{2+}-депо, совместное добавление глутоксима и инозина не приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_i$. Это подтверждает то, что оба агента вызывают мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+}-депо.

Ранее нами были выявлены фармакологические характеристики депо-зависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [21]. Показано, что депо-зависимый вход Ca^{2+}, вызванный опустошением Ca^{2+}-депо при действии 0.5мкМ тапсигаргина или 200мкМ АТФ, блокируется следующими фармакологическими агентами: двумя структурно различными ингибиторами потенциалзависимых Ca^{2+}-каналов – 20мкМ нифедипина или 40мкМ верапамила; ионами Ni^{2+} (1мМ), La^{3+} (1мМ), Gd^{3+} (10мкМ); блокатором неселективных катионных каналов нифлумовой кислотой (100мкМ). В связи с этим представляло интерес исследовать влияние классических органических (нифедипин, верапамил) и неорганических (Ni^{2+}, La^{3+}, Gd^{3+}) блокаторов Ca^{2+}-каналов на вход Ca^{2+}, индуцированный нуклеозидами. Полученные данные позволяют предположить, что приложение инозина или гуанозина изменяет фармакологические характеристики каналов входа Ca^{2+} в макрофагах. Каналы становятся менее чувствительными к блокирующему действию Ca^{2+}-антагонистов нифедипина и верапамила (рис.1а), а также к действию неорганических блокаторов La^{3+} и Gd^{3+}. Эффективным блокатором оказались только ионы Ni^{2+} (рис.1а, 1б). Сходные данные были получены нами при использовании GSSG и глутоксима [16-18].

Таким образом, нами впервые показано, что пуриновые нуклеозиды инозин и гуанозин увеличивают $[Ca^{2+}]_i$.в макрофагах, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+}-депо и последующий депо-зависимый вход Ca^{2+} в клетки. Эффект инозина может быть опосредован его взаимодействием с аденозиновыми рецепторами, широко экспрессируемыми в клетках иммунной системы [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Vinade E.R. et al.* //Brain Res. (2003) 977: 97-102;
2. *Vinade E.R. et al.* //Neurobiol. Learning Memory (2004) 81: 137-43;
3. *Hasko G., Sitkovsky M.V., Szabo C.* //TRENDS Pharmacol. Sci. (2004) 25(3) 152-7;
4. *Szabo G. et al.* //Eur. J. Cardiothorac. Surg. (2006) 30: 96-102;
5. *Neary J.T. et al.* // Trends Neurosci. (1996) 19: 13-8;
6. *Rathbone M.P. et al.* //Prog. Neurobiol. (1999) 59: 663-90;
7. *McMahon M.A. et al.* //New England J. Med. (2007) 356: 2614-21;
8. *Rose J.B., Coe I.R.* //Physiology (2008) 23: 41-8;
9. *Fredholm B.B. et al.* //Pharmacol. Rev. (2001) 52: 527-52;
10. *Крутецкая З.И. и др.* //Цитология (1997) 39(2/3): 164-76;
11. *Guinzberg R. et al.* //Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. (2006) 290: E940-51;
12. *Tinton S.A. et al.* //Eur. J. Biochem. (1996) 238: 576-81;

13. *Xu F. et al.* //Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2006) 290: 1592-8;
14. *Gerwins P., Fredholm B.B.* //J. Biol. Chem. (1992) 267(23): 16081-7;
15. *Ethier M.F., Madison J.M.* //Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2006) 35: 496-502;
16. *Крутецкая З.И. и др.* //ДАН. (2007) 412(5): 700-3;
17. *Курилова Л.С. и др.* //Цитология (2008) 50(5): 452-61;
18. *Kurilova L.S. et al.* //Cell Tiss. Biol. (2008) 2(3): 322-32;
19. *Жуков О.Б. и др.* //Врачебное сословие. (2004) 5/6:51-56;
20. *Корсунская И.М. и др.* //Лечащий врач (2003) 4: 78-9;
21. *Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И.* //Рос. Физиол. Журн. (2000) 86(8): 1030-48.

РОЛЬ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ В ДЕЙСТВИИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ГЛУТОКСИМА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ

Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Игловикова О.И., Шамшев А.В.

Санкт-Петербургский государственный университет

Введение. Одним из фундаментальных регуляторных механизмов в клеточной биологии является редокс-регуляция передачи сигналов и экспрессии генов. Транспорт электронов по боковым цепям функциональных -CH_2-SH групп консервативных остатков цистеина белков обуславливает их редокс-чувствительность. Число известных редокс-чувствительных путей передачи сигнала постоянно возрастает, и имеющиеся данные свидетельствуют о том, что регуляция редокс-состояния клетки может быть полезной для лечения СПИДа и некоторых форм рака [1]. Так, синтетический аналог окисленного глутатиона (GSSG) – фармакологический препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой платины, ФАРМА-ВАМ, Москва) – нашел клиническое применение как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний [2], псориаза [3], лучевой и химиотерапии в онкологии. В последнее время появились данные о том, что другой фармакологический аналог GSSG, зарубежный препарат NOV-002 (GSSG в сочетании с цисплатиной), оказывает рецепторопосредованное действие на клетки, изменяет редокс-состояние клеток премиелоидной линии HL-60, вызывает активацию белков, участвующих в гематопоэзе [4]. Будучи введенным в комбинации со стандартными схемами химиотерапии, NOV-002 обеспечивает

повышение эффективности и переносимости химиотерапии у пациентов с поздними стадиями немелкоклеточного рака легких [4].

Ранее нами было обнаружено, что GSSG и глутоксим увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+}-депо и последующий вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [5-7]. Кроме того, нами впервые показано, что ключевыми компонентами сигнального каскада, запускаемого GSSG и глутоксимом и приводящего к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах, являются тирозинкиназы [6-8], тирозинфосфатазы [6-8], фосфатидилинозитолкиназы [9], малые G-белки семейства ras, а также важнейшие ферменты фосфоинозитидной системы передачи сигнала – фосфолипаза С и протеинкиназа С [10].

Установлено, что действие фосфатидилинозитолкиназ, играющих важную роль в метаболизме фосфоинозитидов, приводит к динамической реорганизации актиновых филаментов [11]. Известно также, что актиновые филаменты имеют высокую редокс-чувствительность и легко подвергаются S-глутатионилированию [12-15]. Актин – основной белок цитоскелета практически всех эукариотических клеток. Из белков цитоскелета актин наиболее чувствителен к окислительному стрессу [12]. Супрамолекулярная организация актина частично зависит от присутствия свободных SH-групп. Показано, что обратимое глутатионилирование Cys374 молекулы актина является физиологическим механизмом регуляции полимеризации актина [13]. Установлено также, что NOV-002 вызывает S-глутатионилирование клеточных белков, главным образом актина. Эффект NOV-002 зависит от его концентрации и времени воздействия на клетки. S-глутатионилирование актина изменяет соотношение F- и G-актина, что приводит к существенным изменениям общей архитектуры цитоскелета и внутриклеточного транспорта [4].

В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможное участие актиновых филаментов в регуляторном действии GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

Методика. Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крысы. Подробно процедура культивирования макрофагов, а также автоматизированная установка для измерения $[Ca^{2+}]_i$ с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM описаны ранее [16].

Эксперименты проводили при комнатной температуре (22-24^{o}C) на 2-3-и сут культивирования клеток.

Для выявления возможного участия элементов актинового цитоскелета в действии GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы, мы исследовали влияние двух структурно различных агентов, вызывающих деполимеризацию микрофиламентов – цитохалазина D и латрункулина B. Цитохалазины, обратимо связываясь с

актиновым мономером, препятствуют добавлению молекул актина к актиновым филаментам, что приводит к деполимеризации микрофиламентов [17]. Новый высокоэффективный агент латрункулин В хорошо проникает через мембрану и также ингибирует полимеризацию актиновых филаментов, связываясь с мономерами актина [18].

На рисунке представлены данные, полученные с использованием глутоксима. Аналогичные результаты получены с применением GSSG.

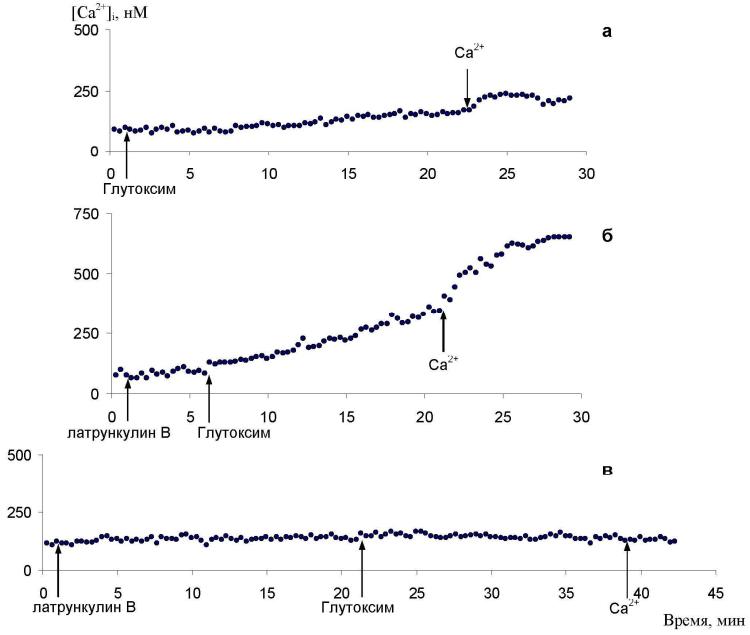


Рис.1. Влияние латрункулина В на эффект глутоксима на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. По вертикали– внутриклеточная концентрация Ca^{2+}, нМ, по горизонтали – время, мин. **а**–клетки инкубировали в течение 21мин в присутствии 200мкг/мл глутоксима в бескальциевой среде, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2мМ Ca^{2+}; **б**–клетки предварительно инкубировали в течение 5мин с 5мкМ латрункулина В в бескальциевой среде, затем добавляли 200мкг/мл глутоксима, через 15мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2мМ Ca^{2+}; **в**–клетки инкубировали в течение 20мин с 5мкМ латрункулина В в бескальциевой среде, после чего добавляли 200мкг/мл глутоксима, через 17мин вводили в наружную среду 2мМ Ca^{2+}.

Результаты и обсуждение. Показано, что инкубация макрофагов в течение 20мин с 200мкг/мл глутоксима вызывает существенное повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+}-депо. Добавление в наружную среду 2мМ Ca^{2+} индуцирует вход

Ca^{2+}, обусловленный, по-видимому, опустошением Ca^{2+}-депо (рис.1а). Предварительная инкубация клеток с 5мкМ латрункулина В в течение 5мин до введения 200мкг/мл глутоксима вызывает усиление обеих фаз Ca^{2+}-ответа, индуцируемого глутоксимом (рис.1б). Более длительная прединкубация (в течение 20мин) с латрункулином В приводит к практически полному подавлению увеличения $[Ca^{2+}]_i$ и входа Ca^{2+}, вызываемых глутоксимом (рис.1в). Аналогичные результаты получены с использованием другого агента, вызывающего реорганизацию актиновых филаментов – цитохалазина D в концентрации 10мкг/мл.

Увеличение Ca^{2+}-ответов, индуцированных GSSG или глутоксимом при кратковременной инкубации клеток с цитохалазином D или латрункулином В, согласуется с полученными нами ранее данными о влиянии на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах другого окисляющего SH-реагента – фениларзиноксида (ФАО) [19]. Обнаружено, что кратковременная (6мин) инкубация перитонеальных макрофагов с агентами, нарушающими структуру актиновых филаментов (20мкг/мл цитохалазина В или 40мкМ фаллоидина), вызывает значительное и прогрессивно нарастающее увеличение $[Ca^{2+}]_i$ при действии ФАО. В том случае, если цитохалазин В или фаллоидин добавлялись на фоне Ca^{2+}-ответа, вызванного ФАО, то с задержкой в 1-2мин происходило дальнейшее существенное увеличение $[Ca^{2+}]_i$. Это свидетельствует о том, что реорганизация актиновых филаментов приводит к стимуляции Ca^{2+}-ответа, индуцированного ФАО [19].

Таким образом, нами впервые показано, что кратковременная инкубация макрофагов с агентами, вызывающими деполимеризацию актиновых филаментов, приводит к усилению обеих фаз Ca^{2+}-сигналов, индуцированных GSSG или глутоксимом. Можно предположить, что при кратковременной инкубации макрофагов с цитохалазином D или латрункулином В происходит разборка подмембранного актина, облегчается передача сигнала, индуцированного GSSG или глутоксимом, от плазмалеммы к Ca^{2+}-депо, что приводит к усилению фазы мобилизации Ca^{2+} из депо. Известно, что кортикальный актин предотвращает экзоцитоз и что разборка этих актиновых филаментов при действии цитохалазина D увеличивает стумулируемую секрецию, способствуя подходу секреторных гранул к плазмалемме [20]. Этим можно объяснить усиление депо-зависимого входа Ca^{2+}, вызываемого GSSG или глутоксимом, после кратковременной прединкубации макрофагов с латрункулином В или цитохалазином D. Можно предположить, что при малом времени воздействия латрункулин В и цитохалазин D вызывают реорганизацию примембранного актина и облегчают взаимодействие Ca^{2+}-депо с депо-зависимыми Ca^{2+}-каналами в плазмалемме. Напротив, при длительной инкубации клеток с латрункулином В или цитохалазином D происходит практически полное

подавление фазы входа Ca^{2+} в макрофаги при действии GSSG или глутоксима. По-видимому, при длительном воздействии латрункулина B или цитохалазина D происходит полная разборка актиновых филаментов, и вспомогательная роль актинового цитоскелета в процессе взаимодействия Ca^{2+}-депо с плазмалеммой становится невозможной. Полученные результаты согласуются с данными о влиянии цитохалазина D и латрункулина A на депо-зависимый вход Ca^{2+} в тромбоциты [21].

Заключение. Таким образом, нами впервые выявлено участие актиновых филаментов в сигнальном каскаде, запускаемом GSSG или глутоксимом, в макрофагах. На основании результатов настоящей работы и более ранних работ [5-10], GSSG и глутоксим могут трансактивировать рецептор с собственной тирозинкиназной активностью и запускать комплексный сигнальный каскад, «ключевыми игроками» в котором являются тирозинкиназы, тирозинфосфатазы, фосфатидилинозитол-киназы, фосфолипаза C, протеинкиназа C, G-белки малой молекулярной массы, а также элементы актинового цитоскелета.

Большая часть сигнальных белков, участвующих в сигнальном каскаде, запускаемом GSSG или глутоксимом, имеет высокую редокс чувствительность. В данной работе выявлен новый компонент в этой сигнальной цепочке – актиновые филаменты. Они могут выступать в качестве «вспомогательных игроков», осуществляющих взаимодействие между важнейшими компонентами редокс-чувствительного сигнального каскада, запускаемого GSSG или глутоксимом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sen C.K.* //Biochem. Pharmacol. (1998) 55: 1747-58;
2. *Жуков О.Б. и др.* //Врачебное сословие. (2004) 5/6:51-6;
3. *Корсунская И.М. и др.* //Лечащий врач. (2003) 4: 78-9;
4. *Townsend D.M. et al.* //Cancer Res. (2008) 68(8): 2870-7;
5. *Крутецкая З.И. и др.* //ДАН (2007) 412(5):700-3;
6. *Курилова Л.С. и др.* //Цитология. (2008) 50(5): 452-61;
7. *Kurilova L.S. et al.* //Cell Tiss.Biol. (2008) 2(3): 322-32;
8. *Крутецкая З.И. и др.* //ДАН (2007) 417(2):273-75;
9. *Крутецкая З.И. и др.* //ДАН (2008) 422(4):562-3;
10. *Kurilova L.S. et al.* //Biological motility (2008) 1:158-61;
11. *Foster F.M. et al.* // J.Cell. Sci. (2003) 116:3037-3040;
12. *Dalle-Donne I. et al.* //Free Rad. Biol. Med. (2001) 31(12): 1624-32;
13. *Dalle-Donne I. et al.* //Free Rad. Biol. Med. (2003) 34(1): 23-32;
14. *Pastore A. et al.* //J. Biol. Chem. (2003) 278(43): 42588-95;
15. *Wang J. et al.* //J. Biol. Chem. (2001) 276(51): 47763-6;
16. *Крутецкая З.И. и др.* //Цитология (1997) 39(2/3):164-76;
17. *Cooper J.A.* //J. Cell Biol. (1987) 105: 1473-8;

18. *Spector I. et al.* //Science. (1983) 219: 493-5;
19. *Крутецкая З.И. и др.* //Цитология (1997) 39(12): 1116-30;
20. *Muallem S. et al.* //J. Cell Biol. (1995) 128: 589-98;
21. *Rosado J.A., Sage S.O.* //J. Physiol. (2000) 526: 221-9.

ХАРАКТЕРИСТИКА Ca^{2+}-КАНАЛОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ТИМОЦИТОВ, АКТИВИРУЕМЫХ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Марова А.А.[1,2], Зинченко В.П.[1]

[1]Институт биофизики клетки, Пущино
[2]Пущинский государственный университет

Увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) является одним из важных событий, ведущих к пролиферации иммунных клеток. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ под действием митогенных стимулов обусловлено как выбросом Ca^{2+} из внутриклеточных депо, так и активацией входа экстраклеточного Ca^{2+}. Во входе Ca^{2+} из внешней среды участвуют Ca^{2+}-каналы, отличающиеся по своим физическим и фармакологическим характеристикам. В настоящей работе описан новый тип неселективного Ca^{2+}-канала тимоцитов, активируемого арахидоновой кислотой. По чувствительности к Gd^{3+}, La^{3+}, ингибиторам протеинкиназ и фосфолипаз этот канал отличается как от депо-зависимых Ca^{2+}-каналов (CRAC), так и от селективных арахидон-регулируемых Ca^{2+}-каналов (ARC).

Введение. Иммунный ответ организма – это сложный процесс, включающий в себя дифференцировку, пролиферацию и секрецию. Основную роль в запуске пролиферативного ответа в лимфоидных клетках играют ионы кальция [1]. В частности, пролиферация тимоцитов под действием митогенных лектинов опосредована увеличением концентрации цитозольного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и выбросом арахидоновой кислоты (AA). При этом механизмы действия AA на Ca^{2+}-транспортирующие структуры долгое время не были до конца исследованы. Сравнительно недавно были обнаружены селективные арахидон-регулируемые Ca^{2+}-каналы (ARC) [4,6], активация которых не зависит от опустошения Ca^{2+}-депо. Использование гидрофильного аналога AA, арахидонилкоэнзима A, показало, что активация ARC каналов происходит на внутренней стороне плазматической мембраны. Также было выяснено, что ARC, в отличие от CRAC каналов, не имеют быстрой инактивации, не ингибируются понижением внутриклеточного pH, не чувствительны к 2-APB и имеют большую селективность к Ca^{2+}. Однако влияние Gd^{3+} и La^{3+} на активность CRAC и ARC каналов было

подобно [2,5]. Недавно была предложена схема регуляции ARC каналов, согласно которой повышение $[Ca^{2+}]_i$ при активации ARC приводит к связыванию Ca^{2+} кальмодулином (КМ) и активации КМ-зависимой фосфатазы – кальцинейрина. В результате происходит дефосфорилирование и ингибирование каналов. Для следующей активации ARC должен быть фосфорилирован, что происходит под действием протеинкиназы А (ПКА) [3].

На тимоцитах также был обнаружен канал, подобный ARC. Однако по некоторым физическим и фармакологическим характеристикам этот канал отличается как от SOC, так и от селективных ARC каналов. Настоящая работа посвящена характеристике этих Ca^{2+}-каналов. В качестве объекта использовались тимоциты крыс линии Wistar.

Результаты и обсуждение. Было обнаружено, что АА дозозависимо в концентрациях 2-8мкМ вызывает увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в тимоцитах (рис.1). При этом в бескальциевой среде подобный эффект не проявляется. Исследования показали, что АА активирует как Ca^{2+}-селективные, так и неселективные Mn^{2+}-проницаемые Ca^{2+}-каналы в тимоцитах (рис.2). Неселективный Mn^{2+}-проницаемый Ca^{2+}-канал имеет сильную температурную зависимость (рис.3), характерную для ферментов (Q_{10}=2), что указывает на активацию канала либо продуктами метаболизма АА, либо АА-зависимыми ферментами.

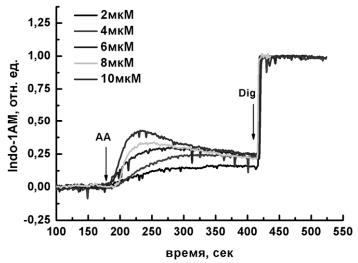


Рис.1. Арахидоновая кислота дозозависимо увеличивает $[Ca^{2+}]_i$.

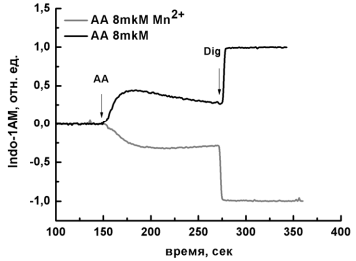


Рис.2. Арахидоновая кислота активирует неселективный Mn^{2+}-проницаемый канал.

Для характеристики канала был проведен ингибиторный анализ с участием ингибиторов метаболизма АА, SOC каналов, протеинкиназ (ПК) и фосфатаз. Было показано, что ингибитор SOC каналов гадолиний (Gd^{3+}) в концентрации 3мкМ не вызывает ингибирования входа Ca^{2+}, активированного АА (рис.4).

Кроме того, продемонстрировано, что 2-АВР, ингибитор IP_3 рецепторов, также не оказывал влияния на активность канала. Однако вход Ca^{2+} через данный канал ингибируется La^{3+} в концентрации 700нМ (рис.5) тогда, как активность селективных ARC каналов снижается в

присутствии 50мкМ La^{3+} [2]. Таким образом, показано, что АА на тимоцитах открывает канал, независящий от опустошения депо.

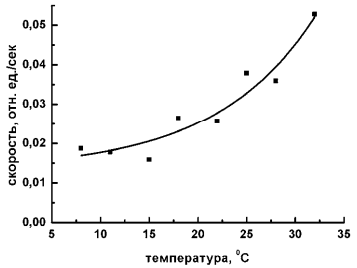


Рис.3. Температурная зависимость неселективного Mn^{2+}-проницаемого канала, активированного арахидоновой кислотой.

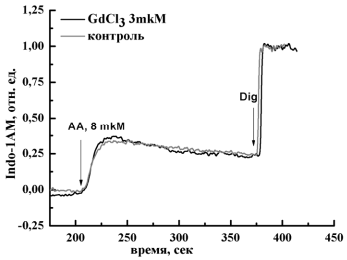


Рис.4. Эффект Gd^{3+} на активность неселективного Mn^{2+}-проницаемого канала, активированного арахидоновой кислотой.

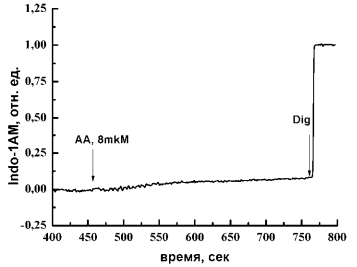


Рис.5. Ингибирование неселективного Mn^{2+}-проницаемого канала, активированного арахидоновой кислотой, La^{3+} в концентрации 700нМ.

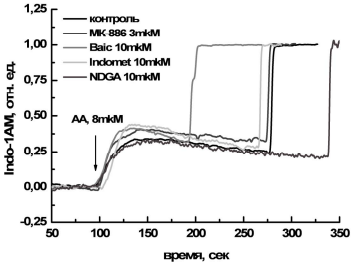


Рис.6. Влияние ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты на активность неселективного Mn^{2+}-проницаемого канала.

Было выяснено, что ингибиторы метаболизма АА (NDGA 10мкМ, indometacin 10мкМ, МК-886 1мкМ, Baicalein 10мкМ) не изменяли активность канала (рис.6). А ингибирование ПКА, которая является ключевым активатором селективных ARC каналов [3], не повлияло на характер входа Ca^{2+}. Использование ингибиторов Ca^{2+}-зависимой ПК, ПКС и тирозин-зависимой ПК показало, что эти ферменты тоже не участвуют в активации данного канала (рис.7).

Ингибиторы кальцинейрина (рис.8), кислотных и щелочных фосфатаз, – также не оказывали влияния на АА-опосредуемый вход Ca^{2+}.

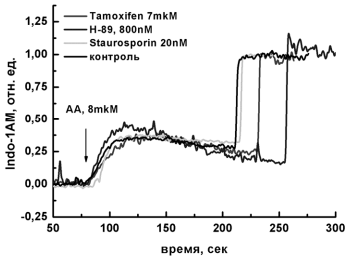


Рис.7. Влияние ингибиторов протеинкиназ на активность неселективного Mn^{2+}-проницаемого канала.

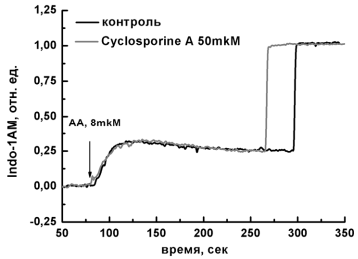


Рис.8. Воздействие ингибитора кальцинейрина на активность неселективного Mn^{2+}-проницаемого канала**.**

В результате проведенной работы охарактеризован новый тип неселективного Mn^{2+}-проводящего Ca^{2+}-канала на мембране тимоцитов, активируемого низкими концентрациями АА. Продемонстрированы его физические и фармакологические характеристики. Полученные результаты важны для понимания механизмов регуляции Ca^{2+}-каналов плазматической мембраны электроневозбудимых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lewis R.S.* //Annu. Rev. Immunol. (2001) 19: 497-521;
2. *Mignen O. et al.* //Biol. Chem. (2003) 278(12): 10174-81;
3. *Mignen O. et al.* //Physiol. (2005) 567(3): 787-98;
4. *Mignen O, Shuttleworth T.J.* //Biol. Chem. (2000) 275(13): 9114-9;
5. *Peppiatt C.M. et al.* //Biochem. (2004) 381(3): 929-39;
6. *Shuttleworth T.J.* //Biol. Chem. (1996) 271(36): 21720-5.

ИНГИБИТОР IP_3-ЗАВИСИМОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ Ca^{2+} 2-APB ПОДАВЛЯЕТ АВТОКОЛЕБАНИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМОДИЯ *PHYSARUM POLYCEPHALUM*

Матвеева Н.Б., Теплов В.А., Бейлина С.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Автоколебательный характер локомоции показан для многих клеток с амебоидным типом подвижности – от низших эукариот до тканевых клеток высших животных [1-3], однако автоколебательное поведение остается значительно менее исследованным, чем передача сигнала и двигательные реакции клеток в ответ на стимулы. Плазмодий *Physarum polycephalum* многоядерная клетка с постоянно поддерживающимися и легко регистрируемыми колебаниями сократительных и регуляторных параметров интересен, в первую очередь, как объект для исследования природы автоколебаний. Генетические данные по эволюции эукариот показали, что *Physarum* входит в группу Amoebozoa, очень рано отделившуюся от ветви, в которой возникли животные [4]. Поэтому исследования на этом объекте не менее интересны и с точки зрения консервативности и эволюционной древности сигнальных систем.

Плазмодий представляет собой типичную амебоидную клетку с динамически организованным сократительным аппаратом в эктоплазме и возвратно-поступательным течением жидкой эндоплазмы. Перемещение плазмодия происходит за счет результирующего переноса эндоплазмы в сторону лидирующего края и обеспечивается силой, генерируемой эктоплазмой в автоколебательном режиме. Автоколебания сократительной активности сопровождаются синхронными колебаниями внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, возрастающей до 420нМ в фазе сокращения и снижающейся до 320нМ в фазе расслабления.[5]. Период автоколебаний меняется в диапазоне от 1 до 5мин в зависимости от функционального состояния плазмодия, а также в ответ на внешние стимулы [6]. Плазмодиальный осциллятор относительно независим от внешней концентрации кальция, поскольку автоколебания изометрической силы продолжаются более часа в среде, содержащей ЭГТА [7]. Они сохраняются, хотя и модифицируются, и в присутствии ингибиторов рианодинового рецептора (RyR) [8].

Настоящая работа является продолжением наших исследований связи плазмодиального осциллятора с IP_3 рецептором (IP_3R), на наличие которой указывал характер действия на плазмодий ингибиторов PLC неомицина и U73122 [9]. Использованный нами 2-аминоэтоксидифенил борат (2-APB) был введен в экспериментальную практику как проникающий антагонист IP_3R [10]. Анализ его использования на разных типах возбудимых и невозбудимых клеток показал, что он действительно является селективным ингибитором IP_3-зависимого высвобождения Ca^{2+}, однако в качестве потенциальных мишеней действия 2-APB помимо IP_3R необходимо рассматривать депо-зависимый вход Ca^{2+} и Ca^{2+}-АТФазы ретикулярной мембраны [11]. Концентрации, при которых 2-APB ингибирует высвобождение Ca^2 варьируют в зависимости от типа клеток, примененного стимула и, по некоторым данным, внутриклеточной концентрации IP_3 [11]. Поскольку последнее представляется важным указанием на прямое взаимодействие 2-APB с IP_3R, мы исследовали его действие на автоколебательное поведение плазмодия в норме и в присутствии аттрактантов, рецепция которых способна стимулировать продукцию IP_3.

Объкт и методы. Плазмодий *Physarum polycephalum* штамм ВКМ(F) 3283 выращивали в поверхностной культуре по методу [12]. Из мигрирующего плазмодия, который представляет собой веерообразную пленку протоплазмы, сплошную в зоне переднего края и трансформирующуюся в сеть протоплазматических тяжей в более каудальных областях, изолировали отрезки тяжей и капли протоплазмы. Капли, вытекающие при проколах плазмодия, далее использовались как образцы для оценки двигательной активности. В изолированных тяжах и в каплях протоплазмы через несколько секунд восстанавливается целостность плазматической мембраны, а через 15-20мин. возобновляется течение протоплазмы и сократительная активность. Автоколебания регистрировали по изменениям продольной силы, генерируемой изолированными тяжами в изометрических условиях. Отрезки тяжей длиной около 4мм и диаметром 250-400мкм фиксировали клеем БФ-6 на крючках высокочувствительного тензиометра [13] и погружали в кювету с контрольным раствором (Hepes 10мМ, pH 7,2, $CaCl_2$ 0,1мМ). Использованы: глюкоза «Serva» (Швейцария), агар «Difco» (США), Hepes, 3-0-метилглюкоза и 2-аминоэтоксидифенил борат (2-APB) «Sigma» (США).

Результаты и обсуждение. В качестве критерия оценки общего действия 2-APB на плазмодий было использовано сохранение его способности к движению. Как видно из рис.1, двигательная активность плазмодиев, регенерировавших из капель протоплазмы, существенно уменьшалась в присутствии 10мкМ 2-APB и полностью подавлялась при более высоких концентрациях ингибитора. В течение 9 часов наблюдения при концентрациях 2-APB больших, чем 10мкМ форма края плазмодиев не изменялась, что свидетельствует о прекращении челночного потока протоплазмы и, следовательно, автоколебаний силы.

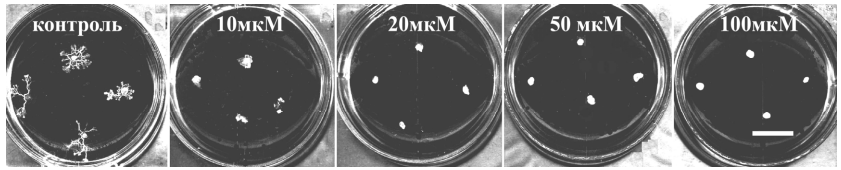


Рис.1. Распространение плазмодиев, регенерировавших из капель протоплазмы, по поверхности 2% агарового геля в контроле и в присутствии 2-APB в указанных концентрациях. Контрольная подложка содержит метиловый спирт в концентрации, соответствующей 100мкМ 2-APB. Ингибитор и растворитель вносили в агар перед застыванием. Съемка через 6 часов от начала опыта. Масштабный отрезок – 10мм.

Существенно, что при этом не отмечалось признаков некротической гибели или апоптоза. Их отсутствие позволяло

предполагать, что показанное на многих клетках повышение внутриклеточной концентрация Ca^{2+} под действием 2-APB [11], если и происходит, то не достигает значений, провоцирующих клеточную гибель.

2-APB вызывал обратимое прекращение автоколебаний силы, генерируемой протоплазматическими тяжами. При концентрации 20мкМ остановка, подобная показанной на рис.2А, наблюдалась в половине, а при 50мкМ во всех опытах, проведенных без применения аттрактантов. Прекращение автоколебаний происходило без предшествующих изменений периода, амплитуды и среднего уровня генерируемой тяжом силы. Время восстановления автоколебаний после удаления ингибитора варьировало в диапазоне 40-60мин, период возобновившихся колебаний был близок к контрольному.

На рис.2Б показано наиболее длительное из наблюдавшихся нами сохранение регулярного автоколебательного режима. Ингибиторный эффект 2-APB определялся на фоне действия аттрактанта (50мМ глюкозы) и при более высокой, чем в других экспериментах, исходной частоте автоколебаний. Увеличение периода и амплитуды колебаний силы в присутствии 20мкМ 2-APB проявилось после 15% растяжения тяжа. Активность IP_3R сохранялась, поскольку блокатор RyR прокаин [14] в концентрации, полностью подавляющей активацию RyR плазмодия кофеином [8], не вызвал остановки колебаний.

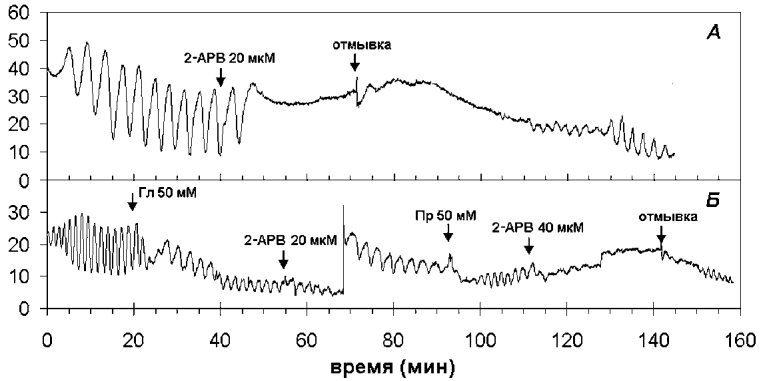


Рис.2. Изменение ингибирующей концентрации 2-APB в зависимости от условий эксперимента: А–полное подавление автоколебаний после добавки 20мкМ 2-APB и обратимость эффекта; Б–длительное сохранение автоколебаний в присутствии 20мкМ 2-APB, добавленного на фоне 50мМ глюкозы, и их подавление после добавки 40мкМ 2-APB. Поддержание автоколебательного режима в присутствии ингибитора RyR прокаина указывает на сохраняющуюся активность IP_3R.

Вместе с тем, в соответствии с общепринятым представлениям о RyR, как ретикулярном канале, расширяющем диапазон изменений внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, прокаин стимулировал увеличение частоты и уменьшение амплитуды автоколебаний силы. Прекращение автоколебаний в ответ на увеличение концентрации 2-APB до 40мкМ сопровождалось увеличением их периода и ростом среднего уровня силы. В ходе отмывки колебания быстро восстановились и имели высокую частоту.

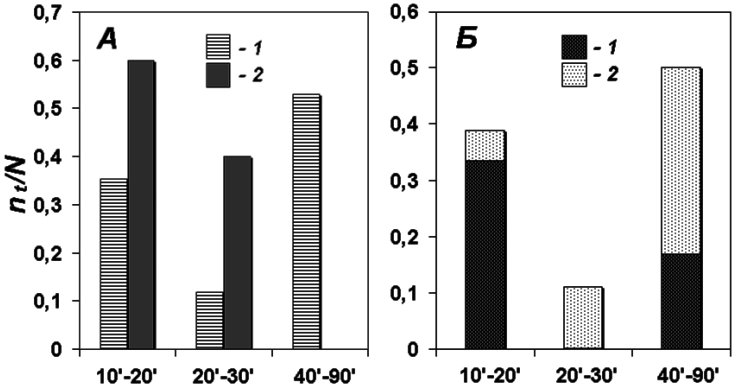


Рис.3. Распределение времен остановки автоколебаний в зависимости: А – от концентрации 2-APB, 1–20мкМ, 2–50мкМ; Б–от условий эксперимента, 1–без дополнительных воздействий, 2–в присутствии глюкозы или 3-0-метилглюкозы, концентрация 2-APB 20мкМ. n_t–число образцов с остановкой колебаний в соответствующем временном диапазоне, N–общее число образцов для данной концентрации 2-APB.

На рис.3 суммированы все полученные нами данные, по временным характеристикам остановки автоколебаний под действием 2-APB. На рис.3А показано их распределение в зависимости от концентрации ингибитора. При 20мкМ распределение имеет два максимума и при 50мкМ сдвигается влево. На рис.3Б показано изменение временных характеристик остановки в зависимости от наличия в среде аттрактанта при концентрации 2-APB 20мкМ. В выборку включены данные, полученные в параллельных экспериментах на тяжах, изолированных из одного плазмодия. Один из тяжей обрабатывался ингибитором сразу после установления регулярного автоколебательного режима, а другой через 15-20мин после добавки глюкозы или ее неметаболизируемого аналога 3-0-метилглюкозы. Диаграмма явно демонстрирует увеличение времени сохранения автоколебаний в присутствии аттрактантов. Наиболее вероятной причиной этого увеличения является возрастание концентрации IP_3, приводящее к полному или частичному сохранению активности IP_3R. Характер

изменений автоколебательного режима также свидетельствует в пользу такого предположения. Во всех экспериментах, где прекращение колебаний наблюдалась позже, чем через 20мин, (как с аттрактантами, так и без) остановке колебаний всегда предшествовало увеличение их периода, как правило, за счет фазы сокращения, часто сопровождавшееся увеличением амплитуды и среднего уровня силы. Наблюдались также срывы и временное восстановление затухающих колебаний. После удаления ингибитора автоколебания восстанавливались сразу, либо за 20-30мин и, в большинстве случаев, имели большую, чем в контроле, частоту, свидетельствующую об увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+}.

Таким образом, в зависимости от времени остановки вызываемое 2-APB прекращение автоколебаний силы может происходить по двум разным сценариям. Быстрая остановка, по-видимому, соответствует полному блокированию IP_3R, исключающему возможность кальций-индуцированного высвобождения Ca^{2+}(CICR), как ходе нормального осцилляторного цикла, так и в ответ на вызываемое 2-APB ингибирование ретикулярных Ca^{2+}АТФаз и увеличение утечки [11]. При длительном сохранении автоколебаний и неполном подавлении активности IP_3R причиной прекращения автоколебаний скорее является действие 2-APB на дополнительные мишени, провоцирующее CICR, рост концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, ее снижение во внутриклеточных пулах и, как следствие, подавление активности IP_3 и Ry рецепторов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ №08-04-01253-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Блиох Ж.Л., Смолянинов В.В.* //Биофизика (1977) 22 (4): 631-9;
2. *Satoh H., Ueda T., Kobatake Y.* //Exp. Cell Res. (1985) 156: 79-90;
3. *Giannone G. et al.* //Cell (2004) 116: 431-43;
4. *Simpson A.G.B., Roger A.J.* //Curr. Biol. (2004) 14(17): R693-6;
5. *Kuroda R. et al.* //Protoplasma (1988) (1): 72-80;
6. *Бейлина С.И. и др.* //Биофизика (1996) 41(1): 133-8;
7. *Wohlfarth-Bottermann K.E., Gotz von-Olenhusen K.* //Cell Biol. Int. Rep. (1977) 1: 239-47;
8. *Матвеева Н.Б. et al.* //Биол. Мембр. (2003) 20(1): 66-71;
9. *Матвеева Н.Б., Бейлина С.И., Теплов В.А.* //Биол. Мембр. (2006) 23(4): 306-15;
10. *Maruyama T. et al.* //Jpn. J. Biochem. (1997) 122: 498-505;
11. *Bootman M.D. et al.* //FASEB J. (2002) 16(10): 1145-50;
12. *Camp W.G.* //Bull. Torrey Bot. Club. (1936) 63: 205-10;
13. *Teplov V.A.* //Protoplasma (1988) 1: 81-8;
14. *Coronado,R. et al.* //Am. J. Physiol. (1994) 266: C1485-504.

ХАРАКТЕРИСТИКА КОНСТИТУТИВНО-АКТИВНЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Сергеев А.И.[1,2], Антонов С.А.[3], Зинченко В.П.[1]

[1]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[2]Пущинский государственный университет
[3]Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Введение. Поддержание постоянной низкой концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток в покое в изменяющихся внешних условиях обеспечивается скомпенсированным постоянным входом и выходом ионов. Откачка кальция из клеток осуществляется Ca^{2+}-АТР-азой плазматической мембраны (PMCA). Поскольку при физиологических уровнях кальция в цитозоле PMCA постоянно активна, то должен быть и постоянно активный Ca^{2+}-канал, обеспечивающий противоположное движение иона.

Известно, что активность PMCA как фермента, в отличие от других Ca^{2+}-транспортирующих систем, имеет характерную сильную зависимость от температуры [1]. Вместе с тем, концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле в клетках в покое поддерживается на постоянном уровне в широком диапазоне температур [2]. Для поддержания постоянной концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле активность компенсирующего конститутивно-активного Ca^{2+}-канала должна зависеть от температуры аналогичным образом.

Таким образом, в настоящей работе предполагалось идентифицировать конститутивно-активный Ca^{2+}-канал, осуществляющий вход Ca^{2+} в электроневозбудимые клетки в покое, провести анализ фармакологических и биофизических свойств этого важного элемента кальциевого гомеостаза клетки, а также экспериментально подтвердить предположение о сильной температурной зависимости канала.

Экспериментальная часть. Объектом исследования служили Т-лимфоциты крысы. Измерения флуоресценции суспензии клеток проводили в термостатируемой ячейке с перемешиванием. Концентрация клеток в ячейке объемом 2мл составляла 3×10^6клеток/мл. Уровень $[Ca^{2+}]_i$ в клетках измеряли ратиометрически по флуоресценции зонда Indo-1. Вход катионов через конститутивно-активный канал детектировался по уменьшению флуоресценции Ca^{2+}-зонда Indo-1 парамагнитными ионом Ni^{2+}.

Результаты. В плазматической мембране существует несколько различных типов Ca^{2+}-каналов, отличающихся по своим свойствам, механизмам регуляции и фармакологии. С использованием флуоресцентных Ca^{2+}-чувствительных зондов в настоящей работе показано, что вход Ca^{2+} в Т-лимфоцитах в покое происходит через специальный конститутивно-активный Ca^{2+}-канал, проводящий также ионы Ni^{2+}. Сильная зависимость активности канала от температуры, показанная на рис.1 и 2, указывает на участие внутриклеточных ферментов в регуляции активности канала. Она совпадает с зависимостью активности Ca^{2+}-АТР-азы плазматической мембраны (PMCA), что предполагает их синхронную работу по поддержанию кальциевого гомеостаза (рис.2). Скорость входа Ca^{2+} в покоящихся клетках увеличивалась при повышении температуры с Q_{10}=1.9.

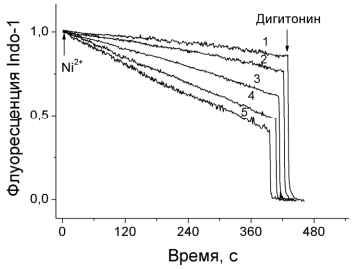


Рис.1. Снижение флуоресценции Indo-1 при входе ионов Ni^{2+} в клетки при разных температурах: 1-13, 2–21, 3–26, 4–31, 5–37°С. Возбуждение флуоресценции 365нм, регистрация 465нм. Здесь и далее исходный сигнал принят за 1, а сигнал после добавления дигитонина – за 0. Концентрация Ni^{2+} 3мМ.

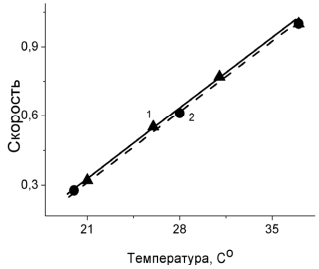


Рис.2. Зависимость от температуры скорости входа Ni^{2+} через конститутивно-активный канал (1), скорости откачки Ca^{2+} из клеток (2).

Для характеристики конститутивно-активного канала нами проведены эксперименты с применением ингибиторов Ca^{2+}-каналов L-типа (верапамил, нифедипин, дилтиазем, исрадипин), Ca^{2+}-независимой фосфолипазы A_2 (бромеоллактон), SOC-каналов (гадолиний), ARC каналов (La^{3+}). Из всех перечисленных ингибиторов только дигидропиридиновый блокатор потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов L-типа исрадипин дозозависимо подавлял скорость входа никеля (рис.3).

На рис.4 приведена зависимость скорости входа ионов Ni^{2+} в клетки в покое от концентрации исрадипина. Скорость измерена линейной аппроксимацией пятиминутного участка кривых на рис.3 через 1мин после добавления Ni^{2+}. Концентрация исрадипина, вызывающая полумаксимальное ингибирование, составила 0.7±0.03мкМ. В то же время исрадипин не влиял на активность каналов ARC, CRAC и SOC (не показано).

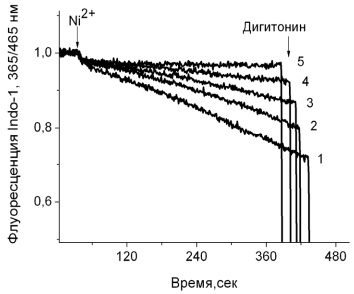


Рис.3. Снижение флуоресценции Indo-1 при входе Ni^{2+} в клетки в присутствии различных концентраций исрадипина. 1– Контроль, 2–0.5; 3–0.7; 4–1; 5–1.5мкМ исрадипина добавлено за 2мин до Ni^{2+}. Концентрация Ni^{2+} 3мМ.

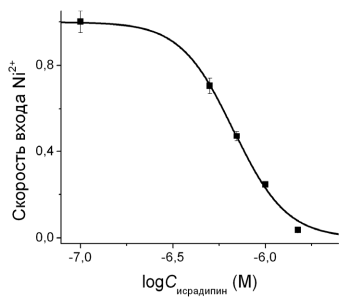


Рис.4. Зависимость скорости входа Ni^{2+} от логарифма концентрации исрадипина. Аппроксимировано сигмоидальной функцией с коэффициентом Хилла 3.1 и EC_{50}–0.67мкМ.

Чтобы оценить чувствительность конститутивного Ca^{2+}-канала к мембранному потенциалу были проведены опыты с уабаином, пропранололом и KCl. После трехминутной инкубации с уабаином или с пропранололом (рис.5) активность канала заметно не изменялась. Деполяризующие концентрации KCl также не влияли на активность канала (не показано). Таким образом, хотя по фармакологическим свойствам канал близок потенциал-зависимым Ca^{2+}-каналам L-типа и ингибируется исрадипином, но не обладает потенциал-зависимостью. Известно, что Ca^{2+}-каналы L-типа регулируются кальмодулином, однако ингибитор кальмодулина калмидазолий также не влиял на активность конститутивного Ca^{2+}-канала (не показано).

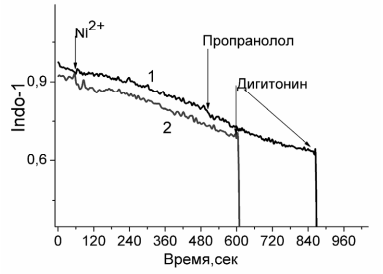


Рис.5. Пропранолол не меняет скорость входа Ni^{2+} по сравнению с контролем (2) и начальным отрезком до его добавки (1). Пропранолол в концентрации 100мкМ

Заключение. В результате исследований идентифицирован и фармакологически охарактеризован новый тип неселективного Ca^{2+}-канала на плазматической мембране Т-лимфоцитов, обеспечивающего конститутивный вход Ca^{2+} в клетки в покое. Показано, что существует внутриклеточный механизм регуляции, позволяющий менять активность канала синхронно с активностью PMCA при изменении температуры. Проведенный ингибиторный анализ предполагает, что канал имеет сходство с потенциал-активируемыми каналами L-типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №07-04-00704.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зинченко В.П., Никифоров Е.Л., Каймачников Н.П.* //Матер. конф. Рецепция и внутриклеточная сигнализация, Пущино (2003): 65-8;
2. *Efremova A.S., Zinchenko V.P.* //Biochemistry (2008) 2(4): 372-9.

МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ Ca^{2+}-КАНАЛА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ ПОВЫШЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ Ca^{2+} В ЦИТОЗОЛЕ ПРИ ПОНИЖЕНИИИ ТЕМПЕРАТУРЫ

Сергеев А.И.[1], Ефремова А.С.[2], Зинченко В.П.[1]

[1]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[2]Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Введение. Ранее показано, что калмидазолиум (R24571) является активатором Ca^{2+}-независимой фосфолипазы А2 (нФлА2) и в микромолярных концентрациях кратковременно активирует неселективный Ca^{2+}-канал в плазматической мембране клеток [1-3]. Известно, что продукты нФлА2 (лизофосфолипид и арахидоновая кислота) являются активатором и ингибитором соответственно для различных кальциевых каналов. Целью работы является экспериментальное доказательство существования в невозбудимых клетках механизма регуляции активности Ca^{2+}-канала плазматической мембраны продуктами нФлА2, обеспечивающего формирование импульса входящего Ca^{2+} и повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле при понижениии температуры.

Методы исследования. Объектом исследования служили Т-лимфоциты крысы и клетки асцитной карциномы Эрлиха. Измерения флуоресценции суспензии клеток проводили в термостатируемой ячейке. Концентрация клеток в ячейке объемом 3мл составляла 3×10^6клеток/мл. Уровень $[Ca^{2+}]_i$ в клетках измеряли по флуоресценции зонда Indo-1. Длина волны возбуждения 365нм регистрации 405 и 490нм. Интенсивность флуоресценции при насыщающих концентрациях Ca^{2+} и

данной температуре принимали за 1, что позволяет определить зависимость интенсивности флуоресценции красителя от температуры.

Результаты исследования. Механизм действия калмидазолия состоит в том, что он образует комплекс с CaM $iPLA_2$, что приводит к изменению конформации и активации фермента [3,4]. Добавление калмидазолия вызывает характерный двухфазный кальциевый сигнал в тимоцитах крысы (рис.1). Показано, что при этом активируется неселективный Ca^{2+}-канал плазматической мембраны [3]. Активация входа Ca^{2+} и временное ингибирование в таком сигнале обусловлены продуктами нФлА2, (лизофосфолипид и арахидоновая кислота), которые являются активатором и ингибитором канала соответственно [4]. Ингибиторы нФлА2 полностью подавляют быструю фазу входа Ca^{2+} и активируют вторую, медленную фазу входа Ca^{2+}, что указывает на участие продуктов нФлА2 как в активации, так и в последующем кратковременном ингибировании неселективных Ca^{2+}-каналов Т-лимфоцитов. Поскольку оба продукта образуются из одного субстрата одновременно в эквимолярных концентрациях, логично предположить, что для генерации Ca^{2+}-сигнала активатор должен иметь большее сродство к каналу, чем ингибитор.

Из рисунка 1 видно, что эффект ингибитора действительно проявляется примерно через 20сек. Таким образом, продукты нФлА2, регулируя активность неселективного Ca^{2+}-канала, могут формировать импульс входящего Ca^{2+}. Если это действительно так, то уменьшение температуры приведет к уменьшению скорости образования ингибитора и, следовательно, к заметному увеличению времени до момента ингибирования канала.

На рисунке 1 приведены Ca^{2+}-сигналы, индуцируемые калмидазолиумом при разных температурах, а на рис.2 зависимости амплитуды и скоростей быстрой и медленной фазы входа Ca^{2+} от температуры. Ca^{2+}-сигнал, индуцированный калмидазолием, действительно демонстрирует необычную зависимость от температуры.

Как видно из рисунков 1 и 2, максимальная скорость входа Ca^{2+} (активность канала) слабо зависит от температуры (рис.2, кривая V1). Вместе с тем, амплитуда быстрой фазы сигнала значительно возрастает при понижении температуры. На рисунке 2 показано, что увеличение амплитуды быстрой фазы сигнала при понижении температуры коррелирует с увеличением времени максимальной активности канала. По-видимому, при неизменной активности канал остается в открытом состоянии дольше при низкой температуре. Эффект роста амплитуды первой фазы Ca^{2+}-сигнала при понижении температуры можно объяснить, находясь в рамках гипотезы о различном сродстве активатора и ингибитора к каналу, при условии, что активатор быстро достигает концентраций близких к насыщающим, что обеспечивает максимальную

активность канала в течение первых 10-30сек. При понижении температуры реакция образования ингибитора замедляется, и канал дольше остается в активном состоянии, что приводит к увеличению амплитуды сигнала. Время от нанесения стимула до начала подавления канала (время максимальной активности) увеличивается с 10 до 30сек при понижении температуры от 33 до 15°C в такой же степени, как и амплитуда быстрой фазы сигнала (рис.2).

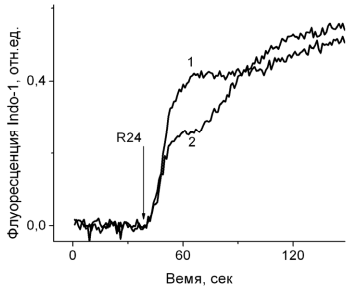


Рис.1. Ca^{2+}-ответы на 1,5мкМ R24571 при различной температуре (1–15; 2–27C°) в тимоцитах крысы. Зависимость интенсивности флуоресценции красителя от температуры учтена при нормализации: Исходный уровень флуоресценции принят за 0, максимальный за 1.

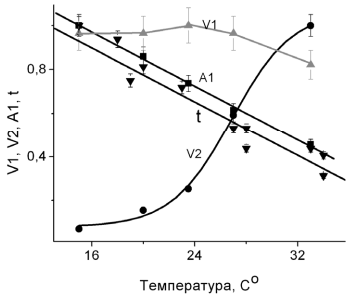


Рис.2. Нормализованные зависимости амплитуды (■) и скоростей быстрой (▲) и медленной (●) фазы входа Ca^{2+} и времени максимальной активности канала (▼) от температуры в тимоцитах крысы.

Чтобы показать универсальность механизма регуляции Ca^{2+}-канала, обеспечивающего формирование импульса и увеличение входа кальция в клетки при понижением температуры мы провели аналогичные эксперименты на клетках асцитной карциномы Эрлиха, отличающейся от тимоцитов большей активностью PMCA, более развитым эндоплазматическим ретикулумом и наличием метаботропного ATP-рецептора P2Y типа. Чтобы исключить вклад выхода кальция из ЭР на общий кальциевый ток под действием R24571, мы предварительно опустошили ЭР добавлением избыточной концентрации АТФ (10мкМ) (рис.3). На рис.3 показаны изменеия концентрации Ca^{2+} в цитозоле клеток АКЭ при последовательном добавлении ATP и калмидазолия при разных температурах. Показано, что Ca^{2+}-сигнал, вызванный активацией ATP метаботропного рецептора сильно подавляется при понижении температуры как по амплитуде, так и по скорости нарастания. Ca^{2+}-сигнал, индуцированный калмидазолиумом возрастает по амплитуде при понижении температуры при неизменной скорости нарастания сигнала. На рис.4 приведенны скорости (первые

производные) Ca^{2+}-сигнала, индуцированного калмидазолием при двух температурах). Показано, что максимальная скорость действительно не изменяется при уменьшении температуры, а время максимальной активности канала возрастает, что и приводит к увеличению суммарного входа Ca^{2+} в клетку.

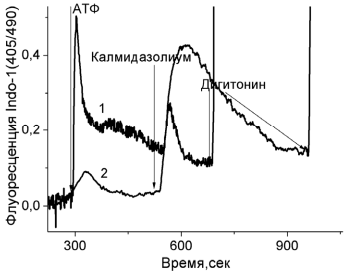


Рис.3. Изменение [Ca^{2+}] в цитозоле под действием 1.2мкМ R24571, добавленного через 1.5мин после опустошения ЭР избытком АТФ (10мкМ).

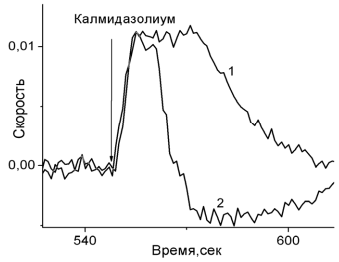


Рис.4. Показано изменение скоростей входа кальция в клетки в зависимости от температуры под действием 1.2мкМ R24571. 1–16°C; 2–37°C.

Заключение. Таким образом, анализ Ca^{2+}-сигнала, индуцированного калмидазолием в клетках при различных температурах, позволил установить наличие положительной и отрицательной обратной связи в регуляции активности Ca^{2+}-канала плазматической мембраны и предложить новый механизм регуляции, основанный на различном сродстве канала к продуктам Ca^{2+}-независимой фосфолипазы A_2, обуславливающего увеличение времени инактивации канала при понижении температуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ефремова А.С., Зинченко В.П.* //Биол. Мембр. (2008) 25: 292-300;
2. *Касымов В.А., Ли В.В., Зинченко В.П.* //Биол. Мембр. (2006) 23: 182-9;
3. *Зинченко В.П. и др.* //Биофизика (2005) 50 (6): 1055-69;
4. *Smani T. et. al*. //Nature Cell Biol. (2004) 6: 113-20.

***

ДЕЙСТВИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. ФАРМАКОЛОГИЯ В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

ВЛИЯНИЕ ПЕРСПЕКТИВНОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРА ФЕНОЗАНА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Алексеева О.М.[1], Рыков В.А.[2], Ким Ю.А.[3], Голощапов А.Н.[1],Бурлакова Е.Б.[1]

[1]Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля, Москва
[2]Пущинский государственный университет
[3]Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Широкое распространение антиоксидантов в качестве терапевтических средств обуславливает необходимость исследования влияния новых веществ данного класса на структуру и функции клеток. Предлагаемый для нейропротекции антиоксидант из группы экранированных фенолов фенозан [β-4-окси-(3,5-дитретбутил-4-оксифенил) калий пропионат] синтезирован в ИХФ РАН [1]. Фенозан – пространственно затрудненный фенол, амфифил, мембранотропное вещество, распределяется во внешнем листке липидного бислоя мембран. Он является сильным антиоксидантом, влияющим на структуру и состав липидной фазы мембран, его молекулы не имеют определенной мишени воздействия. Ранее методом малоугловой рентгеновской дифракции было показано [2], что фенозан в больших концентрациях влияет на организацию бислоев мультиламмелярных липосом из фосфатидилхолина: увеличивает толщину бислоя и снижает уровень регулярности мембран в мультислое. В настоящей работе было протестировано действие фенозана в широком диапазоне концентраций на мембранные препараты разного уровня организации: липосомы, тени эритроцитов и клетки асцитной карциномы Эрлиха.

Методы исследования. Методом дифференциальной адиабатной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) [3] исследовалось взаимодействие фенозана с липосомами, сформированными из индивидуального фосфолипида – димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) [4] и с тенями эритроцитов, полученными по методу [5]. Взаимодействие фенозана с клетками асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), получаемыми по методу [6], тестировали при регистрации рассеяния света разбавленной суспензией клеток АКЭ по методу [7] под прямым углом на длине волны 510нм на спектрофлюориметре Perkin-Elmer-44B.

Результаты и обсуждения. При регистрации термодинамических параметров мембран методом ДСК (энтальпия, максимум температурного перехода и кооперативность) было обнаружено, что доменная организация мембран претерпевает значительные изменения под действием фенозана. В мультиламмелярных липосомах из ДМФХ (табл.1) фенозан в концентрациях ниже 10^{-12}М не вызывает перестроек в доменах липидов. Однако при более высоких концентрациях максимум термоиндуцированного перехода сдвигается в сторону более высокой, возвращается к изначальной и затем к более низкой температуре. В этом же концентрационном интервале кооперативность меняется соответственно: полуширина полуперехода увеличивается – кооперативность снижается; энтальпия также скачкообразно снижается.

Табл.1. Влияние фенозана на термодинамические параметры липосом из ДМФХ.

Концентрация фенозана (М)	Энтальпия (отн. ед.)	Температура максимума перехода (^oC)	Кооперативность (отн.ед.) H 1/2
10^{-3}	0	0	0
10^{-4}	67,4	24,4	0,7
10^{-5}	417,9	24,3	0,8
10^{-6}	420,9	24,4	1
10^{-7}	184,3	24,4	0,8
10^{-8}	273,2	24,4	0,8
10^{-9}	465,8	24,3	1
10^{-10}	431,2	24,3	1
10^{-11}	411,2	24,5	0,7
10^{-12}	410,8	24,4	0,7
10^{-13}	434,4	24,4	0,8
10^{-14}	436,6	24,4	0,8
10^{-15}	444,5	24,4	0,8
10^{-16}	442,2	24,4	0,8
10^{-17}	449,5	24,4	0,8
10^{-18}	472,4	24,4	0,8
10^{-19}	440,9	24,4	0,8
10^{-20}	415,4	24,4	0,8
10^{-21}	460,7	24,4	0,8
0	433,7	24,4	0,8

При концентрации фенозана 10^{-3}М термоиндуцированный переход ДМФХ не выявляется, по-видимому, периодическая структура мембраны липосом значительно нарушается, что согласуется с литературными данными, полученными для больших концентраций фенозана [2]. Фенозан изменяет доменную структуру в мембране нейтрального

фосфолипида и, по литературным данным, влияет на следующий организационный уровень – общие размеры бислоев в мультиламмелярных липосомах фосфолипидов.

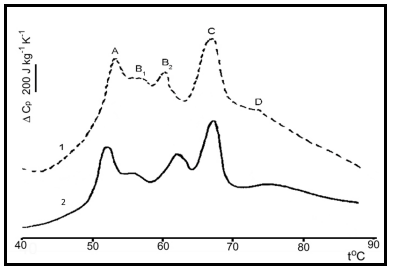


Рис.1. Температурная зависимость избыточного удельного теплопоглощения суспензии мембран теней эритроцитов крысы. С фенозаном (1); контроль -интактные тени (2). По оси ординат ΔCp -изменение относительной теплоемкости (Дж/кг×К).

Табл.2. Влияние фенозана на температуру максимума перехода (^oC) в мембранах теней эритроцитов.

Пики термо-индуцированных переходов	Температура максимума перехода (^oC), фенозан	Температура максимума перехода (^oC),контроль
A	53.2	52.0
B1	56.4	55.2
B2	60.2	62.0
C	67.0	67.4
D	73.6	75.0

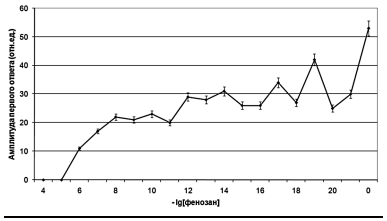


Рис.2. Влияние фенозана на общий клеточный ответ АКЭ. Зависимость величины первого ответа от концентрации фенозана.

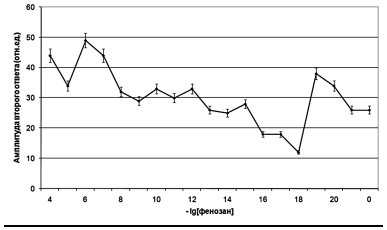


Рис.3. Влияние фенозана на общий клеточный ответ АКЭ. Зависимость величины второго ответа от концентрации фенозана.

Вклад конкретных белков в структуру доменов мембран также оценивался методом ДСК на другом объекте – тенях эритроцитов. Белки мембранного скелета эритроцитов тесно взаимодействуют друг с другом и образуют мембранные домены, денатурация которых формирует структурные тепловые переходы: 5 идентифицированных [8,9] структурных переходов (*A*-, B_1-, B_2-, *C*- и *D*- переходы). Модель вполне адекватна, т.к., по-видимому, в мембранах других клеток развиваются

такие же изменения, поскольку белки семейства спектрина, анкирина, белков полос 4,1 и 4,2 и белка полосы 3 представлены в составе мембранного скелета практически всех клеток организма. Известно [10], что свободнорадикальный процесс, вызывает глобальную структурную перестройку мембранного скелета эритроцитов. Структурные домены мембранного скелета эритроцитов обладают разной чувствительностью к окислительному стрессу. При исследовании влияния антиоксиданта фенозана на структуру белковых доменов в мембранах теней эритроцитов крыс в норме и после предварительной инкубации с фенозаном было обнаружено, что 5 структурных переходов (рис.1) не меняют значительно своей формы. На рис.1 представлены термограммы теней эритроцитов, контрольных (2) и инкубировавшихся с фенозаном (1) в течение 45мин, а затем отмытых центрифугированием от не связавшихся веществ. Концентрация фенозана 10^{-5}М была выбрана на основании данных табл.1, из которых ясно, что эта концентрация вызывает перестройки липидных доменов, но разрушения регулярной структуры еще не происходит. На термограммах теней эритроцитов видно смещение температуры переходов, но все переходы существенно не изменились. Сдвиги (табл.2) максимальных значений термоиндуцированных переходов свидетельствуют о перестройках в организации белковых доменов в присутствии 10^{-5}М, однако сами домены сохраняются.

Полученные нами и литературные данные [1,2] подтверждают, что фенозан обладает сильными мембранотропными свойствами. Для того чтобы указать пределы концентраций, при которых фенозан не будет проявлять свойства гидрофобного яда, было протестировано его влияние на клеточные системы трансдукции сигнала. Так как эритроциты лишены такой системы, то были проведены исследования на клетках АКЭ. При активации Ca^{2+}-сигнальной системы АТФ происходит набухание клеток и пропорционально изменяется интенсивность светорассеяния в суспензии клеток [7,11]. Взаимодействие АТФ с пуринорецепторами на поверхности клетки приводит к повышению цитоплазматической концентрации Ca^{2+}, активации Ca-K каналов и Ca-Cl каналов, изменяющей объем клеток. Общий клеточный ответ отражался в двухфазном изменении объема клетки, по-видимому, в первой фазе происходит освобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, а во второй – компенсаторный вход внеклеточного Ca^{2+}. Зависимость величины первого ответа от фенозана имеет доза-зависимый характер (рис.2.). Зависимость второго ответа (рис.3.) имеет бимодальный вид, характерный для эффекта веществ [12], действующих в сверхмалых дозах.

Суммируя полученные данные можно предположить, что использование фенозана в концентрации не выше 10^{-13}М будет приводить к наименьшим побочным эффектам.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nikiforov G.A. et al.* //Biomed. Chemistry (2005) 51: 413-23;
2. *Архипова Г.В. и др.* //Нейрохимия (1996)13: 128-32;
3. *Privalov P.L., Plotnikov V.V.* //Therm. Acta. (1989) 139: 257-77;
4. *Тараховский Ю.С. и др.* //Биофизика (2008) 53(1): 78-83;
5. *Акоев, В.Р. и др.* //Бюл. Экспер. Биол. Мед. (1997) 123(3): 279-84;
6. *Arslan P. et al.* //J. Biol. Chem. (1985) 260: 2719-27;
7. *Зинченко В.П. и др.* //Биофизика (2005) 50(5): 1055-69;
8. *Jackson W.M. et al.* //Biochemistry (1973) 12: 3662-7;
9. *Гулевский, А.К., Рязанцев, В.В., Белоус, А.М.* //Научные Доклады Высшей Школы. Биологич. Науки (1990): 29-36;
10. *Akoev V.A. et al.* //Biochem. Biophys. Acta (1998) 1371: 284-94;
11. *Artalej O.A., Garcia-Sancho J.* //BBA (1988) 941(9): 48-54;
12. *Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л.* //Биофизика (2004) 49(3): 551-64.

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ КЛЮЧЕВЫХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА SK-N-MC

Бабаков В.Н.[1], Прокофьева Д.С.[1], Войтенко Н.Г.[1], Подольская Е.П.[2], Фатеенков В.Н.[3], Ермолаева Е.Е.[1], Радилов А.С.[1], Гончаров Н.В.[1]

[1]НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, СПб
[2]Институт Аналитического приборостроения РАН, СПб
[3]ФГУ 27 НЦ МО РФ, Москва

Введение. Реализация Конвенции о запрещении химического оружия связана с разработкой нового поколения фармацевтических препаратов. Существующие в настоящее время антидоты имеют ряд недостатков. В последние 5 лет достигнут значительный прогресс в разработке ферментных биоловушек как профилактических антидотов фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ). Основная функция ферментных биоловушек состоит в «обезвреживании» ФОВ до того как токсический агент достиг своей основной физиологической мишени – синапсов нервной системы. Перспективным препаратом этой группы

является бутирилхолинэстераза (БХЭ) плазмы крови человека (препарат находится в стадии клинических испытаний в США).

Первичная терапия отравлений веществами кожно-нарывного действия (КНД) сопровождается деконтаминацией. Только одно соединение из класса веществ КНД – люизит – имеет одобренный антидот. Вещества КНД имеют несколько общих свойств, о которых следует упомянуть для понимания механизмов патогенеза. Одна из характеристик для всех соединений КНД – появление острой иммунной реакции в постинтоксикационный период [1], которая является результатом окислительного стресса (ОС) [2]. ОС проявляется в окислении тиоловых групп, и этот эффект наблюдается для всех веществ КНД. Масштабное окисление тиоловых групп, в свою очередь, может привести к цепи событий, конечным этапом которых является повышение активности редокс-активируемых транскрипционных факторов (например, NF-κB). Сублетальный ОС вызывает повреждения субклеточных органелл; летальный ОС проявляется при полном выключении защитной антиоксидантной системы и приводит к некрозу [3] или апоптозу [4]. Некоторые антиоксиданты, такие как N-ацетил-цистеин (NAC), могут также быть биоловушкой для сернистого иприта. Активация транскрипционного фактора (ТФ) или митоген-активируемой протеинкиназы обычно сопровождается его(ее) фосфорилированием, что позволяет свести действие многочисленных внутриклеточных сигнальных систем активации определенных ТФ. Фосфорилирование ТФ – первый этап его активации, необходимый для дальнейшей транслокации в ядро и активирования генов.

Цель работы заключалась в определении эффектов сернистого иприта и вещества типа Vx (Vx) на фосфорилирование ключевых белков внутриклеточных сигнальных систем, контролирующих воспаление, в клетках нейробластомы человека линии SK-N-MC, на фоне потенциальных антидотных средств – NAC и ацетилхолинэстеразы из эритроцитов человека (АХЭ). Клетки нейронального происхождения были выбраны как наиболее чувствительные к действию ОВ.

Материалы и методы. Для оценки уровня активации ключевых сигнальных белков при действии сернистого иприта (HD) и Vx использовали клетки нейробластомы SK-N-MC. Уровень фосфорилированных белков измеряли набором PathScan Inflammation Multi-Target Sandwich ELISA kit, производства фирмы Cell Signaling Technology, Inc, США. Клетки культивировали в среде для культивирования клеток в составе: среда DMEM, 10% FBS, 2мМ L-глутамина, 50мкг/мл гентамицина. Клетки нейробластомы SK-N-MC рассевали на культуральные флаконы с площадью 75см^2 при 37^{o}C в атмосфере 5% CO_2 и культивировали до 70% конфлюэнтности. За сутки до эксперимента заменяли культуральную среду на аналогичную, но с

пониженным содержанием сыворотки (1% FBS). Затем к клеткам добавляли HD до конечной концентрации 1×10^{-4}мг/мл или Vx до конечной концентрации 1×10^{-5}мг/мл на 1час. Активация ТФ – достаточно быстрый процесс, поэтому использовали инкубацию с ОВ в течение часа. АХЭ и NAC добавляли к клеткам в концентрации 0,1мг/мл и 0,01мМ за 1 час до добавления Vx (АХЭ+Vx) и сернистого иприта (NAC+HD), соответственно, с последующей инкубацией 30мин с протектором и токсикантом. Также изучали эффект самих антидотных средств (АХЭ и NAC). Контролем служили клетки, которым добавляли среду DMEM. Клеткам добавляли ОВ, используя свежеприготовленные 100-кратные растворы на культуральной среде DMEM. К контрольным клеткам добавляли 1/100 среды DMEM.

По завершении инкубации, флаконы с клетками промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли ледяной свежеприготовленный лизирующий раствор (Трис-HCl pH 7,4, 150мМ NaCl, 1% Тритон X100, 1мМ ЭДТА, 1мМ дитиотреитол, 1мМ Na3VO4, 1мМ PMSF), помещали на лед на 5мин, клетки снимали с подложки скребком и лизат переносили в микропробирки. Клетки дополнительно разрушали, пропуская лизат через иглу 23g 15 раз. Лизат центрифугировали 10мин при 10000g и супернатант переносили в другие микропробирки. В супернатанте измеряли концентрацию белка по методу Бредфорда.

Все процедуры проводили по протоколу фирмы-производителя. Лизаты нормализовали по концентрации с использованием прилагаемого раствора, среднее разбавление 1:1. В день выделения лизатов пробы наносили на прилагаемый 96-луночный планшет, содержащий иммобилизованные антитела к изучаемым белкам, и оставляли планшет на ночь при +4^{o}C. На следующий день с планшета удаляли раствор клеточного лизата, планшет промывали 4 раза по 200мкл прилагаемым промывочным раствором и добавляли раствор первичных антител. После инкубации планшет промывали 4 раза по 200мкл промывочным раствором и добавляли раствор вторичных антител. Планшет с вторичными антителами инкубировали 30мин при 37^{o}C на шейкере. После инкубации планшет промывали 4 раза по 200мкл промывочным раствором и добавляли проявляющий раствор на 10мин с инкубацией при 37^{o}C на шейкере. После инкубации добавляли останавливающий реакцию раствор.

Детекцию цветной реакции проводили в течение 5мин после остановки реакции на планшетном спектрофотометре (Thermo) с использованием фильтра поглощения 450нм. Оптическая плотность находится в прямой линейной зависимости с концентрацией исследуемого активированного транскрипционного фактора. Результаты изменения оптической плотности при действии токсикантов представлены на рисунках.

Результаты и обсуждение. Выбранные концентрации ОВ вызывают появление активной формы каспазы-3 в лизате клеток (по данным иммуноблотинга) и частичную гибель клеток при суточном культивировании с выбранными ОВ (данные не представлены). Для HD отмечено дозозависимое падение уровня АТФ по данным АТФ-люминесценции с EC_{50} около 5мкМ (данные не представлены).

Стресс-активируемая протеинкиназа SAPK/JNK (c-Jun N-концевая протеинкиназа) активируется при действии УФ и γ-радиации, церамидов, провоспалительных цитокинов и некоторых факторов роста [5]. Фосфорилирование и димеризация SAPK/JNK является следствием каскада фосфорилирования MAP-киназного пути и приводит к дальнейшей транслокации белка в ядро и регуляции транскрипции через взаимодействие с c-Jun, ATF-2 и другими ТФ. Наблюдается незначительное снижение уровня фосфорилированного белка SAPK/JNK при действии HD относительно контрольного уровня, при действии NAC и совместном действии с HD уровень фосфо-SAPK/JNK находится на одном уровне с контролем (рис.1). АХЭ вызывает 3-кратное повышение уровня фосфо-SAPK/JNK и его 2-кратное повышение при совместном действии с Vx, в то время как сам Vx практически не влияет на уровень фосфо-SAPK/JNK (рис.1).

STAT3 является конечной мишенью для многих цитокинов и факторов роста. STAT3 конститутивно активирован в ряде опухолей человека и проявляет анти-апоптотическую активность. Фосфорилирование STAT3 приводит к его димеризации, ядерной транслокации и связыванию с ДНК [6]. Vx устойчиво повышает активацию системы STAT3 приблизительно в 1,5 раза, тогда как АХЭ проявляет тенденцию к снижению уровня фосфо-STAT3 ниже контрольного уровня. Совместное действие АХЭ и Vx также снижает уровень белка фосфо-STAT3 относительно уровня, вызванного действием Vx (рис.2). HD незначительно активирует систему STAT3, NAC также незначительно активирует систему STAT3, не влияя на повышение, вызванное сернистым ипритом (рис.2).

MAP-киназа p38, подобно SAPK/JNK, активируется при действии различных факторов, таких как осмотический шок, провоспалительные цитокины, УФ и факторы роста. Активированная киназа p38, в свою очередь, способна фосфорилировать ТФ ATF-2, Max и MEF2 [7]. АХЭ и NAC практически не меняют уровень фосфо-p38 относительно контрольного и не влияют на незначительное снижение уровня фосфо-p38, вызванного как HD, так и Vx (рис.3).

NF-κB играет центральную роль в процессах воспаления и иммунного ответа. Комплекс гетеро- или гомодимеров из p65, p50 и p52 субъединиц NF-κB находится в цитоплазме и при активации транслоцируется в ядро. Фосфорилирование p65 усиливает ДНК-связывающую активность NF-κB, но не является необходимым условием проявления такой активности [8]. HD повышает уровень фосфо-p65 относительно контрольного уровня. NAC – антиоксидант, про который известно, что он снижает уровень активации стрессового транскрипционного фактора NF-κB, что подтверждается в нашей работе: NAC снижает уровень фосфо-p65, уровень этой субъединицы также снижается при совместном действии NAC и HD (рис.4). АХЭ не влияет на фосфорилирование p65, и не препятствует повышению уровня фосфо-p65, вызванного Vx.

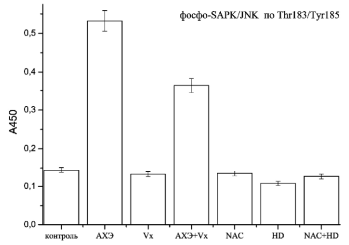


Рис.1. Изменение уровня белка фосфо-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) при действии Vx в концентрации 1×10^{-5}мг/мл и HD в концентрации 1×10^{-4}мг/мл в течение 30мин на клетки линии SK-N-MC. Перед добавлением токсиканта клетки предварительно инкубировали с 0,1мг/мл АХЭ или с 0,01мМ NAC.

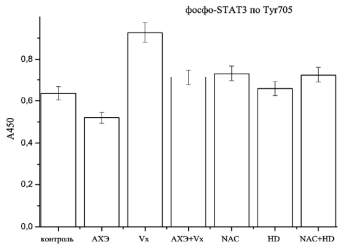


Рис.2. Изменение уровня белка фосфо-STAT3 (Tyr705) при действии Vx в концентрации 1×10^{-5}мг/мл и HD в концентрации 1×10^{-4}мг/мл в течение 30мин на клетки линии SK-N-MC. Перед добавлением токсиканта клетки предварительно инкубировали с 0,1мг/мл АХЭ или с 0,01мМ NAC

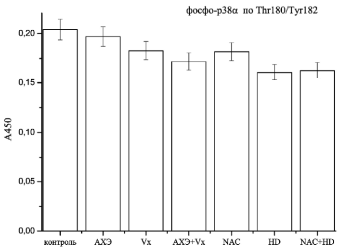


Рис.3. Изменение уровня белка фосфо-p38 (Thr180/Tyr182) при действии Vx в концентрации 1×10^{-5}мг/мл и HD в концентрации 1×10^{-4}мг/мл в течение 30мин на клетки линии SK-N-MC. Перед добавлением токсиканта клетки предварительно инкубировали с 0,1мг/мл АХЭ или с 0,01мМ NAC

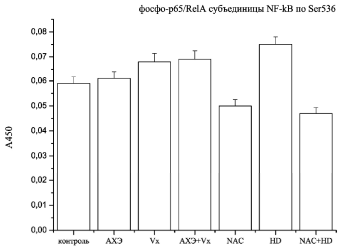


Рис.4. Изменение уровня белка фосфо-p65 (Ser536) при действии Vx в концентрации 1×10^{-5}мг/мл и HD в концентрации 1×10^{-4}мг/мл в течение 30мин на клетки линии SK-N-MC. Перед добавлением токсиканта клетки предварительно инкубировали с 0,1мг/мл АХЭ или с 0,01мМ NAC

Экспрессия АХЭ контролируется сигнальным путем JNK/AP1/ATF2 [9] Существенную активацию JNK АХЭ в клетках SK-N-MC можно объяснить возможной пока неизученной системой обратной связи, действующей на этот сигнальный путь и который не связан с ОС, так как HD и NAC не влияет на активацию этого сигнального пути. Потенциально такой эффект могут вызывать и следовые количества липидов мембран эритроцитов. Эффект Vx на фосфорилирование белка STAT3 нейтрализуется АХЭ и, вполне вероятно, что этот сигнальный путь обладает проапоптотическим действием в клетках линии SK-N-MC.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sidell F. et al.* //Vesicants. Textbook Military Med. Washington, DC (1997);
2. *Bartsch H., Nair J.* //Langenbecks. Arch. Surg. (2006) 391(5): 499-510;
3. *Virag L.* //Curr. Vasc. Pharmacol. (2005) 3: 209-14;
4. *Haddad J.J.* //Int. Immunopharmacol (2004) 4: 475-93;
5. *Kyriakis J.M., Avrush J.* //Physiol.Rev. (2001) 81: 807-69;
6. *Heim M.H.* //J. Recept. Signal Transduct. Res. (1999) 19: 75-120;
7. *Yang S.H. et al.* //Mol. Cell. Biol. (1999) 19: 4028-38;
8. *Baeuerle P.A., Baltimore D.* //Cell (1996) 87: 13-20;
9. *Zhang J.Y. et al.* //Cell Mol. Life Sci. (2008) 65(9): 1435-45.

ВЛИЯНИЕ ОРТО-АМИНОАЗОТОЛУОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *PPAR-α*, *PPAR- γ*, *RXRα* И *CAR* В ПЕЧЕНИ И УРОВЕНЬ *ИЛ-1β* В КРОВИ У МЫШЕЙ КОНТРАСТНЫХ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ХИМИЧЕСКОМУ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗУ ЛИНИЙ

Багинская Н.В.[1], Перепечаева М.Л.[3], Хощенко О.М.[2], Душкин М.И.[2]

[1]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
[2]Институт терапии СО РАМН, Новосибирск
[3]Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск

Введение. Ранее было показано, что самцы мышей линий DD и CC57BR обладают разной чувствительностью к химическому гепатоканцерогенезу. При хроническом введении орто-аминоазотолуола (ОАТ) у мышей линии DD опухоли печени развиваются в 100% случаев, в то время как у CC57BR такие опухоли не обнаруживаются [1]. У мышей DD, в отличие от CC57BR, при введении ОАТ наблюдается ярко выраженная воспалительная реакция в ткани печени [2]. Мыши этих линий также существенно различаются по ряду показателей углеводно-

жирового обмена, гормональному фону и по чувствительности к действию инсулина [3]. Кроме того, нами было показано, что фоновый уровень экспрессии генов ядерных рецепторов (ЯР) PPAR-α и γ у мышей линии DD существенно ниже, чем у CC57BR [3]. Всё это позволило нам выдвинуть предположение, что различия в уровне функционирования ЯР печени у этих животных могут быть причиной их неодинаковой чувствительности к химическому гепатоканцерогенезу.

Целью настоящей работы является изучение изменений экспрессии генов рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом α и γ (PPAR-α и -γ), ретиноидного Х рецептора α (RXR-α) и конститутивного рецептора андростана (CAR) в ткани печени, а также уровня интерлейкина 1β (ИЛ-1β) в крови самцов мышей линий DD и CC57BR после однократного введения ОАТ.

Методы. В эксперименте использовались 3-месячные самцы мышей линии *DD/He (DD)* и *CC57BR/Mv (CC57BR)* разводки Института цитологии и генетики СО РАН. Животные содержались в стандартных условиях вивария группами по 6-8 особей в клетке в естественных условиях освещения и получали комбикорм ПК 120-1 («Лабораторснаб», Москва) и воду *ad libitum*. ОАТ вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 225мг/кг веса тела. Животных забивали через сутки и 4 суток после введения препарата. Контролем служили мыши, получавшие инъекцию соответствующего объёма растворителя (оливкового масла).

Уровень *ИЛ-1β* в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью набора реактивов фирмы «Bender MedSystem GmbH» (Австрия).

Суммарную РНК из ткани печени выделяли с помощью набора для выделения РНК фирмы Вектор-Бест. Относительное содержание мРНК *PPAR-α, PPAR-γ, RXR-α*, и *CAR* определяли методом мультиплексной ОТ-ПЦР. Для синтеза кДНК *in vitro* брали по 400нг РНК на пробу. Амплификацию проводили с парами праймеров, специфичными к нуклеотидным последовательностям *PPAR-α, PPAR-γ, RXR-α*, и *CAR* и гена «домашнего хозяйства» *rpl30,* который выступал в качестве внутреннего стандарта. ПЦР оптимизировали по числу циклов, концентрации Mg^{2+}, количеству праймеров. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 6% ПААГ. Гель окрашивали бромистым этидием, сканировали с помощью видеосистемы «DNA Analyzer» (Москва) и денситометрировали с помощью программы «Total Lab». Уровень мРНК оценивали путем отношения оптической плотности продукта ОТ-ПЦР, полученного с использованием специфических праймеров к нуклеотидной последовательности гена, к оптической плотности продукта, полученного с использованием специфических праймеров к гену «домашнего хозяйства» (*мРНК ЯР /мРНК rpl30)*.

Достоверность различий между исследуемыми группами животных оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В контроле у мышей линии *DD* экспрессия генов *PPAR-γ, RXR-α*, и *CAR* была существенно ниже, чем у *CC57BR* (табл.1, рис.3.). После введения ОАТ относительное содержание мРНК *PPAR-α, PPAR-γ, RXR-α* у мышей *CC57BR* достоверно снижалось, тогда как экспрессия гена *CAR* не изменялась (табл.1, рис.2-3). У мышей *DD* введение ОАТ не повлияло на относительное содержание мРНК *CAR, PPAR-γ* и *RXR-α*, а уровень экспрессии *PPAR-α* снижался только на 4 сутки после введения канцерогена (табл.1, рис.2-3).

Табл.1. Динамика изменения относительного содержания мРНК *CAR* и *RXR-α* в печени мышей *CC57BR* и *DD* после однократного введения ОАТ.

Показатель	Время после введения ОАТ	*CC57BR*	*DD*
RXRα	контроль	3,36±0,24	2,09±0,27^{o}
	1 сутки	2,57±0,23*	1,70±0,12^{o}
	4 суток	2,32±0,22*	2,56±0,31
CAR	контроль	1.60±0.07	1.31±0.03^{o}
	1 сутки	1.75±0.07	1.26±0.06^{o}
	4 суток	1.66±0.09	1.32±0.03

o-достоверные различия между линиями ($p<0,05$); *-достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

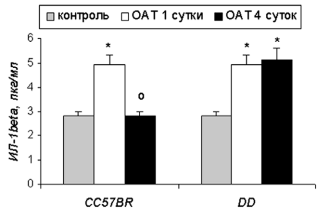


Рис.1. Динамика изменений концентрации *ИЛ-1β* в сыворотке крови мышей 2 линий после однократного введения ОАТ. o-достоверность различий между линиями ($p<0,05$); *-достоверность отличия от контрольной группы ($p<0,05$).

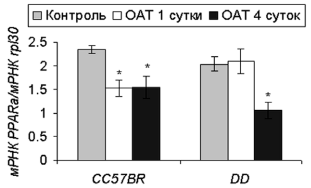


Рис.2. Относительное содержание мРНК *PPARα* в печени мышей линии *CC57BR* и линии *DD*, получавших ОАТ. *-достоверность отличия от контрольной группы ($p<0,05$).

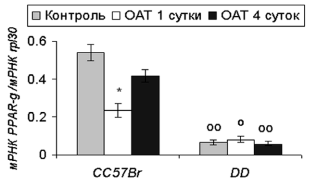


Рис.3. Относительное содержание мРНК *PPARγ* в печени мышей линии *CC57BR* и линии *DD*, получавших ОАТ. o-достоверность различий между линиями ($p<0,05$); oo-достоверность различий между линиями ($p<0,001$); *-достоверность отличия от контрольной группы ($p<0,05$)

У обоих линий мы наблюдали существенное повышение уровня *ИЛ-1β* в крови после введения ОАТ (рис.1), что свидетельствует об усилении воспалительных процессов у этих животных. При этом если у мышей *CC57BR* концентрация этого цитокина к 4 суткам снижалась до контрольного уровня, то у *DD* она оставалась повышенной в течение всего эксперимента, отражая пролонгированный воспалительный ответ на введение ОАТ. Как известно, активация рецепторов *PPAR-α* и *-γ* подавляет секрецию цитокинов и снижает выраженность воспалительных процессов, а развитие воспаления, в свою очередь, снижает уровень экспрессии этих рецепторов [4]. Возможно, что именно развитие воспаления в ответ на введение ОАТ является причиной снижения экспрессии *PPAR-α* и *-γ* у мышей *CC57BR* и *PPAR-α* у *DD.* При этом крайне низкий уровень экспрессии гена *PPAR-γ* в печени у мышей *DD,* по-видимому, способствует большей выраженности и длительности воспалительных процессов у этих животных и, в конечном счёте, повышает их чувствительность к действию гепатоканцерогенов.

Ранее было установлено, что ОАТ специфически повышает ДНК-связывающую активность *CAR* у мышей [5]. При этом, согласно нашим данным, экспрессия гена *CAR* в ткани печени не увеличивается (табл.1). Повышение активности этого ядерного рецептора, согласно данным литературы, может понижать экспрессию и активность *PPAR-α* [6]. Возможно, это является дополнительным фактором подавления экспрессии *PPAR-α* в печени исследованных животных.

Таким образом, в данной работе впервые показано снижение экспрессии ЯР *PPAR-α, PPAR-γ, RXR-α* печени в ответ на введение ОАТ у мышей *CC57BR*, резистентных к его гепатоканцерогенному действию. Установлено, что у чувствительной линии *DD* при введении ОАТ снижается экспрессия только *PPAR-α.* Кроме того показано, что у мышей линии *DD* относительное содержание мРНК *PPAR-γ, RXR-α* и *CAR* существенно ниже, чем у *CC57BR.* Мы предполагаем, что низкий уровень экспрессии *PPAR-γ* может быть одним из факторов пролонгирования воспалительных процессов у мышей *DD* и, в конечном счёте, повышения их чувствительности к химическому гепатоканцерогенезу.

Работа поддержана грантом РФФИ №07-04-00864.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Каледин В.И., Серова И.А., Семёнова Л.А.* //Эксп. онкология (1990) 12(4): 28-30;
2. *Багинская Н.В. и др.* //БЭБиМ (2007) 144(12): 672-5;
3. *Пивоварова Е.Н. и др.* //Биомед. Химия (2009) в печати;
4. *Душкин М.И., Кудинова Е.Н, Шварц Я.Ш.* //Цитокины и воспаление (2007) 2: 18-25;

5. *Пахарукова М.Ю. и др.* //БЭБиМ (2007) 144(9): 313-6;
6. *Maglich J.M., Lobe D.C. and Moore J.T.* //J. Lipid Res. (2009) 50: 439-45.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЛАНТИБИОТИКА ВАРНЕРИНА

Борисова М.П.[1], Коробов В.П.[2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,
[2]Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

Антимикробные пептиды – бактериоцины, продуцируются многими штаммами бактерий и служат в качестве антибиотиков, действие которых направлено против клеток близкородственного вида. Современная классификация относит к ним следующие классы соединений: I – лантибиотики; II – разделяется на IIa – (подобные бактериоцины), IIб - (двухпептидные бактериоцины), IIc – (однопептидные бактериоцины); III класс – термочувствительные бактерии. По строению различаются – α-спиральные, β-складчатые пептиды и лантибиотики, которые имеют в своем составе циклические структуры. Варнерин относится к классу лантибиотиков, который сформирован относительно недавно, хотя первый известный лантибиотик был выделен за год до открытия пенициллина, а структурно определен в 60-е годы, так как его основа, редкая аминокислота, лантионин, была выделена только в 1947 году. Ее остаток – два аланина, соединенных тиоэфирной связью, обязательный структурный мотив для всех, определенных на сегодня лантибиотиков [1]. Высокоспецифической мишенью для этих пептидов является липид II ((undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc(pentapeptide)GlcNAc) [2], который присутствует в мембране бактерий от 103-105 молекул на клетку, понижая действующие концентрации (ниже наномолярных) более чем на три порядка. Некоторые исследования показали, что лантибиотики лучше взаимодействуют с отрицательно заряженными липидами и отразили свойство изученных лантибиотиков образовывать специфические поры при отрицательном потенциале на мембране (trans) по отношению к пептиду [3-7].

К настоящему времени известно около 50 наименований, относимых к лантибиотикам. Самый популярный из них, низин, используется для консервации мяса и молочных продуктов более 40 лет, и до сих пор не появилось резистентных к нему штаммов [8]. Вообще, спектр применения лантибиотиков широк. Так низин активен против многих видов грамположительных бактерий, включая лекарственно устойчивые виды. Он также используется против патогенезов, вызываемых *Clostridium botulinum* и *Listeria monocytogenes* (листериолизин О - основной вирулентный фактор, вызывающий листериозы, менингиты, энцефалиты, внутриматочные инфекции) [9]. Эпидермин активен в отношении *Propionibacterium acnes* [10] и применяется для местной обработки прыщей. Циннамицин и дурамицин используется как ингибитор фосфолипазы А [11,12], в качестве ингибитора ангиотензин превращающего энзима может использоваться анковенин [13]. Кроме того, мирсацидин показывает антимикробную активность против (MRSA) метициллин-устойчивого золотистого стафилококка [14,15]. Мутацин демонстрирует активность, сравнимую с ванкомицином и оксициллином, против многих видов бактерий, в том числе и устойчивых к ванкомицину [16].

Отряд лантибиотиков пока невелик, и поэтому представления о молекулярной структуре и образе действия этих веществ носят самый общий характер, и известные свойства с большой осторожностью переносят на характеристику всего класса, не отвергая неизвестных ранее свойств.

Изложенное выше объясняет наш интерес к новому препарату из серии лантибиотиков – варнерину. Он, как и все лантибиотики, синтезируется на рибосомах. Зрелый белок получается путем дегидротации гидроксиаминокислот, образованием тиоэфирных связей и присоединением к N-концу блокирующей группы. Белок становится активным после ферментативного удаления сигнального пептида. В структуре варнерина имеются необычные аминокислоты: дегидроаланин, дегидробутирин, лантионин, метиллантионин.

Материалы и методы. В работе были использованы коммерческие препараты: фосфатидилхолина из сои (PC) (Sigma), кардиолипина (CL) (Sigma). Были использованы также препараты липидов: общая фракция липидов, выделенных из клеток бактерий вида *Staphylococcus epidermidis* (*S.ep.log*); фракция, в основном, содержащая кардиолипин (CL), выделенная из клеток бактерий Staphylococcus *epidermidis* (*S.ep.CL*); фракция, в основном, содержащая фосфатидилглицерин (PG), выделенная из клеток бактерий *Staphylococcus epidermidis* (*S.ep.PG*). Для забуферения растворов KCl использовали ТРИС и ХЕПЕС (pH=7.15) Варнерин получен в лаборатории Биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (Пермь). Измерения проводили с помощью программы BLM, разработанной А.Я. Зильберштейном, в условиях клямпа потенциала. Знак потенциала указан для транс-стороны (*out*) по отношению к нахождению варнерина.

Результаты и обсуждение. Мембраны, сформированные из коммерческих фосфатидилхолина и кардиолипина в присутствии варнерина с одной стороны и с обеих в концентрации 0.27мг/мл не

изменяли своей проводимости в растворе 0.1-0.2М KCl. В тест-контроле при определении активности данного препарата варнерина на колонии клеток *Staphylococcus epidermidis* наименьшая действующая концентрация равнялась 0,25мкг/мл. Вторым этапом наших исследований была проверка действия варнерина на мебраны, сформированные из липидов, выделенных из клеток бактерий *Staphylococcus epidermidis*.

Общая фракция таких липидов (*S.ep.log.*) в концентрации 20мг/мл формировала устойчивые мембраны и при внесении варнерина с одной стороны в концентрации 0.27мг/мл быстро изменяла проводимость бислоя. На рисунке 1 видно включение и работу канала при потенциале – 50мв, видно также, что при переключении знака потенциала канал тут же выключается. Зафиксированный канал пропускает ток в 0.29рА. Величина проводимости при изменении знака потенциала почти не отличается. При увеличении потенциала в два раза проводимость канала возрастает, примерно, в 3 раза (рис.2).

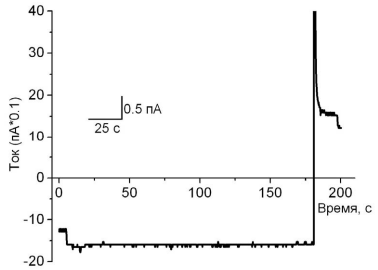


Рис.1. Включение и выключение канала при внесении варнерина 0.27мг/мл (*in*) в 1МKCl лип-д: *S.ep.log*, напряжение: -50мВ, 50мВ.

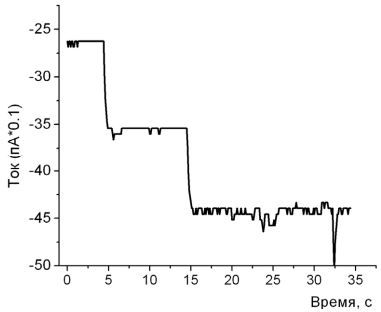


Рис.2. Нарастание тока при отрицательном напряжении -100мВ; 1М KCl; конц. варнерина 0.27мг/мл (*in*); лип-д: *S.ep.log*.

Если мембрана более длительное время находится под воздействием положительного потенциала, то наблюдается уменьшение тока до величины немодифицированного состояния, если отрицательного (на рисунке 2 видно нарастание тока скачками), то сопротивление мембраны падает до величины сопротивления электрода сравнения и мембрана разрушается. Вольтамперная характеристика (рис.3), отражает такое функционирование варнерина в липидной мембране развитием гиперфункции при отрицательных напряжениях.

В работе испытывались и мембраны, сформированные из кардиолипина, выделенного из липидов бактерий *Staphylococcus epidermidis*. Такие мембраны не очень устойчивы, и для работы использовался липидный раствор из смеси (*S.ep.CL*) и лецитина из сои (РС) 1:1. Проводимость каналов при отрицательном потенциале возрастала при -100мв до 5.6рА, а при -50мв от 4 до 6рА. На рисунке 4

видна долгая запись работы одного канала при -100мв. Можно увидеть, что время жизни такого канала в закрытом состоянии несколько больше чем в проводящем. Такая картина типична для мембран из (*S.ep.Cl*). Стоит обратить внимание, что самого действующего вещества при работе на мембранах из (*S.ep.Cl*) требуется 0,08мг/мл, т.е. в три с лишним раза меньше, чем на мембранах, сформированных из общей фракции. При положительных знаках приложенного напряжения ток уменьшается, также как и в случае встраивания варнерина в мембраны из (*S.ep.log*). Мембраны, сформированные из фосфатидилглицерина, выделенного из липидов бактерий *Staphylococcus epidermidis* (*S.ep.PG*), отличались крайней неустойчивостью, и работа проводилась на смеси (*S.ep.PG*) и (РС) из сои 2:3. Действующая концентрация W равна 0,16мг/мл. На рисунке 5 видны включения каналов при -100мв. Каналы пропускают ток в 1.7рА, есть и меньше. Кинетика тока через такие каналы отличается от кинетики токов через каналы, приведенных выше. При положительных потенциалах каналы также стремятся к отключению. Мембраны быстро разрушаются.

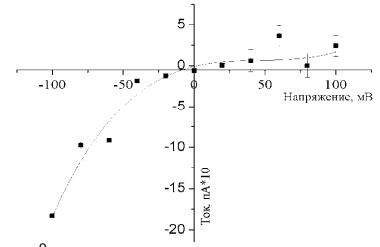


Рис.3. Вольтамперная характеристика мембраны в присутствии варнерина 0.27мг/мл (*in*); липид: *S.ep.log*; 1М KCl.

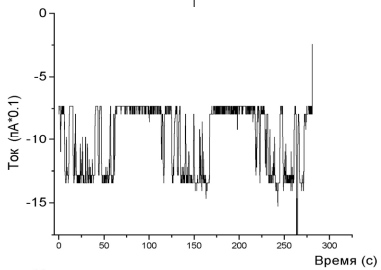


Рис.4. Флуктуация тока через мембрану с варнерином (0.08мг/мл *in)*; 1МKCl; напряжение -100мВ; липид: *S.ep.Cl*+РС (1:1)

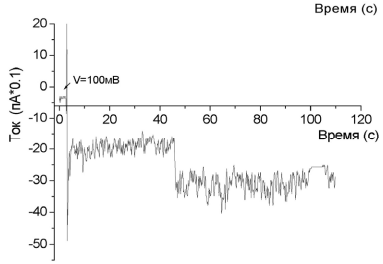


Рис.5. Флуктуация тока через мембрану с варнерином (0.16мг/мл *in)*; 1МKCl напряжение -100мв; липид: *S.ep.PG*+РС (2:3)

В заключении можно сказать, что первый отечественный лантибиотик варнерин обладает рядом характеристик, которые, несомненно, подтверждают его принадлежность к активно действующим известным к настоящему времени веществам, входящим в отряд лантибиотиков. Варнерин действует на мембраны, включающие собственный липид бактерий, в отношении которых проявил антибактериальную активность и в этом смысле выявляет специфическую связь с вполне определенным липидным матриксом. Продемонстрирована зависимость тока через мембрану с варнерином от величины и знака приложенного потенциала. Можно говорить о большем сродстве варнерина к отрицательно заряженным липидам. Наши исследования на модельных мембранах позволяют судить о способе действия варнерина на микробные клетки. Варнерин путем образования специализированных структур – ионных каналов влияет на ионную проницаемость мембран. Вероятно, отрицательно заряженные липиды облегчают сборку проводящих структур, а при отрицательном напряжении на мембране (*trans*) такие структуры более успешно функционируют.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Horn M.J., Jones D.B., Ringel S.J.* //J. Biol. Chem. (1941) 138: 141;
2. *Breukink E. et al.* //Science (1999) 286: 2361;
3. *Gao F.H., Abee T., Konings W.N.* //Appl. Environ. Microbiol. (1991) 57:2164;
4. *Garefa Garcera M.J.et al.* //Eur. J. Biochem. (1993) 212: 417;
5. *Kordel M., Shuller F., Sahl H.G.* //FEBS Lett. (1989) 244: 99;
6. *Breukink F. et al.* //Biochemistry(1997) 36: 6968;
7. *7el-Jastimi R., Lafleur M.* //Biochim. Biophys. Acta (1997) 151: 1324;
8. *Hurst A.* //Adv. Appl. Microbiol. (1981) 27: 85;
9. *Bruno M.E., Kaiser A., Montville T.J.* //Appl. Environ. Microbiol. (1992) 58: 2255;
10. *van Kraaij C. et al.* //Nat. Prod. Rep. (1999) 16: 575;
11. *Fredenhagen A. et al.* //J. Antibiot. (Tokyo) (1990) 43:1403;
12. *Marki F. et al.* //Biochem. Pharmacol. (1991) 42:2027;
13. *Kido Y. et al.* //J. Antibiot. (Tokyo) (1983) 36:1295;
14. *Chattergee S. et al.* //J. Antibiot. (Tokyo) (1992) 45: 839;
15. *Jung G., Sahl H., G. Eds.* //ESCOM. Leiden (1991);
16. *Mota-Meira M. et al.* //Antimicrob. Agents Chemother. (2000) 44: 24.

N-АЦЕТИЛИРОВАНИЕ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СТАРЫХ МЕТОДОВ

Войтенко Н.Г., Глашкина Л.М., Прокофьева Д.С., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В.

НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, СПб

В клетках животных ацетилирование N-концевой аминокислоты является одним из наиболее распространенных и консервативных механизмов трансляционной и пост-трансляционной модификации белков: до 90% белков человека модифицируются посредством N-ацетилирования, не уступая по своей важности таким широко известным модифицирующим процессам как фосфорилирование, метилирование и убиквитинирование, не говоря уже о менее известных сумоилировании и цитруллинировании [1]. N-ацетилтрансферазы (NAT) объединены в суперсемейство ферментов, которые используют в качестве субстрата разные формы ацил-КоА: наиболее охарактеризованы аминогликозид-NAT, глюкозамин-6-фосфат-NAT, гистон-ацетилтрансферазы, микотиол-синтаза, протеин-N-миристоил-трансфераза и Fem-семейство аминоацилтрансфераз [2]. Выявлено 3 комплекса NAT у дрожжей (NatA/B/C) и 2 комплекса у млекопитающих (NatA и NatB), субъединицы которых по-разному сопряжены с клеточным циклом и злокачественным перерождением клеток. Ацетилирование гистонов по остатку лизина – важнейший элемент регуляции экспрессии генов, однако гистоновые ацетилтрансферазы и деацетилазы модифицируют и негистоновые белки, такие как p53, транскрипционные факторы, белки цитоскелета, шапероны, импортины [3,4]. Наряду с убиквитинированием, ацетилирование белков связано с регуляцией протеолитической активности клеток [5].

Начало изучению ацетилирования положили фармакологи и токсикологи: первые публикации датируются 1930-ми годами [6,7]. NAT2 – один из ферментов II фазы биотрансформации лекарственных средств, который способствует их конъюгации и прекращению фармакодинамического эффекта. Роль этого фермента в клинической фармакологии значительна, так как ацетилированию подвергаются более 70% часто применяемых лекарственных препаратов: сульфаниламиды, изониазид, гидралазин, прокаин, прокаинамид, пенициллины, нитразепам, клоназепам, парааминосалициловая кислота, кофеин, амринон, аминоглутетимид и др. Медленный фенотип NAT2 может ассоциироваться как с развитием ряда заболеваний (системная красная волчанка, синдром Дауна, ВИЧ-инфекция, колит, наследственный

псориаз и др.), так и с токсическими реакциями в результате накопления лекарств в организме из-за медленного их метаболизма [8].

Мы использовали в своей работе довольно старые биохимические методы исследования N-ацетилирования [9,10] с целью контроля терапевтической эффективности компонентов комплекса МЕТИС, разработанного для терапии острых отравлений фторацетатом натрия (ФАН). В первую очередь нас интересовала способность этих методов прояснить некоторые аспекты механизма действия метиленовой сини (МС) и других компонентов комплекса МЕТИС, связанные с возможным их влиянием на редокс-состояние клеток и тканей. Ранее обсуждался моноферментативный механизм действия ФА, исходя из следующей логики: если фторацетил-КоА является структурным аналогом ацетил-КоА, их конкуренция за активный центр какого-либо фермента должна оказывать влияние на метаболические реакции с участием ацетил-КоА [11]. Это хорошая идея не только для поиска новых биохимических признаков интоксикации, но также и направление для поиска субстанций, отличных от ацетата, способных конкурентно взаимодействовать с КоА.

Мы использовали метод оценки активности монооксигеназной гидроксилирующей системы печени *in vivo* по динамике выведения метаболитов амидопирина (4-аминоантипирин, ААП, и N-ацетил-аминоантипирин, АцААП) с мочой после нагрузки этим веществом. Оценку ацетилирующей способности печени проводили в сравнительном аспекте при воздействии ФАН и веществ, испытуемых в качестве терапевтических (нитроэфир ДНПГ, глутамат, МС, МЕТИС-1). Исследования процесса ацетилирования проводили на беспородных крысах-самцах, полученных из питомника «Рапполово» РАН. При введении ФАН в/ж в дозе 2мг/кг и ДНПГ в разных дозах выявили, что ФАН обусловливает некоторое снижение содержания обоих метаболитов амидопирина, при этом уровень ацетилированного метаболита АцААП снизился в меньшей степени и недостоверно (табл.1), что свидетельствует о взаимодействии фторацетил-КоА с другими субстратами. Уменьшение выведения метаболитов ксенобиотика может быть обусловлено снижением уровня обмена при интоксикации ФАН. Такие же изменения наблюдались при введении высокой дозы ДНПГ (50мг/кг, табл.1 и рис.1), но низкая доза ДНПГ (5мг/кг) не снижает ацетилирование. Высокие дозы нитроэфира, по-видимому, влияют на активность монооксигеназной системы (напр., в результате снижения уровня NADPH или изменяя степень окисления железа в цитохроме фермента).

В следующем эксперименте мы проводили сравнение степени ацетилирования амидопирина при воздействии ФАН, глутамата, МС и комплекса МЕТИС-1. Выведение АцААП было достоверно снижено при введении МС и комплекса МЕТИС-1 (рис.1). В микросомальной

гидроксилирующей системе ведущую роль в метаболизме ксенобиотиков играют NADPH-зависимые реакции. Поскольку МС может выполнять роль искусственного акцептора электронов от NADPH, можно полагать, что ингибирование процесса ацетилирования амидопирина обусловлено конкурентным ингибированием первой стадии метаболизма амидопирина. Для проверки этого предположения необходимо было провести эксперименты с введением таких препаратов, метаболизм которых проходит только через стадию конъюгации с ацетил-КоА. Примером может быть метод определения ацетилирования с использованием изониазида (ИНА, гидразид изоникотиновой кислоты) в качестве субстрата, который без промежуточного окисления ацетилируется с образованием N-ацетил-изониазида (АцИНА). Изониазид экскретируется с мочой (до 90%) и калом (10-20%) в течение суток. Основные продукты метаболизма изониазида – АцИНА и изоникотиновая кислота. Кроме того, экскретируется небольшое количество конъюгатов с глицином и изоникотинилгидразона [12].

Табл.1. Содержание метаболитов амидопирина в моче крыс после отравления ФАН и введения ДНПГ в различных дозах.

Воздействие	Содержание метаболитов амидопирина, % выведения	
	ААП	АцААП
Контроль	0,345±0,024	3,2±0,192
ФАН, 2 мг/кг	0,184±0,006**	2,48±0,27
ДНПГ, 5 мг/кг	0,338±0,023	3,31±0,358
ДНПГ, 20 мг/кг	0,273±0,026	3,15±0,66
ДНПГ, 50 мг/кг	0,166±0,045*	1,73±0,211***

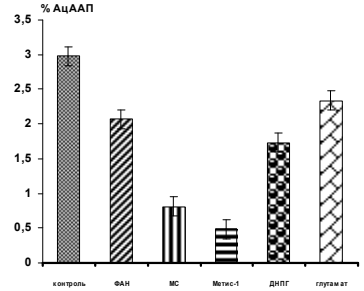


Рис.1. Выведение АцААП (% от введенного амидопирина) с мочой у крыс при воздействии различных препаратов.

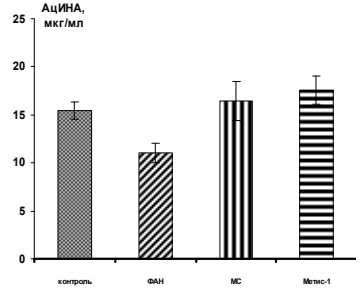


Рис.2. Выведение ацетилированного изониазида (АцИНА) из организма крыс при воздействии различных препаратов.

Сначала мы вводили крысам опытных групп испытуемые вещества, затем крысам всех групп, включая контрольную группу, вводили раствор ИНА в/ж в дозе 10мг/кг. Определяли общее количество суточной мочи крыс и процентное содержание АцИНА. Данные эксперимента представлены на рис.2. У крыс, отравленных ФАН и получивших нагрузку изониазидом, резко снижается диурез. При введении амидопирина такого снижения диуреза у крыс, отравленных ФАН, не наблюдалось. Незначительное, но достоверное снижение выведения АцИНА примерно на 20% выявлено только в группе с интоксикацией ФАН. Но это объясняется не ингибированием ацетилирования при участии фторацетил-КоА, а снижением общего обмена. По представленным данным эксперимента с нагрузкой изониазидом видно, что МС существенно не влияет на ацетилирование в отличие от опытов с амидопирином. Таким образом, можно полагать, что снижение ацетилирования амидопирина связано с вмешательством МС в оксидазную реакцию преобразования амидопирина в 4-аминоантипирин. Уменьшение абсолютного количества выведенного изониазида и его метаболита обусловлено снижением количества выделенной мочи. По-видимому, изониазид действует синергично с ФАН на диурез.

Изучение ацетилирования при интоксикации ФАН подтвердило данные о том, что фторацетил-КоА взаимодействует не только с митохондриальным оксалоацетатом, но может участвовать и в других ферментативных процессах ацетилирования при детоксикации чужеродных соединений и при образовании естественных продуктов обмена [13,14]. Остается открытым вопрос о возможной модуляции зависимых от ацетилирования внутриклеточных сигнальных процессов посредством фторацетил-КоА. В то же время, использование двух разных субстратов, амидопирина и изониазида, свидетельствует о взаимодействии МС и МС-содержащего комплекса МЕТИС с монооксигеназами и другими NADPH-зависимыми ферментами, что, в свою очередь, указывает на переориентацию метаболических путей такими искусственными акцепторами электронов как МС. Степень усиления и баланс различных путей биологического окисления требует отдельного изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yang X.J.* //Oncogene (2005) 24(10):1653-62;
2. *Vetting M.W. et al.* //Arch. Biochem. Biophys. (2005); 433(1): 212-26;
3. *Glozak M.A. et al.* //Gene (2005) 363: 15-23;
4. *Yang X.J., Seto E.* //Mol. Cell. (2008) 31(4): 449-61;
5. *Sadoul K. et al.* //Biochimie (2008) 90(2): 306-12;
6. *Marshall E.K. et al.* //Science (1937) 85(2199): 202-3;

7. *Stokinger H.E.* //Bull NY Acad. Med. (1939) 15(4): 252-7;
8. *Яковлева О.А. и др.* //Укр. хіміотер. журнал (2000) 1: 63-70;
9. *Siegert M. et al.* //Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. (1964) 247: 509-21;
10. *Eidus L., Hamilton E.J.* //Am. Rev. Respir. Dis. (1964) 89: 587-8;
11. *Fanshier D.W. et al.* //J. Biol. Chem. (1964) 239(2): 425-34;
12. *Petry Jr.W.* //Goodman&Gilman The pharm. basis of therapeutics. McGraw-Hill (11^{th}) (2006): 1203-23;
13. *Marcus A., Elliott W.B.* //J. Biol. Chem. (1956) 218(2): 823-30;
14. *Powell G.L., Beevers H.* //Biochim. Biophys. Acta. (1968) 151(3): 708-10.

МЕХАНИЗМЫ БЛОКАДЫ ПРОТОН-АКТИВИРУЕМЫХ КАНАЛОВ АМИЛОРИДОМ И БЕНЗАМИЛОМ

Воробьев В.С., Шаронова И.Н., Колбаев С.Н.

Научный центр неврологии РАМН, Отдел исследований мозга, Москва

Протон-активируемые ионные каналы (acid-sensing ion channels – ASICs) представляют собой активируемые протонами нечувствительные к потенциалу катион-селективные каналы, экспрессирующиеся как в центральной, так и периферической нервной системе. В ЦНС ASICs участвуют в процессах синаптической пластичности, обучении и памяти, а также в развитии тревожных состояний [13]. Проницаемые для кальция протон-активируемые каналы играют важную роль в повреждении и гибели нейронов, развивающихся при ишемии мозга и других формах патологии, сопровождающихся ацидозом и не связанных с глутаматной токсичностью [16,17], что делает эти каналы новой терапевтической мишенью для защиты нейронов от повреждений, развивающихся при этих патологических процессах.

Наиболее известным блокатором ASIC является амилорид, блокирующий все каналы, входящие в суперсемейство дегенерин/эпителиальных Na каналов (ENaC) [1]. Амилорид обратимо блокирует протон-активируемые токи с IC_{50} 10-50мкМ [11,16]. Показано, что амилорид связывается в области наружного вестибюля ENaC [4,5]. На основании заметной степени гомологии между ENaC и ASICs [8] полагают, что амилорид блокирует ASIC токи путем прямой блокады канала, и что область канала перед TM II является критической для развития этого эффекта [7]. Мутация Gly-430 в этой области драматически повышает чувствительность токов ASIC2a к амилориду [2]. Однако свойства ENaC и ASICs в значительной степени разнятся. Эти каналы различаются и по способам активации, и по ионной

селективности, что дает основание предполагать, что они могут отличаться и по чувствительности к блокаторам. Вместе с тем, прямых исследований механизмов блокирующего действия амилорида на протон-активируемые токи нам не известно. Блокатором ASIC является также производное амилорида бензамил, однако имеется лишь единичные исследования, в которых была показана блокада ASIC бензамилом [11]. Задача настоящего исследования состояла в выявлении чувствительности протон-активируемых токов к амилориду и бензамилу и исследовании механизмов их блокирующего действия.

Опыты проводили на изолированных нейронах, выделенных из срезов мозжечка молодых (14-20 дней) крыс с помощью метода вибродиссоциации без предварительной энзиматической обработки [9]. Срезы мозга инкубировали при комнатной температуре в физиологическом растворе следующего состава (мМ): 124 NaCl, 3 KCl, 2 $CaCl_2$, 1.6 $MgCl_2$, 1.28 NaH_2 PO_4, 26 $NaHCO_3$, 14 глюкоза. Раствор насыщали карбогеном (95% O_2, 5% CO_2). Выделение клеток и регистрацию их активности производили в растворе следующего состава (мМ): 145 NaCl, 3 KCl, 2.4 $CaCl_2$, 1.8 $MgCl_2$, 10 HEPES. Микропипетки, изготовленные из боросиликатного стекла, заполняли раствором следующего состава (мМ): 100 CsCl, 30 CsF, 3 $MgCl_2$, 2 Na_2АТФ, 5 ЭГТА, 10 HEPES-Na. Использовали микропипетки, имеющие сопротивление 2-3МОм. Эксперименты проводили при комнатной температуре (20-23^{o}C). Токи, активируемые H^+, регистрировали с помощью пэтч-кламп метода в конфигурации «целая клетка». Для подведения веществ использовали систему для быстрой аппликации, описанную ранее [10]. Скорость замены раствора у регистрируемого нейрона составляла около 20мс.

Концентрационная зависимость для токов, активируемых протонами, описывалась логистическим уравнением: $A=1/(1+(pH_{0.5}/[H^+])^n)$, где $A=I_A/I_{A(pH\ 5)}$ – относительный ответ, вызываемый H^+; $pH_{0.5}$ – концентрация H^+, вызывавшая полумаксимальный ответ; n – коэффициент Хилла. Для количественной оценки модулирующего влияния блокаторов на токи, активируемые постоянной концентрацией протонов, использовали следующее уравнение: $B=1/(1+([Bloker]/IC^{Bl}_{50})^n)$, где $B=I_{pH+Bl}/I_{pH}$ – величина блокады протон-активируемых токов под действием блокаторов, нормированная к амплитуде тока, вызывавшегося в отсутствие блокатора, IC^{Bl}_{50} – концентрация блокатора, вызывавшая полумаксимальный эффект, n – коэффициент Хилла. Количественные данные представлены в виде среднего±стандартные ошибки среднего.

Во всех исследовавшихся нейронах (в работе представлены данные, полученные при регистрации активности 30 нейронов) быстрое закисление среды от нейтрального значения 7.5 до 7.0 и ниже (концентрация протонов, соответственно, выше) при поддерживаемом

потенциале – 70мВ вызывала входящий ток, амплитуда которого возрастала при увеличении концентрации водородных ионов. Концентрация водородных ионов, вызывавшая полумаксимальный ответ ($pH_{0.5}$) составляла 6.32±0.05, коэффициент Хилла 1.27±0.19 (n=7) при использовании растворов в диапазоне pH от 7.5 до 5.0 и концентрации наружного кальция 2.4мМ. Протон-активируемые токи десенситизировали ходе аппликации, и скорость десенситизации возрастала при уменьшении величины pH. Спад тока при $pH_{0.5}$ происходил с постоянной времени от 1.1 до 1.7с.

Количественную оценку эффектов амилорида и бензамила проводили при активации ASIC растворами с pH 6.5, что близко к величине $pH_{0.5}$. При совместной аппликации кислого раствора и блокатора полублокирующие концентрации (IC_{50}), определенные для пика ответа, составили 13.06±0.78 и 2.56±0.56мкМ для амилорида и бензамила соответственно, коэффициент Хилла – 1.00±0.06 и 0.83±0.06 соответственно (n=3-6). Величина блокады ASIC-тока возрастала в ходе аппликации, что, по-видимому, связано с взаимодействием блокатора с открытым ионным каналом, поэтому оценивали также величину подавления ответа при аппликации блокатора через 1с после начала активации рецептора. При аппликации амилорида и бензамила на фоне активации ASIC блок развивался быстро, а величины IC_{50} составили 4.8±0.03 и 1.1±0.07мкМ для амилорида и бензамила соответственно, коэффициент Хилла – 0.77±0.03 и 0.84±0.03 соответственно (n=5-6) (рис.1).

Для выявления механизмов блокады ASIC-токов амилоридом и бензамилом исследовали зависимость блокады от мембранного потенциала. Обнаружено, что при изменении величины поддерживаемого потенциала от -90 до +60мВ степень блокады, вызываемой обоими блокаторами, ослаблялась при деполяризации мембраны нейрона (рис.2, 3 А, Б).

Ослабление блокирующего действия амилорида и бензамила при деполяризации мембраны указывает на то, что механизмом блокирующего действия этих препаратов является блокада открытого ионного канала. Простейшей моделью, позволяющей на основании потенциалочувствительности блока оценить глубину залегания блокирующей частицы в поре канала, является модель Woodhull [15]. Согласно этой модели, зависимость блокады от потенциала может быть аппроксимирована уравнением:

R= K(0)*exp(δ*E/25.68)/(K(0)*exp(δ*E/25.68)+[blocker]).

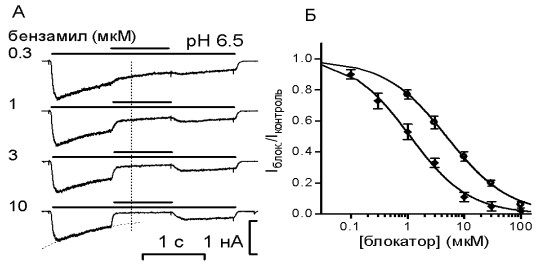


Рис.1. Зависимость блока протон-активируемых каналов, вызываемого амилоридом и бензамилом, от концентрации блокатора. А–записи токов, иллюстрирующие блокаду токов под действием разных концентраций бензамила. Б–графики зависимости величины блока от концентрации амилорида (○) и бензамила (♦).

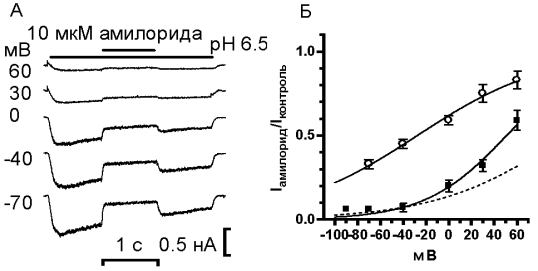


Рис.2. Зависимость блока протон-активируемых каналов амилоридом от поддерживаемого потенциала. А–примеры блока, вызываемого 10мкМ амилорида при разных потенциалах. Б–графики зависимости блока от потенциала при концентрациях амилорида 10 (○) и 100 (□) мкМ. Пунктирной линией показана теоретическая кривая для блока, вызываемого 100мкМ амилорида при условии той же глубины залегания блока, что и при концентрации 10мкМ.

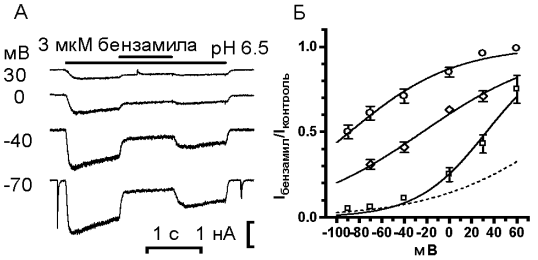


Рис.3. Зависимость блока протон-активируемых каналов бензамилом от поддерживаемого потенциала. А–примеры блока, вызываемого 3мкМ бензамила при разных потенциалах. Б–графики зависимости блока от потенциала при концентрации бензамила 1 (○), 3 (◊) и 10 (□) мкМ. Пунктирной линией показана теоретическая кривая для блока, вызываемого 30мкМ бензамила при условии той же глубины залегания блока, что и при концентрациях 1 и 3мкМ.

Величина K(0) отражает концентрацию, необходимую для развития половины от максимального блокирующего эффекта блокатора при поддерживаемом потенциале 0мВ. Величина δ отражает долю поля, пересекаемого блокирующей частицей, для достижения ее участка связывания. Поскольку амилорид является моновалентным катионом при низких pH(pKa=8.7), величина δ должна отражать долю мембранного поля, пересекаемого одной молекула амилорида для связывается с сайтом внутри канала.

Нами был проведен анализ зависимости блока от потенциала при нескольких концентрациях блокатора. На графиках рис.2Б показана зависимость величины блока от потенциала для концентраций амилорида 10 и 100мкМ. Значения параметров K(0) и δ для 10мкМ амилорида составили 16±0.27мкМ и 0.44±0.01 соответственно (n=6). Однако при анализе потенциал-зависимости блока, вызывавшегося 100мкМ амилорида, величины K(0) и δ составили 24±0.15мкМ и 0.71±0.04, соответственно (n=5). На рис.2Б пунктирной линией показана теоретическая кривая зависимости блока, вызываемого 100мкМ амилорида при условии, что место связывания блокатора находится на той же глубине, что и при действии 10мкМ блокатора.

Сходный анализ потенциалозависимости блока от потенциала был поведен для трех концентраций бензамила – 1, 3 и 30мкМ (рис.3). Для блока, вызываемого 1мкМ бензамила, величины K(0) и δ составили 6.4±0.49мкМ 0.49±0.02, соответственно. Для 3мкМ бензамила величина K(0) была равна 0.45±0.01мкМ, δ=0.45±0.01, для 30мкМ бензамила – K(0)=10±0.58мкМ, δ=0.83±0.04.

Проведенный анализ показывает, что блок ASIC-каналов амилоридом и бензамилом не укладывается в простую модель канального блока, предложенную Wodhooll. Если при концентрациях блокатора, близких к IC_{50}, степень потенциалочувствитель-ности блока указывает на то, что место взаимодействия обоих блокаторов расположено на глубине, соответствующей 0.4 трансмембранного электрического поля, то для более высоких концентраций блокатора этот анализ указывает на значительно большую глубину расположения блокирующей частицы в канальной поре (~0.8). Расхождение величин δ, полученных при разных концентрациях блокатора, позволяет предположить, что потенциалозависимость блока, вызываемого амилоридом и бензамилом, определяется не только локализацией места связывания блокатора в канальной поре, но и какими-то дополнительными факторами. Одним из таких факторов может быть взаимодействие блокатора с проникающими ионами [6] или с ионами Ca^{2+} [7]. Другим фактором, влияющим на потенциалочувствительность блока, может быть потенциалозависимое связывание блокатора, вызывающее конформационные изменения канала [6]. Можно также предположить наличие второго места связывания

блокатора. Выбор между этими возможностями требует дальнейших исследований.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о том, что нативные протон-активируемые каналы, экспрессирующиеся в клетках Пуркинье мозжечка, блокируются амилором и бензамилом по механизму блока открытого канала. При этом их чувствительность к бензамилу примерно в 5 раз выше, чем к амилориду. Выявлена потенциалочувствительность блока, усиливающаяся при возрастании концентрации блокатора.

В последние годы появились данные, свидетельствующие об участии ASICs в ряде патологических процессов в ЦНС, включая ишемию и некоторые нейродегенративные заболевания [3,14,16], что позволяет рассматривать блокаторы ASICs в качестве перспективных терапевтических агентов для предотвращения гибели нейронов, вызываемой этими патологическими процессами. В этой связи выявление механизмов фармакологической блокады протон-активируемых каналов может быть использовано для поиска эффективных способов защиты мозговой ткани от повреждений нейронов, вызываемых ацидозом, и способствует разработке новых лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №08-04-00978, №09-04-00470) и гранта НШ-1150.2008.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Canessa C.M., Merillat A.M., Rossier B.C.* //Am. J. Physiol. (1994) 267(1): 1682-90;
2. *Champigny G. et al.* //J. Biol. Chem. (1998) 273(25): 15418-22;
3. *Friese M.A. et al.* //Nat. Med. (2007) 13(12): 1483-9;
4. *Kellenberger S., Gautschi I., Schild L.* //Mol. Pharm. (2003) 64(4): 848-56;
5. *Kellenberger S., Schild L.* //Physiol Rev. (2002) 82(3):735-67;
6. *Lane J.W., McBride D.W., Hamill O.P.* //Br. J. Pharm. (1993) 108(1): 116-9;
7. *Paukert M. et al.* //J. Gen. Physiol. (2004) 124(4): 383-94;
8. *Schild L. et al.* //J. Gen. Physiol. (1997) 109(1): 15-26;
9. *Vorobjev V.S.* //J. Neurosci. Methods (1991) 38(2-3): 145-50;
10. *Vorobjev V.S., Sharonova, I.N., Haas H.L.* //J. Neurosci. Methods (1996) 68(2): 303-7;
11. *Waldmann R. et al.* //J. Biol. Chem. (1996) 271(18): 10433-6;
12. *Wemmie J.A. et al.* //Neuron (2002) 34(3): 463-77;
13. *Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J.* //Tr. Neurosci. (2006) 29(10): 578-86;
14. *Wong H.K. et al.* //Hum. Mol. Genet. (2008) 17(20): 3223-35;
15. *Woodhull A.M.* //J. Gen. Physiol. (1973) 61(6):687-708;
16. *Xiong Z.G. et al.* //Cell (2004) 118(6): 687-98;
17. *Yermolaieva O. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101(17): 6752-7.

ПОЛИПЕПТИДНЫЕ АНТАГОНИСТЫ НИКОТИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ И Ca^{2+}-КАНАЛОВ ИЗ ЯДОВ ЗМЕЙ СЕМЕЙСТВА *VIPERIDAE*

Вульфиус Е.А.[1], Горбачева Е.В.[1], Филина Ю.В.[1,2], Старков В.Г.[3], Цетлин В.И.[3], Уткин Ю.Н.[3]

[1]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[2]Казанский государственный университет, Казань
[3]Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва

Никотиновые холинорецепторы (нХР) опосредуют быструю синаптическую передачу в скелетных мышцах, автономных ганглиях и некоторых отделах мозга позвоночных, участвуют в регуляции секреции нейротрансмиттеров в центральной и периферической нервной системе, формировании нейронных цепей, играют важную роль в пластичности синаптической передачи. Рецепторы ацетилхолина (АХ) никотинового типа обнаружены также в ненервных тканях, где они участвуют в пролиферации и, возможно, в регуляции функции клеток. Нарушения экспрессии или функционирования нХР приводят к тяжелым заболеваниям.

нХР имеют пентамерное строение. В настоящее время известны 17 подтипов субъединиц, которые по-разному представлены в разных отделах мозга. Сборка субъединиц одного или нескольких подтипов в пентамер дает функциональные рецепторы с различными фармакологическими свойствами и электрофизиологическими характеристиками. Для исследования свойств нХР разного состава, выяснения подтипа нХР в интересующей области или ткани необходимы активные и избирательные агенты. Богатым источником антагонистов нХР являются яды змей семейства *Elapidae*, содержащие высокоактивные трехпетельные α-нейротоксины: α-бунгаротоксин (αBTx), α-кобратоксин (αCTx) и другие [1-3]. С помощью αBTx был помечен, выделен и подробно исследован нХР электрического органа ската – прототип мышечных нХР. Та же группа α-нейротоксинов имеет высокое сродство к гомоолигомерным (α7, α8 или α9) нХР.

Яды змей других семейств в отношении наличия в них агентов, имеющих сродство к нХР, изучены слабо. Из яда храмовой куфии (семейство *Viperidae*) выделен пептид ваглерин-1, блокирующий нХР скелетной мышцы взрослой мыши [4,5]. В ядовитой железе гремучей змеи *Sistrurus catenatus edwardsii* обнаружены транскрипты, кодирующие белки, сходные по строению с трехпетельными α-нейротоксинами элапид [6,7]. В ядах змей обоих семейств найдены также пептиды, блокирующие

потенциал-активируемые Ca^{2+}-каналы [8-10] и Ca^{2+}-активируемые K^{+}-каналы [11], однако сведений в отношении антагонистов каналов очень мало. Поиск избирательных агентов с новыми свойствами представляется весьма актуальным. В перспективе найденные соединения могут быть использованы как основа для создания новых лекарственных средств.

Мы провели скрининг пептидов, содержащихся в яде 6 видов гадюк (семейство *Viperidae*), по способности подавлять ток при возбуждении нХР или Ca^{2+}-канала. Работа проведена на идентифицированных нейронах из большого (RPV2, RPV3) и малого (LP1-3) париетальных ганглиев прудовика *Lymnaea stagnalis*. Ранее мы показали, что около 80% нХР в этих нейронах сходны по фармакологическому профилю с α7 гомоолигомерными нХР позвоночных и α7-подобными нХР из мозга *Lymnaea*, экспрессированными в ооцитах лягушки [12]: (1) ток, вызванный АХ, можно заблокировать αСТх (IC_{50} 60нМ) [13]; (2) ответ на АХ подавляется специфическим антагонистом α7 и α3β2 нХР α-конотоксином ImI [14]; (3) ответ на АХ нечувствителен к α-конотоксинам, избирательным в отношении нХР мышечного типа, а также α9, α3 и α6 содержащих нХР [14,15]; (4) агонисты нХР: никотин, цитизин и холин способны вызвать ответ, равный максимальному ответу на АХ в насыщающей концентрации, что характерно для α7 нХР, и ответы полностью подавляются α-конотоксином ImI [14]. С другой стороны, при деполяризации нейроны прудовика генерируют входящий ток главным образом через Ca^{2+}-каналы. Как правило, порог активации тока близок к потенциалу покоя (-45мВ), ток характеризуется быстрой инактивацией, несимметричной вольт-амперной характеристикой и может быть заблокирован не больше, чем на 30% антагонистами каналов L-типа нифедипином или каналов N-типа ω-конотоксином GVIA (*Чемерис*, неопуб.; *Горбачева и Вульфиус*, неопуб.). Эти данные согласуются с экспрессией в ганглиях *Lymnaea* нескольких подтипов α1-субъединицы Ca^{2+}-канала, сходных по аминокислотной последовательности с α1-субъединицами L, N, T и P/Q каналов позвоночных [16].

Опыты выполнены на изолированных нейронах с использованием метода фиксации мембранного потенциала в условиях внутриклеточной перфузии. Ca^{2+} в наружном растворе полностью заменяли на хорошо проникающий через Ca^{2+}-каналы Ba^{2+}, чтобы максимально снизить побочное действие ядов на мембрану. Клетки обрабатывали цельным ядом или пептидной фракцией в течение 5-7мин. Эффект оценивали по снижению ответа на АХ или деполяризующие ступеньки потенциала с учетом неполной обратимости блока.

На первом этапе были испытаны цельные яды гадюк *Bitis arietans*, *Vipera renardi*, *V.nikolskii*, гюрзы *V.lebetina*, эфы *Echis multisquamatus* и щитомордника *Gloydius saxatilis*. Для сравнения был испытан цельный яд кобры *Naja kaouthia*, содержащий αСТх в высокой концентрации. Все 7 ядов снижали ответы на АХ и деполяризующий сдвиг потенциала (рис.1А, Б). По способности блокировать нХР яды виперид не сильно отличались друг от друга и были значительно слабее, чем яд кобры. По способности блокировать Ca^{2+}-каналы яд кобры оказался не сильнее, чем яды гадюк.

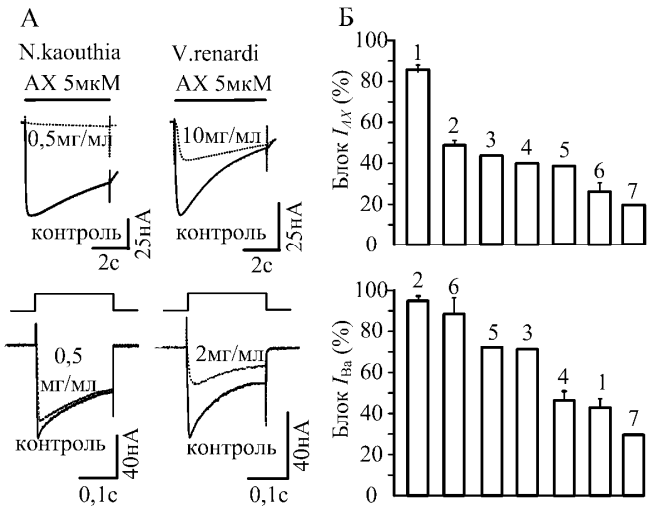


Рис.1. Влияние цельных ядов змей на ток, вызванный АХ или деполяризующим скачком потенциала. А, ответы четырех нейронов на АХ (верхний ряд) и на смещение потенциала от поддерживаемого уровня (-60мВ) до -20мВ в контроле и после 4-7мин обработки раствором яда в концентрациях, указанных около треков тока. Б, относительное уменьшение амплитуды тока, вызванного АХ ($I_{АХ}$, вверху), или Ba^{2+}-тока (I_{Ba}, внизу); 1–*Naja kaouthia*, 2–*Vipera renardi*, 3–*Echis multisquamatus*, 4–*Bitis arietans*, 5-*V. nikolskii*, 6-*V. lebetina*, 7–*Gloydius saxatilis*; каждый столбик–среднее из 2-5 опытов на отдельных нейронах. Концентрации всех ядов, кроме яда кобры, 10мг/мл; яд кобры–0,5мг/мл.

Для дальнейшего исследования были отобраны яды *B.arietans*, *V.renardi*, *V.nikolskii* и *E.multisquamatus*. С помощью гель-фильтрации каждый яд был разделен на 7-11 пептидных фракций пептидов. При их тестировании выявлены фракции с более высокой способностью блокировать обе мишени (одна фракция из яда *B.arietans*, три из яда *V.renardi*, одна из яда *V.nikolskii*, две из яда эфы) или избирательно одну из них (нХР – BaII, EmIV, VnI; Ca^{2+} канал – BaV, VrII, VrVIII, VnIII). В табл.1 представлено относительное снижение тока, вызванного АХ или

скачком потенциала, после обработки нейронов наиболее активными фракциями ядов.

Табл.1. Уменьшение ответов (% к контролю) на АХ или деполяризующий сдвиг потенциала под влиянием наиболее активных полипептидных фракций ядов змей (средние из 2-6 опытов). Порядковый номер фракции каждого яда соответствует уменьшению молекулярной массы.

Ток	*B. arietans* (10мг/мл)[#]			*V. renardi* (5мг/мл)[#]					*E. multisquamatus* (20мг/мл)[#]			*V. nikolskii* (5мг/мл)[#]		
	II	V	VII	II	IV	VII	VIII	IX	I	IV	VIII	I	III	VI
I_{AX}	**58**	42	**84**	35	**68***	**61**	34	**79***	**62**	**58**	**53**	**68**	26	**46**
I_{Ba}	17	**82**	**81**	**90**	**75**	**82**	**57**	**54**	**90**	21	**100**	12	**60**	**68**

[#]Концентрации даны в пересчете на цельный яд, из которого получены фракции.
*Концентрация пептидов 1мг/мл.

Пептидные фракции яда *B.arietans* были подвергнуты хроматографии (BaVII и BaV – обращенно-фазовой, BaII-III – ионообменной). В табл.2 приведены величины относительного уменьшения ответов на АХ или скачок потенциала под влиянием каждой из 10 подфракий BaII-III или 6 подфракций BaV. Видно, что полипептиды из фракций 5 и 6 (мол. масса в диапазоне 25-35кДа) из BaII-III обладают выраженным и относительно избирательным действием на нХР, тогда как пептиды фракции 1 из BaV избирательно ингибируют Ba^{2+}-ток.

Табл.2. Уменьшение (% к контролю) ответов на АХ и деполяризующий сдвиг потенциала под влиянием полипептидных фракций из BaII-III и BaV (средние из 2-6 опытов)

ток	BaII-III (50мг/мл)									
	(2а)	(4)	(5)	(6)	(7)	(9)	(11)	(12)	(13)	(14)
I_{AX}	30	30	**60**	**67**	28	32	14	9	19	18
I_{Ba}	32	24	20	-	33	31	13	14	-	22

	BaV					
ток	(1) 5мг/мл	(2) 5мг/мл	(3) 25мг/мл	(4) 25мг/мл	(5) 25мг/мл	(6) 25мг/мл
I_{AX}	2	22	12	11	15	28
I_{Ba}	**41**	14	10	13	1	15

Зависимость уменьшения ответов 7 нейронов на АХ от концентрации очищенного белка BaII(6-1) (мол. масса 27,4кДа) представлена на рис.4. Относительное сродство к α7-подобным нХР (IC_{50} около 11мкМ) значительно ниже сродства αСТх к тем же рецепторам прудовика (IC_{50} 60нМ) [13] или к α7 нХР позвоночных (0,3-4нМ) [1] и близко к этим величинам для короткого α-нейротоксина NTII (10мкМ и 22мкМ, соответственно). Тем не менее, результат заслуживает

дальнейшего исследования, поскольку это – один из первых примеров пептидного антагониста нХР из яда гадюк.

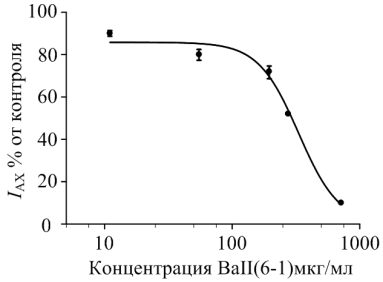


Рис.2. Зависимость уменьшения тока, вызванного АХ, от концентрации очищенного пептида BaII(6-1). Данные 7 опытов на отдельных нейронах.

Таким образом, в ядах 4 видов змей семейства *Viperidae* содержатся пептидные токсины, имеющие сродство к нХР и/или потенциал-активируемым Ca^{2+} каналам. Работа по фракционированию и очистке пептидов продолжается с целью установления аминокислотной последовательности и получения активных и избирательных аналогов исследуемых соединений.

Предварительные результаты опубликованы [17].

Работа поддержана грантами РФФИ №09-04-01061 и №07-04-01004.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Servent D. et al.* //J. Biol. Chem. (1997) 272: 24279-86;
2. *Tsetlin V.* //Eur. J. Biochem. (1999) 264: 281-6;
3. *Tsetlin V.I., Hucho F.* //FEBS Lett. (2004) 557: 9-13;
4. *Schmidt J.J., Weinstein S.A., Schmidt L.A.* //Toxicon. (1992) 30: 1027-36;
5. *McArdle J.J. et al.* //J. Pharmacol. Exp. Ther. (1999) 289: 543-50;
6. *Pahari S., Mackessy S.P., Kini R.M.* //BMC Mol. Biol. (2007) 8: 115;
7. *Doley R. et al.* //BMC Evol. Biol. (2008) 8: 196;
8. *Wang J. et al.* //Biochemistry (2005) 44: 10145-52;
9. *Stotz S.C., Spaetgens R.L., Zamponi G.W.* //J. Memb. Biol. (2000) 174: 157-65;
10. *Wang X., Du L., Peterson B.Z.* //Biochemistry (2007) 46: 7590-7598;
11. *Doorty K.B. et al.* //J. Biol. Chem. (1997) 272: 19925-30;
12. *van Nierop P. et al.* //J. Neurosci. (2005) 25: 10617-26;
13. *Vulfius C.A. et al.* //Neurosci. Lett. (2001) 309: 189-92;
14. *Vulfius C.A. et al.* //Neurosci. Lett. (2005) 373: 232-6;
15. *Горбачева Е.В.* //Канд. дисс. Пущино (2008);
16. *Spafford J.D. et al.* //J. Biol. Chem. (2003) 278: 4258-67;
17. *Горбачева Е.В. et al.* //Биол. Мембраны (2008) 25: 122-7.

СОЧЕТАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АГОНИСТОВ И АНТАГОНИСТОВ ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА *PPARγ* СНИЖАЕТ НЕГАТИВНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ РЕАКТИВНОГО АСТРОГЛИОЗА

Грабеклис С.А.[1], Алёшин С.Е.[1], Райзер Г.[2], Сергеева М.Г.[1]

[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[2]Институт нейробиохимии Отто-фон-Гурике Университет, Магдебург

Введение. В последние годы все большее значение приобретает экспериментальное моделирование внутриклеточных процессов, регулирующих клеточные функции на уровне факторов транскрипции. Объектом данного исследования является семейство транскрипционных факторов PPAR, ядерных рецепторов, играющих ключевую роль в развитии широкого спектра клеточных ответов, таких как метаболизм жирных кислот, регуляция пролиферации и дифференцировки клеток, развитие клеточных ответов на действие провоспалительных стимулов [1]. В качестве модели для изучения PPAR нами были выбраны астроциты, глиальные клетки мозга, активно участвующие в развитии иммунного и воспалительного ответов в ЦНС. Любые повреждения головного мозга ведут к развитию так называемого реактивного астроглиоза, процесса, при котором наблюдается резкое усиление метаболической и пролиферативной активности астроцитов [2]. Реактивный астроглиоз оказывает как защитное влияние на ткань головного мозга (формирование защитных глиальных структур, активное влияние в восстановлении гематоэнцефалического барьера, генерация адаптивного воспалительного ответа), так и повреждающее действие (нарушение процесса регенерации нервной ткани, переход воспаления в хроническую стадию, отёк мозга). Регуляция этого процесса является актуальной задачей современной медицины. Две основные составляющие реактивного астроглиоза – это развитие воспалительного процесса и резкое усиление пролиферативной активности астроцитов. В настоящее время активно изучается возможность применения синтетических агонистов ядерного рецептора PPARγ в терапии ряда нейродегенеративных процессов [3]. Показано их антивоспалительное и нейропротективное действие на клетки мозговой ткани. Целью данной работы является исследование возможности модуляции воспалительной и пролиферативной активности астроцитов путём воздействия на транскрипционный фактор PPARγ. Для этого нами использовались комбинации синтетических агонистов рецептора PPARγ (циглитазона и розиглитазона) и его антагониста GW9662.

Результаты и обсуждение

Влияние PPARγ на экспрессию COX-2 в ЛПС-стимулированных астроцитах. Работа проводилась на культуре первичных астроцитов, выделенных из головного мозга новорожденных крыс. В качестве экспериментальной модели для изучения воспалительного процесса в астроцитах мы использовали обработку клеток провоспалительным стимулом ЛПС (липополисахарид клеточной стенки бактерий), который широко используется при моделировании воспалительных процессов.

Нами было проведено исследование влияния синтетического агониста PPARγ розиглитазона на уровень экспрессии индуцибельной формы циклооксигеназы, COX-2, в астроцитах, стимулированных ЛПС в течение 4-х часов. Обработка клеток ЛПС вызывает четырёхкратное усиление экспрессии COX-2, а добавление розиглитазона ведёт к полуторакратному увеличению ЛПС-индуцированной экспрессии COX-2 (рис.1А). При этом сам розиглитазон не оказывает влияния на экспрессию COX-2. Известно, что для некоторых агонистов PPARγ, помимо активации PPARγ, существует альтернативный, PPARγ-независимый механизм действия на клетки [4]. Для выяснения вопроса, является ли механизм действия розиглитазона на ЛПС-стимулированную экспрессию COX-2 PPARγ зависимым, мы применили два экспериментальных подхода. Во-первых, мы ингибировали активацию PPARγ с помощью антагониста PPARγ GW9662, а во-вторых, мы проводили эксперименты с использованием астроцитов с выключенным геном PPARγ. Обработка клеток антагонистом PPARγ GW9662 ведёт к необратимому ингибированию рецептора с полной потерей возможности его связывания с другими лигандами, выключение гена PPARγ приводит к сильному снижению синтеза PPARγ. Эффективность выключения гена продемонстрирована WB анализом, (рис.1Б). Корреляция между количеством мРНК COX-2 и уровнем экспрессии белка показана с помощью WB анализа (рис.1В).

Уровень экспрессии COX-2 как при ингибировании PPARγ, так и при выключении гена PPARγ, был примерно одинаков. Можно отметить, что как ингибирование, так и выключение PPARγ полностью снимало увеличение уровня экспрессии COX-2, вызванное добавлением 20мкМ розиглитазона к ЛПС-стимулированным астроцитам (рис.1А, В). Полученные результаты говорят о том, что действие розиглитазона, оказываемое им на экспрессию COX-2 ЛПС-стимулированных астроцитов, является PPARγ зависимым. Обработка клеток антагонистом PPARγ, а также выключение гена PPARγ, само по себе не влияло на уровень экспрессии COX-2 ЛПС-стимулированными астроцитами. Таким образом, нами было обнаружено два механизма регуляции экспрессии COX-2. Первый – PPARγ независимый механизм участвует в индукции экспрессии COX-2 в ЛПС-стимулированых астроцитах. Через второй,

PPARγ зависимый механизм осуществляется потенцирование экспрессии COX-2 в ЛПС-стимулированных астроцитах, обработанных PPARγ агонистами.

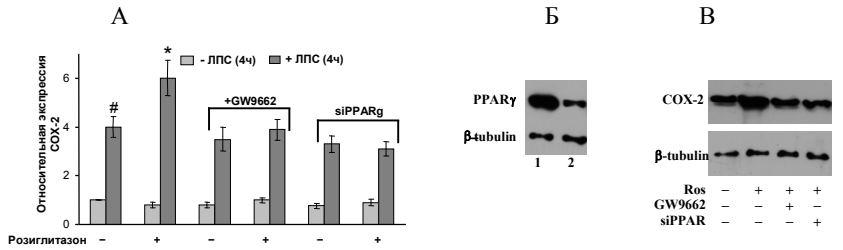


Рис.1. Модулирующее действие, оказываемое розиглитазоном на ЛПС-индуцированную экспрессию COX-2 астроцитами мозга крысы, является PPARγ-зависимым. Клетки были предобработаны в течение 10 минут 1мкМ GW9662 или были трансфецированы PPARγ siRNA. Затем клетки были обработаны розиглитазоном (20мкМ) за 10 минут до добавления ЛПС (100нг/мл). Через 4 часа после добавления ЛПС проводилось измерение мРНК (А) Уровень экспрессии COX-2 оценивался с помощью ПЦР в реальном времени, результат отображается в изменении по отношению к нестимулированным астроцитам. Все данные нормализованы по уровню мРНК GAPDH, данные представлены в виде среднего значения±стандартная ошибка, результаты взяты из трёх разных экспериментов, (*P<0.05). (Б) Эффективность выключения PPARγ оценивалась с помощью WB анализа, колонка 1–контроль, колонка 2–астроциты, трансфицированные PPARγ siRNA. (В) Содержание COX-2 оценивалось с помощью WB анализа, представлены типичные данные для трёх независимых экспериментов.

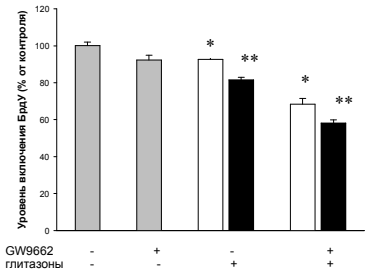


Рис.2. Действие синтетических агонистов и антагонистов ядерных рецепторов PPARγ на пролиферативную активность астроцитов. Астроциты синхронизировали депривацией по сыворотке в течение 48 часов и стимулировали к прохождению клеточного цикла добавлением в среду культивирования 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Клетки были предобработаны в течение 10 минут 1мкМ GW9662, затем клетки были обработаны агонистами PPARγ (20мкМ) одновременно с сывороткой с последующей инкубацией в течение 36 часов, БрдУ добавлялся в последние 12 часов. Белые колонки – циглитазон, чёрные колонки – розиглитазон. Данные представлены в виде среднего значения±стандартная ошибка, результаты взяты из трёх разных экспериментов, (*P<0.005, **P<0.001).

Модуляция воспалительного ответа астроцитов синтетическими агонистами и антагонистами PPARγ. Следующим нашим шагом было изучение влияния PPARγ на пролиферативную активность астроцитов. Клетки стимулировались к вхождению в клеточный цикл добавлением ростовых факторов, пролиферативная активность клеток оценивалась по включению БрдУ в синтезирующуюся ДНК клетки. Полученные результаты демонстрируют, что хотя агонисты (циглитазон и розиглитазон) и антагонисты (GW9662) PPARγ сами по себе не оказывают антипролиферативного действия на активированные астроциты, при их совместном применении наблюдается выраженный потенцирующий эффект ингибирования пролиферативной активности клеток (рис.2).

Таким образом, нами было показано, что PPARγ задействованы как в воспалительном, так и в пролиферативном ответе астроцитов. Более того, модуляция активности PPARγ при использовании пар «агонист-антагонист» может быть перспективным направлением при терапии различных повреждений мозга. Данный подход позволит снизить негативные последствия реактивного астроглиоза.

Работа выполнена при поддержке РФФИ нт №07-04-01160) и RUS 04/004 (Германия).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Keller J.M., Collet P.* //Int. J. Dev. Biol. (2000) 44(5): 429-42;
2. *Laird M.D., Vender J.R., Dhandapani K.M.* //Neurosig. (2008) 16(2-3): 154-64;
3. *Sundararajan S. et al.* //Neurochem. Int. (2006) 49(2): 136-44;
4. *Luna-Medina R., Cortes-Canteli M.* //JBC (2005) 280(22): 21453-62.

СМЕШАННЫЙ ТИП ДЕЙСТВИЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА АГРЕГАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ КРЫС

Добрылко И.А.[1], Гарнюк В.В.[3], Гончаров Н.В.[3], Петрищев Н.Н.[2], Кривченко А.И.[1], Миндукшев И.В.[1,4]

[1]ИЭФБ им.И.М.Сеченова РАН, СПб
[2]Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
[3]НИИ гигиены профпатологии и экологии человека МЗ РФ, СПб
[4]НПФ «Люмэкс», СПб

Диметилсульфоксид (ДМСО) – малотоксичное вещество. Величина среднелетальной дозы $ЛД_{50}$ для различных видов животных

при приеме с пищей лежит в пределах от 2 до 12г ДМСО на 1кг живого веса [1]. Широко исследованы его фармакологические свойства. Было установлено, что ДМСО легко проникает через биологические мембраны, обладает противовоспалительным, антимикробным и противогрибковым действием [2,6]. ДМСО применяется в качестве местного анальгетика при острых травматических заболеваниях, при острой невралгии [9]. Диметилсульфоксид входит в состав сред для криоконсервации крови и тканей [3]. Диметилсульфоксид используется качестве средства, модулирующего действие других лекарств, применяемых в медицинской практике [4]. Опубликованы данные о влиянии ДМСО на микроциркуляцию [5]. Сообщалось, что ДМСО при действии на тромбоциты обладает антиагрегантыми свойствами [10,11], но исследований механизма его действия не проводилось. Нами создана тромбоцитарная модель скрининга новых лекарственных препаратов для выявления клеточного механизма действия [7,8]. В данной работе этот новый подход был применен для исследования действия ДМСО на агрегацию тромбоцитов.

Материалы и методы. Объектом исследования *in vitro* служили тромбоциты крыс самцов линии Вистар. Забор крови у крыс, предварительно наркотизированных уретаном в дозе 1,2г/кг, осуществляли из сонной артерии. В качестве антикоагулянта использовали 3,2% раствор цитрата натрия (pH 6,0) в соотношении 9:1. Цитратную обогащенную тромбоцитами плазму (PRP) получали центрифугированием крови в течение 7мин при 190g. Функциональную активность тромбоцитов исследовали методом малоуглового светорассеяния на лазерном анализаторе размеров частиц «ЛАСКА-1К» (НПФ «ЛЮМЭКС» СПб) [7,8].

Результаты и обсуждение. Исследование влияния раствора ДМСО на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* проводилось при дозах АДФ от 80 до1000нМ (5-8 доз АДФ). Каждая проба, содержащая PRP, предварительно инкубировалась с ДМСО в течение 3 минут. Затем, исследовалась АДФ-индуцированная агрегация в опыте и контроле. Было проведено тестирование для пяти различных по объёму – 5, 10, 20, 100, 200мкл – доз раствора ДМСО, что соответствовало концентрации его в кювете 0,1, 0,2, 0,4, 2, 4об.%.

В таблице 1 приведены полученные данные для величин в EC_{50} (концентрация вещества, необходимая для достижения половины максимального эффекта) и U_{max} (максимальная скорость агрегации при насыщающей дозе вещества) в контроле и опыте по действию раствора ДМСО в разных дозах. При тестировании проб достоверное отличие от контроля было получено для обоих параметров агрегации (EC_{50} и U_{max}). Было зафиксировано отчетливое (от 2,5 до 1,5 раз) уменьшение величины EC_{50} по отношению к контролю. Значения U_{max} во всех пробах достоверно ниже контроля.

Табл.1. Значение кинетических параметров агрегации тромбоцитов крысы (EC_{50} – АДФ, нМ, U_{max} – у.е.).

		Объемная концентрация ДМСО				
	контроль	0,1об.%	0,2об.%	0,4об.%	2об.%	4об.%
Кол-во крыс	(n=6)	(n=6)	(n=5)	(n=6)	(n=4)	(n=5)
EC_{50}	214 ± 21	82±19	116±22	180±18	351±17	409±21
U_{max}	500±15	307±9	321±12	345±16	388±14	417±19
EC_{50}/U_{max}	0.43	0.27	0.36	0.52	0.90	0.98

Таким образом, диметилсульфоксид изменяет оба параметра агрегации, с одной стороны, увеличивая чувствительность действия АДФ (уменьшая EC_{50}), а с другой стороны, снижает максимальную скорость агрегации. Для понимания такого противоречивого характера действия ДМСО на агрегацию тромбоцитов были сделаны расчеты начальных скоростей агрегации по экспериментально полученным значениям EC_{50} и U_{max} (табл.1). Эти расчетные данные представлены в двойных прямых и обратных координатах (рис.1,2).

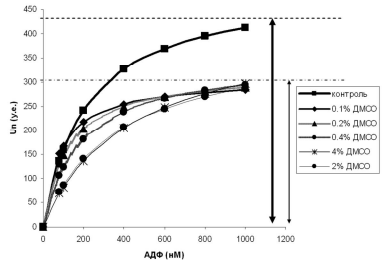


Рис.1. Зависимость нормированной начальной скорости агрегации тромбоцитов (Un) от концентрации АДФ (контроль-опыт раствор ДМСО).

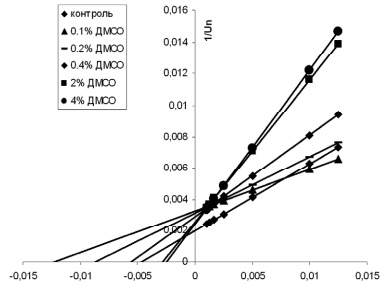


Рис.2. Зависимость нормированной начальной скорости агрегации тромбоцитов (U_n) от концентрации АДФ (контроль-опыт раствор ДМСО) в обратных координатах.

На графике, представленном в обратных координатах (рис.2), прямые зависимостей при действии ДМСО пересекаются в одной точке. Причем характер действия сохраняется во всем исследованном диапазоне концентраций ДМСО - все прямые пересекаются в одной точке. Т.к. эта точка пересечения находится вне обеих осей координат, то можно сделать заключение о **смешанном типе действия** диметилсульфоксида на агрегацию тромбоцитов крысы. Т.е. ДМСО, подавляя максимально

возможную скорость агрегации, тем не менее, увеличивает скорость агрегации при действии малых доз АДФ.

Для того чтобы оценить константу ингибирования при смешанном типе действия ДМСО на агрегацию, рассматривается зависимость тангенса угла наклона (для каждой прямой) от концентрации ДМСО. На рис.3а представлена эта зависимость, видно, что данная зависимость носит насыщающий характер Ленгмюровского типа. Для графического определения константы ингибирования IC_{50} строится зависимость в обратных координатах (рис.3б). Величина IC_{50}=0,28об%. Данная величина показывает, что половинный эффект действия ДМСО на агрегацию достигается при концентрации вещества около 0,3об.%. Эта величина значительно меньше, чем используемая при криопротекции доза 2-6% [3]. При тестировании веществ, растворы которых приготовлены с использованием ДМСО, необходимо учитывать величину IC_{50}, – для исключения влияния самого диметисульфоксида на результаты тестирования, его конечная концентрация должна быть значительно ниже этой величины.

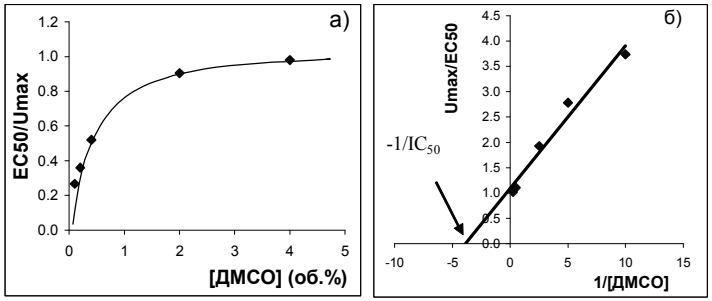


Рис.3. Зависимость EC_{50}/U_{max} от концентрации ДМСО в прямых (а) и обратных координатах (б).

На графике (рис.2) видно, что данная точка пересечения расположена ближе к оси ординат, что позволяет говорить о преимущественном неполном неконкурентном ингибировании агрегации тромбоцитов. Действительно, из графика на рис.1 видно, что максимально возможная скорость агрегации при действии раствора ДМСО почти в полтора раза ниже, чем в контроле (графически показано стрелками). ДМСО самостоятельно не вызывает активацию и агрегацию тромбоцитов, но ингибирует агрегацию при больших дозах АДФ. По-видимому, ДМСО преимущественно подавляет агрегацию за счет угнетения экспрессии (сборки) интегриновых рецепторов, но при этом имеет и другую точку приложения в своем действии на тромбоциты, ускоряя их активацию. Механизм развития такой резистентности связан, скорее всего, с повышением уровня цАМФ, что, в свою очередь, приводит к угнетению функциональной активности тромбоцитов [12]. Вероятно, столь сложный эффект действия диметилсульфоксида, как мембранотропного вещества, объясняется его прямым взаимодействием с G-белками и влиянием на активность аденилатциклазы и фосфолипазы С. Именно через эти белки осуществляется запуск в тромбоцитах двух сигнальных систем противоположной направленности (цАМФ и Ca^{2+}) [11]. Полученные данные позволяют сделать выводы о том, что один из механизмов влияния ДМСО на микроциркуляцию связан с его влиянием на тромбоциты.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кукукшкин Ю.Н.* //СОЖ. Химия (1997);
2. *Basch H., Gadebusch H.H.* //Appl. Microbiol. (1968) 16: 1953-4;
3. *Currie L.M. et al.* //Transfusion (1998) 38(2): 160-7;
4. *Haigler H.J. Ann N.Y.* //Acad. Sci. (1983) 411: 19-27;
5. *Lindenblatt N. et al.* //Thromb. Haemost. (2003) 90(5): 882-92;
6. *Male O.* //Arch. Klin. Exp. Dermatol. (1968) 223: 63-76;
7. *Mindukshev I.V. et al.* //Spectroscopy (2005) 19: 235-46;
8. *Mindukshev I.V. et al.* //Spectroscopy (2005) 19: 247-57;
9. *Sams, W.M., Ann N.Y.* //Acad. Sci. (1967) 141: 242-7;
10. *Schiffer C.A. et al.* //Thromb. Haemost. (1976) 36: 221-9;
11. *Scrutton M.C.* //New York (1993): 1-15;
12. *Tang W.J., Gilman A.G.* //Cell (1992) 70(6): 869-72.

ДЕЙСТВИЕ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МИОБЛАСТОВ КРЫСЫ L6J1

Ермакова И.И.[1], Сакута Г.А.[1], Петров Ю.П.[1], Морозов В.И.[1,2]

[1]Институт цитологии РАН, СПб
[2]Санкт-Петербургский НИИ физической культуры

Введение. Одной из фундаментальных задач клеточной биологии является изучение механизмов взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ), основными элементами которого являются фибриллярные белки и аморфное вещество – протеогликаны (ПГ) и гликозаминогликаны (ГАГ) [1]. Связывание компонентов ВКМ с клеточными рецепторами может привести к запуску различных сигнальных каскадов, регулирующих пролиферацию и выживание клеток или вызывающих их гибель [2,3]. Другой путь регуляции поведения клеток при участии ВКМ состоит в модуляции активности различных

факторов роста, с которыми компоненты ВКМ, преимущественно ПГ, способны взаимодействовать, стимулируя или ингибируя проведение сигналов этих факторов [4,5]. Среди ПГ лучше всего изучены регуляторные функции гепарансульфат ПГ [6-8], обладающих способностью взаимодействовать с широким спектром факторов роста [4]. О регуляторной роли других классов ПГ известно меньше. Как правило, факторы роста связывают полисахаридные цепи ПГ – ГАГ, определяющие принадлежность ПГ к тому или иному классу. Большой интерес вызывает участие ПГ в регуляции миогенеза, важными этапами которого являются пролиферация и дифференцировка миобластов [9]. Цель настоящей работы состояла в изучении влияния ГАГ разных классов на пролиферацию миобластов крысы L6J1 в присутствии фактора роста фибробластов (bFGF), а также на дифференцировку этих клеток.

Методы

Изучение влияния ГАГ в комбинации с bFGF на пролиферацию миобластов. В опытах использовали ГАГ, присущие мышечной ткани – хондроитинсульфат и дерматансульфат, а также гепарин, который не входит в состав ПГ, но структурно и функционально очень близок гепарансульфату ткани, в связи с чем гепарин часто используют в экспериментах в качестве его аналога [10,11]. Фактор роста фибробластов был выбран для проведения экспериментов как один из важнейших регуляторов пролиферативной активности миобластов [9].

В ячейки 24-луночного планшета высевали по 2×10^4 миобластов L6J1 в 1мл среды DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС). Через 1 сутки полную среду убирали, клетки промывали DMEM без ЭБС и оставляли в этой же среде на 12ч. Затем среду заменяли на такую же неполную среду, содержащую 100нг/мл ГАГ, 20нг/мл ростового фактора bFGF и 3мкКи/мл [^{3}H]-тимидина. Через 18ч или 24ч среду убирали, клетки промывали PBS и снимали PBS, содержащим смесь трипсина и версена. Радиоактивность клеточной суспензии подсчитывали на жидкостно-сцинтилляционном счетчике LS 6500 («Beckman», Австрия) в сцинтилляционном коктейле на основе диоксана. Концентрация ГАГ была выбрана на основе данных, приведенных в литературе [11]; концентрация фактора, метки и продолжительность инкубации клеток с меткой и фактором были оптимизированы нами в ходе эксперимента.

Изучение влияния ГАГ на дифференцировку миобластов. В ячейки 24-луночного планшета высевали по 10^5 миобластов в 1мл полной среды. Через 2 суток инициировали дифференцировку миобластов [12,13], полную среду заменяя средой, содержащей 0.5% ЭБС и различные ГАГ (гепарин, хондроитинсульфат, дерматансульфат) в концентрации 1мкг/мл. Среду с соответствующими добавками ежедневно меняли. На 6-е и 10-е сутки дифференцировки клетки фотографировали и далее фотографии клеток анализировали с помощью программы ImageJ, разработанной Национальным институтом здоровья (США) для выполнения биологических задач. Полученные данные обрабатывали в программе Microsoft Office Excel. К параметрам клетки – площадь (A – area) и периметр (P – perimeter), измеренным программой ImageJ, добавляли еще один – коэффициент вытянутости клетки (R_p/R_a), рассчитанный по формуле: $R_p / R_a = P / 2\sqrt{\pi A}$ (R_p/R_a=1 – круглая клетка; R_p/R_a=∞ – бесконечно вытянутая клетка). В качестве показателей дифференцировки рассчитывали: 1) количество миотуб относительно количества всех клеток – $n_{миотуб} /(n_{миобластов} + n_{миотуб}) \times 100\%$; 2) среднюю площадь клетки – $\sum A / n$; 3) среднюю вытянутость клетки – $\sum \left(R_p / R_a \right) / n$, где n – количество клеток (миобластов или миотуб).

Результаты и обсуждение. Оценка действия ГАГ как модуляторов активности bFGF приведена на рис.1. Добавление в инкубационную среду, наряду с bFGF, различных ГАГ модулирует действие фактора. Гепарин к 24ч вызвал достоверное увеличение включения метки. Дерматансульфат наиболее эффективно стимулировал действие bFGF – к 24ч прирост включения метки в присутствии дерматансульфата составил 20% по отношению к действию самого фактора. Напротив, добавление хондроитинсульфата привело даже к некоторому снижению действия bFGF. Полученные данные указывают на разнонаправленное действие различных ГАГ в комбинации с bFGF на ростовую активность миобластов. При этом гепарин и дерматансульфат усиливают действие ростового фактора, тогда как в присутствии хондроитинсульфата интенсивность пролиферации миобластов снижается.

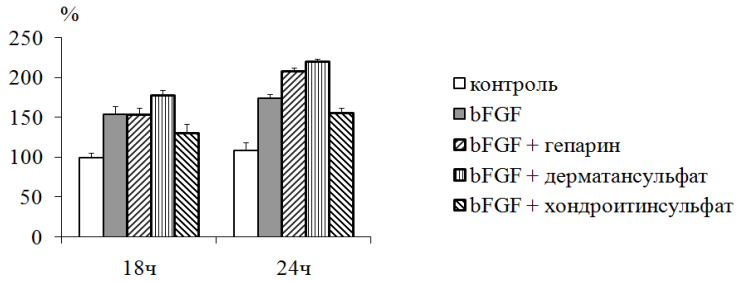


Рис.1. Действие bFGF и гликозаминогликанов на пролиферацию миобластов L6J1. N=3; приведены средние ±SD; *t*-тест; *-p<0.05.

Опыты по дифференцировке миобластов показали, что процесс слияния миобластов с образованием многоядерных миотуб (показатель дифференцировки), происходит в присутствии любой из добавок (рис.2).

Анализ фотографий с помощью программы ImageJ позволил провести количественную оценку полученных данных. По результатам этого анализа все клетки были условно разделены на миобласты и миотубы в соответствии со степенью вытянутости. Это позволило вычислить раздельно средние значения площади и вытянутости для популяции миобластов и миотуб, а также сравнить число миотуб с миобластами, не включенными в процессы миогенеза.

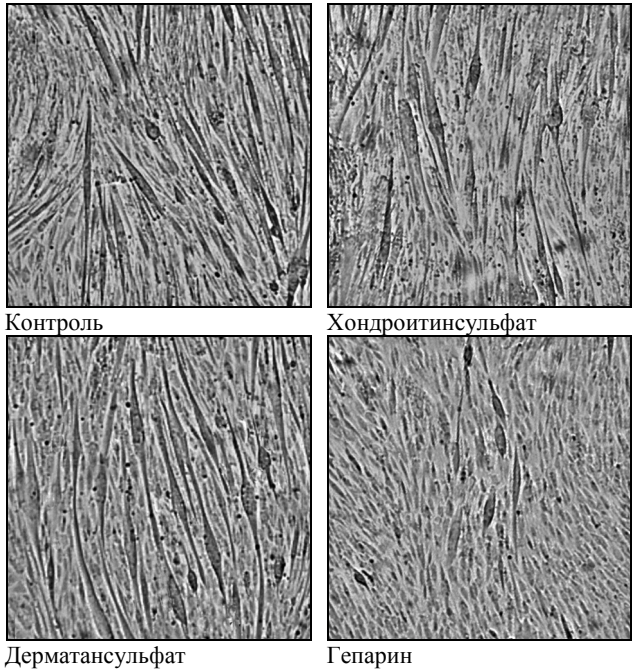


Рис.2. Дифференцировка миобластов L6J1 в присутствии гликозаминогликанов. Прижизненные микрофотографии клеток.

Миобласты в целом однородны по площади и вытянутости на всех сроках дифференцировки, в то время как площадь и степень вытянутости миотуб возрастает в ходе дифференцировки (рис.3а, б). Вытянутость миотуб в присутствии гепарина достоверно меньше, чем в контроле (рис.3а). Между тем нет различий по вытянутости миотуб между остальными добавками и контролем. Средняя площадь миотубы для гепарина и остальных добавок достоверно не отличается от контроля в ходе дифференцировки (рис.3б). Относительное количество миотуб для всех добавок, кроме гепарина, достоверно не отличается от контроля, в то время как в присутствии гепарина появляется в среднем в 2 раза меньше

миотуб, чем в контроле (рис.3в). Таким образом, в присутствии гепарина дифференцировка миобластов протекает медленнее, чем в контроле. Остальные ГАГ не влияют на дифференцировку миобластов в условиях эксперимента.

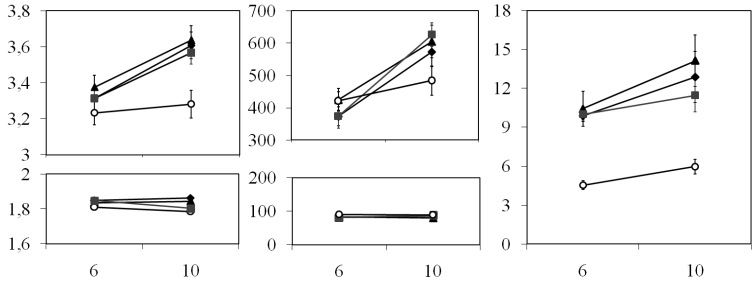


Рис.3. Изменение параметров миобластов и миотуб в процессе дифференцировки миобластов L6J1 в присутствии гликозаминогликанов (6-е и 10-е сутки после инициации дифференцировки). а–степень вытянутости клетки, б–площадь клетки, в–относительное количество миотуб.

Ингибирующие действие гепарина на дифференцировку трансформированных миобластов на первый взгляд согласуется с нашими данными, демонстрирующими способность гепарина стимулировать пролиферативную активность bFGF, который известен как мощный ингибитор дифференцировки миобластов [9]. Основываясь на этих данных, можно предположить, что гепарин подавляет дифференцировку миобластов опосредованно через фактор bFGF. И такое предположение уже было высказано ранее в работе, посвященной изучению действия гепарина на рост первичных миобластов [14]. Однако, в наших экспериментах дифференцировка миобластов происходила в системе, в которой концентрация факторов роста минимальна (0.5% ЭБС), и объяснение, предполагающее регуляцию дифференцировки миобластов гепарином через bFGF, вряд ли приемлемо. С другой стороны, если считать, что 0.5% сыворотки достаточно для проявления ингибирующего дифференцировку действия фактора bFGF, то в этом случае и дерматансульфат должен был бы подавлять дифференцировку миобластов, поскольку он даже эффективнее, чем гепарин, стимулировал пролиферативную активность фактора (рис.1). Тем не менее, дерматанульфат не влиял на дифференцировку миобластов. Можно предположить, что в подавлении дифференцировки миобластов гепарином реализуется механизм, не вовлекающий bFGF. Не исключено, что гепарин препятствует слиянию миобластов. Обнаружено, например, что слияние миобластов находится под контролем простагландина $PGF_{2\alpha}$ и интерлейкина IL-4, которые секретируются миотубами [15]. На других клетках – Т-лимфоцитах –

показано, что гепарин или его олигосахариды ингибируют экспрессию интерлейкинов IL-4 и IL-5 этими клетками, подавляя воспалительный процесс [16]. Подавление синтеза интерлейкина IL-4 может происходить и в случае миобластов, и тогда ингибирование дифференцировки миобластов под влиянием этого ГАГ в наших опытах можно было бы объяснить подавлением слияния миобластов. Действительно, по нашим данным гепарин не просто уменьшает количество миотуб, а приводит к образованию небольших, слабо вытянутых миотуб. Это может свидетельствовать о том, что гепарин препятствует слиянию миобластов с уже имеющимися миотубами, тем самым подавляя рост образовавшихся миотуб.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rhodes J.M., Simons M.* //J. Cell Mol. Med. (2007) 11(2): 176-205;
2. *Iozzo R.V.* //N.Y. Marcel Dekker Inc. (2000) 442p.;
3. *Marastoni S. et al.* //Connect. Tis. Res. (2008) 49(3): 203-6;
4. *Taipale J., Keski-Oja J.* //FASEB J. (1996) 11(8): 51-9;
5. *Oehrl W., Panayotou G.* //Connect. Tis. Res. (2008) 49(3): 145-8;
6. *Brandan E., Larrain J.* //Basic Appl. Myol. (1998) 8(2): 107-13;
7. *Gallagher J.T.* //J. Clin. Invest. (2001) 108(3): 357-61;
8. *Kirkpatrick C.A., Selleck S.B.* //J. Cell Sci. (2007) 120(11): 1829-32;
9. *Charge S.B., Rudnicki M.A.* //Physiol. Rev. (2004) 84(1): 209-38;
10. *Aviezer D. et al.* //Cell (1994) 79(6): 1005-13;
11. *Villena J., Brandan E.* //J. Cell Physiol. (2004) 198(2): 169-78;
12. *Jin P., Sejersen T., Ringertz N.R.* //J. Biol. Chem. (1991) 266(2): 1245-9;
13. *Kroll T.G. et al.* //J. Biol. Chem. (1994) 269(12): 9270-7;
14. *Kardami E., Spector D., Strohman R.C.* //Dev. Biol. (1988) 126(1): 19-28;
15. *Pavlath G.K., Horsley V.* //Cell Cycle (2003) 2(5): 420-3;
16. *Ji S.L. et al.* //World J. Gastroenterol. (2004) 10(23): 3490-4.

ВЛИЯНИЕ ЦИСПЛАТИНА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ У МЫШЕЙ С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХА

Замай Т.Н., Замай О.С., Бородина Н.А.

Сибирский федеральный университет, Красноярск

Введение. Цисплатин – противоопухолевый препарат, являющийся комплексным соединением двухосновной платины и широко использующийся в онкологии для подавления опухолевого роста. Однако при применении цисплатина возможны нарушения функции почек, анафилактические реакции, лейкопения, тромбоцитопения, анемия и нейропатии, поскольку он не обладает специфичностью в отношении только опухолевых клеток и распределяется во всех биологических жидкостях и тканях организма [1]. Токсический эффект цисплатина на функциональное состояние органов и тканей связан, прежде всего, с его антипролиферативным действием на все быстро делящиеся клетки, в том числе и лимфоциты. Именно поэтому оценка воздействия этого часто применяемого противоопухолевого препарата на состояние иммунной системы является актуальным. Цель работы – изучение влияния цисплатина на структурно-функциональные показатели лимфоцитов у мышей с асцитной карциномой Эрлиха.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на белых мышах-самцах ICR массой 27-35г. Все мыши были разделены на три группы. Мышам из первой и второй групп было трансплантировано по 3млн. асцитных клеток внутрибрюшинно. Животные третьей группы составляли группу контроля. Мышам второй группы помимо глюкозы инъецировали по 500мкг цисплатина в 200мкл физиологического раствора. Введение препаратов проводили на 3-и, 5-ые, 7-ые, 9-ые и 11-ые сутки развития опухоли. Объектом исследования служили лимфоциты, выделенные у мышей на 13-ые сутки развития опухоли.

Концентрацию внутриклеточного кальция определяли с помощью флуоресцентного зонда Fura-2AM на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA) при 25^{o}C [2]. Уровень pH в лимфоцитах определяли с помощью флуоресцеина изотиоцината (ФИ) [3]. Измерения в течение 60сек на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA) при длине волны возбуждения – 493нм, поглощения – 520нм. Микровязкость липидного бислоя и зоны белок-липидного контакта мембран лимфоцитов оценивали с помощью флуоресцентного зонда пирена. Микровязкость липидного бислоя мембран клеток оценивали при длине волны возбуждения - 334нм, а микровязкость зон белок-липидных контактов – при 286нм [4] на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA). Спектры снимали в трех повторностях с последующим автоматическим усреднением. Уровень NAD(P)H измеряли по его собственной флуоресценции. Определение проводили на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA). Проба содержала 200тыс. отмытых клеток корковой зоны почек, ресуспендированных в 2мл раствора Хенкса. Флуоресценцию NAD(P)H снимали в течение двух минут при длине волны возбуждения 365нм и длине волны испускания 450нм [5].

Результаты и их обсуждение. Любому функциональному состоянию клетки соответствует определенный спектр таких

физико-химических параметров как мембранный потенциал, pH, вязкость мембраны, редокс-статус, внутриклеточная концентрация катионов кальция и др. В частности, известно, что изменение функционального статуса лимфоцитов сопровождается увеличением внутриклеточного содержания катионов кальция. Устойчивое повышение уровня катионов кальция в клетке является первым событием, происходящим в ответ на активацию мембранных рецепторов митогеном. Причем уровень внутриклеточного кальция увеличивается сразу после активации лимфоцитов и поддерживается на протяжении несколько часов. Свою функцию катионы кальция выполняют, регулируя активность таких внутриклеточных факторов, как фосфолипазы, протеазы, эндонуклеазы и др., координация которых объединяет различные сигнальные пути для формирования адекватного клеточного ответа [6]. Таким образом, кальций является одним из ключевых факторов изменения функционального статуса клетки.

Результаты наших исследований показали, что в лимфоцитах мышей-опухоленосителей на 13-е сутки развития карциномы Эрлиха внутриклеточное содержание катионов кальция в цитозоле было снижено примерно в 4 раза по сравнению с контролем (рис.1), что свидетельствует о подавлении функциональной активности лимфоцитов и неспособности организма противостоять опухолевому росту. Введение цисплатина мышам-опухоленосителям не изменяло $[Ca^{2+}]_{in}$ в лимфоцитах (рис.1).

Концентрация катионов кальция в любых клетках напрямую зависит от физико-химических свойств клеточной мембраны, поскольку они определяют работу мембранно-связанных ферментов, каналов и рецепторного аппарата. В процессе своего жизненного цикла физико-химические свойства мембран лимфоцитов неоднократно изменяются. В частности, при стимуляции лимфоцитов мембрана становится более текучей, что позволяет лимфоцитам осуществлять свои функции более эффективно. Поэтому определение вязкости мембраны – важнейшего интегрального показателя, характеризующего физико-химические свойства мембраны, является необходимым для оценки функционального состояния лимфоцитов и исследования причины снижения содержания катионов кальция в лимфоцитах животных-опухоленосителей. Результаты проведенных исследований показали, что у мышей на 13-ые сутки развития асцитной карциномой Эрлиха лимфоциты имели более текучую, по сравнению с контрольными животными, мембрану, поскольку коэффициент эксимиризации пирена $J_э/J_м$ в зоне белок-липидного контакта был повышен на 40%, а в зоне липидного бислоя – на 43%. Введение цисплатина не изменяло вязкость мембран лимфоцитов (рис.2).

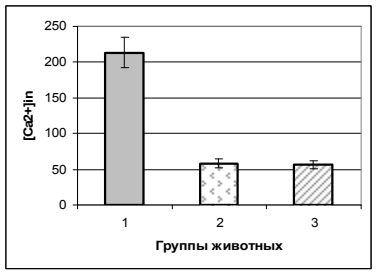


Рис.1. Внутриклеточное содержание катионов кальция ($[Ca^{2+}]_{in}$) в лимфоцитах интактных мышей (1), мышей с асцитной карциномой Эрлиха (2) и мышей с асцитной карциномой Эрлиха, которым вводился цисплатин (3). Все экспериментальные группы содержали по 14 мышей. P1,2<0,001; P1,3<0,001.

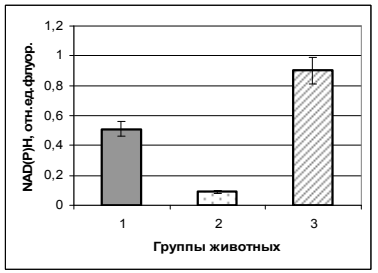


Рис.2. Коэффициент эксимеризации пирена (Jэ/Jм) зоны белок-липидного контакта в лимфоцитах интактных мышей (1), мышей с асцитной карциномой Эрлиха (2) и мышей с асцитной карциномой Эрлиха, которым вводился цисплатин (3). Все экспериментальные группы содержали по 14 мышей. P1,2<0,001; P1,3<0,001; P4,5<0,05; P4,6<0,05.

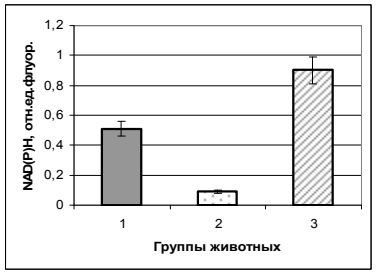


Рис.3. Уровень NAD(P)H в лимфоцитах интактных мышей (1), мышей с асцитной карциномой Эрлиха (2) и мышей с асцитной карциномой Эрлиха, которым вводился цисплатин (3). Все экспериментальные группы содержали по 14 мышей. P1,2<0,001; P1,3<0,05; P2,3<0,001.

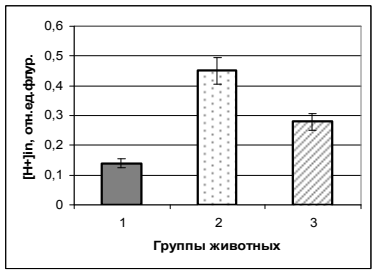


Рис.4. Уровень $[H^+]_{in}$ в лимфоцитах интактных мышей (1), мышей с асцитной карциномой Эрлиха (2) и мышей с асцитной карциномой Эрлиха, которым вводился цисплатин (3). Все экспериментальные группы содержали по 14 мышей. P1,2<0,001; P1,3<0,05; P2,3<0,05.

Таким образом, снижение внутриклеточного содержания катионов кальция в лимфоцитах мышей-опухоленосителей сопровождалось увеличением текучести их клеточной мембраны. Такие согласованные изменения свойств мембраны и внутриклеточной концентрации катионов кальция соответствуют данным литературы, однозначно

свидетельствующим, что увеличение текучести клеточной мембраны стимулирует активность Ca^{2+}-АТРазы (PMCA) и подавляет пассивную проницаемость Ca^{2+}, в результате чего внутриклеточное содержание катионов кальция снижается [7]. Однако функциональный статус лимфоцитов при этом остается непонятным, поскольку, судя по снижению внутриклеточного содержания кальция, функция лимфоцитов у мышей с асцитной карциномой подавлена, а увеличение текучести ее мембраны свидетельствует в пользу их стимуляции. Можно предположить, что снижение вязкости клеточной мембраны вызвано структурными, а не функциональными изменениями, поскольку опухолевые клетки эффективно поглощают различные энергетические субстраты, в том числе и холестерин. Следовательно, увеличение текучести мембраны может быть связано со снижением содержания холестерина в мембране лимфоцитов. Тем не менее, для установления функционального статуса лимфоцитов необходимо определить величину изменений других клеточных параметров.

Уровень NAD(P)H, косвенно характеризующий соотношение окисленных и восстановленных субстратов, может дать представление о функциональном состоянии лимфоцитов, поскольку редокс-статус клетки определяет активность множества внутриклеточных белков [8], а, следовательно, и состояние клетки. В наших исследованиях уровень NAD(P)H в лимфоцитах мышей с асцитной карциномой Эрлиха был значительно ниже, чем у интактных животных (рис.3), что свидетельствовало об изменении редокс-статуса лимфоцитов в условиях опухолевого роста. Вероятно, это связано с уменьшением количества восстановленных субстратов в клетке из-за интенсивного поглощения опухолевыми клетками глюкозы, аминокислот, холестерина и других субстратов и снижения их содержания в плазме крови [9]. В лимфоцитах мышей, которым вводился цисплатин, уровень NAD(P)H в лимфоцитах резко возрастал и был даже выше, чем в контроле. Для объяснения такого феномена можно выдвинуть два предположения. Первое – подавление опухолевого роста цисплатином и, следовательно, снижение потребления опухолью энергетических субстратов могло привести к увеличению содержания глюкозы в плазме крови и, следовательно, лимфоцитах, что с неизбежностью должно способствовать увеличению уровня восстановленных пиридиннуклеотидов. Другое объяснение – цисплатин является просто эффективным ингибитором окислительных процессов в лимфоцитах, что так же может способствовать увеличению уровня NAD(P)H.

Для уточнения функционального состояния лимфоцитов был определен еще один показатель, позволяющий охарактеризовать уровень активности клеток, – $[H^+]_{in}$. Хорошо известно, что повышение уровня pH_{in} является ранним универсальным механизмом, ответственным за

митогенную стимуляцию [10], в то время как закисление цитоплазмы характеризует апоптоз [11,12]. В наших исследованиях уровень $[H^+]_{in}$ в лимфоцитах мышей с асцитной карциномой Эрлиха был значительно выше по сравнению с интактными животными (рис.4). В условиях введения цисплатина, несмотря на снижение степени закисления цитозоля лимфоцитов, он так же оставался выше контрольного уровня. Таким образом, результаты исследований позволяют предположить, что в популяции лимфоцитов у мышей-опухоленосителей, находящихся на стадии развитой опухоли, происходят такие метаболические изменения, которые могут способствовать их апоптотической гибели. Однако этому выводу противоречат полученные нами данные, свидетельствующие о снижении внутриклеточного содержания катионов кальция в лимфоцитах, хотя, как известно, именно эти катионы активируют ферменты, участвующие в запуске каскадных реакций апоптоза.

Совокупность всех полученных нами данных позволяет заключить, что лимфоциты, функционирующие в организме с развитой карциномой Эрлиха, снижают свою функциональную активность. Лечение цисплатином не ухудшает функциональное состояние лимфоцитов, а, возможно, даже способствует улучшению их энергетического состояния, приводя к снижению потребления энергетических субстратов опухолью.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pedersen-Bjergaard J., Daugaard G., Hansen S.W.* //Lancet (1991) 338: 359-63;
2. *Замай Т.Н., Замай А.С.* //Биохимия (2006) 71(10): 1347-53;
3. *Gore M.G.* //Spectroph. Spectrofluor. Pract. Appr. NY (2000) 368p.;
4. *Бордюшков Ю.Н. и др.* //Вопросы Мед. Химии (2000) 1: 72-80;
5. *Petty H.R., Kindzelskii A.L.* //PNAS Biophys. (2001) 98: 3145-9;
6. *Goraya T.A., Cooper D.M.* //Cell Signal (2005) 17: 789-97;
7. *Владимиров Ю.А., Ритов В.Б.* //Биомембр.: Струк., Функ., Мед. Асп. Рига (1981): 22-47;
8. *Дак Д.К., Молик Н.* //Биохимия (2004) 69(1): 16-24;
9. *Шапот В.С.* //Биохим. Асп. Опухол. Роста М. (1977) 304с;
10. *Putney L.K., Denker S.P., Barber D.L.* //Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. (2002) 42: 527-52;
11. *Rich I.N. et al.* //Blood (2000) 95: 1427-34;
12. *Matsuyama S., Reed J.C.* //Cell Death Differ. (2000) 7: 1155-65.

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЦИТОЗОЛЬНОГО КАЛЬЦИЯ И ТРАНСМЕМБРАННОЙ АСИММЕТРИИ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЛИЦЕРОЛА

Землянских Н.Г., Кофанова О.А.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН, Харьков

Введение. Стрессовые факторы, возникающие в процессе замораживания-отогрева клеточных суспензий, вызывают гибель части популяции, несмотря на применение криопротекторов. Смерть клеток может быть вызвана различными причинами, в том числе, экстремальным превышением физических и химических параметров среды, которому клетки не способны противостоять, а также развитием процессов апоптоза/некроза [1]. Эритроциты, лишенные ядра и органелл, подобно ядерным клеткам, обладают механизмом программной смерти, получившим название эриптоз, что отражает специфичность структуры данного типа клеток. Осмотический шок, повышение уровня цитозольного кальция, окислительный стресс, истощение энергетических субстратов и другие факторы вызывают в эритроцитах развитие характерных морфологических и структурных изменений, свойственных апоптозу [2,3].

Долгосрочное хранение крови при ультранизких температурах широко используется в медицинской практике во всем мире. Различные методы криоконсервирования эритроцитов, связанные с варьированием скоростей замораживания, конечной температуры хранения, состава криоконсерванта, базируются на использовании одного криопротектора – глицерола. В связи с этим, исследование структурных и функциональных изменений эритроцитов, индуцированных данным соединением, представляет особый интерес для понимания механизмов выживания клеток в экстремальных условиях криоконсервирования. Кроме того, глицерол относится к группе осмолитов – веществ, синтезируемых организмами разного уровня в стрессовых условиях и способствующих сохранению их жизнеспособности, поэтому изучение модификаций различных клеточных структур, вызванных данным химическим соединением, может быть актуальным также с точки зрения более глубокого понимания общебиологических процессов адаптации клеток.

Целью работы было изучение изменений уровня внутриклеточного кальция и асимметрии трансмембранного распределения фосфатидилсерина в эритроцитах человека под влиянием глицерола.

Материалы и методы. Объектом исследования эритроциты крови доноров II(а) группы, заготовленной с использованием глюкозо-цитратного раствора, со сроком гипотермического хранения не

более 5 суток. Эритроциты тщательно отмывали от плазмы и компонентов белой крови и переносили в Рингер-глюкозный раствор [4] или среду А (145мМ NaCl, 10мМ HEPES, pH 7,4), которые служили контрольными средами. Криопротекторная среда содержала 30% глицерола, 70мМ NaCl, 10мМ трис-HCl, pH 7,4.

Уровень свободного кальция в цитоплазме эритроцитов оценивали с помощью Fluo-4AM [5] на флуоресцентном микроскопе Nikon (Япония) при λ_{ex}=488нм и λ_{em}=516нм.

Исследование асимметричного распределения фосфатидилсерина в эритроцитах проведены на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickenson,США) с использованием набора реактивов Annexin V-FITC detection KIT (Becton Dickenson,США)

Для ингибирования активности Ca^{2+}-АТРазы эритроциты предварительно инкубировали в контрольных средах в присутствии 1мМ Na_3VO_4 и соответствующую концентрацию поддерживали в дальнейшем во всех исследованных растворах.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программного пакета Statgraphics plus 2.1 for Windows.

Результаты и обсуждение. Эритроциты млекопитающих не содержат внутриклеточных резервов Ca^{2+} и его концентрация определяется балансом скоростей транспортных потоков данного катиона через плазматическую мембрану. Выведение Ca^{2+} из эритроцитов человека осуществляется Ca^{2+}-АТРазой, являющейся единственным механизмом транспорта против электрохимического градиента. Для оценки влиянии глицерола на уровень свободного Ca^{2+} в эритроцитах исследовали динамику изменений интенсивности флуоресценции Ca^{2+}-селективного зонда Fluo-4 в предварительно нагруженных клетках в течение 30мин. На рис.1 видно, что в глицерол-содержащей среде интенсивность флуоресценции несколько увеличивается, особенно в начальный период эксперимента на протяжении примерно 10мин (кривая 2), в то время как в контрольной среде уровень флуоресценции остается постоянно низким в течение всего времени исследований. В дальнейшем уровень Ca^{2+} в эритроцитах, инкубируемых в глицерол-содержажей среде стабилизируется. Причиной повышения концентрации Ca^{2+} в клетках в присутствии криопротектора может быть облегчение его захвата из внеклеточной среды и/или торможение активности Ca^{2+}-АТРазы. Ранее было показано, что каталитическая активность Ca^{2+}-насоса существенно зависит от содержания глицерола в среде. В 20-30% концентрационном диапазоне АТФазная активность снижается примерно на 25% [6]. Для того, чтобы оценить роль изменений активности Ca^{2+}-АТРазы в повышении уровня Ca^{2+} в эритроцитах в присутствии глицерола использовали ингибитор (1мМ о-ванадат). Из рис.1 следует, что добавление о-ванадата приводит к существенному

повышению интенсивности флуоресценции Fluo-4 в эритроцитах как в контрольной так и в глицерол-содержащей средах (кривые 3 и 4). В обоих случаях отмечается медленное постепенное увеличение уровня свободного Ca^{2+}. Различия в динамике изменений интенсивности флуоресценции Fluo-4 в эритроцитах с неработающим Ca^{2+}-насосом в присутствии глицерола и в контрольной среде слабо выражены. Это позволяет предположить, что рост концентрации Ca^{2+} в глицерол-содержащей среде (кривая 2) связан в значительной мере со снижением активности Ca^{2+}-АТРазы, осуществляющей транспорт катиона из клетки.

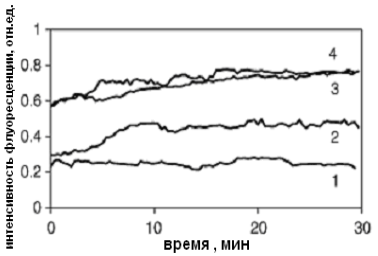


Рис.1 Интенсивности флуоресценции Fluo-4 в эритроцитах в контрольной (1) и глицерол-содержащей средах (кривая 2); в присутствии о-ванадата в контрольной (3) и глицерольной (4) средах.

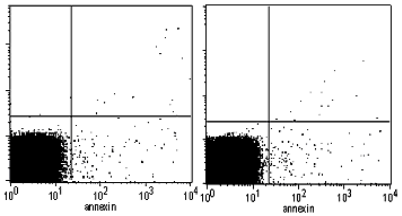


Рис.2. Проточноцитометрический анализ экспонирования фосфатидилсерина в эритроцитах, инкубированных 3ч в контрольной (1) и глицеролсодержащей (2) средах. Ось Х–интенсивность флуоресценции аннексин V-FITC в логарифмическом выражении, ось У– не содержит параметров измерения; левый нижний сектор – клетки, не связывающие аннексиновую метку; правый нижний сектор – клетки, меченные аннексин V-FITC.

Таким образом, введение глицерола в эритроциты сопровождается повышением уровня свободного Ca^{2+}, однако концентрация его весьма далека от критических значений, способных дестабилизировать структурное и метаболическое состояние субклеточных систем, поскольку интенсивность флуоресценции Fluo-4 возрастает значимо, но не намного превышает контрольные показатели. Осмысление физиологических последствий повышения уровня свободного Ca^{2+} в эритроцитах в глицерол-содержащей среде требует более детального анализа структурных изменений, в частности, модификаций состояния липидного бислоя плазматической мембраны.

В структуре мембраны важным элементом в определении жизнеспособности клеток является асимметричное распределение фосфолипидов в липидном матриксе. Влияние глицерола на асимметрию

трансмембранного распределения фосфолипидов в мембране эритроцитов исследовали с применений аннексин V-FITC, обладающего высоким сродством к фосфатидилсерину. Известно, что в норме данный фосфолипид полностью находится во внутреннем монослое мембраны. Экстернализация фосфатидилсерина является одним из признаков апоптоза клеток и служит сигналом к элиминации эритроцитов макрофагами в русле крови [2]. Влияние глицерола на асимметрию в распределении фосфатидилсерина исследовали, пролонгируя инкубационный период до 3 часов при 37°С, что позволяло реализоваться во времени возможным структурным нарушениям, индуцированным в мембране действием криопротекторра. Рис.2 свидетельствует о том, экстернализация фосфатидилсерина в глицерол-содержащей среде практически не отмечалась и количество эритроцитов, меченных аннексином V-FITC, в клеточной популяции не превышало 1%.

Увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах под влиянием глицерола ставит вопрос о его значении в регуляции асимметрии трансбислойного распределения фосфатидилсерина в условиях нагрузки клеток криопротектором. Известно, что Ca^{2+} активирует скремблазу, АТР-независимый фермент, функция которого направлена на разрушение трансмембранной фосфолипидной асимметрии. Введение или удаление данного катиона из среды, содержащей глицерол позволяет прояснить возможность включения захваченного из внеклеточной среды Ca^{2+} в регуляции структурного состояния мембраны, поскольку одним из механизмов повышения уровня свободного Ca^{2+} может быть увеличение проницаемости плазматической мембраны из-за осмотических эффектов в процессе насыщения клеток криопротектором. Кроме того, использование о-ванадата, ингибитора АТРазных реакций, позволяет выявить роль Ca^{2+}-АТРазы в поддержании асимметрии распределения фосфатидилсерина в присутствии криопротектора, несмотря на определенную условность такого подхода, обусловленную игнорированием роли других АТР-зависимых процессов в регуляции структурного состояния липидного бислоя. Как видно на рис.3 включение Ca^{2+} в состав внеклеточного раствора повышает долю эритроцитов, меченных аннексином V-FITC, как в контрольной (2) так и в глицерол-содержащей (5) средах. Вместе с тем, несмотря на практически двукратное увеличение числа клеток, связывающих аннексин их доля в общей популяции после 3-часового инкубирования, остается низкой и не превышает 2%. Прирост количества клеток, способных связывать аннексин V-FITC более заметно возрастает после введения в состав инкубационых сред о-ванадата. Процент эритроцитов, экспонирующих фосфатидилсерин на наружной поверхности мембраны, что подтверждается связыванием аннексинового маркера с клетками, в глицерольной среде выше (6), чем в контроле (3). Тем не менее, и в

данном случае число эритроцитов с эктернализованным фосфатидилсериномне достигает существенных значений, поскольку не превышает 3% от общего числа клеток в клеточной суспензии.

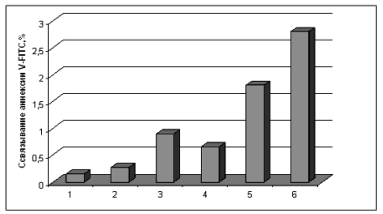


Рис.3. Связывание анексин V-FITC с мембранами эритроцитов: 1-3 – в контрольной среде, 4-6 – в глицерол-содержащей среде; 1,4 – в отсутствии Ca^{2+} в среде; 2,5 – в присутствии Ca^{2+} в среде; 3,6 – в присутствии Ca^{2+} и о-ванадата в среде.

Для объяснения полученных результатов существенным представляется факт возрастной гетерогенности эритроцитов крови человека. Известно, что старые эритроциты характеризуются снижением активности Ca^{2+}-АТРазы, повышением уровня цитозольного Ca^{2+}, уменьшением размеров клеток [8]. Можно предположить, что повышение свободного кальция в субпопуляции старых клеток на фоне уже существующего более высокого уровня данного катиона может способствовать ускорению процессов ассоциируемых с возрастной деградацией, одним из элементов которой является нарушение асимметрии фосфатидилсерина липидного матрикса.

Таким образом, можно заключить, что глицерол способствует повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в эритроцитах человека до уровня, который не вызывает в клетках развитие негативных процессов, влияющих на их стабильность в стрессовых условиях. В частности, как показало пролонгирование времени контакта эритроцитов с данным химическим соединением, асимметрия трансмембранного распределения фосфатидилсерина в липидном бислое не нарушалась существенно даже под влиянием дополнительных воздействий (включение Ca^{2+} и о-ванадата в состав криопротекторного раствора). По-видимому, сбалансированность потоков Ca^{2+} через мембрану в присутствии глицерола сохраняется на достаточном уровне и сдвиг, определяющий прирост его в цитозоле, не является критическим для физиологии клеток. Изменение концентрации свободного Ca^{2+} в эритроцитах в условиях их насыщения криопротектором может служить стимулом модификации структурного состояния белков мембрано-цитоскелетного комплекса, во многом определяющим стабильность клеток при экстремальных воздействиях, ассоциируемых с процессами замораживания-отогрева.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Baust J.M., Van Buskirk R., Baust J.G.* //Cryobiol. (2002) 36(4): 262-70;
2. *Bratosin D. et.al.* //Cell Death Differ. (2001) 8(12): 1143-56;
3. *Klarl B.A. et al.* //Am. J. Phisiol. Cell Phisiol. (2006) 290(1): C244-53;
4. *Lang K.S. et al.* //Cell. Phisiol. Biochem. (2002) 12(5-6): 365-72;
5. *Kaetstner L. et al.* //Cell Calcium (2006) 39(1): 13-9;
6. *Землянских Н.Г., Кофанова О.А.* //Биохимия (2006) 71(8): 1112-8;
7. *Sakthivel R., Faroog S.M., Kalaiselvi P.* //Clin. Chim. Acta (2007) 382 (1-2): 1-7;
8. *Romero P.J., Romero E.A.* //Blood Cell Mol. Diseases (1999) 25(1): 9-19.

НИТРИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ОКСИДА АЗОТА В ЗОНЕ РОСТА АСЦИТНОЙ ОПУХОЛИ

Наумов А.А.[1], Шаталин Ю.В.[1,2], Сухомлин Т.К.[1,2], Парнышкова Е.Ю.[1], Поцелуева М.М.[1,2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино
[2]Пущинский государственный университет

В настоящее время установлено, что наряду с натуральными киллерами, полиморфноядерные лейкоциты и макрофаги являются компонентами неспецифического иммунитета, вовлеченными и в защиту организма при развитии опухолей [1-4]. Развитие врожденного иммунного ответа на трансплантированные асцитные опухоли реализуется в основном в продукции активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) макрофагами и ПМЯЛ, при этом гиперподукция данных соединений оказывает токсическое действие на весь организм, а не только на патологические образования, что приводит к ряду осложнений, и, зачастую, способствует гибели опухоленосителя.

Уникальная химическая природа и большое число внутриклеточных мишеней для NO и его физиологически активных окислительно-восстановительных форм, оставляют открытым вопрос, каким образом и сколь специфично опосредуется повреждающее действие оксида азота на клетки. В настоящее время идет активное изучение мишеней оксида азота и выяснение вопроса, является ли NO достаточно цитотоксичным или же более активны его производные. Известно, что NO в клетках-мишенях образует активные интермедиаты, такие как нитрозоний (NO^+), нитроксил (NO^-) и пероксинитрит ($ONOO^-$). В этой связи некоторые исследователи [5] считают, что большинство цитотоксических эффектов NO принадлежит, на самом деле, ONOO-, который образуется в реакции с супероксидом (O_2^-). Действительно, пероксинитрит значительно более активен: он интенсивно нитрозилирует

белки и может являться источником очень токсичного гидроксил-радикала OH.

Целью работы является изучение изменения содержания различных метоболитов оксида азота в зоне развития асцитной гепатомы Зайделя при модуляции концентрации оксида азота ингибитором NO-синтазы и донором NO.

Материалы и методы.

Реактивы: нитропрусид натрия (SNP), N-нитро-L-аргинин (Fluka, Швейцария), KIT - Nitrotirosine ELISA0187 (HyCult biotechnology b.v.), Cd (хч, Россия), реактив Грисса (Диа-М, Россия).

Животные. В экспериментах использовали крыс-самцов линии Вистар весом 200-220г. Крысы содержались в условиях вивария на стандартном рационе при свободном доступе к воде и пищи, при температуре 16-20^{o}C в режиме естественной освещенности.

Формирование экспериментальной опухоли. Для формирования опухоли использовали клетки асцитной гепатомы Зайделя, отбираемой у крыс опухоленосителей на 5 сутки развития опухоли. Трансплантацию клеток асцитной гепатомы Зайделя проводили в брюшную полость животного в объёме 0,8мл. Среднее время жизни особей с трансплантированной опухолью составляет 12-14 дней.

Концентрацию NOx измеряли фотометрически при длинне волны 540нм с помощью реактива Грисса с предварительным восстановлением нитрат ионов до нитрита кадмием щелочной среде.

Содержание нитротирозина в асцитной жидкости проводили при помощи набора «Nitrotirosine ELISA0187» («HyCult biotechnology b.v.») в соответствии с приложенной к набору инструкцией.

Полученные результаты. В данной работе была исследована динамика содержания нитритов/нитратов (NOx), как конечного продукта окисления NO в организме, и нитротирозина, являющегося маркером на пероксинитрит $ONOO^-$.

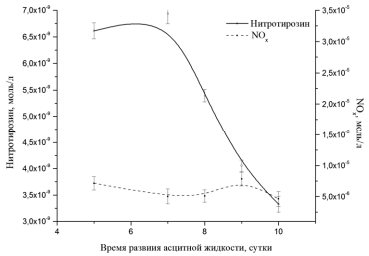


Рис.1. Содержание нитротирозина и NO_x в асцитной жидкости при развитии гепатомы Зайделя (контрольная группа животных).

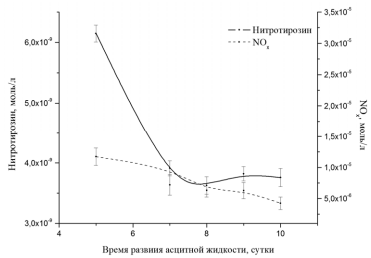


Рис.2. Содержание нитротирозина и NO_x в асцитной жидкости при развитии гепатомы (ежесуточное введение 0,25мл 10^{-4}моль/л раствора нитроаргинина).

Как видно из рис.1 при нормальном течение опухолевого роста значительные изменения концентрации ***NOx*** в асцитной жидкости не наблюдаются. Содержание нитротирозина, при этом, в начальный период опухолевого роста составляет ~6,5-7нМ, затем происходит резкое снижение концентрации нитротирозина до ~3,5нМ на 10 сутки от начала эксперимента.

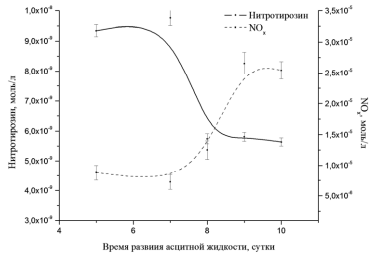


Рис.3. Содержание нитротирозина и NO_x в асцитной жидкости при развитии гепатомы (ежесуточное введение 0,25мл 10^{-4}моль/л раствора SNP).

При ежесуточном введении ингибитора NO-синтазы (N-нитроаргинина) наблюдается ожидаемый спад концентрации ***NOx*** (рис.2) в асцитной жидкости, обусловленный общим снижением продукции NO в организме. При этом содержание ниротирозина в образцах, отобранных на 5 сутки развития опухоли, соответствует уровню контрольного опухоленосителя (~6нМ), затем происходит резкое снижение его концентрации до 4нМ.

В случае введения донора NO (нитропрусид натрия (SNP)), содержание ***NOx*** в зоне роста опухоли совпадает с таковым у контрольного опухоленосителя (рис.3) в начальный период, затем наблюдается их накопление вплоть до концентрации ~25мкМ. Содержание нитротирозина было повышенно по сравнению с контролем на всём протяжении развития опухоли и составляло в начальный период ~9-10нМ, а в конечный – 5-6нМ.

Обсуждение результатов. При анализе экспериментальных данных было обнаружено, что при развитии асцитной опухоли у животных не наблюдалось значительного изменения концентрации нитритов/нитратов, что, по-видимому, связано с быстрой утилизацией низкомолекулярных соединений из зоны роста опухоли. Тем не менее, изменение концентрации метаболитов NO было зафиксировано по нитрированным тиразиновым остаткам белковых молекул, скорость диффузии которых из асцитной жидкости снижена. Так период полувыведения нитритов и нитратов из асцитной жидкости составляет примерно 30 минут (рис.4.1), тогда как для нитротирозина он составляет 2-2,5 часа (рис.4.2), а его полное выведение при кратковременном стимулировании образования NO (введение в зону роста опухоли SNP в концентрации 10^{-4}М, 0,25мл) составил 6-8 часов.

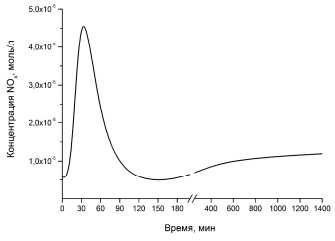


Рис.4.1. Динамика содержания нитритов и нитратов в асцитной жидкости в течении суток после введения SNP в брюшную полость опухоленосителя.

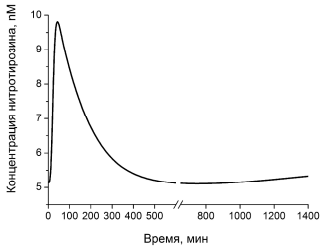


Рис.4.2. Динамика содержания нитротирозина в асцитной жидкости в течении суток после введения SNP в брюшную полость опухоленосителя.

Введение конкурентного ингибитора NOS (нитроаргинина) оказывало, преимущественно, влияние на образование нитрозилированного тирозина, содержание которого в асцитной жидкости уменьшалось с большей скоростью в ходе развития опухоли. При этом содержание NO_3 и NO_2 уменьшилось незначительно. Данная зависимость связанна, по-видимому, с тем, что с уменьшением активности NO-генерирующей системы уменьшается скорость образования пероксинитрита, который является нитрозилирующим агентом в реакции с тирозином. Слабое снижение уровня NO_x обусловлено тем, что их концентрация в зоне роста опухоли и так низка. Уменьшение поступления нитритов/нитратов компенсируется достаточно медленным их удалением при таких низких концентрациях.

Наиболее интересные результаты были получены при исследовании влияния донора NO – SNP. Наряду со снижением содержания нитротирозина во второй фазе опухолевого роста наблюдается также увеличение содержания нитритов и нитратов. Это можно объяснить тем, что в ходе роста опухоли снижается содержание АФК [6] в асцитной жидкости, что приводит к снижению образования пероксинитрита и, как следствие, к снижению нитрозилирования белков. При этом избыток оксида азота, изъятый из реакции образования пероксинитрита, повышает содержание NO_x.

Работа поддержана проектами Рособразования согласно тематическому плану ЕЗН №1.4.08 и ведомственной программой РНП грантами №6663 и №6872.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ackermann M.F. et al.* //Canser Res. (1989) 49(1): 528-32;
2. *Kok P.M., van Kessel, Jan Verhoef.* //Pathobiology (1990) 58: 249-64;

3. *Pustovidko A., Potselueva M., Evtodienko Yu.* //IUBMB Life. (2000) 50: 69-73;
4. *Поцелуева М.М. и др.* //Цитология (2005) 47: 1032-8;
5. *Albina JE, Reichner JS.* //Cancer Metastasis Rev. (1998) 17(1): 39-53;
6. *Шаталин Ю.В.* //Автореф. дисс. к.б.н. (2008).

ВЛИЯНИЕ ГЕПАТЭКТОМИИ НА СТАТУС МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК КРЫСЫ

Панин Л.Е., Кузнецов П.А., Гимаутдинова О.И., Поляков Л.М.

ГУ Научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН, Новосибирск

Метилирование ДНК – ключевой эпигенетический механизм для подавления экспрессии многих генов, включая гены белков-регуляторов клеточного цикла, рецепторов, ферментов репарации ДНК и апоптоза [1,2]. Известно, что метилированию подвергаются CpG-островки [2]. В наших работах показано, что комплексы стероид-аполипопротеин AI (тетрагидрокортизол, андростерон, дегидроэпиандростерон и его сульфат) связываются преимущественно с GCC/CGG-содержащими последовательностями в изолированной ДНК, что дозозависимо влияет на ее копирование и транскрипцию. Молекулярный механизм этого явления определен. Он заключается в инициировании локального плавления ДНК в сайтах связывания указанных комплексов, что приводит к активации экспрессии генов [3]. На основании этих результатов предположили, что комплекс ТГК-апоА-I может играть роль в регуляции экспрессии генов в процессах регенерации клеток печени, подобную роли транскрипционных факторов, изменяющих структуру ДНК.

Ранее было показано, что прединкубация тетрагидрокортизола (ТГК) с апоА-I приводит к специфическому дозозависимому взаимодействию с ДНК *in vitro*. В результате образуются однонитевые участки в ДНК, расщепляемые S1 нуклеазой [3,4]. Такие стероидные гормоны с анаболическим действием как андростерон, дегидроэпиандростерон, дегидроэпиандростерон-сульфат и тетрагидрокортизол в комплексе с апоА-I увеличивали скорость биосинтеза белка, а дегидроэпиандростерон-сульфат и тетрагидрокортизол повышали также скорость синтеза ДНК в культуре гепатоцитов [5]. Можно предположить, что степень метилирования CpG-участков отразится на проявлении регуляторных свойств комплексов стероид-апоА-I. В данной работе исследовали влияние

гепатэктомии на степень метилирования ДНК крысы и способность комплекса ТГК-апоАI связываться с ДНК до и после гепатэктомии.

Материалы и методы. Операция гепатэктомии была проведена на 2-х крысах-самцах линии *Wistar*: возраст 3мес., вес 200г. Из удаленных долей печени крыс №1 и №2 выделялась контрольная ДНК. Через 36ч животное №1 забивали, соблюдая Правила работы с лабораторными животными; из его печени выделяли ДНК. Из печени крысы №2 выделяли ДНК через 72ч. Полученные препараты ДНК гидролизовали рестриктазой Fsp4HI (Сибэнзим). Как известно, рестриктаза Fsp4HI «узнает» сайты с нуклеотидной последовательностью GCNGC/CGNCG [2]. Если цитозин метилирован, то рестриктаза «не разрезает» указанный сайт. В 50мкл буфера рестрикции (33мМ трис-ацетат, pH 7,9, 10мМ ацетат магния, 66мМ ацетат калия, 1мМ ДТТ) содержалось 1,2 мкг ДНК и 1е.а. Fsp4HI. Реакционную смесь инкубировали 16ч при 37°С. Контрольные препараты ДНК обрабатывали аналогично, но без добавления фермента. Затем ДНК подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле, который окрашивали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете на цифровой фотоаппарат.

Препараты ДНК инкубировали с комплексом ТГК-апоАI [4] и затем с нуклеазой *mung bean*, которая гидролизует однонитевые участки в нуклеиновой кислоте. Реакционная смесь содержала 2мкг ДНК в 50мМ ацетате натрия, 30мМ хлориде натрия, 1мМ сульфате цинка, pH 5 и 1е.а. нуклеазы *mung bean.* Смесь инкубировали 20мин при 37ºС. ДНК анализировали с помощью электрофореза, как описано выше. Содержание фрагментов ДНК на электрофореграммах оценивали с помощью программы GelPro.

Результаты и обсуждение. На рис. видно, что в результате гепатэктомии возрастает количество фрагментов с меньшей молекулярной массой после инкубации с рестриктазой. Сравн.: дор. 6 с дор. 2 (36 час после гепатэктомии) и дор. 8 с дор. 4 (72ч после гепатэктомии).

Таким образом, показано, что ДНК, выделенная из регенерирующей печени (36 и 72ч после гепатэктомии) значительно полнее гидролизуется рестриктазой Fsp4HI, т.е. происходит деметилирование CpG-участков в результате операции на печени крысы.

При взаимодействии с комплексом ТГК-апоА-I всех препаратов ДНК наблюдается защита от гидролиза нуклеазой *mung bean,* что свидетельствует о связывании указанного комплекса и с метилированными, и с неметилированными одноцепочечными участками вида GCC, либо CGG.

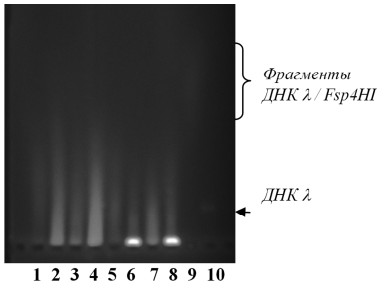


Рис. Влияние гепатэктомии на гидролиз ДНК рестриктазой Fsp4HI. ДНК до гепатэктомии: дор. 1,3,5 и 7; после гепатэктомии: дор. 2 (36ч) и дор. 4 (72ч). 1) контрольная ДНК (1мкг, крыса №1), инкубированная с Fsp4HI; 2) ДНК (2мкг, крыса №1), 36ч регенерации, инкубация с Fsp4HI; 3) контрольная ДНК (1мкг, крыса №2), инкубированная с Fsp4HI; 4) ДНК (2мкг, крыса №2), 72ч регенерации, инкубация с Fsp4HI; 5)-8) дубль 1-4 в тех же условиях, но без рестриктазы; 9) ДНК λ (0,5мкг), инкубирован-ная с Fsp4HI; 10) ДНК λ (0,5мкг).

Табл. Содержание в геле фрагментов ДНК крысы размером более 3 т.п.н. до и после гепатэктомии в присутствии и в отсутствие комплекса ТГК-апоАI.

Кол-во ДНК до гепатэктомии		Кол-во ДНК после гепатэктомии	
		36 час	72 час
ДНК	100%	100%	100%
ДНК$^{+}$mung bean нуклеаза	40%	20-25%	15-20%
ДНК$^{+}$ТГК-апоАI+m.b. н-за	50%	25-30%	25-30%

ЛИТЕРАТУРА

1. *Li H. et al.* //J. Biol. Chem. (2006) 281: 19489-500;
2. *Zingg J.M., Jones P.A.* //Carcinogenesis (1997) 18(5): 869-82;
3. *Панин Л.Е. и др.* //Биохимия (2002) 67: 953-8;
4. *Панин Л.Е. и др.* //Молек. биол. (2007) 41 (4): 647-53;
5. *Панин Л.Е., Хощенко О.М., Усынин И.Ф.* //Проблемы эндокринологии (2002) 48(6): 45-8.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ РЕГУЛЯЦИЮ ПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ

Парнова Р.Г., Николаева С.Д., Бахтеева В.Т., Фок Е.М., Лаврова Е.А.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М.Сеченова РАН, СПб

Хорошо известно, что основным компонентом, определяющим токсические эффекты грам-отрицательных бактерий и инициирующим реакции врожденной иммунной защиты, являются липополисахариды

(ЛПС) – продукты бактериальной клеточной стенки. В основе узнавания ЛПС клеткой хозяина и активации экспрессии генов, обеспечивающих реакции неспецифического иммунного ответа, лежит чрезвычайно сложная сигнальная цепь, начинающаяся со связывания ЛПС со специфическими мембранными рецепторами TLR4 (toll-like receptor 4) и образования комплекса, включающего в себя ЛПС, ЛПС-связывающий белок, собственно TLR4 и белки mCD14 и MD-2 [1,2]. Передача сигнала внутри клетки происходит при участии большого количества адапторных белков (MAL, MyD88, TRAM, TRIF), меняющих активность протеинкиназ, которые в свою очередь активируют транскрипционные факторы, такие как, например, NF-kB [3]. Посредством NF-kB-опосредованного механизма связывание ЛПС с TLR4 приводит к усилению экспрессии NO-синтазы индуцибельного типа (iNOS) и увеличению продукции NO, играющего важнейшую роль в обеспечении защитных реакций клетки, индуцируя повреждения ДНК, белков и липидов бактериальной клетки [4,5].

Данные последних лет показывают, что подобные сигнальные системы могут быть активированы не только в «профессиональных» иммунокомпетентных, но и в эпителиальных клетках, образующих первый барьер на пути патогенов, хотя данные о возможности эффекта ЛПС на этот тип клеток неоднозначны [6,7]. Используя в качестве модельного объекта эпителий мочевого пузыря лягушки, традиционно применяющийся в исследованиях механизмов водного транспорта, мы обнаружили, что (1) эпителий мочевого пузыря амфибий может быть колонизирован как грам-положительными, так и грам-отрицательными бактериями, и (2) изолированные эпителиальные клетки при их инкубации *in vitro* обладают мощным NO-зависимым антибактериальным эффектом [8]. В связи с этим целью данной работы явилось исследование молекулярных механизмов сопряжения эффектов бактериальных эндотоксинов и сигнальных систем, регулирующих продукцию NO в эпителиальной клетке.

Методы. Эксперименты проводили на самцах травяной лягушки *Rana temporaria L*. Все использованные методы подробно описаны в опубликованных ранее работах [8-11]. Ниже приводится краткое описание применяемых приемов. Эпителиальные клетки, изолированные в бескальциевой среде с ЭДТА, культивировали в стерильных 24-луночных планшетах (1-2×10^6клеток/лунку) в среде следующего состава: 1 часть среды L-15 (Leibovitz), 0.39 части H_2O, гентамицин, неомицин (40мкг/мл), пенициллин (20ед/мл), стрептомицин (20мкг/мл); осмоляльность 230мосм/кг H_2O. Анализ экспрессии мРНК iNOS проводили методом ПЦР, совмещенной с обратной транскрипцией, с помощью набора Titan One Tube RT-PCR System (Roche). Праймеры к генам iNOS и GAPDH (глицерофосфат-дегидрогеназа) конструировали с помощью программы Primer3 к консервативным последовательностям данных генов различных животных, имеющихся в базах данных (tcaccaggaaatgctgaacta (5’–3’), tgcttcttgaaactctctccatt (3’–5’) и aaggcttctgctcacttgaagg (5’–3’), tatgagatccaccacacggt (3’–5’) для iNOS и GAPDH, соответственно). Идентичность полученных ПЦР-продуктов iNOS и GAPDH подтверждали данными секвенирования. Анализ экспрессии белка iNOS и аргиназы в лизате эпителиальных клеток проводили стандартным методом иммуноблотинга, применяя универсальные антитела против всех типов NOS (Affinity Bioreagents), а также антитела против аргиназы I и II (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). В качестве вторичных антител использовали иммуноглобулины кролика, меченые пероксидазой. Активность NOS в изолированных иетактных эпителиальных клетках через 21ч инкубации оценивали по скорости превращения [^{3}H]-*L*-аргинина (Amersham) в [^{3}H]-*L*-цитруллин [9], концентрацию нитритов в среде измеряли по методу Грисса [12]. Активность аргиназы также оценивали двумя способами: (1) в интактных эпителиальных клетках, нагруженных [^{3}H]-*L*-аргинином, по продукции [^{3}H]-*L*-орнитина и (2) в гомогенате эпителиальных клеток по оценке продукции мочевины [10]. Визуализацию синтеза NO эпителиальными клетками проводили с помощью витального флуоресцентного красителя 4,5-диаминофлуоресцеин-диацетата (DAF-2DA) на флуоресцентном микроскопе TSC SL (Leica) с конфокальной приставкой DMR.

Использованные реактивы: ЛПС *E.coli* (0127:B8), пирролидин-дитиокарбамат (PDTC) (Sigma), 1400W (Biomol), (S)-(2-бороноэтил)-L-цистеин (BEC) (Calbiochem).

Результаты и обсуждение Проведенные эксперименты показали, что ЛПС *E.coli* вызывает усиление экспрессии iNOS. Это демонстрируют следующие результаты: (1) В первичной культуре эпителиальных клеток добавление ЛПС приводит к увеличению концентрации нитритов, стабильных метаболитов NO, в культуральной жидкости (рис.1А); наблюдаемый эффект ЛПС подавлялся высокоселективным ингибитором iNOS 1400W (20мкМ) и ингибитором NF-kB PDTC (100мкМ). (2) Оценка активности NOS, измеряемая по продукции [^{3}H]-*L*-цитруллина в клетках, нагруженных [^{3}H]-*L*-аргинином, показала, что 21-часовая инкубация клеток ЛПС приводит к значительному росту активности фермента по сравнению с клетками, инкубируемыми в отсутствие ЛПС; наблюдаемый эффект ЛПС подавлялся 1400W.(рис.1Б) (3) ЛПС вызывает резкое усиление экспрессии мРНК iNOS в эпителиальных клетках через 6 часов после его добавления (рис.1В). (4) Иммуноблотинг лизата эпителиальных клеток инкубированных с ЛПС выявил резкое усиление экспрессии белка iNOS через 21 час после его добавления (данные не приведены) (5) Визуализация синтеза NO эпителиальными клетками с помощью флуоресцентного красителя DAF-2DA показала, что ЛПС увеличивал

среднюю флуоресценцию клеток на 29±3% по сравнению с контролем. Усиление флуоресценции в ответ на ЛПС наблюдалось в большинстве клеток суспензии (данные не приведены).

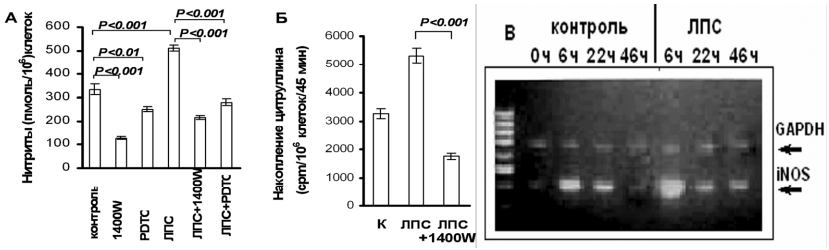


Рис.1. Влияние ЛПС *E.coli* (25мкг/мл) на продукцию нитритов (А), накопление [^{3}H]-L-цитруллина (Б) и экспрессию мРНК iNOS в изолированных эпителиальных клетках (В).

Известно, что хотя внутриклеточная концентрация аргинина, субстрата образования NO, во много раз превышает величину K_m для NOS, активность фермента значительно зависит от поступления субстрата из внеклеточной среды (так называемый «парадокс аргинина») и от «биодоступности» субстрата для NOS внутри клетки. В связи с этим дальнейшая задача нашей работы состояла в попытке выяснить влияет ли ЛПС, помимо собственно усиления экспрессии iNOS, на механизмы, обеспечивающие фермент субстратом, из которых наибольший интерес представляло исследование роли транспортеров аминокислот, а также аргиназы – фермента, превращающего *L*-аргинин в *L*-орнитин и мочевину и конкурирующего таким образом с NOS за общий субстрат [13,14].

Транспорт аргинина в клетки осуществляется специфическими транспортерами катионных аминокислот (CAT1, CAT2, CAT3). Проведенные эксперименты показали, что кинетика транспорта аргинина в эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки характеризуется насыщением, описываемым уравнением Михаэлиса-Ментен (рис.2А). Процесс транспорта не зависит от присутствия Na^+ и ингибируется лизином и орнитином, что свидетельствует об участии транспортера катионных аминокислот y^+L-типа. Инкубация эпителиальных клеток с ЛПС в течение 21 часа приводит к активации транспорта аргинина в клетку (рис.2Б), причем приблизительно в той же степени, что и усиление индукции iNOS. Интересно, что транспорт аргинина в наших экспериментах блокировался 1400W (20мкМ), ингибитором iNOS, что свидетельствует, по всей вероятности, о тесном пространственном расположении фермента и системы транспорта субстрата, что может обеспечивать их взаимозависимость.

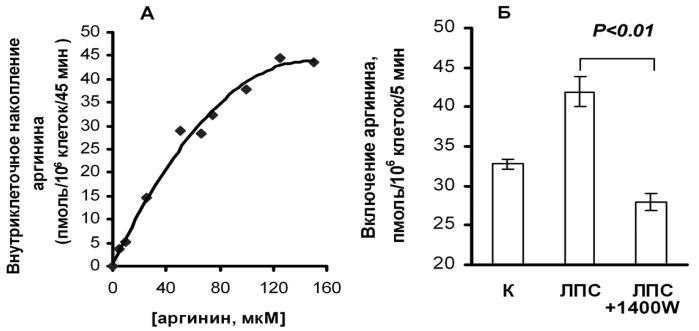


Рис.2. Типичная кривая накопления аргинина в свежевыделенных эпителиальных клетках(А) и накопление аргинина в клетках, прединкубированных в течении 21 часа с ЛПС *E.coli* (25мкг/мл) или без него (контроль) (Б).

Другой мишенью действия ЛПС на продукцию NO могла быть регуляция активности или экспрессии аргиназы. Предварительно нами было установлено, что (1) в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки экспрессируется аргиназа II типа, (2) величина K_m фермента составляет 23мМ; (3) активность фермента подавляется селективным ингибитором аргиназы BEC в концентрациях от 1 до 100мкМ. Полученные данные показали, что аргиназа действительно участвует в регуляции продукции NO. Ингибирование ее активности (BEC, 100мкМ) приводило к увеличению концентрации нитритов, продуцируемых эпителиальными клетками (рис.3А) и повышению продукции [^{3}H]-*L*-цитруллина в клетках, нагруженных [^{3}H]-*L*-аргинином (рис.3Б). Как, однако, объяснить этот феномен, если концентрация аргинина в использованных нами средах была избыточна, а Km аргиназы значительно превышает K_m для NOS? Согласно современным моделям, существует пул внутриклеточного аргинина, локализующийся в микродомене, образованном тесным пространственным расположением в клетке NOS и митохондриальной аргиназы [15, 16]. В этом микродомене, по-видимому, и разыгрывается конкурентная борьба за субстрат, которая оказывается возможной несмотря на значительную разницу в Km для обоих ферментов. Недавно было показано, что NO вызывает S-нитрозилирование двух остатков цистеина в молекуле аргиназы, что приводит к резкому снижению ее Km [16]. По этим данным именно S-нитрозилированная форма аргиназы способна конкурировать с NOS за субстрат.

Измерение активности аргиназы в гомогенате эпителиальных клеток, прединкубированных в течение 21 часа с ЛПС показало, что бактериальный эндотоксин вызывает снижение активности фермента (рис.3В). Остается неясным, связан ли наблюдаемый эффект ЛПС с

изменением экспрессии аргиназы, однако, очевидно, что его физиологическое значение направлено на увеличение продукции NO.

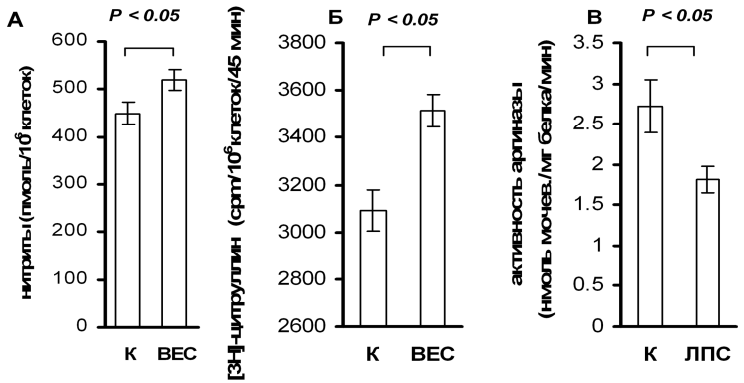


Рис.3. Влияние ВЕС, ингибитора аргиназы, на продукцию нитритов (А) и накопление [^{3}H]-L-цитруллина (Б) изолированными эпителиальными клетками. (В) Активность аргиназы в гомогенате эпителиальных клеток, прединкубированных в течение 21 часа с ЛПС или без него (контроль).

Полученные данные свидетельствуют о наличии в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки молекулярного механизма распознавания ЛПС и функционировании системы врожденной иммунной защиты, центральную роль в которой играет NF-kB-опосредованная индукция экспрессии iNOS. Дополнительными механизмами, обеспечивающими повышение уровня NO, являются усиление транспорта аргинина в клетку и снижение активности аргиназы. Таким образом, в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки выявляется разветвленная сигнальная система внутриклеточного действия ЛПС, обеспечивающая NO-зависимые механизмы врожденного иммунитета.

Работа поддержана грантом РФФИ №08-04-00837а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Palsson-McDermott E.M., O'Neill L.A.* //J. Immunol. (2004) 113 : 153-62;
2. *Takeda K., Akira S.* //Internat. Immunol. (2005) 17: 1-14;
3. *Friedman R., Hughes A.L.* //Immunogenetics (2002) 53: 964-74;
4. *Fang F.C.* //J. Clin. Invest. (1997) 99: 2818-25;
5. *Guzik T.J. at al* //J. Physiol. Pharmacol. (2003) 54: 469-87;
6. *Schilling J.D. et al.* //J. Immunol. (2001) 166: 1148-55;
7. *Schilling J.D., et al.* //Infect. Immunol. (2003) 71: 1470-80;
8. *Фок Е.М. и др.* //Цитология (2008) 50 (10): 893-8;

9. *Bachteeva V. et al.* //Amer. J. Physiol. (2007) 293 (1): 528-37;
10. *Николаева С.Д. и др.* //Ж. Эвол. Биохим. Физ. (2008) 44 (3): 234-40;
11. *Лаврова Е.А. и др.* //Росс. Физиол. Журнал (2009) 95 (3): 215-24;
12. *Green L.C. et al.* //Anal. Biochem. 1982. 126: 131-8;
13. *Berkowitz D.E. et al.* //Circulation (2003) 108: 2000-6;
14. White A.R. et al. //Hypertension (2006). 47: 245-51;
15. *Simon A. et al.* //Circ. Res. (2003) 93: 813-20;
16. *Santhanam L. et al.* //Circ.Res. (2007)101 (7):692-702.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ И КОНФОРМАЦИЮ МОЛЕКУЛ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ *HANSENULA POLYMORPHA*

Рыков В.А.[1], Ашин В.В.[2], Махмутов Б.Б.[3], Скарга Ю.Ю.[4], Ким Ю.А.[4]

[1]Национальный центр биотехнологии РК, Астана, Казахстан
[2]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино
[3]Кызылординский государственный университет, Казахстан
[4]Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Введение. Алкогольоксидаза (АО), катализирует окисление спиртов в присутствии растворенного кислорода с образованием соответствующего альдегида и пероксида водорода. Фермент пригоден для определения содержания низших спиртов и нашёл широкое применение при конструировании биосенсоров в сочетании с сенсорами на кислород и пероксид водорода [1,2]. Для увеличения стабильности и чувствительности АО в алкобиосенсорах необходима информация о пространственной структурной организации и динамике конформационных изменений фермента под влиянием различных факторов, в том числе и температуры. Лабильность белковой молекулы по отношению к изменению температуры является одним из ее важных свойств. Повышение температуры оказывает дезорганизующее действие, как на растворитель, так и на белковую макромолекулу, переводя ее в конформацию с большей доступной свободной энергией, т.е. к более развернутой форме молекулы [3-5]. При этом в местах слабых взаимодействий может происходить разрыв связей, удерживающих одну или несколько полипептидных цепей, к нарушению структуры белка и утрате специфической функциональной активности молекулы.

При более низких температурах, как правило, наблюдается постепенное повышение активности ферментов, сообразно повышению температуры. Изменение скорости ферментативной реакции в зависимости от температуры связано с ее влиянием на стабильность

фермента, на скорость распада фермент-субстратного комплекса, на сродство фермента к субстрату и т.д.

В настоящей работе приведены результаты исследований АО дрожжей *Hansenula polymorpha,*направленные на выявление связи стабилизирующих эффектов этанола с конформационными изменениями данного фермента и зависимости его активности от температуры.

Материалы и методы. АО была выделена из дрожжей *H. polymorpha,* выращиваемых в качалочных колбах на среде с глицеролом, в качестве основного источника углерода, и метанолом, добавляемом на более поздних стадиях культивирования в качестве индуктора синтеза АО [6,7]. В дальнейшем, после разрушения дрожжевых клеток, выделение белка происходило с помощью хроматографических методов очистки и гельфильтрации.

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Perkin Elmer MPF-44B. Активность фермента определяли по стандартной ортодианизидиново-пероксидазной методике (USA Patent, 4,430,427, Feb.7, 1984). Реактивы – метанол 2М, фосфатный буфер pH 7,4 с ортодианизидином(0,01%), раствор конской пероксидазы 2мкг/мл, образец (алкогольоксидаза, 0,9мкМ). Измерение поглощения света проводилось на спектрофотометре М40, на длине волны λ=460нм в термостатируемой кювете при 25°С, при непрерывном перемешивании.

Экспериментальная часть. Термолабильность ферментов объясняется тем, что температура воздействует на белковую часть фермента, оказывая влияние на скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса и на все последующие этапы преобразования субстрата при ее повышении, что ведет к усилению катализа, а слишком высокие значения температуры ведут к денатурации белка и снижению каталитической функции.

Результаты экспериментов показывают, что изменение активности АО происходит не только при прямом нагревании, но и после охлаждения фермента до комнатной температуры сохраняется повышенная активность. При этом максимум активности АО при прямом нагревании приходится на 55°С, то есть непосредственно близко к температуре денатурации фермента – 58°С [8], а максимум активности сразу после охлаждения – на 50°С (рис.1). Максимум активности при нагревании достигается в течении 3 минут, ещё 3 минуты держится на уровне достигнутого максимума, и затем постепенно идёт на спад (рис.2). Вероятно, изменение активности под воздействием температуры происходит под влиянием постепенно нарастающих конформационных изменений в молекуле фермента, носящих сложный характер – увеличение активности не отвечает правилу удвоения на каждые 10°С, конформационные перестройки происходят не одномоментно, а в течении времени.

АО является флавопротеидом, содержащим прочно связанный в нековалентном виде кофактор – флавинадениндинуклеотид (FAD) [9], который имеет максимумы оптического поглощения в области 450нм и флуоресценции – 520нм. Молекула FAD, связанная в белках, имеет развернутую конформацию [10], поэтому возможен перенос электрона от расположенных поблизости электронодонорных групп в остатках триптофана, тирозина или цистеина, приводящая к тушению его флуоресценции.

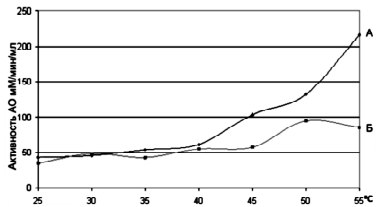


Рис.1. Изменение активности АО при разных температурах реакционной смеси (А) и при 25°С, после предварительного прогревания при соответствующей температуре в течении 3мин и охлаждения (Б).

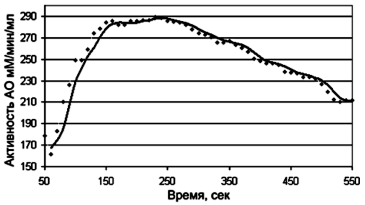


Рис.2. Изменение активности АО при температуре 50°С в течение 10мин. АО добавлялась в конечной концентрации 0,1нМ, на 2мл среды измерения. В остальных пунктах схема проведения опыта осталась такой же.

При нагревании образца АО в диапазоне температур 25-55°С, и последующем измерении флуоресценции FAD при комнатной температуре (25ºС), показано, что интенсивность последней увеличивается (рис.3). Возможно, это связано с конформационными изменениями белка (более развернутая структура), приводящими к увеличению расстояния между ароматическими аминокислотами и FAD.

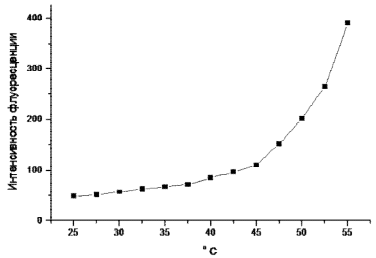


Рис.3. Зависимость интенсивности флуоресценции FAD в АО образца (концентрация белка 0,3мг/мл), предварительно инкубировавшейся при различной температуре в течение 10мин. Измерение флуоресценции производилось при температуре 25°С.

Инкубирование фермента в интервале температур 25-55°С приводит к структурным перестройкам, отражающимся на изменении интенсивности флуоресценции кофактора. При этом влияние этанола на прогретые и непрогретые образцы АО, по данным флуоресценции, также

различно. Молекулы этанола увеличивают «активный» интервал температур фермента на 10°С. Флуориметрические данные о стабилизирующем эффекте этанола хорошо коррелируют с результатами микрокалориметрических исследований фермента [8].

Необходимо отметить, что АО относится к группе аллостерически регулируемых ферментов. Мы не исключаем, что в ходе дальнейших наших исследований будет найдено низкомолекулярное соединение, способное значительно увеличить стабильность АО в составе биосенсора, не мешая при этом анализам низших спиртов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Verduyn C., van Dijken J.P., Scheffers, W.A*. //Biotechnol. Bioeng. (1983) 25: 1049-55;
2. *Guibault G.G., Palleschi G., Lubrano G.* //Biosens. Bioelectron. (1995) 10: 379-92;
3. *Диксон М., Уэбб Э.* //Ферменты. М. (1982) 1: 392с.;
4. *Кушнер В.П.* //Конф. изменч. и денатур. биопол. Л: Наука (1977): 275;
5. *Александров В.Я.* //Клетки, макромол. и темп. Л: Наука (1975): 293;
6. *Jens Klabunde et al.* //Fems Yeast Research. (2007) 7(7): 1168-80;
7. *Maria B. et all*. //Eukaryot Cell. (2004) 3(1): 52-60.
8. *Рыков В.А. и др.* //Конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» Минск (2008): 246-8;
9. *Vonck J., van Bruggen E.F.* //Biochim. Biophys. Acta (1990) 1038 :74-9;
10. *VisserA.J.W.G.* //Photobiol. (1984) 40: 703-6.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ДИТЕРПЕНОИДНОГО АЛКАЛОИДА ДЕЛЬФАТИНА НА ИОННЫЕ КАНАЛЫ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ

Хушматов Ш.С.

Институт физиологии и биофизики АН РУз, Ташкент

Введение. В настоящее время не вызывает сомнения, что кардиоваскулярные нарушения являются одной из главной причин смерти среди больных в мире [1]. Известно, что большинство заболеваний сердца сопровождается нарушением процесса электромеханического сопряжения в кардиомиоцитах [6]. Поиск новых перспективных кардиотропных препаратов, обладающих селективный модулирующих активность сократительного аппарата кардиомиоцитов, является необходимым условием совершенствования профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим, изучение механизмов фармакологической регуляции Ca^{2+}-транспортирующих систем имеет важное значение для разработки новых и наиболее эффективных подходов профилактики и лечения сердечных аритмий и других заболеваний сердца.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение влияния дитерпеноидного алкалоида дельфатина, выделенного из растений рода *Delphinium L.* [3] на Ca^{2+}-транспортирующие системы папиллярной мышцы крысы.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводились на папиллярной мышце сердца белых крыс (200-250г). Изометрическую силу сокращения папиллярной мышцы регистрировали с помощью механотрона F30 (Hugo Sachs, Германия). Перфузию препарата осуществляли физиологическим раствором Кребса (состав, мМ: NaCl – 120; KCl – 4,8; $CaCl_2$ – 2; $MgSO_4$ – 1,2; KH_2PO_4 – 1,2; $NaHCO_3$ – 20; глюкоза – 10), pH=7,4, оксигенированного карбогеном (95% O_2, 5% CO_2) при 35±0,5°С. Мышцу раздражали с помощью платиновых электродов и электростимулятора ЭСЛ-2 импульсами прямоугольной формы частотой 0,1Гц, длительностью 5мс и амплитудой, превышающей пороговую на 20%. После периода стабилизации находили длину препарата, при которой мышца развивает максимальное изометрическое напряжение (L_{max}) и в этих условиях выполняли все эксперименты. Регистрацию мембранного потенциала и потенциала действия ПМ осуществляли стандартной микроэлектродной техникой [2]. Микроэлектроды изготавливали из тугоплавкого стекла марки С482 и заполняли раствором 2,5М KCl. Регистрацию потенциала действия (ПД) осуществляли с помощью стеклянного микроэлектрода с сопротивлением 15-20МОм. Регистрируемые данные визуализировались и сохранялись в компьютере IBM PC при помощи цифро-аналогового преобразователя Logger Lite 1,4,0 (Vernier Software & Technology, США). Статистическая обработка данных проводилась с помощью комплекта программ Origin 6,1 (Microsoft, США). Оценка достоверности результатов проведена по критерию Стьюдента, для всех представленных данных P=0,05.

Результаты и их обсуждение. Как показали результаты экспериментов, алкалоид дельфатин специфически влияет на сократительную активность папиллярной мышцы крысы. В частности, было обнаружено, что эффекты дельфатина имеют дозозависимый характер, и начиная с концентрации 3×10^{-6}М, он вызывал подавление силы сокращений, степень которого возрастала с увеличением его концентрации и достигала максимума при 3×10^{-5}М. При этом было обнаружено, что при частоте стимуляции 0,1Гц и при концентрации 5×10^{-6}М дельфатин первоначально проявляет положительный инотропный эффект и увеличивает амплитуду сократительного ответа на

18,4±1,2%, относительно контроля. Через 35мин инкубации положительный инотропный эффект дельфатина сменялся на отрицательный, с уменьшением силы сократительного ответа на 27,3±2,1% относительно контроля. Вместе с тем было обнаружено, что положительный инотропный эффект дельфатина уменьшается с увеличением частоты стимуляции и при высоких частотах (выше 1,0Гц) вообще не наблюдается [4].

С целью выяснения механизмов, лежащих в основе инотропного действия дельфатина, нами было изучено его влияние на функцию Na^+/Ca^{2+}-обменника, выполняющего важную роль в поддержании Ca^{2+}-гомеостаза кардиомиоцитов и регуляции их сократительной активности. Известно, что в кардиомиоцитах функция Na^+/Ca^{2+}-обменника является главным Ca^{2+}-вытесняющая система в течение процесса релаксация [5]. Нарушение в работе Na^+/Ca^{2+}-обменника связано патологическими сердечными фенотипами, в людях связано с патофизиологическими условиями включение аритмии и остановки сердца [8]. Локализация в мембране, биофизические свойства и молекулярные механизмы, лежащие в основу функцию Na^+/Ca^{2+}-обменника широко изучены и достаточно хорошо характеризованы. Двухвалентный катион Ni^{2+} наиболее широко используется чтобы блокировать Na^+/Ca^{2+}-обменника внеклеточной стороне в кардиомиоцитах [7]. В предварительных экспериментах было показано, что блокирование Na^+/Ca^{2+}-обменника ионами Ni^{2+} (10мМ) при частоте стимуляции 0,1Гц вызывает усиление сократительной активности мышцы на 14,5±2,2%, относительно контроля, которое объясняется увеличением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцитов и их накоплением в саркоплазматическом ретикулуме (СР) в результате нарушения Ca^{2+}-выводящей функции Na^+/Ca^{2+}-обменника. Добавление в этих условиях дельфатина (5×10^{-6}М) приводило к дальнейшему усилению сократительной активности мышцы на 11,2±2,4% (рис.1), что может указывать на то, что дельфатин также влияет на функцию Na^+/Ca^{2+}-обменника, возможно в результате модификации транспорта ионов Na^+ и Ca^{2+} через потенциал-зависимые Na^+- и Ca^{2+}-каналы сарколеммы. Подтверждением этого предположения является подавление дельфатином амплитуды ПД, в основном их восходящей фазы, что свидетельствует о блокировании потенциал-зависимых Na^+-каналов сарколеммы.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что в основе инотропного действия дельфатина лежит комплексная модификация функции потенциал-зависимых Na^+-каналов и Na^+/Ca^{2+}-обменника сарколеммы, а также Ca^{2+}-транспортирующих систем СР, приводящая к изменению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и сократительной активности кардиомиоцитов соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Усманов П.Б., Курбанов А.Ш., Хушматов Ш.С.* //Журнал Фарм. Вестник Узб. (2008) 2: 43-4;
2. *Первис* //М. (1983) 200;
3. *Шакиров Р. и др.* //Химия природн. соед. (1996) 3: 410-512;
4. *Хушматов Ш.С., Салимов Б.Т., Усманов П.Б.* //Узб. биол. журн. (2008) 5: 11-3;
5. *Blaustein, M.P., Lederer, W.J.* //Physiol. Rev. (1999) 79: 763-854;
6. *Bers D.M.* //Nature (2002) 415: 198-205;
7. *Matsuoka, S., Hilgemann D.W.* //J. Physiol. (1994) 476: 443-58;
8. *Shigekawa M., Iwamoto, T.* //Circ. Res. (2001) 88: 864-76.

БЕТА-ЭНДОРФИНПОДОБНЫЙ ПЕПТИД ПЕНТАРФИН УВЕЛИЧИВАЕТ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ КАЛЬЦИЯ У ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ

Чернов А.С.[1], Сергиевич Л.А.[2], Карнаухова Н.А.[2], Ковалицкая Ю.А.[3], Давыдова Г.А.[1]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[3]Филиал Института биоорганической химии РАН, Пущино

В процессах клеточного деления и дифференцировки, происходящих в доимплантационный период эмбриогенеза млекопитающих, важную роль играют пептидные ростовые факторы [1,2]. Одним из факторов, который влияет на развитие эмбрионов *in vivo*, является опиоидный нейропептид – бета-эндорфин. Он секретируется фолликулярными клетками, окружающими яйцеклетку, и регулирует созревание и овуляцию ооцитов [3]. Клетки эндометрия секретируют бета-эндорфин во время имплантации зародыша в стенку матки [4].

Известно, что бета-эндорфин взаимодействует как с опиоидными [5], так и с неопиоидными (не чувствительными к опиоидному антагонисту налоксону) рецепторами [6]. Способность бета-эндорфина связываться с несколькими типами рецепторов объясняется особенностями его структуры (рис.1). Молекула этого гормона содержит три различных участка связывания: N- и С-концевые фрагменты, отвечающие за связывание с опиоидными рецепторами, и центральную часть молекулы (аминокислотная последовательность 9-20(23)), которая взаимодействует только с налоксон-нечувствительными рецепторами [7,8].

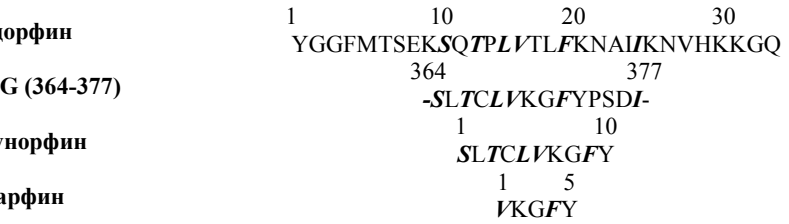


Рис.1. Аминокислотные последовательности бета-эндорфина, фрагмента 364-377 тяжелой цепи IgG, иммунорфина, пентарфина (совпадающие аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом и курсивом).

В начале 80-х годов американские ученые при выделении из экстракта плаценты человека бета-эндорфина использовали в качестве аффинного сорбента иммобилизованные антитела к этому гормону [9]. Помимо бета-эндорфина, ими была выделена тяжелая цепь IgG. Оказалось, что фрагмент 364-377 (SLTCLVKGFYPSDI) Н-цепи IgG подклассов 1-4 имеет 50% подобия с фрагментом бета-эндорфина 10-23 (рис.1).

Завьялов и соавт. синтезировали декапептид иммунорфин (рис.1), соответствующий последовательности 364-373 Н-цепи IgG человека и установили, что иммунорфин конкурирует с ^{125}I-меченным бета-эндорфином за связывание с высокоаффинным рецептором на перитонеальных макрофагах мыши [10]. О роли этого пептида в развитии млекопитающих ничего не известно. Позднее исследователями иммунорфина были получены его фрагменты и изучено специфическое связывание с мембранами головного мозга крысы. Оказалось, что самым коротким активным фрагментом иммунорфина является фрагмент 6-10 – пятичленный пептид – пентарфин (VKGFY) (рис.1). Согласно данным Наволоцкой [11], пентарфин более активен в биологических тестах, чем иммунорфин. Молекула пентарфина лишена концевых участков, ответственных за связывание с опиоидными рецепторами. Поэтому стимулирующее действие на развитие ранних эмбрионов осуществляется только через неопиоидные рецепторы бета-эндорфина [11].

Ранее нами было показано, что пентарфин оказывает стимулирующее действие на развитие ранних эмбрионов, значительно повышает жизнеспособность, снижает количество аномально развитых бластоцист [12]. По сравнению с бета-эндорфином, стимулирующее действие пентарфина выражено в большей степени.

Известно, что одним из значимых путей передачи внутриклеточного сигнала при активации опиоидных рецепторов является инозитолфосфатный цикл. Стимуляция опиоидных рецепторов приводит к образованию инозитол-1,4,5-трифосфата, который в свою очередь стимулирует выброс кальция из внутриклеточных депо [13].

Показано, что у ранних эмбрионов мыши есть опиоидные рецепторы [14]. Однако не известно, оказывает ли влияние бета-эндорфин на изменение внутриклеточного кальция у ранних эмбрионов. Имеются данные лишь о действии бета-эндорфина на созревание ооцитов мыши. При добавлении бета-эндорфина наблюдалось увеличение внутриклеточного кальция в ооцитах [15].

Целью работы было изучить влияние пентарфина на изменение уровня внутриклеточного кальция у 2-клеточных эмбрионов мыши *in vitro*.

Материалы и методы. Работа проведена на лабораторных мышах стока SHK. День обнаружения копулятивной пробки принимали за первый день беременности. 2-х клеточные зародыши вымывали из яйцеводов самок на 2-ой день беременности. Мышей забивали с помощью цервикальной дислокации. Было проведено 9 серий экспериментов. В каждом эксперименте исследовали от 4 до 11 эмбрионов.

Полученные эмбрионы культивировали в модифицированной среде Виттена без сыворотки с добавлением 2μM Fluo-3AM (Molecular Probes, UK) при 37^{o}C и 5% CO_2 в течение 30 минут. Fluo-3AM – специфический краситель с высоким сродством к Ca^{2+} в форме ацетоксиметильного (AM) эфира, что позволяет ему легко диффундировать через мембрану клетки. После окрашивания эмбрионы отмывали в PBS (HyClone, USA) дважды и помещали в лунку на предметном стекле в среде M2 (Sigma, USA). Исследования проводили с помощью метода микроспектрального флуоресцентного анализа с использованием двухволнового микрофлуориметра «Радикал ДМФ-2» («Радикал», Россия) [16]. Размер фотометрируемого участка соответствовал размеру эмбриона. Флюоресценция эмбрионов возбуждалась излучением ртутной дуговой лампы ДРШ 250-2 в длине волны 488нм.

В работе использовали пентарфин, синтезированный в Государственном научно-исследовательском институте особо чистых биопрепаратов (С.-Петербург). Пентарфин добавляли в среду с эмбрионами в конечной концентрации 10^{-7}M. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и обсуждения. На рис.2 представлены результаты изменения флуоресценции 2-клеточных эмбрионов, окрашенных Fluo-3AM в контроле (кривая 1) и опыте (кривая 2) при добавлении 10^{-7}M пентарфина. Результаты представлены в виде отношений интенсивностей флуоресценции к их начальным значениям в контроле и опыте в процентах. Измерения проводились на протяжении 75 минут с интервалом 15 минут. Интенсивность флуоресценции измеряли отдельно для каждого бластомера 2-клеточного эмбриона. Для снижения

разрушающего влияния облучения на эмбрионы, время измерения одного бластомера не превышало 5 секунд.

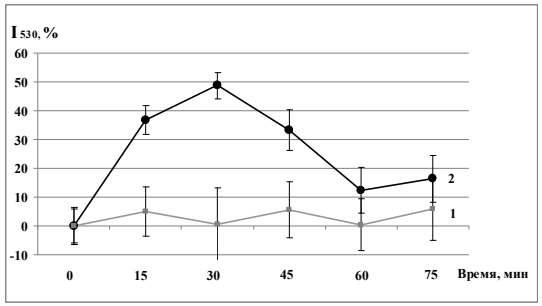


Рис.2. Влияние пентарфина (10^{-7}М) на изменение внутриклеточного кальция у 2-клеточных эмбрионов мыши. 1 – контроль; 2– опыт.

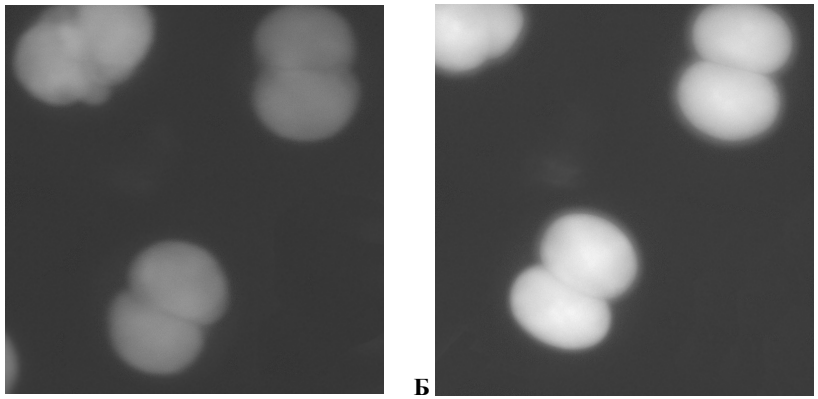


Рис.3. Эмбрионы мыши на 2-клеточной стадии, окрашенные Fluo-3AM А – контроль, Б – опыт (добавление пентарфина 10^{-7}М).

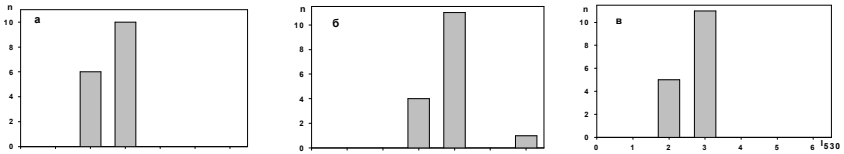


Рис.4. Гистограммы распределения эмбрионов мыши по интенсивностям флуоресценции на длине волны 530нм до (а) и через 30 (б) и 60 (в) минут после добавления пентарфина.

Из рис.2 видно, что в контроле уровень флуоресценции не менялся на протяжении всего времени измерения и соответствовал базовому уровню цитоплазматического Ca^{2+} эмбриона (рис.2 кривая 1, рис.3А).

После добавления в среду пентарфина (10^{-7}М) происходило постепенное увеличение интенсивности свечения эмбрионов в течение

первых 30 минут в среднем приблизительно на 50% (рис.2 (кривая 2), рис.3Б), после чего происходил спад до контрольного значения.

На рис.4 в качестве примера показаны гистограммы распределения количества эмбрионов по интенсивностям флуоресценции (в относительных единицах) в одной из серий экспериментов. Эмбрионы до добавления пентарфина имели низкие значения интенсивностей флуоресценции, незначительно различающиеся между собой (рис.4а). Через 30 минут после добавления пентарфина значения интенсивностей флуоресценции увеличивались, при этом гистограмма расширялась и сдвигалась вправо (рис.4б), а через 60 минут возвращалась к значениям флуоресценции, близким к контрольным значениям (рис.4в).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что взаимодействие пентарфина с неопиоидными рецепторами на поверхности эмбриона вызывает активацию внутриклеточных систем с выходом Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Можно предположить, что механизм передачи сигнала в клетке при связывании пентарфина с неопиоидными рецепторами бета-эндорфина аналогичен таковому при связывании бета-эндорфина с опиоидными рецепторами.

Для подтверждения нашего предположения в дальнейшем планируется использование блокаторов и активаторов компонентов фосфоинозитольной сигнальной системы с целью выявления их роли в процессах передачи сигнала при связывании пентарфина с неопиоидными рецепторами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Harvey M.B. et al.* //Mol. Human Reprod. (1995) 10: 712-18;
2. *Teruel M., Smith R., Catalano R.* //Biocell (2000) 24: 107-22;
3. *Lim A.T. et al.* //Nature (1983) 303: 709-11;
4. *Wahlstrom T. et al.* //Life Sci. (1985) 36: 987-90;
5. *Li C.H.* //Cell (1982) 31: 504-5;
6. *Hazum E., Chang K.-J., Cuatercasas P.* //Science (1979) 205: 1033-5;
7. *Van Der Bergh P., Rozing J., Nagelkerken L.* //Immunol. (1991) 72: 537-43;
8. *Van Der Bergh P., Rozing J., Nagelkerken L.* //Immunol. (1993) 79: 18-23;
9. *Julliard J.H. et al.* //Science (1982) 208: 183-5;
10. *Zav'yalov V.P. et al.* //Immunol. Lett. (1996) 49: 21-6;
11. *Navolotskaya E.V. et al.* //Peptides (2002) 23: 1115-9;
12. Ковалицкая Ю.А. и др. //ДАН (2005) 405(1): 137-41;
13. *Harrison C., Smart D., Lambert D.G.* //Br. J. Anaesth. (1998) 81(1): 20-8;
14. *Калюжный А.Е. и др.* //Бюл. Эксп. Биол. Мед. (1989) 108: 622-4;
15. *Dell'Aquila M.E. et al.* //Mol. Reprod. Dev. (2002) 63: 210-22;
16. *Карнаухов В.Н.* //М. (2001): 187с.

РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА НА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ СИСТЕМУ ИНФУЗОРИИ *DILEPTUS ANSER*

Шпаков А.О., Деркач К.В., Успенская З.И., Шпакова Е.А., Юдин А.Л.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН, СПб

Введение. Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) синтезируется ферментом аденилатциклазой (АЦ) и выполняет функции вторичного посредника, осуществляя передачу сигнала от активированной гормоном аденилатциклазной системы (АЦС) к цАМФ-зависимым эффекторным белкам. Еще сравнительно недавно считали, что цАМФ у эукариот функционирует исключительно как вторичный посредник. Имелись лишь единичные сообщения о том, что он может выполнять функции гормона (первичного посредника) у грибов *Dictyostelium discoideum* и *Neurospora crassa* [1,2]. У этих организмов цАМФ связывается с цАМФ-рецепторами, которые представляют собой рецепторы серпантинного типа, сопряженные с гетеротримерными G-белками. Проведенный нами анализ геномов позволил выявить белки, структурно близкие цАМФ-рецепторам *D. discoideum* и *N. crassa*, у низших (грибов *Aspergillus terreus*, *A. clavatus* и *Gibberella zeae*, инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, *T. thermophila* и *Paramecium tetraurelia*, амебы *Polysphondylium pallidum*) и высших эукариот, в том числе у млекопитающих [3]. Так, в частности, была обнаружена гомология между цАМФ-рецепторами *D. discoideum* и *N. crassa*, с одной стороны, и орфановыми рецепторами (GPR98, GPR123, GPR125, GPR126, GPR128, GPR133, GPR143 и GPR157) и Frizzled-рецепторами млекопитающих, с другой, причем наиболее отчетливо структурное сходство между ними было выражено в области цАМФ-связывающего сайта. Это свидетельствует о том, что функции цАМФ, как первичного посредника, могут быть гораздо шире и не ограничиваются отдельными представителями низших эукариот. Следует отметить, что изучение хемотаксиса и агрегации, контролируемых внеклеточным цАМФ, необходимо для понимания молекулярных основ фагоцитарной активности лимфоцитов, направленного движения сперматозоидов и других процессов, определяющих жизненно важные функции у человека и высших позвоночных животных.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния внеклеточного цАМФ на активность АЦС свободноживущей инфузории *Dileptus anser* и выяснение молекулярных механизмов регуляторного действия этого циклического нуклеотида. Ранее нами было показано, что

негормональные активаторы АЦ и некоторые гормоны позвоночных животных влияют на активность АЦС у этой инфузории, причем их действие реализуется через посредство гетеротримерных G-белков [4-6].

Методика. В опытах использовали инфузорий *D. anser*, которых культивировали в среде Prescott (кормом для них служили инфузории *T. pyriformis*). Плотность культур составляла 140-150клеток/мл. Клетки *D. anser* получали из массовой культуры одного клона инфузорий объемом до 3-4л. Их осаждали центрифугированием (600g, 3мин), трижды отмывали 20мМ Tris-HCl-буфером (pH 7.5), ресуспендировали в концентрации $5x10^5$ клеток/мл и использовали для связывания с меченым цАМФ. Гомогенат клеток инфузорий для определения активности АЦ и ГТФ-связывания получали растиранием клеток в ручном гомогенизаторе. Количество разрушенных клеток составляло не менее 95% от их общего количества.

Связывание проводили в 20мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.5), содержащем 5мМ кофеин и 10мМ ДТТ для подавления синтеза и деградации цАМФ. Для связывания брали 100мкл клеток и инкубировали их с различными концентрациями [8-^{3}H]цАМФ (1-100нМ) в течении 30мин при 25^{o}C, затем инкубационную смесь помещали на фильтры GF/B, которые трижды промывали Tris-HCl-буфером (по 5мл), высушивали и измеряли их радиоактивность. Значения специфического связывания [8-^{3}H]цАМФ рассчитывали вычитанием неспецифического связывания [8-^{3}H]цАМФ, измеренного в присутствии 10^{-4}М немеченого цАМФ, из общего связывания [8-^{3}H]цАМФ. Для расчета K_D и числа связывающих мест (B_{max}) для цАМФ кривые насыщения преобразовывали по методу Скэтчарда. Для определения аффинности сайтов, связывающих цАМФ, к различным лигандам измеряли специфическое связывание 50нМ [8-^{3}H]цАМФ в присутствии возрастающих концентраций (10^{-9}-10^{-4}М) немеченого лиганда. Значения K_i для лигандов рассчитывали по формуле $IC_{50}/(1+[S]/K_D)$, где [S] – концентрация [8-^{3}H]цАМФ, IC_{50} – концентрация немеченого лиганда, вызывающего 50%-ное замещение [8-^{3}H]цАМФ.

Определение ГТФ-связывания G-белков проводили, как описано ранее [5]. Специфическое ГТФ-связывание определяли как разность между связыванием меченого [8-^{3}H]GppNHp в пробе в отсутствие ГТФ и таковым в присутствии 10мМ ГТФ. Специфическое ГТФ-связывание выражали в пмоль [8-^{3}H]GppNHp на мг белка. Определение активности АЦ проводили, как описано ранее [6]. Активность фермента выражали в пмоль цАМФ за 1мин на мг белка.

Результаты. На первом этапе были изучены специфическое связывание [8-^{3}H]цАМФ с клетками *D. anser* и конкурентное вытеснение меченого лиганда немеченым цАМФ, N^6,$O^{2'}$-дибутирил-цАМФ (негидролизуемым аналогом цАМФ), цГМФ и аденозином, а также

влияние гуаниновых нуклеотидов, активаторов гетеротримерных G-белков, на связывание цАМФ. Циклический нуклеотид специфично связывался с клетками *D. anser* в условиях *in vivo* со значениями K_D (27нМ) и B_{max} (2.65фмоль цАМФ на 50000 клеток). В пересчете на одну клетку D. anser число связывающих мест, являющихся рецепторами для цАМФ, составило 4500, что примерно на порядок меньше числа цАМФ-рецепторов у гриба *D. discoideum* [7]. Следует отметить, что уровень неспецифического связывания, который определяли в присутствии 10^{-4}М цАМФ, был сравнительно высоким и составлял 40-50% от общего связывания. Немеченый цАМФ конкурентно вытеснял [8-^{3}H]цАМФ со значениями IC_{50} и K_i равными 48 и 17нМ, соответственно, в то время как дибутирил-цАМФ, аденозин и цГМФ в этом отношении были неэффективными. В присутствии ГТФ (10^{-4}М) наблюдалось снижение аффинности цАМФ-рецепторов к лиганду, на что указывают сдвиг вправо и изменение формы кривой конкурентного вытеснения меченого цАМФ его немеченым аналогом. Значения IC_{50} и K_i в этом случае повышались до 150 и 53нМ, соответственно. Полученные данные свидетельствуют в пользу функционального сопряжения цАМФ-рецепторов инфузории *D. anser* с гетеротримерными G-белками.

На втором этапе изучали влияние цАМФ на базальную активность АЦ, которая составила 985±75пмоль цАМФ за 1мин на мг белка, и на базальный уровень ГТФ-связывания, являющегося показателем функциональной активности G-белков, который составил 0.37±0.04 пмоль [8-^{3}H]GppNHp на мг белка. Добавление цАМФ (10^{-7}-10^{-4}М) приводило к отчетливо выраженной стимуляции фермента со значением EC_{50} равным 2мкМ. В присутствии 10^{-5}М гуанилилимидодифосфата (GppNHp), негидролизуемого аналога ГТФ, который повышал базальную активность АЦ на 117%, стимулирующий эффект цАМФ потенцировался. Потенцирующий эффект GppNHp, который рассчитывали как разность между величиной стимулированной активности фермента при совместном действии цАМФ (10^{-4}М) и GppNHp (10^{-5}М) и величиной арифметической суммы активностей при раздельном их действии, составил 31%. В присутствии сурамина (10^{-5}М), специфичного ингибитора гетеротримерных G-белков, вызываемая цАМФ стимуляция АЦ полностью подавлялась. Блокировались также стимулирующие АЦ эффекты GppNHp и совместно GppNHp и цАМФ. В концентрациях 10^{-7}-10^{-4}М цАМФ стимулировал ГТФ-связывание (EC_{50}, 8мкМ). Стимуляция циклическим нуклеотидом активности АЦ и ГТФ-связывания G-белков, а также потенцирование его АЦ эффекта в присутствии GppNHp и его ингибирование в присутствии сурамина свидетельствуют о том, что цАМФ реализует свое влияние на АЦ через гетеротримерные G-белки стимулирующего типа, родственные G_s-белкам позвоночных животных.

На заключительном этапе было изучено влияние на АЦС *D. anser* структурно близких цАМФ пуриновых нуклеотидов (АМФ, ГМФ, цГМФ), аденозина и дибутирил-цАМФ, негидролизуемого аналога цАМФ. Пуриновые нуклеотиды и аденозин (10^{-4}М) практически не влияли на базальную и стимулированную цАМФ активность АЦ. Дибутирил-цАМФ (10^{-4}М) повышал на 48% базальную активность АЦ и снижал стимулирующий АЦ эффект 10^{-4}М цАМФ (с 353 до 296%). Аденозин и цГМФ (10^{-4}М) повышали базальный уровень ГТФ-связывания на 37 и 51%, соответственно, но не влияли на стимуляцию ГТФ-связывания цАМФ. В то же время дибутирил-цАМФ снижал стимуляцию ГТФ-связывания цАМФ (со 104 до 73%), но сам сравнительно слабо влиял на базальный его уровень. Полученные результаты указывают на высокую специфичность регуляторного действия цАМФ на АЦС инфузории, а также на отсутствие заметного влияния других пуриновых нуклеотидов на цАМФ-зависимые сигнальные пути.

Обсуждение. Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что внеклеточный цАМФ стимулирует функциональную активность АЦС инфузории *D. anser*, выполняя функцию гормона (первичного посредника). Этот циклический нуклеотид специфично и с высоким сродством связывается с поверхностными рецепторами инфузорий. Значение K_D для связывания цАМФ у *D. anser* (27нМ) очень близко значениям K_D для связывания цАМФ с цАМФ-рецепторами 1-го и 3-го типов у гриба *D. discoideum* (25 и 47нМ). У *D. discoideum* имеются четыре типа цАМФ-рецепторов, которые экспрессируются на разных стадиях жизненного цикла гриба и различаются аффинностью к циклическому нуклеотиду [1]. Наиболее высоким сродством к цАМФ обладает цАМФ-рецептор 1-го типа, который экспрессируется на ранних стадиях агрегации грибов в многоклеточное образование и ответственен за направленное их движение к центрам агрегации по возрастающему градиенту цАМФ. цАМФ-рецептор 1-го типа контролирует хемотаксис у *D. discoideum*, в то время как другие типы цАМФ-рецепторов, которые экспрессируются на более поздних стадиях, ответственны за регуляцию процессов дифференцирования многоклеточного образования, формирования плодового тела и споруляции.

Совпадение значений K_D для цАМФ-рецептора инфузории и цАМФ-рецептора 1-го типа *D. discoideum* может указывать на то, что цАМФ у *D. anser*, так же как у гриба, играет роль хемоаттрактанта. При этом цАМФ у инфузории может функционировать как половой или пищевой хемоаттрактант. Второе представляется более вероятным, поскольку *D. anser* является хищником и активно преследует и поглощает другие, более мелкие, микроорганизмы, в частности

инфузории *T. pyriformis*, ориентируясь по выделяемым ими веществам. Нами обнаружено, что в геномах инфузорий рода *Tetrahymena* имеются гены, которые кодируют рецепторные белки, гомологичные цАМФ-рецепторам *D. discoideum* [3]. Не исключено, что цАМФ определяет межклеточную коммуникацию инфузорий рода *Tetrahymena*, что и может быть использовано хищной инфузорией *D. anser* для обнаружения тетрахимен, являющихся для нее источником пищи.

Сходство между чувствительными к цАМФ АЦС *D. anser* и *D. discoideum* состоит в том, что обе эти системы в качестве сопрягающего компонента включают гетеротримерные G-белки, которые ответственны за преобразование и передачу сигнала от активированного лигандом цАМФ-рецептора к эффекторным белкам, в том числе к АЦ. В пользу участия гетеротримерных G-белков в передаче цАМФ-сигнала свидетельствуют следующие обнаруженные нами факты. Во-первых, цАМФ стимулирует ГТФ-связывание G-белков. Во-вторых, в присутствии GppNHp, негидролизуемого аналога ГТФ, снижается аффинность рецептора к цАМФ, что указывает на функциональное сопряжение рецептора с гетеротримерными G-белками. Снижение аффинности иллюстрируется сдвигом вправо кривой конкурентного вытеснения меченого цАМФ его немеченым аналогом при добавлении GppNHp. В-третьих, GppNHp потенцирует стимулирующее влияние цАМФ на активность АЦ, что является одним из критериев функционального сопряжения между основными компонентами АЦС – рецептором, G-белком и АЦ. И, наконец, в присутствии сурамина, специфичного ингибитора гетеротримерных G-белков, стимулирующие эффекты цАМФ на активность АЦ и ГТФ-связывание полностью блокируются.

Связывание рецепторов инфузории с цАМФ является высоко специфичным, о чем свидетельствуют следующие факты. Во-первых, структурно близкие цАМФ аденозин и цГМФ практически не влияют на специфическое связывание цАМФ с рецепторами. Во-вторых, в присутствии пуриновых нуклеотидов и аденозина сохраняются стимулирующие эффекты цАМФ на активность АЦ и ГТФ-связывание G-белков. Заметное влияние на передачу цАМФ-сигнала оказывает только дибутирил-цАМФ. Однако его действие реализуется в сравнительно высоких концентрациях (10^{-4}М), в которых он на 40% снижает специфическое связывание цАМФ с рецепторами и ослабляет вызываемую цАМФ стимуляцию АЦ и G-белков. Низкая эффективность дибутирил-цАМФ, вероятно, обусловлена наличием двух бутирильных остатков, которые не позволяет ему успешно конкурировать с цАМФ за связывание с рецепторами в диапазоне концентраций, являющихся физиологическими для инфузорий.

Нами также обнаружено, что аденозин и цГМФ в концентрациях 10^{-4}М заметно стимулируют ГТФ-связывание G-белков, хотя при этом практически не влияют на базальную активность АЦ. Эти данные указывают на возможное участие аденозина и цГМФ в регуляции сопряженных с G-белками сигнальных каскадов, которые не включают АЦ в качестве эффекторного звена. Сигнальные механизмы действия аденозина и цГМФ в клетках инфузорий *D. anser* требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, нами впервые показано, что АЦС свободноживущих инфузорий *D. anser* стимулируется внеклеточным цАМФ, который специфично связывается с поверхностными рецепторами и реализует свое регуляторное влияние на фермент АЦ через посредство гетеротримерных G-белков. Эти результаты свидетельствуют о том, что цАМФ у инфузорий не только является вторичным посредником, регулирующим цАМФ-зависимые сигнальные каскады, но и выполняет функцию внешнего сигнала, запускающего эти каскады извне.

Работа поддержана РФФИ №09-04-00692а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dornmann D., et al.* //J. Cell Sci. (2001) 114: 2513-23;
2. *Krystofova S., Borkovich K.A.* //Eukaryot. Cell. (2006) 5: 1503-16;
3. *Shpakov A.O., Pertseva M.N.* //Int. Rev. Cell Mol. Biol. (2008) 269: 151-282;
4. *Деркач К.В., и др.* //Цитология (2002) 44: 1129-34;
5. *Шпаков А.О., и др.* //Журн. Эвол. Биохим. Физиол. (2004) 40: 290-7;
6. *Шпаков А.О., и др.* //Журн. Эвол. Биохим. Физиол. (2007) 43: 109-15;
7. *Haastert P.J., Bishop J.D., Gomer R.H.* //J. Cell. Biol. (1996) 134: 1543-9.

ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ И БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВИДЕТЕЛЬСТВА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДОФАМИНА С ЦИТОСКЕЛЕТОМ

Шубина В.С.[1,2], Софин А.Д.[3], Лавровская В.П.[2], Вихлянцев И.М.[2], Безгина Е.Н.[2], Павлик Л.Л.[1,2], Мошков Д.А.[1,2]

[1]Пущинский государственный университет
[2]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[3]Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Нарушение баланса между дофаминергической и глутаматергической системами мозга лежит в основе различных невропатологий. Механизм такого нарушения невозможно определить

без решения главного вопроса о клеточной мишени, на которую действуют нейротрансмиттеры. На этот счет существует две точки зрения. Первая, ее можно считать классической и общепринятой, рассматривает в качестве мишени специфические рецепторы, расположенные на плазматической мембране нейрона [8]. Химические лигандные взаимодействия нейротрансмиттера с ними приводят к функциональному сдвигу благодаря изменению баланса транспортируемых в нейрон ионов и активации каскада внутриклеточных вторичных мессенджеров. Вторая предполагает, что нейротрансмиттер сам по себе как химически активное вещество способен взаимодействовать с некоторыми молекулярными компонентами клетки, такими как липиды, а также структурные и ферментные белки мембран и цитозоля, изменять их физико-химические свойства и таким образом трофически нарушать клеточную функцию [1,5,7]. Недавними биофизическими и ультраструктурными исследованиями трофического эффекта нейротрансмиттеров дофамина (ДА) и глутамата (ГЛУ) установлено, что их внутриклеточной мишенью является специальный органоид, организующий множество сигнальных внутриклеточных и межклеточных процессов, а именно цитоскелет, главным образом, его актиновый компонент [2,3]. В частности, показано, что аппликация ДА на маутнеровские нейроны (МН) золотой рыбки приводит к усилению резистентности утомлению и к гипертрофии специализированных синаптических контактов, предполагающей дополнительную полимеризацию в них актина. Аппликация ГЛУ, наоборот, повышает утомляемость МН и разрушает цитоскелет клетки, деполимеризуя актин [1]. Аналогичный противоположный эффект на агрегатное состояние актина ДА и ГЛУ обнаруживается *in vitro*. Кроме того, показано, что ДА способен проникать через фосфолипидную мембрану и полимеризовать актин, предварительно заключенный в липосомы [4]. Оставалось невыясненным, каким образом ДА и ГЛУ взаимодействуют с актином и влияют на его свойства. Также представлялось необходимым доказать действительное проникновение ДА внутрь живой клетки путем его визуализации цитохимическим методом. Изучению этих вопросов посвящена настоящая работа.

Использованы следующие методики. Г-актин выделяли из скелетных мышц кролика по стандартному методу [9]. Взаимодействие ДА с актином исследовали при 4°С в течение 3сут, добавляя его к раствору глобулярного (Г-) актина в среде, содержащей 2мМ ТРИС, 0,2мМ NaATP, 0,2мМ $CaCl_2$ и меркаптоэтанол (pH=7,4). Использовали ДА в концентрациях $2{,}4\times10^{-4}$М, $2{,}4\times10^{-3}$М, $8{,}3\times10^{-3}$М, $2{,}4\times10^{-2}$М и 0,035М, так чтобы отношение молярных концентраций Г-актин/ДА было равно 1:10, 1:100, 1:350, 1:1000 и 1:1500. Образование нитей филаментозного (Ф-) актина контролировали методом электронной

микроскопии. Сформированный Ф-актин центрифугировали при 4500об/мин в течение 40мин, используя концентраторы с порогом отсечения 10кДа. Фильтрат собирали и, используя метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), определяли количество прошедшего ДА. Осадок на фильтре подвергали действию либо 4М мочевины (1ч), либо ГЛУ в концентрации 8мг/мл (4ч) при комнатной температуре, после чего методом ВЭЖХ определяли количество мономерного актина и аффинно-связанного с ним ДА.

Контрольные препараты (Г-актин и Ф-актин, образованный под действием 100мМ KCl) подвергались тем же воздействиям, что и опытные образцы.

В опытах по ВЭЖХ аликвоты отбирали в объеме 20мкл и пропускали через гель-фильтрующую колонку NUCLEOGEL GFC 300-8 (300x7,7мм) в буфере, содержащем 2мМ ТРИС, 0,2мМ $CaCl_2$, 150мМ NaCl (pH=7,4). Детекцию осуществляли по измерению оптической плотности при λ=280нм.

Константа связывания определялась по уравнению Скетчарда, исходя из отношения свободного и связанного количества ДА.

Для электронной микроскопии образцы объемом 5мкл наносили на сеточки с пленкой-подложкой из формвара или пиолоформа, укрепленной углеродом. Препарат окрашивали уранилацетатом. и исследовали в электронном микроскопе TESLA BS-500 при увеличении 32000x.

Для цитохимической визуализации ДА использовали клеточную культуру ВНК-21. ДА добавляли в среду инкубации либо одновременно с посевом клеток (до их распластывания), либо на 3 сутки роста клеток в стандартных условиях после формирования монослоя. В последнем случае на дне чашки Петри находилось покровное стекло, к которому прикреплялись клетки и на котором они продолжали свой рост до образования монослоя. Клетки инкубировали с ДА в буферном растворе, содержащем 0,9% NaCl, 5мМ HEPES, 5мМ глюкозы, 1мМ $CaCl_2$, 1мМ $MgCl_2$ (pH=7,2) и антиоксидант-метабисульфит натрия (200мкМ) при 37°С и 5% CO_2. Использовали концентрации ДА от 10 до 1000мкМ и время его действия от 30мин до 5ч. После инкубации клетки трижды отмывали от ДА. Суспензии клеток наносили в виде мазка на предметное стекло, монослой изучали прямо на покровном стекле, на котором он формировался. Цитохимическую реакцию на ДА, проникшего внутрь клеток ВНК-21, осуществляли по методу Фалька [6]. Кратко, полученные препараты клеток высушивали 2сут над концентрированной серной кислотой, и нагревали до 80°С над параформальдегидом. Изохинолины, образовавшиеся в процессе конденсации катехоламинов и паров формальдегида, визуализировали с помощью флуоресцентного

микроскопа (Люмам-ИЗ) по флуоресценции при 490-500нм (λ_{ex}=330, 375нм).

Результаты исследований суммированы ниже. Анализ ультраструктурных данных, полученных с помощью электронной микроскопии, показывает, что ДА вызывает полимеризацию Г-актина (рис.1), при этом степень полимеризации увеличивается с возрастанием концентрации ДА, а, следовательно, с возрастанием молярного соотношения Г-актин/ДА (1:10; 1:100; 1:350; 1:1000; 1:1500). Видно, что с ростом концентрации ДА число нитей и их протяженность в случайно выбранных участках в поле зрения микроскопа увеличивается. Используя метод ВЭЖХ, определено количество ДА, аффинно связанного с актином. Насыщение наблюдается при соотношении Г-актин/ДА примерно 1молекула Г-актина/100 молекул ДА. По предварительным данным константа связывания актина с ДА составляет $2{,}1\cdot10^{-2}\pm1{,}2\cdot10^{-2}$. С учетом возможности образования комплекса ДА/актин можно предположить, что степень полимеризации зависит от концентрации обоих компонентов в системе. Определено, что нити Ф-актина, сформированные под влиянием ДА, подвержены деполимеризации при действии другого нейротрансмиттера – ГЛУ, который, как было показано ранее, не только предотвращает образование нитей Ф-актина под воздействием 100мМ KCl, но также деполимеризует Ф-актин, предварительно полученный взаимодействием со 100мМ KCl [1]. Установлено, что если в среду инкубации с Г-актином и ДА вводить ГЛУ, полимеризации актина не наблюдается в течение 4ч и более, тогда как совместная инкубация Г-актина и ДА при прочих равных условиях уже через 30мин (при комнатной температуре) практически полностью полимеризует актин. Кроме того, показано, что добавление ГЛУ в среду, содержащую в себе ДА и Ф-актин, образованный под влиянием ДА, приводит к практически полному исчезновению фибрилл спустя 4 часа и высвобождению ДА в среду инкубации (подобный эффект наблюдается при деполимеризации Ф-актина, полученного под воздействием ДА, мочевиной). Это свидетельствует о включении ДА в структуру полимерного актина.

Результаты по окраске катехоламинов, в нашем случае ДА, внутри клеток ВНК-21 представлены на рис.2. Данные показывают, что воздействия препаративных процедур не повреждают морфологии клеток, целостность их структуры не нарушается, размер и форма полностью идентичны интактным клеткам, визуализированным классическими гистологическими методами (не представлено). Видно, что контрольные клетки ВНК-21 обладают собственной небольшой флуоресценцией в данном диапазоне длин волн, по-видимому, связанной с наличием эндогенных катехоламинов и индоламинов (рис.2а). Инкубация клеток в присутствии ДА приводит к значительному

повышению интенсивности флуоресценции (рис.2б), что свидетельствует о присутствии больших количеств ДА в цитоплазме клеток, безусловно, проникшему из среды инкубации в процессе культивирования. Яркость свечения цитозоля увеличивается с ростом концентрации и временем действия ДА. Способность ДА проникать внутрь клеток обнаруживается не только в случае нахождения их в суспензии, но также при добавлении ДА к предварительно сформированному монослою (рис.2в,г). И в этом случае специфическая морфология клеток, типичная для распластанных фибробластов (полигональная или веретеновидная форма) сохраняется. При этом интенсивность свечения цитоплазмы многократно повышается, если в культуральной среде находился ДА. В то же время, существенно, что клетки, подвергшиеся воздействию ДА до прикрепления к субстрату, при условиях равенства концентрации и длительности действия ДА, обладают большей яркостью, чем клетки в монослое.

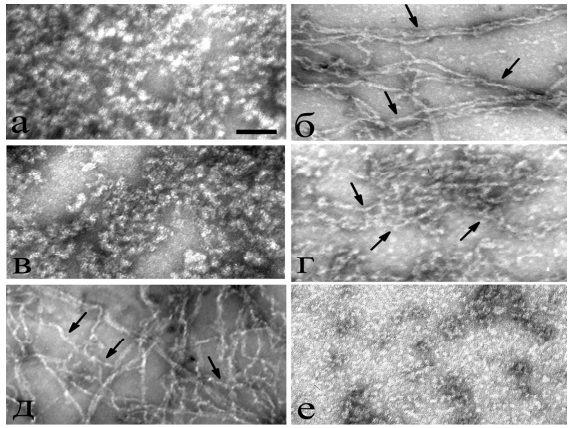


Рис.1. Ультраструктура препаратов Г-актина при его инкубации в различных средах (негативное контрастирование). а–Г-актин (контрольный препарат) после инкубации в течение 4ч в присутствии 10мМ KCl. б–контрольный препарат Ф-актина, сформированного под воздействием 100мМ KCl. в–Г-актин после взаимодействия с ДА (молярное соотношение Г-актин/ДА=1/10) сохраняет глобулярную структуру, практически идентичную контрольной. г, д–Г-актин после инкубации с ДА в соотношении 1/100 (г) и 1/1000 (д). Появляются нити Ф-актина, длина которых прямо зависит от концентрации ДА. е–препарат Ф-актина, сформированного при взаимодействии с ДА, после 4ч инкубации в присутствии ГЛУ. Наблюдается практически полное превращение Ф-актина в Г-актин. Стрелками указаны нити Ф-актина. Масштабная линейка 0,1мкм.

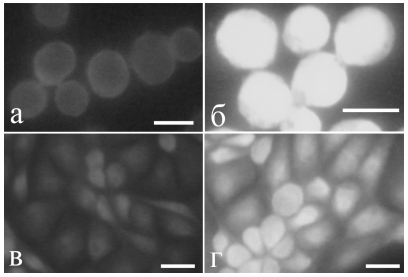


Рис.2. Контрольные клетки ВНК-21 и клетки, подвергшиеся действию дофамина, окрашенные по реакции Фалька. Контрольные препараты суспензии клеток (а) и монослоя (в); б, г–клетки ВНК-21 спустя 5ч инкубации с дофамином в концентрации 1000мкМ. Масштабная линейка 10мкм.

Последнее можно объяснить большей пропорцией Г-актина (до 70%) в цитозоле неприкрепившихся клеток, служащего субстратом для захватывания ДА. Распластанные клетки обладают развитым актиновым цитоскелетом, не взаимодействующим с ДА (пропорция Ф-актина достигает 70%). Оставшаяся часть Г-актина способна связаться с меньшим количеством ДА, что и обусловливает ослабление общей интенсивности флуоресценции. Таким образом, с одной стороны, полученные данные свидетельствуют о том, что ДА способен проникать через плазматическую мембрану живой клетки, что приводит к увеличению цитозольной концентрации данного катехоламина. С другой стороны, в экспериментах *in vitro* показано, что в присутствии ДА мономерный актин формирует многочисленные протяженные нити, т.е. полимеризуется, в то время как ГЛУ оказывает на агрегатное состояние актина противоположное действие, что согласуется с полученными ранее результатами в экспериментах *in vivo* [1]. Данное обстоятельство приводит к предположению, что нейротрансмиттеры способны оказывать неспецифическое действие на постсинаптический нейрон, влияя на актиновый цитоскелет клетки, который, как известно, играет ключевую роль в функционировании нейрона, в том числе и во внутриклеточной и межклеточной сигнализации.

Работа финансировалась грантами поддержки научных школ НШ №217.2008.4 и «Развития научного потенциала высшей школы» №3840.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Безгина Е.Н. и др.* //Нейрофизиол. (2006) 38(4): 320-30;
2. *Дзебан Д.А. и др.* //Морфология (2003) 123(2): 33-8;
3. *Павлик Л.Л. и др.* //Морфология (2003) 123(1): 41-5.
4. *Павлик Л.Л. и др.* //Биофизика (2008) 53(1): 66-72;
5. *Cantor R.S.* //Biochemistry (2003) 42(41): 11891-7;
6. *Lindvall O. et al.* //J. Histochem. Cytochem. (1975) 9: 697-9;
7. *Milutinovic, P.S. et al.* //Anesth. Analg. (2007) 105(2): 386-92;
8. *Missale C. et al.* //Physiol. Rev. (1998) 78(1): 189-225;
9. *Pardee J.D., Spudich J.A.* //Meth. Cell Biol. (1982) 24(1): 271-89.

Научное издание

Международная конференция
РЕЦЕПЦИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

(2-4 июня 2009 г.)

Сборник статей

Под редакцией В.П. Зинченко, С.С. Колесникова, А.В. Бережнова

Том 1

Материалы изданы в авторской редакции с пленок, предоставленных ИБК РАН

Лицензия ЛР №040829 от 11 июля 1997 г.

Налоговая льгота – общероссийский классификатор продукции
ОК–005–93, том 2; 953000 – книги и брошюры.

Подписано в печать 05.05.2009 г. Формат 60×90/16. Печать офсетная.
Бумага офсетная. Усл.печ.л. 25,5. Тираж 160 экз. Заказ 10720.

Отпечатано с оригинала-макета в Объединенном научно-техническом издательстве
Пущинского научного центра РАН.
142290, г.Пущино Московской обл., проспект Науки, 3. ОНТИ.