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 2

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.

РОЛЬ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ В ПРОЦЕССАХ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА

Асланиди К.Б.[1], Мякишева С.Н.[2]

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

Известно, что переключение генетических программ клетки осуществляется под действием целого ряда веществ гормональной природы. Связываясь с соответствующими рецепторами, эти вещества изменяют мембранную проницаемость для неорганических ионов и тем самым меняют внутриклеточное содержание соответствующих ионов. Расчеты показывают, что аналогичные сдвиги ионного состава внутриклеточной среды можно получить изменением внешней среды [1]. Многочисленные экспериментальные данные также указывают на участие градиента неорганических ионов на плазматической мембране в переключении основных режимов функционирования клетки [2,3,4]. В последние годы особая роль в процессах внутриклеточной регуляции отводится перекиси водорода, которая функционирует как сигнальная молекула, вовлеченная не только в энергетический обмен, но и в ответы на стресс или сигналы роста [5].

Целью нашей работы было выявление роли отдельных компонентов сложных культуральных сред в этих процессах.

Ниже будет показано, что для бессывороточных сред существуют вполне определённые значения концентраций ионов $[Na^+]_o$, аминокислот, углеводов и значения pH, при которых скорость дифференцировки клеток нейробластомы была минимальной, а скорость пролиферации, соответственно, – максимальной.

Исследования проводились на клетках нейробластомы N1E-115 мыши, которые культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки при 37°C (№2 в табл.1.) [7]. Плотность посева в стандартных пластиковых флаконах составляла 1×10^4 клеток на см^2. Для индукции дифференцировки и последующей гибели клеток использовали бессывороточные среды DMEM (№3, 4, 5, 6), раствор Hanks (№8, 9, 10), среду Лейбовитца L-15 [6] (№7) и среду Гелетюка-Костенко [7] (№11).Через сутки клетки переводили на одну из сред, представленных в таблице 1.

Все исследованные среды вызывали полноценную дифференцировку и последующую гибель клеток. Степень

морфологической дифференцировки определяли как долю клеток, образующих отростки, длина которых более чем в 2 раза превышала диаметр сомы клетки. В качестве критериев, характеризующих процесс дифференцировки, были выбраны: 1. Время воздействия, за которое доля дифференцированных клеток достигала 70±10% (далее – время дифференцировки – $t_{дифф.}$); 2. Время воздействия, за которое гибель клеток достигала 85±10% (далее – время гибели – $t_{гиб.}$).

Табл.1. Составы использованных сред.

№	Молярность Σ [C_i], мМ	pH	[Na^+], мМ	[K^+], мМ	[Ca^{2+}], мМ	$\frac{[Na^+]}{[K^+]}$	Аминокислоты и витамины, мМ	Углеводы, мМ
1*	377	8,2	185	5,4	4,3	34,3	11,2	6,6
2	350	7,5	160	5,4	1,8	29,6	11,2	6,6
3	377	7,5	185	5,4	4,3	34,3	11,2	6,6
4	350	6,8	160	5,4	1,8	29,6	11,2	6,6
5	350	7,5	160	5,4	1,8	29,6	11,2	6,6
6	350	8,2	160	5,4	1,8	29,6	11,2	6,6
7	354	7,6	150	5,8	1,3	25,9	33,6	10
8	323	6,8	137	5,35	1,26	25,6	0	5,56
9	323	7,4	137	5,35	1,26	25,6	0	5,56
10	323	8,2	137	5,35	1,26	25,6	0	5,56
11	214	7,5	90	5	2	18	0,97	11,1

*-к среде DMEM добавлено 10% сыворотки, 25мМ NaCl, 2,5мМ $CaCl_2$.

В нейтральной бессывороточной среде DMEM время дифференцировки составляло 24 часа, а время гибели 120 часов. Наибольшая интенсивность пролиферации наблюдалась в среде №2 (DMEM после добавления 10% сыворотки). Количество дифференцированных клеток не зависело от длительности культивирования и не превышало 2-3%. Гипертоническая среда №1, созданная на основе DMEM и содержащая 10% сыворотки, а также 185мМ NaCl и 4,3мМ $CaCl_2$,, увеличивала время дифференцировки клеток в 3 раза, а время гибели дифференцированных клеток – почти в 2 раза.

Для выявления влияния кислотности среды в диапазоне от pH 6,8 до pH 8,2 использовали бессывороточные среды DMEM (№4, 5, 6) и раствор Hanks (№8, 9, 10). Минимальная скорость дифференцировки и максимальная скорость гибели регистрировались при нейтральном pH. При изменении pH от 6,8 (среды №4, №8) до 8,2 (среды №6, №10) как скорость дифференцировки, так и скорость гибели дифференцированных клеток могли изменяться более чем в 2 раза.

При нейтральных pH гипертонический раствор (№3) слабо влиял как на скорость дифференцировки, так и на скорость гибели. Высокое

содержание аминокислот и углеводов в среде №7 практически не влияло на дифференцировку, но почти в 2 раза уменьшало время гибели дифференцированных клеток. Гипотонический раствор с высоким содержанием углеводов ускорял не только дифференцировку, но и гибель дифференцированных клеток.

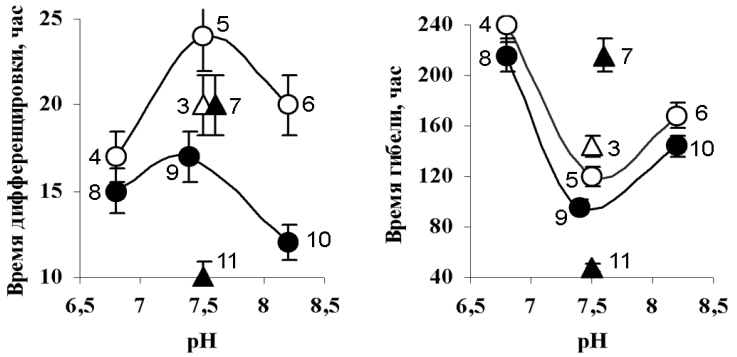


Рис.1. Зависимость времени дифференцировки (слева) и времени гибели дифференцированных клеток нейробластомы (справа) от pH индуцирующей среды. Полыми кружками обозначены модификации среды DMEM, а тёмными – модификации раствора Hanks. Цифры около экспериментальных точек соответствуют номерам сред в табл.1.

Анализировалось влияние содержания ионов Na^+, K^+ и Ca^{2+}, а также отношения Na^+/K^+ в различных не содержащих сыворотку средах (см. табл.1: №3, №5, №7, №9, №11) на времена дифференцировки и времена гибели клеток нейробластомы при pH 7,5.

Зависимость времени дифференцировки ($t_{дифф.}$) от содержания ионов Na^+ хорошо описывалась полиномом второй степени: $t_{дифф.}$=-0,0017 ($[Na^+]_o$)2+0,58 $[Na^+]_o$ - 29,001, при R2=0,8644. Это означает, что при 160мМ<$[Na^+]_o$<180мМ скорость дифференцировки была минимальной. Высокие значения $[Na^+]_o$ способствовали длительному переживанию дифференцированных клеток. Более того, времена гибели клеток с большой точностью (R2=0,9998) были пропорциональны содержанию $[Na^+]_o$: $t_{гиб.}$=1,0143$[Na^+]_o$ - 43,044. Это означает, что при $[Na^+]_o$<40мМ клетки очень быстро погибнут. Указанные зависимости практически не нарушалась при изменении pH среды. Отметим, что времена дифференцировки и гибели дифференцированных клеток аналогичным образом зависели от соотношения Na^+/K^+ и осмотичности сред. Из общего ряда выделялась среда №7, в которой содержание аминокислот в 3 раза превышало их содержание в средах №3 и №5. Таким образом, высокое содержание аминокислот не влияло на скорость дифференцировки, однако, в 2 раза увеличивало время выживания

дифференцированных клеток. Зависимость времен дифференцировки и гибели клеток от содержания кальция (1,26мМ>$[Ca^{2+}]_o$>4,3мМ) и калия (5,0мМ>$[K^+]_o$>5,8мМ) в различных средах (№3, №5, №7, №9, №11) при pH 7,5 обнаружить не удалось.

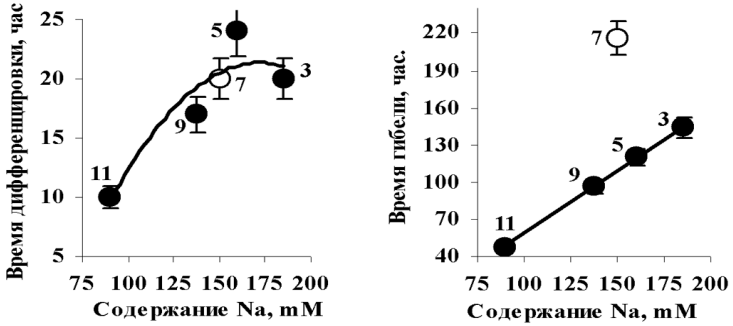


Рис.2. Зависимость времени дифференцировки клеток (слева) и времени гибели дифференцированных клеток нейробластомы (справа) от содержания ионов Na^+ в индуцирующей среды. Цифры около экспериментальных точек соответствуют номерам сред в табл.1.

Анализ влияния осмотичности питательной среды на дифференцировку клеток нейробластомы проводили с использованием не содержащих сыворотку индуцирующих сред (№3, 5, 7, 9, 11). Как скорость дифференцировки, так и скорость гибели дифференцированных клеток незначительно уменьшались с ростом осмотичности. Время дифференцировки имело максимум в области гипертонических сред.

Углеводы, также как и кислород, являются субстратами дыхательной цепи, ответственной за продукцию перекиси водорода. Зависимость времени дифференцировки нейробластомы от содержания углеводов для сред с pH 7,5 имела максимум (см. рис.2.).

Это означает, что при содержании углеводов в индуцирующей среде порядка 8-9мМ скорость дифференцировки была минимальной, а скорость пролиферации – максимальной. Времена гибели клеток нейробластомы были прямо пропорциональны содержанию углеводов $C_{угл}$ в среде: $t_{гиб.}$=26,199 $C_{угл}$ – 44,3721 (R2=0,9575). Из этой зависимости следует, что при концентрации углеводов менее 1,7мМ время выживания клеток будет нулевым, и такие концентрации являются летальными. Исключение составляла гипотоническая среда Гелетюка-Костенко, уменьшающая время выживания почти в 5 раз. Причиной быстрой гибели дифференцированных клеток в среде №11 являлось, по-видимому, низкое содержание ионов Na^+ и/или аминокислот.

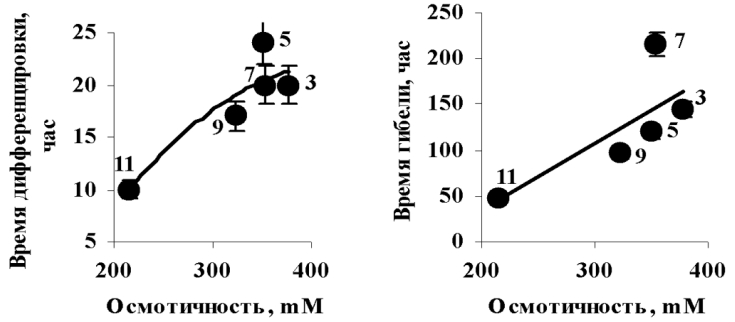


Рис.3. Зависимость времени дифференцировки клеток (слева) и времени гибели дифференцированных клеток нейробластомы (справа) от осмотичности среды. Цифры около экспериментальных точек соответствуют номерам сред в табл.1.

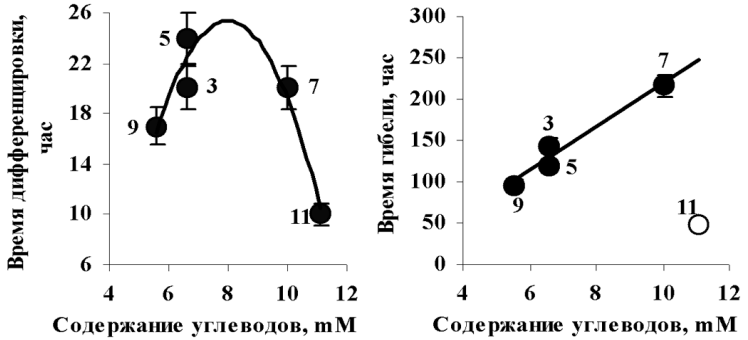


Рис.4. Зависимость времени дифференцировки клеток (слева) и времени гибели клеток нейробластомы (справа) от содержания углеводов в индуцирующей среде. Цифры около экспериментальных точек соответствуют номерам сред в табл.1.

Таким образом, проведённый анализ выявил оптимальные для пролиферации значения компонентов бессывороточной среды. Скорость дифференцировки росла при изменениях параметров от оптимальных, как в сторону их увеличения, так и в сторону уменьшения. Можно ожидать, что активная пролиферация культуры в стандартной среде DMEM, содержащей 10% сыворотки, определяется как минимум 4 параметрами. В частности, для максимальной пролиферации уровень углеводов должен поддерживаться в диапазоне 7,5-9,5мМ, аминокислот в диапазоне 15-25мМ, 165мМ<$[Na^+]_o$<185мМ при pH 7,6-7,7. Лучше всего клетки переживали в средах №4, №7 и №8. Следовательно, можем полагать, что дифференцированные клетки в отличие от пролиферирующих, практически не нуждаются в аминокислотах и

витаминах, а достаточный уровень углеводов можно оценить величиной порядка 5,6мМ. Этот состав препятствует переходу клеток нейробластомы в состояние программируемой клеточной гибели. Считается установленным, что пролиферации, дифференцировке и программируемой гибели клетки соответствуют разные уровни перекиси водорода [3,8].

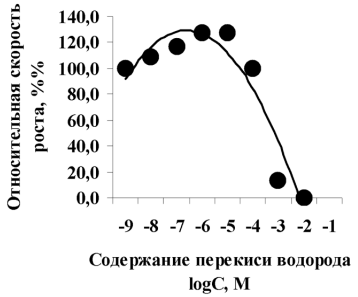


Рис.5. Зависимость относительной скорости роста верхушки мицелиального гриба *Alternaria alternate* от содержания перекиси водорода в окружающей среде [9]. На экспериментальные точки наложена линия тренда V/V0=-6,5581(logC)2+44,398(logC)+54,06. R2=0,9015. Регистрируемое в экспериментах удлинение верхушки является показателем увеличения биомассы. Следовательно, в эксперименте регистрировалась скорость пролиферации V, нормированная на фоновое значение V0, полученное при содержании перекиси водорода во внешней среде $C=10^{-9}$M.

Пролиферирующим клеткам соответствуют определённые концентрации перекиси водорода. Отклонение любого из параметров среды от оптимальных приводит к изменению продукции перекиси водорода дыхательной цепью [2,8]. Незначительное отклонение приведёт к дифференцировке, а более сильное – к апоптозу и даже к некрозу [2]. В этих представлениях обратимость дифференцировки или злокачественный рост могут вызываться не только окислительным стрессом, но и активацией антиоксидантных систем [2,5].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Aslanidi K.B., Panfilov A.V.* //Math. Biosci. (1986) 79: 45-54;
2. *Meir A.* //Modulator (2004) 18: 2-7;
3. *Скулачев В.П.* //Биохимия (2007) 72(12): 1700-14;
4. *Levin M.* //Trends Cell Biol. (2007) 17(6): 261270;
5. *Marco G. et al.* //Mol. Cell Biol. (2007) 8: 722-8;
6. *Leibovitz A.* //Tis. Cult. Assoc. Manual. (1977) 3: 557-9;
7. *Kostenko M.A., Myakisheva S.N., Popov V.I.* //Neurosci. Behav. Physiol. (1997) 27(5): 516-23;
8. *Fraker C.A. et al.* //Stem Cells (2007) 25: 3155-64;
9. *Асланиди К.Б. и др.* //ДАН (2003) 392(1): 1-3.

МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ, СОДЕРЖАЩИЕ Р65 СУБЪЕДИНИЦУ ФАКТОРА NF-κB И БЕЛКИ ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛЕТКАХ А431

Бобков Д.Е., Кропачёва И.В., Пинаев Г.П.

Институт цитологии РАН, С.-Петербург

В настоящее время принято считать, что цитоскелет принимает участие в проведении внутриклеточных сигналов и регуляции экспрессии генов [1,2], однако конкретные механизмы этого явления до сих пор остаются неясными. Одним из возможных механизмов может быть участие белков цитоскелета в качестве скаффолдов, на которых образуются мультимолекулярные комплексы, включающие сигнальные молекулы.

Ранее нами было обнаружено, что NF-κB, который является широко распространённым быстро индуцибельным транскрипционным фактором [3], солокализуется с актиновыми структурами, стресс-фибриллами и фокальными контактами и взаимодействует с фибриллярным актином *in vitro* [4], однако было неясно, с какими белками цитоскелета он может взаимодействовать. Так как появились данные о том, что киназа MEKK1, являющаяся одним из активаторов NF-κB, способна взаимодействовать с актин-связывающим белком α-актинином [5], были проведены исследования, которые показали, что возможность взаимодействия в цитоплазме p65-субъединицы NF-κB и α-актинина-4 действительно существует. Методами иммунофлюоресценции и конфокальной микроскопии нами было показано, что α-актинин-4 и p65 солокализуются в цитоплазме и совместно перераспределяются в ядро под действием ростовых факторов и цитохалазина D [6]. Также было показано, что в иммунопреципитатах из тотальных лизатов обнаруживаются оба белка, даже при реорганизации цитоскелета под действием эпидермального фактора роста или цитохалазина D, а субъединицы NF-κB p65 и p50 выявляются среди белков, взаимодействующих с α-актинином при аффинной хроматографии [7]. При этом оставалось неясным, являются ли эти белки элементами одного комплекса.

В связи с этим, целью данной работы было выяснение, входят ли белки p65 и α-актинин-4 в состав одного комплекса. Взаимодействие цитоскелетных белков с сигнальными молекулами может быть недостаточно прочным, и, следовательно, комплексы могут разрушаться в процессе выделения. Поэтому мы решили использовать метод предварительной обработки клеток низкими концентрациями

формальдегида, который и применяют для создания сшивок между взаимодействующими белками [8].

Материалы и методы. Клетки эпидермоидной карциномы человека линии А431 были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН). Клетки культивировали при 37°С в среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной сыворотки. Для экспериментов использовали культуры, достигшие субконфлюентного состояния. В одном эксперименте использовали 6 культуральных чашек диаметром 9см. Клетки предварительно обрабатывали в течение 10 минут раствором 30мкМ формальдегида в бессывороточной среде. Действие формальдегида останавливали сменой среды на 0,125М раствор глицина на PBS в течение 5 минут. Клетки лизировали SF-буфером (100мМ NaF, 50мМ KCl, 2мМ $MgCl_2$, 1мМ EGTA, 10мМ К-фосфатный буфер pH 7,0, 0,5М сахароза, 1% тритон Х-100, ингибиторы протеаз). Лизис проводили 10 минут на льду и затем из разрушенных клеток центрифугированием при 12000g осаждали тритон-нерастворимую фракцию, а супернатант фильтровали через 0,45мкм фильтр (Millipore, США). 400мкл полученного лизата наносили на колонку superose 6HR (GE Healthcare, США) в системе FPLC Pharmacia System (Pharmacia, Швеция). Элюцию проводили F-буфером (100мМ NaF, 50мМ KCl, 2мМ $MgCl_2$, 10мМ К-фосфатный буфер pH 7,0) при скорости потока 0,2мл/мин, фракции собирали на льду по 0,4мл. Относительное количество белка в подвижной фазе на выходе из колонки измерялось в динамическом режиме с помощью оптического детектора UV-1 (Pharmacia) на длине волны 280нм. Во фракции добавляли 0,05% диоксихалат натрия и 5% трихлоруксусную кислоту, затем их замораживали и осаждали белки центрифугированием при 15000g. Белки разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS [9]. Использовали 12,5%-ный гель. После электрофореза гель окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым или переносили на мембрану Immobilon-P (Millipore, США) [10]. Перенос белков с геля на мембрану проводили в Трис-глициновом буфере pH 8,3, с 10%-ным метанолом и 0,1%-ным SDS. Иммуноблотинг проводили в соответствии с ECL Western blotting protocols (Amersham). Мембрану промывали 20мин буфером TBST (25мМ Трис-HCl pH 7,4, 150мМ NaCl и 0,1% Твина-20) с последующим блокированием 5%-ым обезжиренным сухим молоком, разведённым на TBST, в течение 1ч. Для усиления сигнала на иммуноблотинге использовали субстраты SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, США). Хемилюминисцентное излучение регистрировали при помощи системы ChemiDoc (Bio-Rad, США). В работе использовали моноклональные антитела мыши против α-тубулина, высокомолекулярных изоформ тропомиозина (Sigma, США), α-

актинина-1 (Santa Cruz Biotechnology, США) и поликлональные кроличьи антитела против α-актинина-4 (ImmunoGlobe, Германия) и p65-субъединицы NF-κB (Abcam, Англия). В качестве вторых антител в иммуноблотинге использовали кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши, и козьи антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). Для удаления неспецифически связывающихся белков в полученные в результате гель-фильтрации фракции добавляли смесь сефарозы с белком G (Amersham, Швеция) из расчёта 50мкл на 1мл и инкубировали, аккуратно перемешивая, 1 час при 4°С. Затем сефарозу осаждали центрифугированием при 2000g, к супернатанту добавляли антитела и инкубировали, аккуратно перемешивая, в течение ночи при 4°С. Затем добавляли смесь сефарозы с белком G и инкубировали, аккуратно перемешивая, в течение 4 часов при 4°С. Иммунопреципитаты осаждали центрифугированием при 2000g, промывали 4 раза раствором PBS и разделяли методом электрофореза с последующим иммуноблотингом.

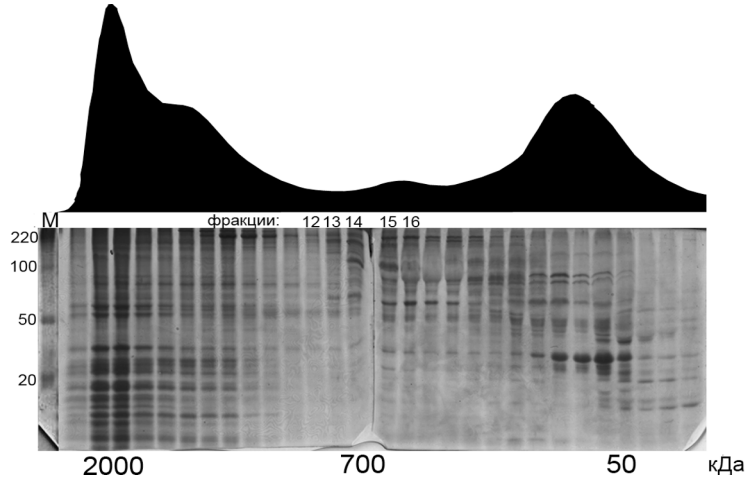


Рис.1. Профиль элюции и электрофореграмма разделения белков цитоплазмы клеток А431. Гель окрашен Кумасси бриллиантовым голубым.

Результаты. Используя калибровочные белки, был определён диапазон разделения колонки, в котором мы могли бы наблюдать как одиночные белки, так и мультимолекулярные комплексы. В результате гель-фильтрации было получено 30 фракций, содержащих белки и комплексы молекулярной массой от 10 до 2000кДа. На рис.1 представлены профиль элюции, полученный в результате разделения клеточного лизата, и электрофоретический профиль белкового состава

соответствующих фракций, на котором можно заметить, что как фракции, содержащие одиночные белки, так и фракции, содержащие мультимолекулярные комплексы, имеют сложный белковый состав. При анализе полученных фракций на наличие интересующих нас белков методом вестерн-блот было обнаружено, что белки α-актинин-4 и p65 выявляются в одной и той же области высокомолекулярных (порядка 600кДа) фракций (фракции 15-16 на рис.2).

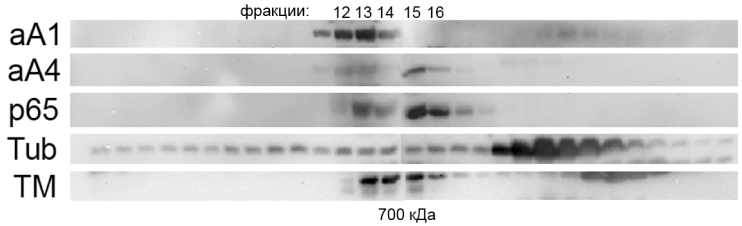


Рис.2. Выявленные во фракциях после гель-фильтрации белки α-актинин-1 (aA1), α-актинин-4 (aA4), p65-субъединица NF-κB (p65), тубулин (Tub) и тропомиозин (TM).

Кроме того, нас интересовали другие белки, потенциально способные взаимодействовать с p65 – это ещё одна немышечная изоформа α-актинина, актин-связывающий белок тропомиозин и тубулин – основной структурный белок системы микрофиламентов. α-актинин-1 был выявлен в более высокомолекулярной области порядка 800кДа (фракции 11-14 на рис.2). α-Тубулин был обнаружен практически во всех фракциях, начиная с области, соответствующей 50кДа. Также в области 13-16 фракций, соответствующей молекулярным весам 600-800кДа, были обнаружены высокомолекулярные изоформы тропомиозина (рис.2). Таким образом, мы обнаружили, что в одних фракциях одновременно обнаруживаются белки p65, α-актинин-4, тубулин и тропомиозин, но не α-актинин-1. Так как в этой области могут находиться различные мультимолекулярные комплексы, то мы применили метод перекрёстной иммунопреципитации для выяснения, находятся ли эти белки в составе одного комплекса.

Для этого мы объединили фракции 12-16, и из них был проведён ряд иммунопреципитаций поликлональными антителами против белков p65 и α-актинин-4. В результате были выделены комплексы, схожие по интенсивности и расположению электрофоретических полос (рис.3). Иммуно-блоттинг показал, что при иммунопреципитации из фракций антителами против α-актинина-4 в комплексе с ним выявляется белок p65 и не выявляются тубулин и тропомиозин. α-Актинин-4 при этом представлен на блоте двумя полосами, соответствующими

полноразмерному белку и меньшим количеством фрагмента 75кДа (рис.4). При иммунопреципитации из фракций антителами против p65, в комплексе выявляется α-актинин-4, который в большей степени представлен фрагментом 75кДа, но не выявляется α-актинин-1. В этом же комплексе обнаружены тропомиозин и тубулин (рис.4).

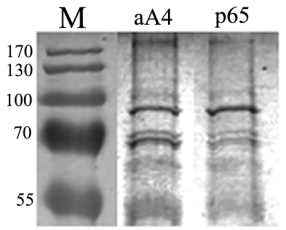


Рис.3. Электрофоретическая картина разделения иммунопреципитатов из фракций 12-16. Дорожки: M – маркер; aA4, p65 – комплексы, осаждённые антителами против α-актинина-4 и p65-субъединицы NF-κB.

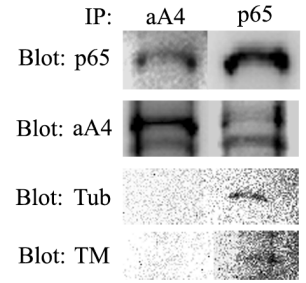


Рис.4. Вестерн-блот анализ иммунопреципитатов, осаждённых антителами против α-актинина-4 (IP: aA4) и p65-субъединицы NF-κB (IP: p65); в комплексе с p65 выявлены α-актинин-4 (aA4), тубулин (Tub) и тропомиозин (TM).

Обсуждение. Так как в работе использовали лизирующий SF-буфер, для которого показано, что он не приводит к изменению соотношения G- и F-актина в лизате и сохраняет структуры актинового и тубулинового цитоскелета [11], полученные результаты свидетельствуют о том, что α-актинин и p65, помимо взаимодействия со структурами цитоскелета, обнаруживаются в цитозоле в составе высокомолекулярных комплексов, значительно превышающих их суммарную массу. При этом было выявлено, что в состав этих комплексов входят также другие белки. Поскольку ранее было обнаружено, что тропомиозин, помимо связывания F-актина, обнаруживается в цитоплазме в составе частиц [12], необходимо было выяснить, не входит ли он в состав исследуемых комплексов. Оказалось, что действительно тропомиозин обнаруживается в одном комплексе с p65. В этой же высокомолекулярной фракции находится и тубулин – основной структурный белок системы микрофиламентов. Для того чтобы определить, входят ли эти белки в состав одного комплекса, была проведена перекрёстная иммунопреципитацию из объединённых фракций области 600-900кДа. Результаты показали, что белки p65 и α-актинин-4, а также его фрагмент 75кДа, действительно входят в состав одного комплекса. При этом p65, помимо комплексов, содержащих α-актинин-4, образует комплексы с тубулином и тропомиозином. Электрофоретический анализ показывает,

что помимо идентифицированных белков, в состав этих комплексов входит ряд других белков, которые могут быть постоянными структурными элементами анализируемых комплексов. Мы планируем в дальнейшем определить, что это за белки, методами масс-спектрометрии.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют о том, что элементы как актинового, так и тубулинового цитоскелета могут выступать в роли участников организации мультимолекулярных комплексов, включающих p65, а возможно и другие сигнальные молекулы. Немышечный α-актинин представлен двумя изоформами – α-актинин-1 и α-актинин-4. В цитоплазме для обоих α-актининов были обнаружены фрагменты 75кДа [13], роль этих фрагментов остаётся неясной, однако наши данные позволяют предположить, что 75кДа фрагмент участвует в образовании комплекса с p65-субъединицей NF-κB. Известно, что α-актинин-4 солокализуется в цитоплазме и совместно мигрирует в ядро с p65 субъединицей транскрипционного фактора NF-κB [6], а полноразмерный α-актинин-4 и фрагменты α-актининов 1 и 4 выявлялись во фракции белков, прочно связанных с хроматином [13], что вместе с данными нашей работы указывает на возможную роль α-актининов в проведении сигнала.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №07-04-01190-а и гранта Президента РФ №НШ-7852.2006.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schmidt A., Hall M.N.* //Annu. Rev. Cell Dev. Biol. (1998) 14: 305-38;
2. *Fazal F. et al.* //J. Biol. Chem. (2007) 282: 3940-50;
3. *Hayden M.S., Ghost S.* //Genes Dev. (2004) 18: 2195-294;
4. *Are A.F. et al.* //Exp. Cell Res. (2000) 256: 533-44;
5. *Christerson L.B., Vanderbilt C.A., Cobb M.H.* //Cell Motil. Cytoskelet. (1999) 43: 186-98;
6. *Бабаков В.Н. и др.* //Цитология (2004) 46(12): 1064-72;
7. *Babakov V.N. et al.* //Exp. Cell Res. (2008) 314: 1030-38;
8. *Orlando V.* //TIBS (2000) 25: 99-104;
9. *Laemmli U.K.* //Nature (1970) 227: 680-5;
10. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* //PNAS USA (1979) 76: 4350-4;
11. *Blikstad I., Carlsson L.* //J. Cell Biol. (1982) 93: 122-8;
12. *Grenklo S.* //Eur. J. Cell Biol. (2008) 87: 905-20;
13. *Большакова А.В. и др.* //Цитология (2009) 51(2): 122-9.

РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ

Винокуров М.Г., Юринская М.М.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Гибель клеток, наряду с процессами пролиферации и дифференцировки, играет важную роль в формировании и поддержании структурно-функционального постоянства как отдельных клеток и тканей, так и всего многоклеточного организма. Начиная с работ Керра, исследования механизмов гибели клеток привели к формированию современных общепринятых представлений о двух основных формах гибели клеток – апоптозе (программируемая клеточная гибель) и некрозе.

Работы последних лет показали универсальность механизмов апоптоза клеток различных многоклеточных организмов. Апоптоз является физиологическим механизмом удаления лишних или функционально поврежденных клеток, необходимым как для нормального развития организма в эмбриональном периоде, так и для поддержания тканевого гомеостаза у взрослых организмов. Нарушения механизмов регуляции апоптоза, приводящие к его ингибированию или, наоборот, к излишнему активированию, являются важным фактором патогенеза различных заболеваний, в том числе и воспалительных.

Апоптоз играет важную роль в разрешении воспалительного процесса и предотвращении повреждения тканей, вызванного гранулоцитами, т.к. повреждение тканей связано с неэффективным клиренсом нейтрофилов вследствие ингибирования их апоптоза.

Возможность направленного регулирования апоптоза нейтрофилов при воспалении в настоящее время рассматривается в качестве перспективного лечебного подхода для восстановления клеточного гомеостаза организма человека и снижения нейтрофил-зависимого повреждения тканей, в том числе при системном воспалительном ответе.

Активатором патологических процессов при грамотрицательном сепсисе являются компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахариды (LPS, эндотоксины). Взаимодействие эндотоксинов (липополисахаридов) с нейтрофилами, наряду с другими клетками-мишенями (моноцитами, макрофагами, эндотелиоцитами), имеет важное значение в активации патофизиологических событий, приводящих к генерализованной инфекции (сепсису). Эндотоксины (при грамотрицательном сепсисе) праймируют и задерживают апоптоз нейтрофилов. Действие эндотоксинов на клетки-мишени является сложным комплексным механизмом, включающим внеклеточное распознавание лиганда, проведение сигнала через мембрану,

внутриклеточное распознавание, последующий сигнальный процессинг, активацию и транслокацию транскрипционных факторов, и, наконец, транскрипцию и экспрессию генов.

Экспериментальные исследования, выполненные в последнее десятилетие, значительно расширили представления о молекулярных механизмах функционирования нейтрофилов в норме и при воспалении. Исследованы основные пути регуляции апоптоза и передачи активационных сигналов от Toll-like рецепторов при взаимодействии эндотоксинов с нейтрофилами. Благодаря значительному объему полученных результатов, были идентифицированы основные рецепторы и сигнальные молекулы, участвующие в реализации апоптоза и взаимодействии эндотоксинов с клетками-мишенями. Исследуется роль межклеточных взаимодействий в регуляции клеточной гибели клеток-мишеней эндотоксинов.

Можно выделить несколько механизмов или уровней воздействия на клетки врожденного иммунитета для снижения их активации при действии эндотоксинов. Первый заключается в использовании нетоксичных соединений, обладающих способностью блокировать действие эндотоксинов на клетки-мишени. Второй – воздействие на механизмы регуляции апоптоза клеток-мишеней. И в первом и во втором случаях следует выделить два уровня возможного влияния на регуляцию апоптоза:

– на специфические мембранные рецепторы, участвующие в регуляции апоптоза клеток-мишеней;

– на внутриклеточные пути регуляции апоптоза; на этом уровне важная роль принадлежит взаимосвязи сигнальных путей.

Вместе с тем остаются недостаточно исследованными вопросы, связанные с взаимодействием сигнальных путей регуляции клеточной гибели нейтрофилов при сепсисе и других воспалительных процессах. Очевидно, ответы на эти вопросы позволят расширить не только представления о клеточном метаболизме и функционировании организма человека при различных патологиях, связанных с воздействием эндотоксинов, но и предложить эффективные методы коррекции этих патологий.

РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ А431 ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

Грудинкин П.С., Козюлина П.Ю., Зенин В.В., Никольский Н.Н.

Институт цитологии РАН, СПб

Введение. Клетки линии А431 экспрессируют повышенные количества рецептора EGF вследствие амплификации кодирующего его гена, что является одной из причин их бесконтрольной пролиферации [1]. В то же время, повышенная экспрессия рецептора EGF приводит к нетипичному ответу на EGF в высоких (наномолярных) концентрациях – ингибированию клеточного роста и гибели клеток. Подобное действие EGF известно для ряда линий трансформированных клеток, экспрессирующих повышенное количество рецептора EGF, и редко встречается среди других клеток. Причины ингибирующего эффекта EGF не вполне ясны – в литературе указывается на значение остановки клеточного цикла [2-5] или апоптотической гибели клеток [6-9] в этом процессе. Не до конца выяснены и сигнальные пути, приводящие к реализации EGF-зависимого ингибирования прироста популяции клеток А431, однако наибольшее внимание исследователей привлекает транскрипционный фактор STAT1. STAT-белки активируются фосфорилированием по тирозину и дополнительным фосфорилированием по серину, после чего димеризуются, транспортируются в ядро и активируют транскрипцию генов-мишеней [10]. STAT1 чаще всего передает проапоптотический и антипролиферативный сигнал. Эксперименты с использованием доминантно-негативных конструкций [11] и олигонуклеотидных «ловушек» [5], а также корреляция между ингибирующим клеточный рост эффектом EGF и активацией STAT1 [7,11,12] показали участие STAT1 в вызываемом EGF ингибировании прироста популяции клеток А431. Тем не менее, использованные методы не позволили четко доказать роль STAT1 и отделить его от других представителей семейства STAT. Дифференциальный подход к изучению транскрипционных факторов семейства STAT важен еще и потому, что для другого представителя семейства, STAT3, доказана центральная роль в зависимой от рецептора EGF супрессии апоптоза, являющейся необходимым компонентом трансформированного фенотипа разнообразных опухолей, экспрессирующих повышенные количества рецептора EGF [13,14].

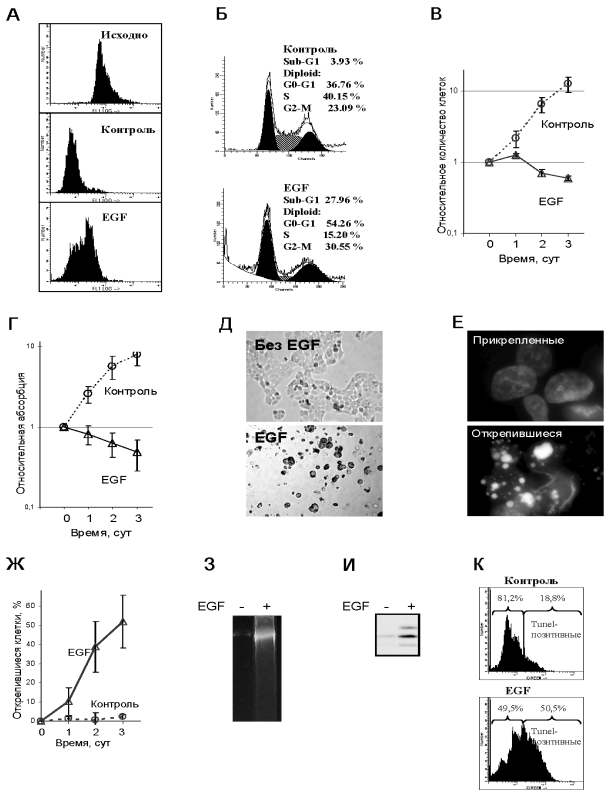


Рис.1. EGF вызывает апоптотическую гибель клеток А431. Клетки А431 рассевали в плотности $1{,}1\times10^4$ клеток на см^2 и через 16-24ч (12-14ч для панели А) добавляли 200нг/мл EGF. **А:** Проточная цитофлуориметрия: разбавление метки CFDA-SE. Показано распределение по флуоресценции CFDA-SE клеток, фиксированных непосредственно после мечения («Исходно»), и клеток, культивировавшихся в течение 2,5сут («EGF» – из них 2сут в присутствии EGF). **Б:** Проточная цитофлуориметрия: распределение по фазам клеточного цикла. Через 2сут культивирования клетки (вместе с открепившимися) окрашивали иодидом пропидия. Показан процент гиподиплоидных (Sub-G1) клеток и распределение диплоидных клеток по фазам клеточного цикла. **В:** Ежедневный подсчет количества клеток. **Г:** Количество жизнеспособных клеток оценивалось каждые сутки при помощи реакции МТТ. **Д:** Микрофотографии клеток в фазово-контрастном режиме через 2сут после добавления EGF. **Е:** Типичная морфология ядер прикрепленных и открепившихся клеток при окраске DAPI. **Ж:** Ежедневный подсчет процента открепившихся клеток. **З:** Детекция экстрахромосомной ДНК через 2сут после обработки EGF. **И:** Иммуноблоттинг тотальных лизатов клеток через 2сут после обработки EGF, выявление активной (расщепленной) каспазы 3. **К:** Проточная цитофлуориметрия: реакция TUNEL. Показано распределение клеток по интенсивности флуоресценции через 2сут культивирования в отсутствие или в присутствии EGF.

EGF индуцирует остановку клеток А431 в фазах клеточного цикла G2 и G1 и последующую апоптотическую гибель. Методом проточной цитофлуориметрии с мечением клеток флуоресцентным красителем CFDA-SE позволяет отделить пролиферирующие клетки, интенсивность флуоресценции которых уменьшается вдвое при каждом делении (и, соответственно, пик распределения на гистограмме флуоресценция-количество смещается влево по сравнению с только что помеченными клетками), от блокированных или задержанных в цикле клеток [15]. В нашем случае воздействие EGF приводило к задержке деления большей части популяции клеток А431 (рис.1А). Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла показал, что при действии EGF уменьшается доля клеток А431 в фазе S и увеличивается доля клеток в фазах G2/M и (в меньшей степени) G1 (рис.1Б), что в совокупности с данными мечения CFDA-SE позволяет говорить о блоке клеточного цикла в фазах G2 и G1. В то же время EGF вызывал значительное увеличение доли клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК, что свидетельствует о стимуляции клеточной гибели. При действии EGF наблюдалось уменьшение числа клеток, детектируемое как прямым подсчетом (рис.1В), так и методом МТТ (рис.1Г). При действии EGF клетки теряли характерную эпителиальную морфологию и округлялись (рис.1Д). Тем не менее, окраска ДНК клеток реагентом DAPI выявила только незначительное количество апоптотических клеток (с ядрами, содержащими фрагменты конденсированного хроматина) среди клеток, остающихся прикрепленными, в то время как практически все клетки, открепившиеся от подложки, имели ядра с характерной апоптотической морфологией (рис.1Е). Мы полагаем, что апоптоз, вызываемый EGF в клетках А431, сопровождается быстрым откреплением клеток. В этих условиях число открепившихся клеток должно коррелировать с интенсивностью апоптотической гибели клеток. Действительно, процент открепившихся клеток А431 резко возрастал при воздействии EGF (рис.1Ж). Индукция апоптоза при обработке клеток А431 EGF была также подтверждена методами детекции экстрахромосомной ДНК (рис.1З), иммуноблотом с использованием антител против активной (расщепленной) каспазы 3 (рис.1И) и проточной цитофлуориметрией с использованием реакции TUNEL, позволяющей обнаружить апоптотические клетки путем детекции образующихся при апоптозе разрывов ДНК (рис.1К). Таким образом, в использованных в работе условиях EGF вызывает в клетках А431 остановку клеточного цикла в фазах G2 и G1, но конечным результатом действия EGF является апоптоз, сопровождающийся откреплением клеток от субстрата.

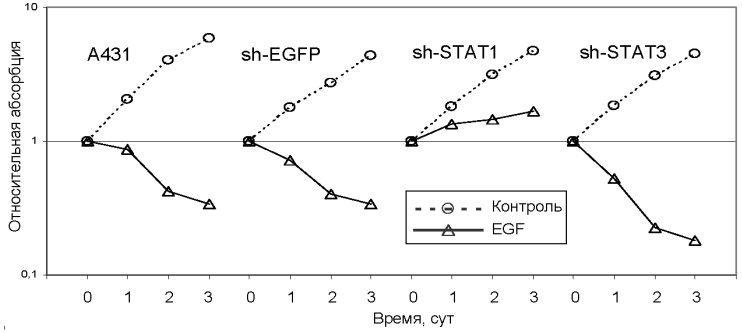


Рис.2. Уменьшение количества STAT1, но не STAT3, снижает чувствительность клеток A431 к EGF. Клетки A431, нетрансфицированные или стабильно трансфицированные плазмидами, экспрессирующими миРНК против белков STAT1 (sh-STAT1), STAT3 (sh-STAT3) и контрольного белка EGFP (sh-EGFP), культивировали без EGF или в присутствии 200нг/мл EGF. Количество жизнеспособных клеток оценивалось каждые сутки при помощи MTT.

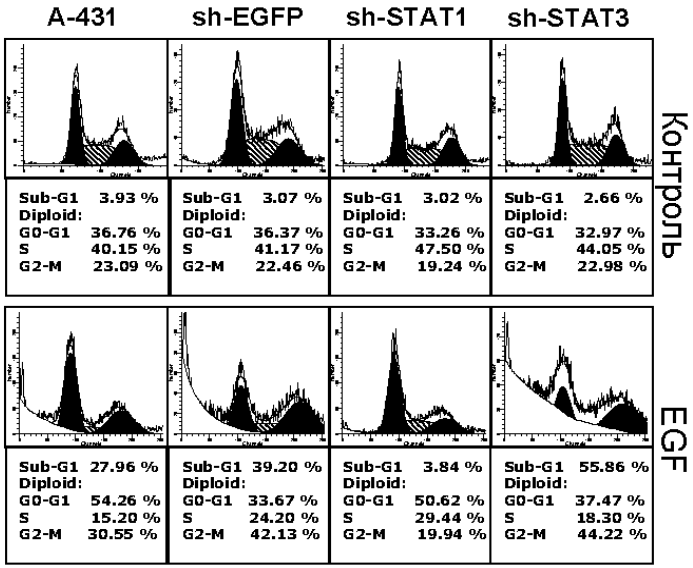


Рис.3. Уменьшение количества STAT1, но не STAT3, снижает долю гиподиплоидных клеток A431 при действии EGF. Клетки культивировали 2сут в присутствии или в отсутствие EGF. Прикрепленные и открепившиеся клетки объединяли, фиксировали, окрашивали иодидом пропидия и анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Процент гиподиплоидных клеток (Sub-G1) и распределение диплоидных клеток по фазам клеточного цикла вычисляли в программе ModFit LT.

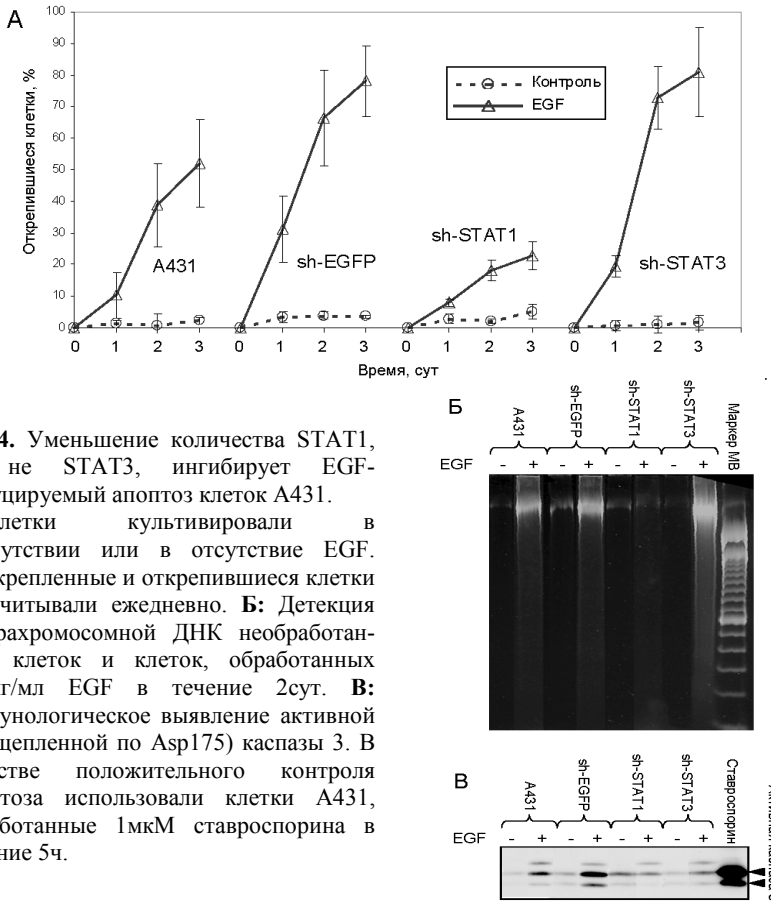


Рис.4. Уменьшение количества STAT1, но не STAT3, ингибирует EGF-индуцируемый апоптоз клеток A431. **А:** Клетки культивировали в присутствии или в отсутствие EGF. Прикрепленные и открепившиеся клетки подсчитывали ежедневно. **Б:** Детекция экстрахромосомной ДНК необработанных клеток и клеток, обработанных 200нг/мл EGF в течение 2сут. **В:** Иммунологическое выявление активной (расщепленной по Asp175) каспазы 3. В качестве положительного контроля апоптоза использовали клетки A431, обработанные 1мкМ ставроспорина в течение 5ч.

Направленное снижение количества STAT1, но не STAT3, значительно уменьшает чувствительность клеток A431 к проапоптотическому действию EGF. Для того чтобы достоверно установить значение каждого из транскрипционных факторов STAT1 и STAT3 в клетках A431, мы сконструировали плазмиды на основе вектора mU6pro [16], экспрессирующие малые интерферирующие РНК (миРНК), направленные против STAT1 или STAT3, а также против EGFP (зеленого флуоресцентного белка, отсутствующего в человеческих клетках) в качестве контроля, и получили постоянные клеточные линии (далее sh-STAT1, sh-STAT3 и sh-EGFP). Методом иммуноблоттинга доказано снижение количества (и, соответственно, фосфорилирования) целевого STAT-белка при отсутствии изменений в уровне другого STAT-белка или рецептора EGF. Уменьшение количества STAT1 или STAT3, по данным

реакции МТТ (рис.2) и подсчета клеток, не влияло на прирост клеток в контроле, а при действии EGF клетки sh-STAT1, но не sh-STAT3 или sh-EGFP, приобретали устойчивость к EGF – клетки sh-STAT1 продолжали делиться в присутствии EGF. Методом проточной цитофлуориметрии не было выявлено различий в распределении клеток разных линий по циклу в контроле, однако при действии EGF мы наблюдали отсутствие характерного для линии A431 накопления гиподиплоидных клеток у линии sh-STAT1 (рис.3), что говорит об уменьшении EGF-зависимой гибели клеток при снижении количества STAT1. Процент открепившихся клеток при действии EGF также был значительно меньше в линии sh-STAT1 (рис.4А). Наконец, методами детекции экстрахромосомной ДНК (рис.4Б) и иммуноблотом с использованием антител против активной каспазы 3 (рис.4В) мы показали отсутствие EGF-зависимого апоптоза в клетках sh-STAT1.

Таким образом, в клетках линии A431, подобно некоторым другим опухолевым клеткам [11,17], STAT1 действительно является центральным передатчиком сигнала от EGF на индукцию апоптоза. В то же время характерный для многих EGF-зависимых опухолевых клеток [13,14] механизм супрессии апоптоза через активацию STAT3 не реализуется в клетках A431.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Van de Vijver M.J., Kumar R., Mendelsohn J.* //JBC (1991). 266: 7503-08;
2. *MacLeod C.L. et al.* //J. Cell. Physiol. (1986) 127: 175-2;
3. *Fan Z. et al.* //J. Cell Biol. (1995) 131: 235-42;
4. *Jakus J., Yeudall W.A.* //Oncogene (1996) 12: 2369-76;
5. *Ohtsubo M. et al.* //J. Cell. Physiol. (2000) 184: 131-7;
6. *Gulli L.F. et al.* //Cell Growth Differ. (1996) 7: 173-8;
7. *Chin Y.E. et al.* //Mol. Cell. Biol. (1997) 17: 5328-37;
8. *Smida Rezgui S. et al.* //Int. J. Cancer. (2000) 87: 360-7;
9. *Morazzani M. et al.* //Int. J. Cancer. (2004) 110: 788-99;
10. *Bromberg J.F.* //BioEssays (2001) 23: 161-9;
11. *Bromberg J.F. et al.* //Cell Growth Differ. (1998) 9: 505-12;
12. *Chin Y.E. et al.* //Science (1996) 272: 719-22;
13. *Karni R., Jove R., Levitzki A.* //Oncogene (1999) 18: 4654-62;
14. *Rubin Grandis J. et al.* //J. Clin. Invest. (1998) 102: 1385-92;
15. *Lyons A.B.* //J. Immunol. Methods. (2000) 243: 147-54;
16. *Yu J.-Y., DeRuiter S.L., Turner D.L.* //PNAS USA (2002) 99: 6047-52;
17. *Watanabe G. et al.* //Cancer J. (2001) 7: 132-9.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ И ИМУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ МЯГКОМ СТРЕССЕ, СТИМУЛИРУЮЩЕМ «ИЗБЫТОЧНОЕ» ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Захарченко М.В.[1], Захарченко А.В.[1], Хундерякова Н.В.[1], Симонова М.А.[2], Васильева А.А.[1], Литвинова Е.Г.[1], Федотчева Н.И.[1], Маевский Е.И.[1], Кондрашова М.Н.[1]

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

И.А. Аршавский привлек внимание к тому обстоятельству, что нагрузки, создаваемые по методу Селье и его последователей, выходят за диапазон физиологических для исследуемого животного и являются патогенными. Благодаря этому четко выявляется классическая триада повреждения, но активные приспособительные реакции стираются грубыми воздействиями и ускользают от исследователей [1]. И.А. Аршавским были разработаны методы воздействия естественных физиологических нагрузок на растущих животных, выявившие их мощное стимулирующее влияние. Активные адаптационные процессы, реализующиеся при воздействии нагрузок физиологической силы, были названы физиологическим стрессом. При физиологическом стрессе восстановление трат после работы происходит не только до исходного уровня, но перекрывает его – явление суперкомпенсации, «избыточное» восстановление. В его основе, по-видимому, лежит усиление процессов энергообеспечения, но данные о механизмах регуляции энергетических процессов в митохондриях при физиологическом стрессе отсутствуют. По нашему мнению исследование митохондриальных процессов при разных физиологических состояниях затрудняется тем, что выделение митохондрий полностью разрушает их нативную структурную организацию в сеть, через которую осуществляется воздействие физиологических сигналов, например такого универсального регулятора как Ca^{2+}.

В нашей лаборатории разработан метод определения активности дегидрогеназ митохондрий в лимфоцитах на мазке крови, сохраняющий структуру сети благодаря иммобилизации на стекле и использованию современных биохимических сред для исследования митохондрий (цито-био-химический метод) [2,3,4]. Была разработана также модель физиологического стресса на животных перед достижением зрелости, которые более чувствительны к возбуждающим воздействиям, чем взрослые. Ниже будут представлены данные исследования на этой модели активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и α-кетоглутаратдегидрогеназы (КДГ) в митохондриях лимфоцитов крови,

показателей активности иммунной системы – лимфоцитов и нейтрофилов, иммунной активности нейтрофилов и активности энергетических процессов в митохондриях печени, определяемой по накоплению ионов Ca^{2+}. Выбор для исследования СДГ и КДГ обусловлен тем, что они являются участниками субстратно-гормональной системы регуляции, связывающей митохондрии и вегетативную нервную систему через сигнальное взаимодействие субстратов ЯНТ и КГЛ и медиаторов – адреналина (АДР) и ацетилхолина (АЦХ) [5,6]. Модель стресса удобна для исследования этой сигнальной системы регуляции, так как, среди прочих механизмов, начальная острая фаза, реакция тревоги по Селье, развивается при доминирующем влиянии АДР, а компенсаторные восстановительные процессы – активная адаптация, развиваются при доминировании влияния АЦХ.

Материалы и методы

Протокол модели. Для проведения одного эксперимента брали по 6 крыс линии Вистар разведения вивария ИТЭБ возраста 6-ти недель, весом до 200г, так как они являются незрелыми особями и более чувствительны к внешним воздействиям. Забой крыс проводили с десяти утра в течение двух часов. В предварительных опытах показано, что исследуемые показатели у группы животных в один день и близкое время до полудня очень близки. Реакции на опытное воздействие, например, на стресс, близки у отдельных особей, так как опытное воздействие перекрывает возбуждающее влияние других факторов. Воспроизведение показателей контроля требует большей тщательности в обращении с животным. Следует стараться минимально возбуждать его при взятии в руки, переносе в другое помещение. Для всех животных исключается пребывание в комнате, где проводится эксперимент с другим животным. Для уменьшения воздействия посторонних факторов на контроль эвтаназию этих животных проводили в начале опыта. Для обеспечения более полного сохранения физиологического покоя, животных усыпляли в герметичной камере, предварительно заполненной углекислым газом. Через 15-25с у животных происходила остановка дыхания, однако работа сердца продолжалась, тогда крысу быстро извлекали из камеры, декапитировали, и, слив первые капли, собирали кровь на предварительно охлажденное часовое стекло. Из забранной крови приготовляли мазки на одноразовых предметных стеклах. Обработку мазков крови проводили цитобиохимическим методом. Метод включает новый более точный способ расчета активности СДГ и КДГ, описанный ранее и при изложении результатов.

Цитобиохимическое определение активности дегидрогеназ. Проводили восстановление красителя нитросинего тетразолия (НСТ) на мазках крови [2-4]. Активность СДГ и КДГ измеряли на компьютеризованной видеомикроскопической установке по общей площади окраски продукта реакции – формазана в 30 клетках, интенсивность которого по оптической плотности превышала определенный фоновый уровень. Единичная приводимая величина является результатом сканирования множества окрашенных объектов – 500-700 и является статистически достоверной.

Измерение иммунной функции нейтрофилов и измерение Ca^{2+} емкости. Измерение иммунной активности нейтрофилов проводили путем регистрации хемилюминесценции, индуцированной добавлением зимозана [7]. Определение энергетической функции митохондрий проводили на гомогенате печени путем измерения Ca^{2+}-емкости митохондрий по изменению мембранного потенциала регистрируемого $ТФФ^{+}$-селективным электродом в ответ на последовательные добавки ионов кальция в концентрациях 20-50мкМ [8]. Приведены величины емкости, определенной в 50мкл гомогената.

Результаты. Результаты иллюстрируются типичным опытом, в котором использованы крысы веса от 161 до 178г в следующих состояниях: контроль в покое (интактная), после мягкой иммобилизации в пенале, ограничивающем движение без болевых ощущений на сроки 30, 60, 120 и 180мин. Результаты цитобиохимического исследования ЛФ крови крыс при развитии ИС представлены на рис.1. Согласно этому методу активность СДГ определяли не одной, как в цитохимических методах, а тремя пробами: 1) на эндогенных субстратах (ЭС), 2) при добавлении к ЭС 5мМ малоната (МАЛ), 3) при добавлении 5мМ янтарной кислоты (ЯНТ). Восстановление НСТ при добавлении ЯНТ является мерой ее активности, как и в цитохимическом методе. Однако измерение восстановления за счет ЭС и в присутствии МАЛ позволяет определить вклад в окисление эндогенной ЯНТ и других субстратов. Если, как в контроле МАЛ снижает восстановление на ЭС, для более точного определения активности СДГ нужно вычесть из показателя общего восстановления с 5мМ ЯНТ (проба 3) именно этот остаток с 5мМ МАЛ (проба 2). Величину активности СДГ без дополнительного расчета мы называем: «общая СДГ», а величину с поправкой на вклад других процессов: «истинная СДГ». В ряде случаев, например при 30мин ИС 5мМ МАЛ не снижает, а повышает окраску при низкой активности СДГ. В этих случаях для расчета истинной активности СДГ мы вычитаем из показателей пробы с ЯНТ показатели пробы ЭС, так как избыточное восстановление создается именно добавлением МАЛ.

Видно, что при развитии ИС стресса общая активность СДГ возрастает через 30 и 60мин до 260% и 264%, а затем через 2 часа снижается до уровня 145% от контроля, и, наконец, к 3 часам ИС составляет только 60% от контроля. Цитобиохимическим методом впервые определяется не только активность СДГ, но и ее функциональное состояние по влиянию добавки изолимонной кислоты

(ИЗЛ) 500мкМ. Активирующее СДГ действие ИЗЛ позволяет выявить скрытое торможение этого фермента щавелевоуксусной кислотой [10] которое развивается при патогенных воздействиях (болезнях или экспериментальном стрессе). Ингибирующее СДГ действие ИЗЛ выявляет обычно не учитываемую гиперактивацию. Причина гиперактивации, как и причина более глубокого ингибирования активности СДГ – одна и та же – ослабление энергетического контроля скорости дыхания в митохондриях. Эти скрытые показатели выявляют изменения активности СДГ значительно чувствительнее, чем просто измерение общей активности СДГ в присутствии только добавленной ЯНТ. Видно, что в состоянии покоя ИЗЛ не влияет на активность СДГ, что выявляет действительно спокойное состояние более отчетливо, чем только величина активности. С другой стороны видно, что ИЗЛ сильно снижает активность СДГ на протяжении ИС от 30мин до 2-х часов. Реакция СДГ на ИЗЛ еще более четко, чем величина общей активности выявляет отличие фермента в покое и при ИС. В покое состояние СДГ определяется как просто активное, от 30 до 120мин ИС оно является гиперактивным и после 3-х часов – ингибированным. Кроме СДГ мы определяли активность КДГ, в пробе КГЛ 5мМ с МАЛ 5мМ, которая обозначается как «общая КДГ». Видно (рис.1), что в покое активности СДГ и КДГ уравновешены, что свидетельствует о хорошем балансе катаболических и анаболических, восстановительных процессов, активируемых симпатической и парасимпатической отделами вегетативной нервной системы. Соотношения активностей видны и по высотам столбиков и показаны цифрами над ними. При 30мин ИС КДГ повышается, как и СДГ, однако возрастание ее активности отстает от повышения активности СДГ. Это отставание усиливается при 60мин ИС. Очень важно, что при 2-х часовом ИС наблюдается приближение активности КДГ к уровню покоя. Как и СДГ активность КДГ приближается к покою, но примерно в полтора раза превышает его. Особенно надо обратить внимание на то, что восстанавливается характерное для покоя уравновешивание СДГ и КДГ с небольшим превышением КДГ. Эти данные впервые в остром опыте четко выявляют фазу развития активной адаптации в результате стрессирующего воздействия в физиологическом диапазоне. После 3ч ИС наблюдается ингибирование СДГ и снижение восстановления НСТ КГЛ. Однако при этом добавка КГЛ проявляет действие, противоположное обычному. Как видно, она эффективно устраняет повышенное восстановление НСТ, обусловленное добавкой МАЛ. Величина этого действия показана добавочным столбиком над восстановительной активностью КДГ. Она представляет разницу между восстановлением в присутствии МАЛ без КГЛ и с его добавкой. Именно эта разница является мерой активности КДГ в данном случае. Предположительно это действие КДГ является

антиоксидантным, так как повышение восстановления НСТ МАЛ, наиболее вероятно, обусловлено супероксидом. Кетогруппа и тиоловые группы КДГ могут устранять образующийся супероксид, то есть проявляют антиоксидантное действие [9]. Такое извращение обычного восстанавливающего действия КГЛ свидетельствует о существенных нарушениях в дыхательной цепи при 3-х часовом стрессе. Представленные пробы составляют специфический паттерн – узор цитобиохимических характеристик, позволяющий гораздо более подробно описывать реакцию митохондрий, чем единичный показатель. Также как для СДГ, мы проводили более точное определение активности КДГ с использованием вычитания пробы ЭС+МАЛ из величины восстановления НСТ при добавлении КГЛ. Как и для СДГ, величина без расчета называется «общей активностью КДГ», а с поправкой на вклад других процессов – «истинной активностью КДГ». Переход к определению истинной активности СДГ и КДГ позволяет выявить отличия исследуемых состояний в более яркой форме, чем по общей активности (рис.2). Видна умеренная активность и сбалансированность СДГ и КДГ в покое, гиперактивация при 30 и 60мин ИС.

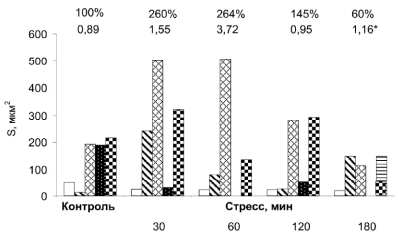


Рис.1. Цитобиохимические паттерны (узоры) незрелых крыс после стресса разной продолжительности. Представлена площадь гранул формазана в 30 клетках (S). Столбики слева-направо: 1 – эндогенные субстраты (ЭС), 2 – ЭС+ 5мМ МАЛ, 3-5мМ ЯНТ, 4-5мМ ЯНТ+500мкМ ИЗЛ, 5-5мМ КГЛ+5мМ МАЛ. Надстройка над последним столбиком – антиоксидантное действие КГЛ. Над паттернами в верхней строке указано в % отношение СДГобщ в данном состоянии к показателю контроля. Нижняя строка – СДГобщ/КДГобщ (*-к антиоксидантному действию).

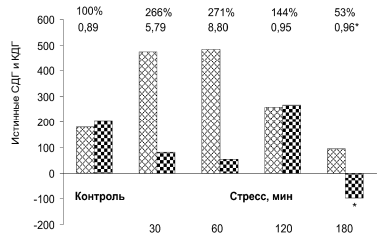


Рис.2. Отношение показателей истинных СДГ и КДГ при развитии стресса. Ромбики – СДГист, шашечки – КДГист. *-для антиоксидантного действия КГЛ. Над диаграммами в верхней строке указано в % отношение СДГист в данном состоянии к показателю контроля. Нижняя строка – СДГист/КДГист (*-для антиоксидантного действия КГЛ).

Также выражен возврат к покою по активности и сбалансированности дегидрогеназ, с превышением исходного уровня.

После 3ч ИС наблюдается ингибирование СДГ и снижение активности КДГ. При расчете истинной величины оно выражается отрицательным числом. Поэтому на диаграмме оно отложено вниз, что подчеркивает особенность действия КГЛ.

Над столбиками представлены отличия показателей при ИС от покоя и отношения истинных активностей СДГ и КДГ. Видно, что амплитуда этих различий гораздо больше, чем по общей активности. Это показывает, что предложенный метод анализа данных позволяет более чувствительно выявить изменения в организме.

Измерения количества клеток белой крови и ХЛ НФ в ответ на активацию зимозаном показали двукратное увеличение количества ЛФ в циркулирующей крови на 30 и 60мин стресса и небольшое повышение НФ на 30мин и 120мин. Увеличение этих клеток, по-видимому, обусловлено выбросом в кровяное русло пристеночного пула лейкоцитов, происходящим при остром стрессе [10]. При этом основное увеличение происходит за счет ЛФ, так как их количество много больше, чем НФ. Изменения количества НФ по абсолютной величине значительно меньше, чем ЛФ. Однако именно они обусловливают ХЛ. Поэтому в пределах 30 и 60мин стресса наблюдается более выраженная корреляция изменений ХЛ с уровнем НФ, чем ЛФ. Сопоставление изменений количества ЛФ в крови и активности СДГ, определяемой в 30 ЛФ, показывает, что организм отвечает на стрессорное воздействие не только увеличением числа этих клеток, но и активацией в них СДГ с реципрокным снижением активности КДГ. Как и по изменению активности этих ферментов, так и по количеству ЛФ и НФ, а также ХЛ к 120мин видно возвращение показателей к уровню покоя, несмотря на продолжающееся стрессорное воздействие. Это указывает на развитие компенсаторных процессов, которые по исследованным показателям мы связываем с активацией КДГ.

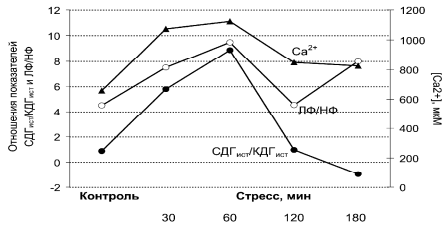


Рис.3. Сопоставление изменений показателей энергетического обмена и иммунной системы при развитии стресса.

Сходство реакций исследованных показателей особенно наглядно при сопоставлении отношений ЛФ/НФ, СДГист/КДГист, а также энергетической функции МХ, определенной по накоплению Ca^{2+}, приведенному на рис.3. Видно, что в пределах физиологического стресса до 2-х часов наблюдается полная корреляция между этими показателями. Устранение гиперактивности СДГ и возрастание активности КДГ,

выражающееся в снижении отношения их активностей сопряжено с нормализацией отношения ЛФ/НФ. Последнее указывает на восстановление физиологической адаптационной реакции в условиях продолжающегося стрессорного воздействия [11]. При 3ч стрессе дальнейшее снижение функций митохондрий сопряжено с почти двукратным возрастанием ЛФ/НФ, что свидетельствует о развитии патогенной адаптационной реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аршавский И.А.* //Физиол. Механ. Закон.. Индив. Развит. (1982) 270с.;
2. *Кондрашова М.Н. и др.* //Патент №2007143021/15 (047111) (2007);
3. *Хундерякова Н.В. и др.* //IV межд.конф. Нанобио – и др. нов. и перспект. биотехн. (2007): 153-8;
4. *Хундерякова Н.В.* //Автореф. дисс. к.б.н. биофиз. (2007) 23с.;
5. *Кондрашова М.Н.* //Вопр. Биол. Мед. Фармац. Химии (2002) 1: 7-12;
6. *Кондрашова М.Н.* //Горизонты Биофиз. (2003): 147-54;
7. *Сафронова В.Б. и др.* //Бюлл. Эксп. Биол. Мед. (2003) 136 (9): 295-8;
8. *Fedotcheva N.I. et al.* //Toxycol. Lett. (2008): 180, 182-8;
9. *Fedotcheva N.I., Sokolov A.P., Kondrashova M.N.* //Free Rad. Biol. (2006) 41: 56-64;
10. *Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И.* //Стресс Сист. крови (1983) 239с;
11. *Гаркави Л.Х.* //Активацион. Терап. Антистрес. Реак. (2006) 255с.

РОЛЬ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ *P53* И *BCL-2* В ТИМУСЕ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Камышный А.М.

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Введение. Оксид азота (NO) представляет собой уникальный по своей природе и механизмам действия вторичный мессенджер в большинстве клеток организма, что послужило причиной его детального изучения в последние два десятилетия [1]. NO, который может оказывать как про-, так и антиапоптотическое действие, оказывает важное влияние на функциональное состояние лимфоидного и эпителиального компартментов тимуса в норме и при экспериментальной патологии, играя, таким образом, роль эффектора в селекции и развитии тимоцитов [4]. Введение ингибиторов NO-синтаз (NOS) частично может защищать

животных от индуцированного введением стрептозотоцина повреждения β-клеток, а у мышей с инактивированным геном iNOS снижена чувствительность к индукции стрептозотоцинового диабета [7].

Наряду с этим, важнейшими регуляторами уровня апоптоза тимоцитов являются белки p53 и Bcl-2. Белок p53 способен не только активировать гены, участвующие в индукции клеточной смерти за счет своей транскрипционной функции, но и принимает непосредственное участие в индукции митохондриального пути апоптоза [3]. Повреждение ДНК способствует накоплению p53, который, в свою очередь, блокирует прогрессию клеточного цикла в фазе G1, препятствуя, таким образом, репликации ДНК до репарации повреждения. Если репарация повреждения невозможна, то белок p53 запускает механизм апоптоза. Продукт гена *bcl-2* – белок Bcl-2 имеет молекулярную массу 26кД и является важнейшим репрессором апоптоза, который обладает двойным действием: может функционировать и как ионный канал, и как адаптерный белок [8]. Он экспрессируется на мембране митохондрий, в меньшей степени – на ядерной мембране и на поверхности клеток. В свою очередь, важным фактором риска развития сахарного диабета 1 типа (СД 1 типа) является дефект позитивной и негативной селекции тимоцитов, осуществляемой путем апоптоза. Поэтому, целью настоящей работы было изучить влияние введений неселективного блокатора NOS N-нитро-L-аргинина (NnLa) на уровень экспрессии белков p53 и Bcl-2 в тимусе у крыс с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД).

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на 28 самцах крыс линии Вистар массой 230-250г (возраст 5-6 месяцев). ЭСД моделировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (SIGMA, США) в дозе 50мг/кг. NnLa (SIGMA, США) вводили в дозе 10мг/кг и 50мг/кг 14 дней внутрибрюшинно со 2 недели развития ЭСД. Через 3 недели животных с уровнем гликемии больше 8ммоль/л декапитировали под наркозом и выделяли тимус, который фиксировали в растворе Буэна (18 часов) и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин.

Для идентификации iNOS в тимусе использовали метод электрофореза на полиакриламидном геле (SDS-PAGE) с последующим иммуноблоттингом на PVDF-мембрану. Иммуноблоттинг проводили с помощью оборудования и протоколов BioRad Labs (USA), с использованием антител и реактивов фирмы Sigma Chemical (США). Для визуализации реакции использовали набор реактивов ProteoQwestTM Colorimetric Western Blotting Kit, TMB Substrate (Sigma), детекцию проводили путем реакции с тетраметилбензидином (TMB, Sigma). Интенсивность окрашивания определяли с помощью компьютерной денситометрии (программа TotalLab TL100, www.nonlinear.com) и представляли в у.е.

Для выявления экспрессии белка Bcl-2 в тимусе использовали иммуногистохимический метод непрямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональные антитела к и Bcl-2 крысы производства Sigma Chemical (США). Для выявления экспрессии p53 в тимусе использовали метод двойной иммунофлюоресценции. Для этого регидрированные гистологические срезы тимуса инкубировали в течение 18 часов во влажной камере при T=4^{o}C одновременно с первичными кроличьими моноклональными антителами к p53 крысы производства Santa Cruz Biotechnology (США) и с мышиными моноклональными антителами к CD4 крысы производства Beckman Coulter (США), уже конъюгированными с флюоресцеина изотиоционатом (FITC). После отмывки избытка первичных антител в 0,1М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 минут (T=37^{o}C) с вторичными антителами в разведении 1:64. В качестве вторичных антител использовали козьи антитела к полной молекуле IgG кролика, конъюгированные с Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, США). После инкубации срезы промывали 0,1М фосфатным буфером и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (9:1) для последующей люминесцентной микроскопии. Изображение, получаемое на микроскопе AXIOSKOP (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390нм (FITC) или 595нм (Texas Red) с помощью высокочувствительной видеокамеры COHU-4922 (COHU Inc., США) вводилось в компьютерную систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия).

Результаты исследования и обсуждение. Определение количества белка iNOS в гомогенатах тимуса методом SDS-PAGE-электрофореза с последующим иммуноблоттингом показало, что развитие ЭСД сопровождается увеличением количества iNOS в тимусе крыс линии Wistar в 4 раза ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой животных. Введение NnLa в дозе 10мг/кг крысам с ЭСД приводит к снижению количества iNOS в 2,3 раза ($p<0,05$) по сравнению с диабетическими животными, оставаясь, тем не менее, на 79% ($p<0,05$) выше уровня контрольных значений. Повышение дозы NnLa до 50мг/кг оказывает более выраженный эффект и сопровождается уменьшением количества iNOS в 7,4 раза ($p<0,05$) по сравнению с диабетическими животными и в 1,8 раза ($p<0,05$) по сравнению с контролем.

Изучение серийных срезов тимуса контрольных крыс, предварительно инкубированных с моноклональными антителами к p53, показало, что развитие ЭСД сопровождалось увеличением количества $p53^{+}$-клеток в корковом веществе тимуса на 36% ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой животных и не влияло на их численность в медуллярной зоне. Ведение NnLa в дозе 10мг/кг крысам с ЭСД не влияло на количество $p53^{+}$-клеток в коре тимуса, тогда как повышение дозы NnLa до 50мг/кг приводило к достоверному снижению их плотности

популяции на 19% ($p<0,05$) по сравнению с диабетическими животными. В мозговом веществе тимуса введение NnLa в дозе как 10мг/кг, так и 50мг/кг крысам с ЭСД не сопровождалось изменениями количества $p53^+$-клеток. Изучение концентрации белка p53 показало, что развитие ЭСД приводило к ее достоверному увеличению в коре тимуса во всех классах $p53^+$-клеток на 7-21% ($p<0,05$) по сравнению с контролем. Введение NnLa характеризовалось ярко выраженными дозозависимыми эффектами: доза 10мг/кг приводила к увеличению концентрации белка p53 в коре, тогда как доза 50мг/кг оказывала противоположный эффект – концентрация p53 снижалась во всех классах $p53^+$-клеток на 6-10% ($p<0,05$) по сравнению с диабетическими животными. Изучение концентрации белка p53 в мозговом веществе тимуса показало относительную стабильность данного параметра. Так, развитие ЭСД, а также введения NnLa в дозе 50мг/кг крысам с ЭСД не приводили к изменениям концентрации p53. Исключение составляет только введение NnLa в дозе 10мг/кг крысам с ЭСД, сопровождавшееся достоверным увеличением концентрации p53 у $p53^+$-средних и $p53^+$-больших лимфоцитов по сравнению с диабетическими животными.

Развитие ЭСД у крыс линии Wistar сопровождалось увеличением количества $Bcl\text{-}2^+$-клеток в корковом веществе тимуса в 2 раза ($p<0,05$) и в мозговом веществе на 64% ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой животных. Введение NnLa в дозе как 10мг/кг, так и 50мг/кг приводило к достоверному снижению количества $Bcl\text{-}2^+$-клеток в коре тимуса на 52-53% ($p<0,05$) и в медуллярной зоне на 43-56% ($p<0,05$) по сравнению с диабетическими животными.

Полученные результаты дают возможность предположить о наличии тесной связи между изменениями экспрессии Bcl-2, p53, iNOS и уровнем апоптотических процессов в тимусе. Возможно, что гиперэкспрессия Bcl-2 с одной стороны защищает от NO-опосредованного апоптоза, тогда как с другой стороны способствует выживанию аутореактивных клонов лимфоцитов и тем самым является значительным фактором риска развития СД. Кроме того, можно допустить суммирование эффектов NO и Bcl-2 в отношении блокирования апоптоза, так как антиапоптотическое действие NO общеизвестно и может быть опосредовано через синтез цГМФ с последующим ингибированием каспаз или повышением экспрессии того же Bcl-2. Изучение совместных эффектов Bcl-2 и iNOS рядом исследователей также показало, что существует четкая зависимость между интенсивностью их экспрессии и уровнем апоптоза. Так, в экспериментах по трансфекции макрофагов линии RAW264 человеческим Bcl-2 трансфецированные клетки были защищены от гибели, вызванной активацией iNOS [4]. Было высказано предположение, что антиапоптотический эффект Bcl-2 реализуется посредством

значительного снижения NO-индуцированного повышения экспрессии белка Bax. Наряду с этим, есть и противоположные данные, согласно которым взаимодействие NO с членами суперсемейства Bcl-2 выражается в том, что при действии оксида азота на клетку понижается уровень внутриклеточного белка Bcl-2, возможно, через каспаз-индуцированное расщепление или p53-зависимое подавление его экспрессии [9]. Отдельный интерес представляют и данные о роли митохондрий в восприятии апоптотического сигнала от NO и к синтезу самого NO. В ряде работ показано наличие конститутивной формы NOS в митохондриях, и в частности, способности митохондрий печени крыс к самостоятельному синтезу NO [5]. Работы по очистке митохондриальной NOS (mtNOS) и изучению ее ферментативных характеристик показали, что эта изоформа NOS локализована во внутренней митохондриальной мембране. Выяснилось, что mtNOS очень схожа с макрофагальной iNOS, но экспрессируется конститутивно. В настоящее время пока не ясно, считать mtNOS отдельной изоформой, или это та же iNOS, содержащая посттрансляционные модификации, которые ведут к иной субклеточной локализации. Открытие mtNOS позволяет не только функционально, но и пространственно связать NO-зависимый апоптоз и регуляторы апоптоза из семейства bcl-2, тем более что кроме NO митохондрии генерируют активные формы кислорода, а значит участвуют в патогенезе повреждения клетки. Интересные данные были получены при изучении выхода цитохрома С из митохондрий после стимуляции mtNOS [6]. Повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле – хорошо известный индуктор апоптоза, но только недавно выяснено, что при этом значительную роль играет mtNOS. Показано, что для этого типа апоптоза необходимо поглощение Ca^{2+} митохондриями, при этом происходит активация mtNOS, начинается выход цитохрома С в цитозоль и одновременно происходит усиление перекисного окисления липидов. Выход цитохрома С, также как перекисное окисление липидов предотвращается ингибиторами NOS (L-NMMA) и гиперэкспрессией Bcl-2. С другой стороны, Сагач В.Ф и соавт. (2004) [2] показали, что преинкубация митохондрий с ингибитором NO-синтаз L-NAME (10^{-4}моль/л) достоверно увеличивала величину Ca^{2+}-индуцированного набухания митохондрий сердца и стимулировала открытие митохондриальной поры (МП), тогда как введение в инкубационную среду донора NO нитропруссида натрия (10^{-4}моль/л) после добавления L-NAME восстанавливало типичное Ca^{2+}-индуцированное набухание. Эти результаты согласуются с нашими данными о снижении экспрессии Bcl-2 в тимусе после введений блокаторов NOS, так как известно, что белок Bcl2 препятствует открытию МП.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мойбенко О.О. и др.* //Фізіол. журн. (2004) 50(1): 11-30;
2. *Сагач В.Ф. и др.* //Фізіол. журн. (2004) 50(2): 49-63;
3. *Чумаков П.М.* //Успехи Биол. Химии (2007) 47: 3-52;
4. *Brune B., von Knethen A., Sandau K.* //Eur. J. Pharmac. (1998) 351: 261-72;
5. *Elfering S., Sarkela T., Giulivi C.* //J. Biol. Chem. (2002) 277: 38079-86.;
6. *Ghafourifar P., Klein S., Schucht O.* //J. Biol. Chem. (1999) 274: 6080-4;
7. *Haluzfk M., Nedveldkovi J.* //Physiol. Res. (2000) 49: 37-42;
8. *Hemann M., Lowe S.* //Cell Death Diff. (2006) 13: 1256-9;
9. *Mebmer U., Brune B.* //Biochem. J. (1996) 319: 299-305.

ФРАГМЕНТАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* КАК МЕХАНИЗМ ЗАЩИТЫ ОТ СТРЕССА

Кнорре Д.А., Соколов С.С., Маркова О.В., Северин Ф.Ф.

НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им М.В.Ломоносова, Москва

При индукции программируемой клеточной смерти в клетках эукариот наблюдается фрагментация митохондрий [1]. Долгое время считалось, что этот процесс является необходимым этапом активации программы клеточного самоубийства. Однако в некоторых случаях было показано, что фрагментация митохондрий и активация апоптоза – независимые процессы [2]. В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* фрагментация митохондрий может быть вызвана стрессорными условиями: высокой концентрацией этанола [3] тепловым шоком [4] или некоторыми фармакологическими соединениями, например, амиодароном [5]. Недавно мы показали, что в некоторых случаях при стрессе, в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* образуются митохондриальные структуры, в которых несколько митопластов окружено одной наружной мембраной. Такие структуры могут формироваться за счет фрагментации митопластов в пределах одной наружной мембраны митохондрий. Мы показали, что наличие подобных структур в клетке положительно коррелирует с устойчивостью к стрессу [6].

В ходе данной работы мы получили данные предполагающие, что фрагментация митохондрий может служить для защиты митохондриальной ДНК от окислительного повреждения.

Митохондриальная ДНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* организована в крупные ДНК-белковые комплексы (нуклеоды), каждый из которых содержит несколько копий митохондриального генома. Эти

комплексы могут быть выявлены методами флуоресцентной микроскопии с помощью зондов, окрашивающих двуцепочечную ДНК. В норме, митохондрии дрожжей представлены в виде протяженных филаментов, в каждом из которых содержится несколько нуклеоидов (рис.1А).

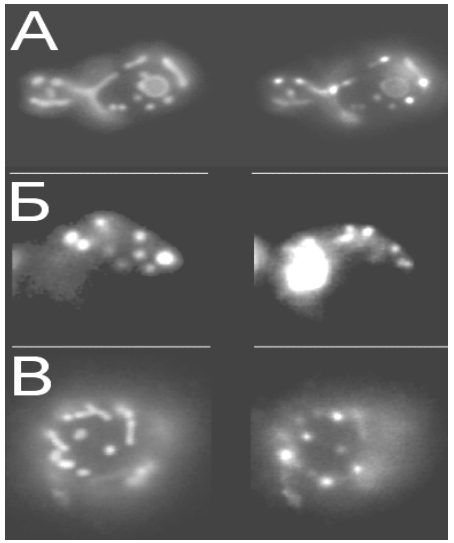


Рис.1. Окраска митохондрий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на трансмембранный потенциал (Тетраметил-родамин, слева) и митохондриальную ДНК (4',6-диамидино-2-фенилиндол, справа). А - контрольные клетки. Б - клетки, обработанные высокой концентрацией этанола (13% этанола, 1 час). В - Клетки подвергнутые действию теплового шока (46^{o}C, 30мин)

Мы исследовали характер распределения нуклеоидов в митохондриях дрожжей в условиях стресса. В соответствие с ранее опубликованными данными, было показано, что в клетках дрожжей обработанных 13% этанолом происходит фрагментация митохондрий [3]. Мы показали, что в пределах каждой отдельной клетки наблюдается обратная зависимость между интенсивностью флуоресценции тетраметилродамина и 4',6-диамидино-2-фенилиндола. На рисунке 2Б видно, что окраска на митохондриальную ДНК и трансмембранный потенциал в клетке дрожжей пространственно расходятся. Таким образом, при стрессе фрагментированные митохондрии образуют две фракции: часть фрагментов митохондрий содержит большое число копий митохондриальной ДНК и имеет относительно низкий трансмембранный потенциал, другая часть – с высоким трансмембранным потенциалом не содержит митохондриальной ДНК. Аналогичную картину наблюдали в клетках в условиях теплового шока (рисунок 1В). Известно [7], что митохондрии с высоким $\Delta\Psi$ могут быть источником активных форм кислорода, которые способны повреждать ДНК. Поэтому, подобная сегрегация митохондриальной ДНК и потенциала в митохондриях дрожжей в условиях стресса представляется способом защиты

митохондриальной ДНК. В подтверждения этого мы показали, что в клетках дрожжей штамма Δ*fis1,* в которых нарушен механизм деления митохондрий, под действием этанола не наблюдается сегрегации митохондриальной ДНК и трансмембранного потенциала, а резистентность клеток этого штамма к этому виду стресса значительно снижена.

Также можно предположить, что подобная сегрегация нужна клеткам дрожжей для «контроля качества» митохондриальной ДНК при выходе из стресса. Недавно была опубликована работа [8], в которой авторы показали, что после фрагментации одна из образовавшихся митохондрий деполяризуются. После этого, если эта митохондрия по каким-либо причинам оказывается неспособна восстановить свой трансмембранный потенциал, то она попадает в аутофагосому. Возможно, подобный процесс происходит в клетках дрожжей в ответ на стресс, способный привести к повреждению митохондриальной ДНК.

*Работа поддержана грантом РФФИ №*09-04-01583-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Skulachev V.P. et. al.* //Mol. Cell Biochem. (2004) 256-257(1-2): 341-58;
2. *James D.I., Martinou J.C.* // Dev. Cell (2008) 15(3): 341-3;
3. *Kitagaki et al.* // FEBS Lett. (2007) 581: 2935-42;
4. *Lewandowska A. et. al.* // Biochim. Biophys. Acta (2006) 1763(2): 141-51;
5. *Pozniakovsky A.I. et .al.* //J. Cell Biol. (2005) 168(2): 257-69;
6. *Knorre D.A. et. al.* //Biochemistry (2008) 73(11): 1254-9;
7. *Korshunov et al.* //FEBS Lett. (1997) 416: 15-8;
8. *Twig G. et. al.* //EMBO J. (2008) 27(2):433-46.

ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК В БУРОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ПЕЧЕНИ СПЯЩИХ И АКТИВНЫХ СУСЛИКОВ (*SPERMOPHILLUS UNDULATUS*)

Крамарова Л.[1,2]*, Cannon B.*[2]*, Nedergaard J.*[2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]The Wenner-Gren Institute, Stockholm, Sweden

Резюме. В данной работе был прослежен уровень апоптоза в буром жире и печени зимоспящих и активных сусликов на протяжении годового периода. С помощью метода иммуноферментного анализа (ELISA) проанализированы цитоплазматические фрагменты ДНК. В состоянии спячки уровень апоптоза как в печени, так и в БЖТ у животных был значительно снижен. В печени активных животных этот процесс увеличивался в 4 раза и не зависел от сезона. В буром жире уровень апоптоза не зависел от состояния животных (спячка/активность), но находился в прямой корреляции с функциональной нагрузкой данной ткани.

Введение. У млекопитающих, подверженных сезонным воздействиям температуры окружающей среды, бурая жировая ткань (БЖТ) претерпевает циклические изменения, состоящие из рекрутизации ткани при уменьшении длины светового дня и температуры и атрофии ткани, когда световой день и температура увеличиваются [1-3]. Зимоспящие животные проявляют сезонные изменения термогенной активности бурой жировой ткани. Однако, информация относительно ее регуляции, а также регуляции роста и инволюции ткани до сих пор ограничена или противоречива. Нами обнаружено, что перед залеганием в спячку у якутских сусликов (*Spermophillus undulatus*), живущих при постоянной температуре и световом дне происходит увеличение веса бурого жира в 5-8 раз. В летний период у активных животных можно найти лишь небольшое количество ткани, остающееся в подлопаточной области. В данной работе мы исследовали, сопровождается ли инволюция данной ткани активацией апоптоза в ней.

Материалы и методы

Животные. Суслики (*Spermophillus undulatus*) были отловлены в Якутской области в августе месяце, перевезены в Пущино и помещены в виварий, в индивидуальные клетки. Пища вода и гнездовой материал давали в достаточном количестве. В ноябре все животные были перенесены в темную комнату с температурой 2-4°C. БЖТ и печень от активных животных забирали в июне и октябре, а также между баутами спячки – в феврале и марте; от спящих животных – в январе, феврале и марте на 3-5-й день баута.

Определение содержания ДНК. Содержание ДНК в тканях определяли по методу, описанному Downs and Wilfinger [4], а также West et al. [5]. В качестве стандарта была использована ДНК спермы лосося, концентрация которой определялась спектроскопическим методом при 260нм. Для того чтобы растворить ДНК, гомогенаты ткани обрабатывали ультразвуком, и аликвоты суспензии обрабатывали 10мМ ЭДТА (pH подводили до 12.3 с помощью NaOH). Образцы инкубировали при 37°C в течение 30 минут, охлаждали на льду, нейтрализовали 1M KH_2PO_4 и выдерживали на льду 10 минут. Флюоресцентный краситель Hoechst 33258 (Serva) был растворен в 10мМ NaCl, 10мМ Tris-HCl, (pH 7.0) до конечной концентрации 200нг/мл раствора и добавлен к образцам в равном объеме. Флюоресценцию измеряли при 455нм и длине волны возбуждения 350нм на спектрофлюориметре Shimadzu RF-540.

Количественное определение фрагментации ДНК. С помощью метода иммуноферментного анализа (ELISA) были проанализированы цитоплазматические фрагменты ДНК, связанные с гистонами. Для этого использовали коммерческий набор фирмы Roche (Cell Death Detection ELISA^{plus}; Mannheim, Germany). Гомогенаты ткани инкубировали в течение 30 минут в коммерческом лизисном буфере и центрифугировали 20 минут при 13000g в центрифуге Eppendorf при 4°C для разделения цитозольной и ядерной фракций. Аликвоты цитозольной фракции добавляли в лунки и инкубировали с антигистоновыми антителами и антителами к ДНК, коньюгированными с пероксидазой. Для того чтобы обеспечить равную загрузку клеток в каждом исследовании и для каждого образца, мы предварительно определяли количество ДНК в каждом из них и затем готовили соответствующие разведения. Иммунокомплекс определяли добавлением субстратного раствора, содержащего ABTS (2'2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate). Измерение оптической плотности проводили при 405нм на спектрофотометре Labsystemms Multiscan Plus. В качестве контроля использовали коммерческий субстратный раствор.

Результаты. На протяжении годового периода мы проследили изменения в уровне фрагментации ДНК (как меры апоптоза) в печени и буром жире активных и гибернирующих сусликов. В печени (рис.1), мы обнаружили низкое содержание апоптоза у животных, находящихся в глубокой спячке и этот уровень был неизменным на протяжении всего периода спячки (январь-март). Следует отметить, что в этой ткани уровень фрагментации ДНК в 4 раза выше у животных в активном состоянии и является стабильным на протяжении года. Одним из объяснений может быть то, что скорость обновления клеток в печени у активных животных в 4 раза выше, по сравнению с гибернирующими животными.

В БЖТ (рис.2), мы наблюдали более сложную картину. У животных в состоянии спячки уровень апоптоза в этой ткани был приблизительно в 2 раза ниже по сравнению с печенью. Неожиданно мы обнаружили, что активное состояние не обязательно ассоциировалось с высокой скоростью апоптоза. Было показано, что уровень апоптоза у активных животных в феврале был неотличим от такового у спящих животных в этом месяце. Однако он увеличивался в 5 раз в марте и в 10 раз в июне месяце. После этого скорость апоптоза снижалась, и к октябрю возвращалась к низкому уровню, характерному для гибернирующих животных. Приемлемым объяснением этих данных, является то, что скорость апоптоза может служить одним из основных регуляторов массы ткани, ее атрофии или рекрутизации. Так, в феврале бурая жировая ткань все еще нужна для продукции тепла, поэтому апоптоз держится на низком уровне. В марте физиологическая

потребность в данной ткани уменьшается, а в июне эта потребность сводится до минимума и, соответственно, апоптоз ускоряется, чтобы ускорить атрофию ткани. В начале нового сезона зимней спячки скорость апоптоза снова значительно снижается, позволяя протекать процессу рекрутизации ткани.

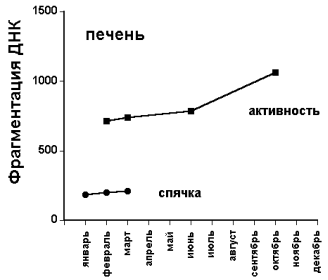


Рис.1. Фрагментация ДНК (относительные единицы) в печени сусликов. Печень была взята от сусликов в различных физиологических состояниях (спячка/активность) на протяжении годового периода. Результаты были нормализованы на контрольный образец, который в предварительных экспериментах показал наименьший уровень поглощения (фрагментация ДНК). Данные получены от 4-6 животных.

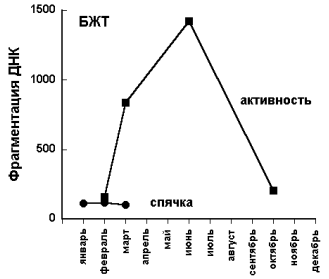


Рис.2. Фрагментация ДНК (относительные единицы) в буром жире сусликов. БЖТ была взята от сусликов в различных физиологических состояниях (спячка/активность) на протяжении годового периода. Результаты были нормализованы на контрольный образец, указанный в подписи к рис.1. Данные получены от 4-6 животных.

Дискуссия

Зимняя спячка и апоптоз. Большие различия физиологической активности в состояниях спячка/бодрствование должны были привлечь внимание исследователей в связи с возможностью контроля апоптоза. Однако мы нашли всего несколько статей, в которых изучалось влияние зимней спячки на уровень апоптоза. В различных тканях зимоспящих и активных сусликов были исследованы профили экспрессии некоторых генов, относящихся к процессу апоптоза, и найдены различия в уровне их экспрессии [6]. В статье Fleck и Carey [7] был прослежен процесс апоптоза в кишечнике у зимоспящих в процессе гибернации и в летний период. Был обнаружен низкий уровень апоптоза у летних, активных животных и высокий уровень в состоянии зимней спячки. Это противоположно тому, что мы нашли не только в БЖТ, но и в печени. Суммируя данные, мы можем сделать заключение, что различия в уровне и скорости апоптоза в общем не связаны с гибернацией. Скорее всего,

уровень апоптоза в ткани связан с функциональной активностью данной ткани в течение гибернации.

Регуляция апоптоза в БЖТ. Современные представления о контроле апоптоза в буром жире сложились, в основном, из исследований видов животных, не впадающих в спячку. Так, у мышей, перемещенных из тепла в условия холода, скорость апоптоза в БЖТ уменьшалась и, наоборот, если мышей возвращали в тепло, скорость апоптоза снова увеличивалась [8]; таким образом, апоптоз следует требованию физиологической потребности мыши в большем или меньшем количестве БЖТ. Уровень апоптоза, вероятно, контролируется норадреналином. Так, в культуре клеток, выделенных из БЖТ различных грызунов, добавление норадреналина уменьшало скорость апоптоза [8-10].

У сусликов на протяжении года степень стимуляции норадреналином различна, и теоретически мы можем проанализировать, могут ли подразумеваемые различия симпатической активности объяснить различия в уровне апоптоза, полученные в нашей работе. Различиями в симпатической активности можно адекватно объяснить цирканнуальные события у сусликов, находящихся в активном состоянии: зимой БЖТ постоянно стимулируется для того, чтобы продуцировать тепло, и в это время наблюдается низкий уровень апоптоза. Соответственно, в течение лета, когда симпатическая стимуляция прекращается до наступления новых холодов, уровень апоптоза очень высок. В состоянии глубокой спячки симпатическая стимуляция БЖТ низкая и можно было ожидать, что апоптоз должен быть высоким. Однако вопреки предположениям, полученный низкий уровень апоптоза в этом состоянии не может быть легко объяснен с использованием модели адренергического контроля.

В этом отношении вопрос регуляции апоптоза в БЖТ зимоспящих является частью общего вопроса регуляции рекрутизации данной ткани у зимоспящих. Рекрутизация обычно отображает цирканнуальные ритмы, которые не всегда совпадают со сдвигом в погодных условиях (тепло\холод). У многих зимоспящих животных развита сезонная гиперфагия и ожирение, и накопление массы бурого жира перед залеганием в спячку (конец лета). Рекрутизация БЖТ в этих условиях не может быть вызвана норадреналином, так как его присутствие активировало бы термогенез в ткани, и тем самым предотвратило бы накопление массы белого жира и в целом веса тела животного [11]. Сигнальный путь и вещества, индуцирующие рост БЖТ (и, соответственно, ингибирование апоптоза) без активации симпатической нервной системы, у гибернаторов в настоящее время неизвестны.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Royal Swedish Academy of Sciences.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cannon B., Nedergaard J.* //Physiol. Rev. (2004) 84: 277-359;
2. *Nedergaard J., Cannon B.* //Mam. hiber. Phil. Trans. R. Soc. London (1990) B326: 669-86;
3. *Kramarova L.I. et al.* //Comp. Biochem Physiol. (2007) 146(3): 408-14;
4. *Downs T.R., Wilfinger W.W.* //Anal. Biochem. (1983) 131: 538-47;
5. *West D.C., Sattar A., Kumar S.* //Anal. Biochem. (1985) 147: 289-95;
6. *Yan J. et al.* //Physiol. Genomics (2007) 32:170-81;
7. *Fleck C.C., Carey H.V.* //Am. J. Physiol. (2005) 289: R586-95;
8. *Lindquist J.M. Rehnmark S.* //J. Biol. Chem. (1998) 273: 30147-56;
9. *Briscini L. et al.* //FEBS Lett. (1998) 431: 80-4;
10. *Nisoli E. et al.* //Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. (2001) 25: 1421-30;
11. *Boyer B.B. et al.* //Life Cold. Ecol. Physiol. Molec. Mech. (1993): 483-91.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СИСТЕМ ЭНЕРГЕТИКИ КЛЕТКИ, ГЛИКОЛИЗА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ, НА РАЗВИТИЕ ПРОЦЕССА АПОПТОЗА ПРИ ИШЕМИИ МОЗГОВОЙ ТКАНИ

Лобышева Н.В.[1,2], Селин А.А.[1], Тоньшин А.А.[2], 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

Введение. Работа посвящена исследованию механизмов клеточной гибели при ишемии. Ишемический инсульт является следствием локального нарушения системы кровоснабжения головного мозга. Известно, что ишемическая область очага инсульта гетерогенна [1]. Использование методики радиоавтографического измерения потока крови в пораженных участках мозговой ткани, зона инсульта была разделена на зону «полутени» (где поток крови достигает значений от 20% до 40% от нормальной величины) которая окружает зону «ядра» инсульта (где поток крови ниже 20% от нормального) [2]. Изменение потока крови в зоне ишемического инсульта приводит к снижению жизненно важных субстратов, что активирует запуск молекулярных механизмов индуцирующих массовую гибель нервных клеток в области ишемического очага [3]. Наиболее критическим является недостаток энергетических субстратов – глюкозы и кислорода, необходимых для поддержания необходимого уровня АТФ в клетке. Целью настоящего исследования являлось выяснение, каким образом субстраты двух

основных систем энергетики клетки – гликолиза (глюкоза) и окислительного фосфорилирования (кислород), влияют на развитие процесса клеточной гибели.

Результаты. Эксперименты проводились на переживающих срезах коры головного мозга в модельных условиях *in vitro*, предположительно соответствующих условиям в областях ишемического очага:

1. область ишемии I (ОИ I) – центр ишемического очага, в котором полностью отсутствует, как глюкоза, так и кислород (срезы переживали в полной аноксии в присутствии дезоксиглюкозы и в отсутствии глюкозы);
2. область ишемии II (ОИ II), в которой есть глюкоза, но уровень кислорода близок к нулевому. В свою очередь, данную область можно разделить на подобласти со сниженным уровнем глюкозы (5мМ) (ОИ IIа) и физиологически нормальным уровнем глюкозы (10мМ) (ОИ IIб) (срезы переживали в полной аноксии в присутствии 5 и 10мМ глюкозы);
3. область ишемии III (ОИ III), в которой уровень глюкозы близок к уровню в интактной ткани (10мМ), а уровень кислорода существенно ниже нормы, при этом создаются оптимальные условия для генерации активных форм кислорода (срезы переживали в аноксии/реоксигенации в присутствии 10мМ глюкозы).

В этих модельных условиях оценивали специфику деструкции ДНК как маркер апоптоза, целостность внешней мембраны митохондрий в связи с исследованием выхода проапоптотического белка цитохрома с, активность каспазы 3, участие NMDA рецептора в реализации клеточной гибели, и эффект тормозного нейромедиатора глицин в предотвращении клеточной гибели.

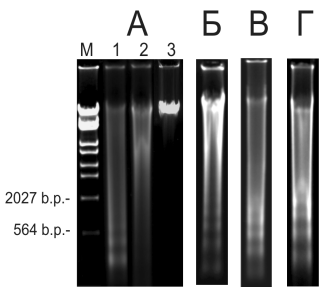


Рис.1. Межнуклеосомная фрагментация ДНК, как маркер апоптоза, наблюдается в областях ишемии ОИ II и ОИ III через 24ч. Электрофорез ДНК, выделенной из срезов коры после инкубации: (А) 1 - в аноксии (ОИ IIб, 10мМ глюкозы); 2 - в отсутствии глюкозы и в присутствии 20мМ дезоксиглюкозы (ОИ I); 3 – интактная ДНК; М – маркер. (Б) в аноксии (ОИ IIа, 5мМ глюкозы). (В) в аноксии в присутствии 10мМ глюкозы и 20мМ дезоксиглюкозы. (Г) Инкубация в условиях аноксии/реоксигенации (ОИ III).

На первом этапе наших экспериментов исследовались интенсивность и характер процессов деструкции ДНК в условиях моделирующих области ишемического очага (ОИ I-III). Характер распада ДНК рассматривался нами в качестве критерия протекания процессов

некроза и апоптоза, развивающихся в ткани коры головного мозга в условиях дефицита кислорода и глюкозы.

В ишемической области I при подавленном гликолизе, когда в аноксии в среде инкубации полностью отсутствовала глюкоза и было 20мМ дезоксиглюкозы, наблюдается неспецифический распад ДНК – маркер некроза (рис.1А, дорожка 2). Межнуклеосомная фрагментация ДНК, которая свидетельствует о протекании апоптоза, наблюдается в области ишемии IIа, при низком уровне глюкозы 5мМ (рис.1Б) и в области ишемии IIб, где уровень глюкозы был близок к физиологическому 10мМ (рис.1А, дорожка 1). Следует отметить, что в условиях аноксии в случаях, когда в среде присутствует глюкоза (10мМ) и дезоксиглюкоза (20мМ) также наблюдается межнуклеосомный распад ДНК (рис.1В). Данный результат можно объяснить тем, что, по-видимому, для запуска программируемой клеточной гибели необходимо совсем небольшое количество АТФ, которое клетки мозга могут синтезировать даже при очень низком уровне гликолиза. В области ишемии III при аноксии/реокигенации в присутствии 10мМ глюкозы также наблюдается межнуклеосомная фрагментация ДНК (рис.1Г)

На втором этапе исследования анализировали целостность внешней мембраны митохондрии – проницаемость для проапоптотического белка цитохрома с.

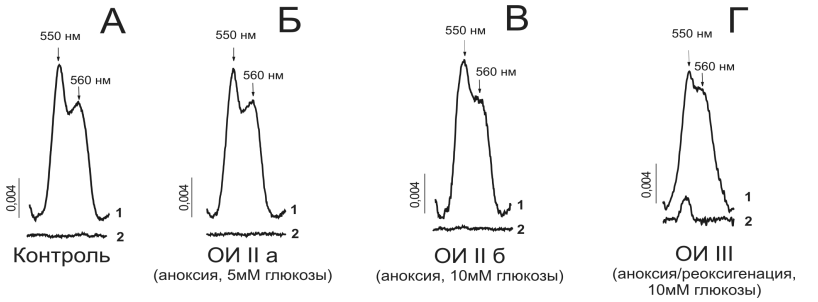


Рис.2. Цитохром с локализован в митохондриях после 6 часов инкубации в ОИ IIа (5мМ глюкозы) и ОИ IIб (10мМ глюкозы). Измерение цитохрома с в митохондриях и цитозоле с помощью спектров оптического поглощения 550нм – максимум поглощения цитохрома с, 560нм – максимум поглощения цитохрома b. (1) Суспензия; (2) Супернатант. (А) – контрольный гомогенат (получен при гомогенизации в среде с высокой ионной силой 120мМ KCl); (Б) – гомогенат мозговых срезов после 6ч инкубации в ОИ IIа (получен при гомогенизации в среде 120мМ KCl); (В) – гомогенат мозговых срезов после 6ч инкубации в ОИ IIб (получен при гомогенизации в среде с высокой ионной силой 120мМ KCl).

Исследования спектральных характеристик гомогенатов срезов коры головного мозга показали, что в областях ишемии IIа и б в течение 6-24ч цитохром с не выходит из митохондрий в цитозоль (рис.2б,в). Пик цитохрома с (λ=550нм) в супернатанте также не наблюдался.

Качественно другая картина наблюдалась при исследовании спектральных характеристик гомогенатов после инкубации в условиях аноксии/ реоксигенации (область ишемии III). После гомогенизации пик цитохрома с в осадке был значительно ниже, чем в контроле, при этом появился пик цитохрома с в супернатанте (рис 2г).

Таким образом, процесс клеточной гибели в условиях аноксии и аноксии/реоксигенации развивается по-разному: в одном случае без участия цитохрома с, в другом с его выходом из митохондрий в цитозоль клеток.

На третьем этапе работы исследовали активность каспазы 3. В настоящее время известно множество механизмов протекания программируемой клеточной смерти (ПКС). Условно ПКС можно разделить на каспаз-зависимые и -независимые [4]. Активация каспаз может происходить как с участием, так и без участия цитохрома с [5].

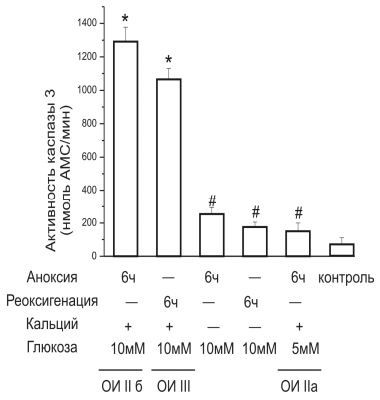


Рис.3. Флуорометрическое измерение активности каспазы 3 в мозговых срезах. Активация каспазы 3 наблюдается после 6 часов инкубации в ОИ II б (10мМ глюкозы) и в ОИ III (при аноксии/реоксигенации). Отсутствие активации каспазы 3 наблюдается в ОИ IIа (5мМ глюкозы), и в случае, когда 2,0мМ Ca^{2+} в среде инкубации были заменены 0,25мМ EGTA в ОИ IIб и ОИ III. Контролем является мозговая ткань интактного животного. Данные приведены с учетом SE. *p<0,001 vs. контроль; #достоверно не отличаются от контроля, p>0,05 vs. контроль.

Представлялось интересным узнать, при каких условиях индукции клеточной гибели активируется каспаза 3 и коррелирует ли ее активация с выходом цитохрома с. Исследование активности каспазы 3 флуорометрическим методом показало, что в области ишемии IIа при сниженном уровне глюкозы (5мМ) не наблюдалось активации каспазы 3 (рис.3). В этой области ишемии протекает каспаз-независимый апоптоз. В области ишемии II при нормальном уровне глюкозы (10мМ) уже через 6 часов наблюдалась активация каспазы 3 (рис.3). При этом активация каспазы 3 происходила без участия цитохрома с, так как он был локализован в митохондриях (рис.2). В области ишемии III также

наблюдалась активация каспазы 3 (рис.3). В этой области ишемии протекает каспаз-зависимый «классический» апоптоз, связанный с выходом цитохрома с из митохондрий в цитозоль.

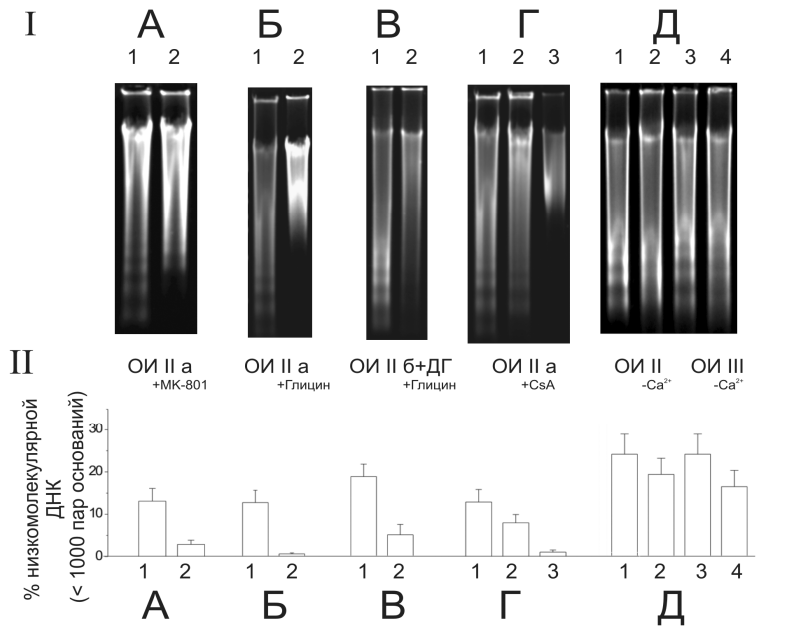


Рис.4. ДНК, выделенная из срезов коры после инкубации I (А) в аноксии (ОИ IIа, 5мМ глюкозы)1 – без добавок 2 – 10мкМ МК-801; (Б) в аноксии ОИ IIа 1 – без добавок, 2 – 5мМ глицина; (В) в аноксии в присутствии 10мМ глюкозы и 20мМ дезоксиглюкозы 1 – без добавок, 2 – 5мМ глицина; (Г) в аноксии (ОИ IIа, 5мМ глюкозы) 1 – без добавок, 2 – 5мкМ CsA, 3 – 10мкМ CsA; (Д) в аноксии (ОИ IIб) 1 – без добавок, 2 –при отсутствии Ca^{2+} и в присутствии 0,25мМ EGTA в среде; в аноксии/реоксигенации (ОИ III) 3 – без добавок , 4 – при отсутствии Ca^{2+} и в присутствии 0,25мМ EGTA в среде. Блок II Процент низкомолекулярной ДНК от общей массы ДНК.

В настоящей работе была обнаружена связь между распадом ДНК (апоптозом, протекающим в ткани коры головного мозга) и эффектом перевозбуждением NMDA рецепторов, что возникает, как известно, в условиях дефицита кислорода. Специфический ингибитор NMDA рецепторов МК-801 существенно снижал интенсивность межнуклеосомной фрагментации при апоптозе, развивающемся в области ишемии IIа при пониженной концентрации глюкозы (5мМ) (рис.4А). Однако в области ишемии IIб (10мМ глюкозы) и в области ишемии III (аноксии/реоксигенации) аналогичного эффекта не наблюдалось (данные

не приведены). Перевозбуждение NMDA-рецепторов может подавляться не только ингибиторами, но и тормозными нейромедиаторами, например милимолярными концентрациями глицина [6]. В ходе экспериментов было установлено, что апоптоз в области ишемии IIa при пониженной концентрации глюкозы в среде (5мМ) существенно снижался под воздействием 5мМ глицина (рис.4Б). Аналогичный результат – значительное подавление межнуклеосомной фрагментации ДНК – был получен при частичном подавлении гликолиза дезоксиглюкозой (рис.4В). При нормальном уровне глюкозы (10мМ) в области ишемии II глицин не влиял на фрагментацию ДНК (данные не приведены).

Известно, что перевозбуждение NMDA рецепторов приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и набуханию клетки [7]. Исходя из этого, в случае связи индукции апоптоза с перевозбуждением NMDA-рецепторов, этот процесс должен подавляться при снижении концентрации кальция в среде инкубации. При инкубации срезов в областях ишемии II и III в безкальциевой среде, содержащей 0,25мМ EGTA, межнуклеосомной фрагментации ДНК через 24ч не наблюдалось (рис.4Д).

Было обнаружено, что индукция процесса апоптоза в области ишемии IIa при низкой глюкозе (5мМ) связана с открытием неспецифической поры в митохондриях. Присутствие 10мкМ циклоспорина А в среде инкубации подавляло межнуклеосомную фрагментацию ДНК (рис.4Г). При нормальной концентрации глюкозы в области ишемии II и III эффекта циклоспорина А не наблюдалось (данные не приведены).

Выводы. В работе показано, что при отсутствии кислорода и глюкозы (ОИ I) в ткани развивается некроз. В полной аноксии при сниженном уровне глюкозы (ОИ IIa) развивается каспаз-независимый апоптоз (рис.3) без выхода цитохрома с из митохондрий в цитозоль (рис.2Б), который реализуется из-за гиперактивации NMDA рецептора и сопровождается открытием неспецифической поры в митохондриях (рис.4А,Г). В аноксии в присутствии 10мМ глюкозы (ОИ IIб) индукция апоптоза сопровождается активацией каспазы 3, которая осуществлялась без выхода цитохрома с. При аноксии/реоксигенации апоптоз развивался по «классическому» пути [8], с выходом цитохрома с из митохондрий в цитозоль (рис.2Г) и при активации каспазы 3 (рис.3). Таким образом, доказано, что в области ишемического инсульта могут развиваться как минимум четыре различных молекулярных пути гибели клеток, причем выбор пути клеточной гибели определяется уровнем кислорода и глюкозы в ткани. Следует указать, что тормозной нейромедиатор глицин блокирует развитие апоптоза при аноксии в ОИ IIa. Кроме того показано, что циклоспорин, который блокирует открывание неспецифической поры в митохондриях и выход проапоптозных белков в цитоплазму, также ингибирует развитие апоптоза в этой зоне.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Astrup J., Siesjo B.K., Symon L.* //Stroke (1981) 12(6): 723-5;
2. *Belayev L. et al.* //J. Cereb. Blood Flow Metab. (1997) 17(12): 1266-80;
3. *Jones S.P. et al.* //J. Adv. Nurs. (2007) 60(6): 577-94;
4. *Lamy L. et al.* //J. Biol. Chem. (2003) 278(26): 23915-21;
5. *Molz S. et al.* //Neurochem. Res. (2008) 33(1): 27-36;
6. *Lynch J.W.* //Physiol. Rev. (2004) 84(4): 1051-95;
7. *Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H.* //Am. J. Pathol. (1990) 136(3): 593-608;
8. *He X. et al.* //J. Neurol. Sci. (2008) 268(1-2): 18-27.

ВЛИЯНИЕ АЛЬДОСТЕРОНА НА ОБЪЕМ ГЛАВНЫХ КЛЕТОК СОБИРАТЕЛЬНЫХ ТРУБОК ПОЧКИ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ГИПООСМОТИЧЕСКОГО ШОКА

Логвиненко Н.С., Соленов Е.И.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Альдостерон является основным регулятором баланса натрия в организме, осуществляющим направленное изменение потоков натрия через главные клетки эпителия кортикального отдела собирательных трубок (CCD) нефрона почки. Основными мембранными белками, принимающими в этом участие являются апикальный натриевый канал (ENaC), через который натрий поступает в главную клетку, и базолатерально локализованный натриевый насос, активно выводящий натрий из клетки в околоклеточную среду, откуда он попадает в капиллярную сеть [1]. Апикальная мембрана главных клеток постоянно омывается канальцевой жидкостью, осмотическое давление которой изменяется в широких пределах, что влияет на величину клеточного объема. Гипотоническая среда является наиболее опасной для клетки, поскольку появляется угроза разрыва клеточной мембраны в результате набухания [2]. В задачу настоящего исследования входило изучение влияния альдостерона на кинетические характеристики изменения объема клеток в условиях гипоосмотического воздействия на фрагменты собирательных трубок почки крысы, полученных методом микродиссекции.

В экспериментах использовались 60-ти дневные крысы линии Вистар из лаборатории экспериментальных животных ИЦиГ СО РАН

(Новосибирск). Суспензию фрагментов почечных канальцев получали по методу, опубликованному ранее [4]. Осмотический шок вызвался сменой нормотонического фосфатного солевого раствора с осмотической концентрацией 280мОсм/кг на гипотонический, полученный разведением в 2 раза водой (140мОсм/кг). Смена омывающего раствора происходила в течение 100мсек. Изменение объема клетки выражали в относительных величинах флуоресценции красителя Calcein в клетках, расположенных на открытом конце фрагмента CCD. Базолатеральная и апикальная поверхности этих клеток контактируют с окружающим раствором. В работе использовали разработанную нами модификацию метода непрерывной регистрации флюоресценции при изменении объема клетки в процессе реакции на осмотический шок [4].

Характерная кривая изменения объема главных клеток CCD крыс в ответ на осмотический шок в контроле и при добавлении альдостерона (10нМ) представлена на рис.1. Как видно из рис.1, гипотонический шок (280/140мОсм/кг) вызывал быстрый рост объема главных клеток CCD с последующим снижением. При возвращении клеток в изотоническую среду объем клеток стабилизировался на более низком уровне. В присутствии альдостерона (10нМ) амплитуда роста клеточного объема уменьшилась почти втрое и составляла примерно 30% от соответствующего контроля. Время восстановления объема клетки увеличилось почти вдвое (0.09±0.02 и 0.21±0.03сек. соответственно; $p<0.05$). Замена альдостерона пятикратной дозой кортикостерона (50нМ) не привела к изменению кривой изменения объема клетки, по сравнению с контролем (не показано), что свидетельствует о специфичности эффекта альдостерона. Из литературы известна чувствительность эпителиального натриевого канала (ENaC) к механическим воздействиям, проявляющимся при резком изменении объема клеточной мембраны [2,3].

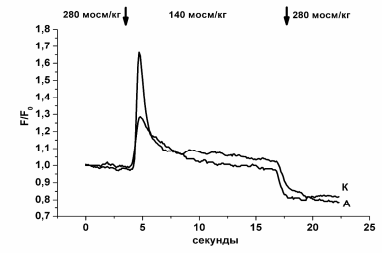


Рис.1. Влияние альдостерона на типичный профиль относительной флюоресценции при изменении клеточного объема CCD почки крысы в условиях гипоосмотического шока (280-140мОсм/кг). F/F_0 – относительная флюоресценция; Вертикальные стрелки – смена осмолярности. К – контроль; А– альдостерон (10нМ).

Для того, чтобы выявить возможное участие ENaC и, соответственно, трансмембранных натриевых потоков в реакции главных клеток на гипоосмотический шок, мы исследовали эффект его ингибитора амилорида. Амилорид (10^{-5}М) не оказал существенного влияния на характер изменения клеточного объема (не показано). Однако

отрицать его участие в реализации быстрого эффекта альдостерона нам представляется преждевременным. Возможно, в присутствии альдостерона ENaC выступает как один из полноправных участников механизма компенсации резкого увеличения объема клетки в условиях гипоосмотического шока. Так ранее нами была показана возможность временного входа натрия в клетку в фазе набухания [5]. Можно предположить, что альдостерон влияет на активность ENaC и других ионных и водных каналов, перераспределяя трансмембранные водные и ионные потоки, что приводит к смягчению реакции клетки на гипоосмотический стресс и, вследствие этого, повышает вероятность выживания клетки в неблагоприятных условиях.

Работа выполнена при поддержке: РФФИ №08-04-00658, №08-04-00541, «Ведущие научные школы» НШ-1647.2008.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Booth R.E., Johnson J.P., Stockand J.D.* //Adv. Physiol. Educ. (2002) 26: 8-20;
2. *Hoffmann E.K., Lambert I.H., Pedersen S.F.* //Physiol. Rev. (2009) 89: 193-277;
3. *Satlin L.M. et al.* //Am. J. Physiol. Renal. Physiol. (2006) 291(5): 923-31;
4. *Solenov E.I. et al.* //J. Neurosci. Methods (2002) 113 (1): 85-90;
5. *Solenov E.I.* //J. Bioph. (2008): 1-5.

ДИСБАЛАНС БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА BCL-2 В МОДУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ

Марошкина А.Н.[1], Чечина О.Е.[1], Жукова О.Б.[1], Рязанцева Н.В.[1], Прохоренко Т.С.[1], Биктасова А.К.[1], Белкина М.В.[1], Сазонова Е.В.[1], Зима А.П.[1], Радзивил Т.Т.[2]

[1]ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, Томск
[2]Центральная научно-исследовательская лаборатория, межкафедральная лаборатория молекулярной медицины, Томск

В настоящее время актуальным направлением медицины является исследование модуляции апоптоза как основного звена патогенеза многих заболеваний, в том числе и персистентных вирусных инфекций [1,4,6]. Митохондриям принадлежит одна из ведущих ролей в развитии и регуляции программированной клеточной гибели. Установлено, что изменения митохондрий, такие как уменьшение трансмембранной разности потенциалов, освобождение некоторых митохондриальных белков,

увеличение продукции активных форм кислорода, разрушение электрон-транспортной цепи и торможение синтеза АТФ, определяют некоторые аспекты клеточной гибели [2,6]. Большую роль в регуляции митохондрийзависимого апоптоза играют проапоптотические и антиапоптотические белки семейства Bcl-2, которые могут стать мишенью действия вирусных агентов [7]. Так, дефект митохондриального пути апоптоза является одной из причин повышенной жизнеспособности инфицированных вирусом клеток, что приводит к хронизации процесса и обуславливает недостаточную эффективность терапии. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) также способен модулировать программированную клеточную гибель и тем самым вызывать длительную персистенцию в организме человека [3]. В связи с этим целью настоящего исследования явилось установление особенностей реализации митохондриального пути апоптоза лимфоцитов крови при клещевом энцефалите (КЭ).

В программу исследования были включены 51 пациент (27 женщин и 24 мужчин) в возрасте от 20 до 45 лет: 30 больных с острой лихорадочной формой КЭ легкой или умеренной степени тяжести, а также 21 пациент с длительной персистенцией ВКЭ (хроническое (более 6мес) течение). Верификация диагноза КЭ устанавливалась путем сбора эпидемиологического анамнеза, оценки неврологического статуса и проведения лабораторных методов исследования. Все пациенты были обследованы до начала лечения. В контрольную группу были включены 25 здоровых доноров (10 мужчин и 15 женщин) с аналогичными характеристиками по полу и возрасту. Исследовали стабилизированную гепарином (25ЕД/мл) венозную кровь, взятую из локтевой вены утром до приема пищи. Объектом исследования служили лимфоциты, выделенные из крови путем центрифугирования на слое «Ficoll-Paque» плотностью 1,077.

Регистрацию апоптоза лимфоцитов проводили методом, основанным на определении экспрессии фосфатидилсерина с помощью аннексина V, конъюгированного с FITC методом проточной лазерной цитометрии. Цитофлуориметрическая оценка изменения величины мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$) осуществлялась с использованием раствора флюорохрома JC-1. Содержание Bad, Bax и Bcl-2 определяли методом вестерн-блоттинга с помощью соответствующих моноклональных антител («Sigma», США). Статистическую обработку полученных данных проводили методами описательной статистики и непараметрического анализа (критерии Крускала-Уоллиса, Манна-Уитни с поправкой Бонферрони). Достоверными считали различия при $p<0,05$.

Как показали результаты проведенного нами исследования у больных острым КЭ и у пациентов с хронической антигенемией ВКЭ содержание аннексин-V^+-лимфоцитов и лимфоцитов со сниженным $\Delta\psi$

достоверно повышалось по сравнению со значениями данных параметров у здоровых лиц. Обнаружено также, что число апоптотических клеток и лимфоцитов со сниженным $\Delta\psi$ у пациентов с длительной антигенемией ВКЭ было достоверно более низким, чем у больных острым клещевым энцефалитом (табл.1).

В остром периоде заболевания усиление апоптоза, возможно, связано с защитной реакцией организма, направленной на противостояние дальнейшей репликации возбудителя [4]. С другой стороны, ВКЭ обладает тропизмом к лимфоидной ткани, поэтому чрезмерная гибель иммунокомпетентных клеток, осуществляющих реализацию противовирусного иммунитета, может обусловливать несостоятельность Т-клеточного звена [3,5]. Это приводит к смещению иммунного баланса в сторону Th2 и позволяет вирусу длительно сохраняться в организме с формированием хронического инфекционного процесса.

Табл.1. Оценка реализации апоптоза лимфоцитов крови при клещевом энцефалите (Me(Q1-Q3)).

Группы обследованных	Количество лимфоцитов в апоптозе, %	Количество лимфоцитов со сниженным потенциалом митохондрий, %
Здоровые доноры	9,38(8,92-13,54)	2,73(1,97-5,23)
Больные острым клещевым энцефалитом	28,67(25,16-30,30) $p_1<0,001$	10,40(8,36-16,90) $p_1<0,01$
Пациенты с длительной антигенемией вируса клещевого энцефалита	20,85(17,20-25,66) $p_1<0,001$ $p_2=0,036$	7,57(6,93-8,37) p1<0,01 p2=0,03

p_1-достоверность различий, по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров; p_2-достоверность различий, по сравнению с аналогичными показателями у больных острым клещевым энцефалитом.

Кроме того, было выявлено нарушение баланса про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Так, у пациентов с острым КЭ содержание белка Bax достоверно увеличивалось, а количество Bcl-2 снижалось по сравнению с контрольной группой. С другой стороны, установлено, что у пациентов с острым КЭ наблюдалось снижение содержания белка Bad относительно значений аналогичного параметра у здоровых доноров (табл.2). Вероятно, это связано с тем, что уже на раннем этапе инфекционного процесса вирус старается подавить апоптоз и обеспечить выживаемость зараженных им клеток. Известно, что флавивирусы способны активировать P13K/Akt сигнальный путь, что в свою очередь приводит к фосфорилированию белка Bad протеинкиназой B (Akt). С помощью данного механизма поддерживается целостность митохондрий и происходит ингибирование программированной

клеточной смерти [8]. Вероятно, что в условиях острого инфекционного заболевания преобладает Bax-опосредованный апоптоз.

Хроническая антигенемия ВКЭ сопровождалась снижением содержания белка Bax на фоне увеличения Bcl-2 по сравнению с таковым у пациентов с острым КЭ. При этом проапоптотический белок Bad уже не выявлялся (табл.2). Снижение количества апоптотических клеток при хронической антигенемии ВКЭ может быть связано с дисбалансом белков семейства Bcl-2. Сам белок Bcl-2 расположен на внешней мембране митохондрии. Он может ингибировать апоптоз, опосредованный некоторыми каспазами, в частности, модулировать цитохром c/Apaf-1/каспаза-9-путь, главным образом, регулируя высвобождение цитохрома c [1].

Табл.2. Внутриклеточное содержание антиапоптотического и проапоптотических белков у пациентов с клещевым энцефалитом (Me(Q1-Q3)).

Показатель	Здоровые доноры	Больные острым клещевым энцефалитом	Пациенты с длительной антигенемией вируса клещевого энцефалита
Внутриклеточное содержание белка Bax, усл. ед.	0,66(0,53-0,75)	0,81(0,73-0,98) $p_1<0,01$	0,45(0,42-0,57) $p_1=0,024$ $p_2<0,001$
Внутриклеточное содержание белка Bad, усл. ед.	0,65(0,44-0,72)	0,35(0,29-0,36) $p_1=0,024$	Не выявлялся
Внутриклеточное содержание белка Bcl-2, усл. ед.	0,55(0,46-0,70)	0,36(0,31-0,44) $p_1<0,01$	0,59(0,48-0,61) $p_1>0,05$ $p_2<0,01$

p_1-достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров; p_2-достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у больных острым клещевым энцефалитом

Логично предположить, что при хронической антигенемии вируса клещевого энцефалита увеличение Bcl-2 позволяет данному белку конкурентно связываться с Bax и образовывать гетеродимеры [9,10]. В результате происходит нейтрализация функции проапоптотического белка с последующей инактивацией программированной клеточной гибели. Отсутствие белка Bad вероятно связано с его ингибированием, поэтому он не может подавлять активность белка Bcl-2, что в свою очередь приводит к повышению содержания антиапоптотического белка.

Таким образом, при клещевом энцефалите модулирование митохондриального пути апоптоза на раннем этапе развития заболевания осуществляется путем нарушения баланса про- и антиапоптотических белков. Однако, при хронической антигенемии ВКЭ преобладающее действие антиапоптотического белка на митохондрии, возможно, способствует ингибированию гибели клетки. Дальнейшее изучение

молекулярных механизмов регуляции апоптоза митохондриальными белками даст возможность разрабатывать новые подходы к лечению клещевого энцефалита.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белушкина Н.Н.* //Архив патологии (2001) 1: 51-60;
2. *Бра М., Квинан Б., Сузин С.А.* //Биохимия (2005) 70(2): 284-93;
3. *Рязанцева Н.В.* //Бюлл. Экспер. Биол. Мед. (2006) 141(5): 544-7;
4. *Сепиашвили Р.И. и др.* //Аллергология Иммунол. (2000) 1(1): 15-23;
5. *Чечина О.Е. и др.* //Гематол. Трансфузиол. (2008) 53(2): 38-41;
6. *Adams J.M.* //Genes Develop. (2003) 17: 248-95;
7. *Burlacu A.* //J. Cell. Mol. Med. (2003) 7(3): 249-57;
8. *Lee C.-J., Liao C.-L., Lin Y.-L.* //J. Virology (2005) 79: 8388-99;
9. *Suzuki M.* //Cell (2000) 103: 645-54;
10. *Goping I.S.* //J. Cell. Biol. (1998) 143: 207-15.

СОПРЯЖЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ КИНАЗЫ mTOR, БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА И ЦЕРАМИДА ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Мартынова Е.А.

НИИ питания РАМН, Москва

Цель работы. Изучение взаимодействия киназы mTOR, белков теплового шока и церамида при метаболическом стрессе в модельной системе на линейных животных.

Введение. При метаболическом стрессе выживание клеток зависит от активации сигнальных путей белков теплового шока, киназы mTOR (mammalian Target of Rapamycin), а также ряда митохондриальных, эндоплазматических и лизосомальных белков. Ключевой киназой, контролирующей эффективность трансляции мРНК при ответе клетки на метаболический стресс является киназа mTOR, которая формирует два многокомпонентных комплекса – mTORC1 и mTORC2. Биологическим смыслом наличия двух комплексов является координация функционально различных ответов на нутриенты и ростовые факторы. Комплексы отличаются по чувствительности (mTORC1) или резистентности (mTORC2) к рапамицину, а также сопряженностью с сигнальными путями белков теплового шока. Комплекс mTORC2 включает киназы mTOR, mLST8, PRR5, mSIN1, Rictor и шаперон HSP70. Комплекс mTORC2 фосфорилирует киназу Akt по Ser^{473}, что позволяет ей

полностью активироваться [1]. Эффекторами сигнального пути mTOR являются рибосомальная киназа p70 S6PK1 и фактор транскрипции eIF-4EBP-1 [2].

Сопряжение сигнального пути mTOR с энергетическим потенциалом клетки осуществляется за счет взаимодействия с циклоАМФ-активированной протеинкиназой AMPK. В ответ на снижение уровня АТФ в клетке киназа LKB1 фосфорилирует AMPK по Thr^{172} [3]. В активной форме AMPK действует как индуктор или ингибитор апоптоза в зависимости от одновременной активации в клетке сигнальных путей белков p53, p73, PTEN и т.д. AMPK фосфорилирует Raptor в комплексе mTORC1 по двум консервативным Ser последовательностям, что позволяет сигнальному белку 14-3-3 соединиться с комплексом mTORC1, ингибировать его активность и вызвать остановку клеточного цикла [4].

Опухолевые супрессоры TSC1 и TSC2 блокируют функцию комплекса mTORC1 и активирует сигналы от mTORC2 [5]. Продукты генов *tsc1* (гамартин) и *tsc2* (туберин) формируют собственные сигнальные пути, сопряженные с киназой p70 S6PK1. Сигнальный путь TSC1/mTOR регулирует трансляцию белков. Ингибирование TSC1 и TSC2 обусловливает постоянную активацию комплекса mTORC1 и его сигнального пути [6]. В клеточных линиях потеря TSC1 или TSC2 вызывает эндоплазматический стресс, который является критическим моментом в патогенезе нарушения регуляции mTOR [7].

Белки теплового шока (HSP – Heat Shock Proteins) – это группа белков, экспрессия которых повышается при тепловом или другом стрессе. Действие стрессовых агентов осуществляется путем повышения экспрессии факторов транскрипции HSF, регулирующих индуцированную экспрессию *hsp* генов. HSP выполняют функции молекулярных шаперонов, переносят белки на протеасомы для деградации, контролируют качество сборки белков, транспортируют измененные белки через мембраны клетки. HSP объединяются в семейства по их молекулярной массе, и обозначаются, соответственно, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, семейство малых стрессовых белков – sHSP (HSP20 – 30) и семейство нуклеотид-связывающих белков, ассоциированных с рибосомами (HSP15).

При нелетальных стрессовых воздействиях адаптивно повышается экспрессия фактора транскрипции HSF1, а позднее – HSF2. HSF1 определяет связывающую активность фактора HSF2 с ДНК, при этом HSF2 может модулировать HSF1-индуцированную экспрессию *hsp* генов [8]. Взаимодействие HSF1 и HSF2 осуществляется за счет их тримеризованных доменов. Связывание HSF с HSE (Heat Shock Elements) в промоторном регионе *hsp* генов приводит к их транскрипционной активации. На промоторе гена *hsp70* собирается хроматин-

ассоциированный комплекс, состоящий из HSF1 и Strap, который вовлекает в комплекс ацетилтрансферазу p300, что повышает связывание HSF1 и ацетилирование хроматина в *hsp* гене. Strap контролирует гены репарации ДНК, регулирует активности p53, координирует стрессовые сигналы, что повышает шансы клеток на выживание.

При стрессе денатурированные белки переносятся от HSP70 к HSP90 ко-шапероном Sti1/HOP (HSP организующий протеин), который взаимодействует одновременно с HSP70 и HSP90 через TPR домены (тетратрикопептидные повторы). Кроме HOP, вторичными мессенджерами в сигнальном пути HSP являются HDJ1 и Bag-2 (Bcl-2-ассоциированный атаноген-2). Белки S100A2 и S100A6 могут нарушать формирование комплекса HSP70/HSP90/HOP за счет ингибирования TPR домена [9].

Одним из путей передачи сигналов к ядру клетки при стрессе является фосфорилирование 4-х киназ JAK (Janus Activated Kinase) и 7 факторов транскрипции семейства STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), которые одновременно являются вторичными мессенджерами [10]. Киназа JAK фосфорилирует по тирозину один из STATов, который димеризуется и перемещается в ядро. Для связывания с ДНК STAT1 должен быть фосфорилирован одновременно по Thr^{701} и Ser^{727}. Если фосфорилирование идет только по Ser, то STAT ассоциируется с другими белками, в том числе, с фактором транскрипции HSF1, и в этом случае действует как транскрипционный активатор для белков теплового шока. При активации киназой JNK фактора STAT3 его транскрипционная активность ингибируется.

В настоящее время нет данных о пересечении сигнальных путей киназы mTOR, HSP и церамида. Однако известно, что при ответе клетки на стресс происходит реорганизация плазматической мембраны, что ультимативно включает в себя активацию сфингомиелиназы плазматической мембраны, распад сфингомиелина и образование церамида. Церамид является вторичным мессенджером многих сигнальных путей, в том числе апоптоза, сигнала от TNF-α на NF-kB, а также регулирует взаимодействие метаболитов кислорода с сигнальными путями ряда митохондриальных белков, в том числе Bak, Bax, Bcl-2.

В нашей работе мы попытались найти взаимосвязь между церамидом и стрессовыми белками. С этой целью использован фумонизин B1, который ингибирует синтез церамида de novo, но при этом повышает активность сфингомиелиназы и уровень церамида, образованного из сфингомиелина.

Методы исследования. Работа выполнена на мышах линии C57Bl/6 (самках в возрасте 10 недель). Эксперименты проведены согласно международным правилам работы с лабораторными животными. В качестве модельной системы стресса использовано полное

голодание мышей на протяжении 72 часов с последующим полным восстановлением питания. Измерение экспрессии белков проводили в начале опытов, каждые 6 часов в первые сутки голодания и затем через каждые 24 часа. Первичные культуры клеток печени и тимуса мышей инкубировали в среде RPMI-1640 с L-глютамином (Flow), обогащенной 10мМ Hepes (Sigma) и 10% ЭТС (Flow). Экспрессию рецепторов, окрашенных антителами к HSP90, HSP70, HSP60, HSP27, p21, p27, Bid, Bax, Bcl-xL, mTOR, NF-kB, Lon, IRβ, анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson) по программе CellQuest. Флюоресценцию FITC определяли при длине волны 530±15нм. Флюоресценцию PE и пропидиума иодида определяли при длине волны 610±5нм. В каждом образце анализировалось 10 тысяч событий. Активность киназ определяли стандартными методами. Статистический анализ проводили по программе ANOVA.

Результаты. Интерес к белку HSP60 обусловлен его локализацией в митохондриях, где он контролирует фолдинг белков и переносит неправильные белки к протеасомам для деградации. В цитозоле HSP60 АТФ-зависимо ускоряет активацию каспазы-3, выполняя функцию фольдазы. Повышение экспрессии белка HSP60 в клетках печени мышей при метаболическом стрессе отражено на рис.1.

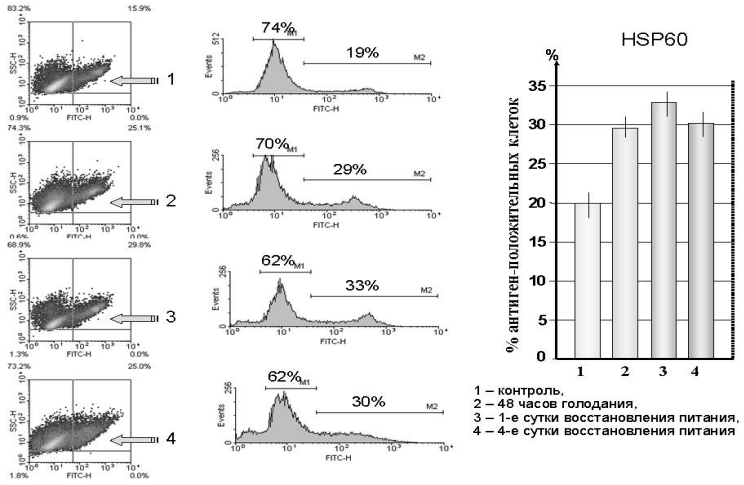


Рис.1. Изменение экспрессии белка теплового шока HSP60 при метаболическом стрессе (по данным проточной цитометрии).

Белки семейства HSP70 локализуются в разных компартментах клетки, все связывают АТФ. Уровень экспрессии HSP70 повышается в несколько раз при стрессе. HSP70 является молекулярным шапероном

белка Rictor в комплексе mTORC1, сопряженного с регуляцией синтеза белка при энергетическом стрессе. При метаболическом стрессе в нашем эксперименте повышение экспрессии HSP70 происходит параллельно с активацией деления клеток печени (рис.2), что было подтверждено исследованием маркеров клеточного цикла (ингибиторов p21 и p27, Rb протеина, циклина D1). Обнаружена гетерогенность экспрессии HSP70 в разных популяциях клеток. После восстановления питания животных экспрессия белка HSP70 продолжала повышаться в течение суток. Известно, что в стадии восстановления клеток после метаболического стресса HSP70 перемещается в ядро, что сопровождается повышением интенсивности флюоресценции клеток.

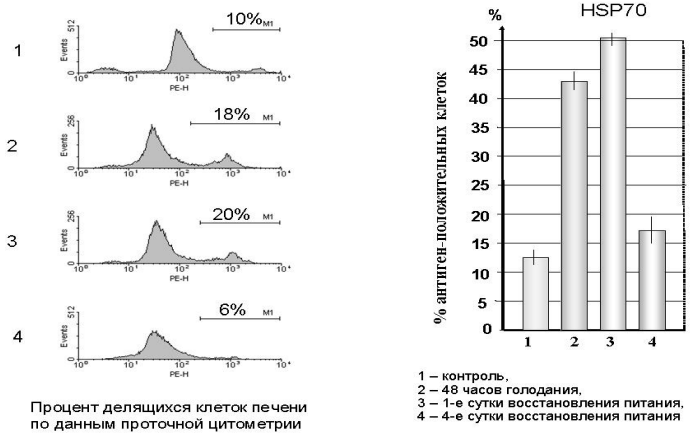


Рис.2. Сопоставление экспрессии белка теплового шока HSP70 и процента делящихся клеток печени при метаболическом стрессе.

Среди измеренных белков уровень экспрессии HSP70 в течение эксперимента повышался наиболее значимо (рис.3). При метаболическом стрессе на фоне повышения экспрессии HSPs наблюдается снижение экспрессии митохондриальной протеазы Lon, энергетического сенсора клеток киназы mTOR и β-рецептора инсулина (IR-β) (рис.3). Кинетика изменения белка mTOR в клетках печени имеет те же закономерности, что и кинетика Lon протеазы, то есть максимальное снижение зарегистрировано через 72 часа голодания, и после восстановления питания отмечался подъем уровня этих белков в клетке.

При восстановлении питания организма число рецепторов инсулина IR-β в клетках печени продолжало повышаться, что отрицательно коррелировало с уровнем HSP60 (r=-0,583). HSP60 может модулировать сигнальный путь инсулина и инсулин-подобного ростового

фактора (IGF-1). Повышение фракции HSP60 в цитозоле препятствует убиквитинированию IGF-1, что усиливает проведение сигнала IGF-1 [11].

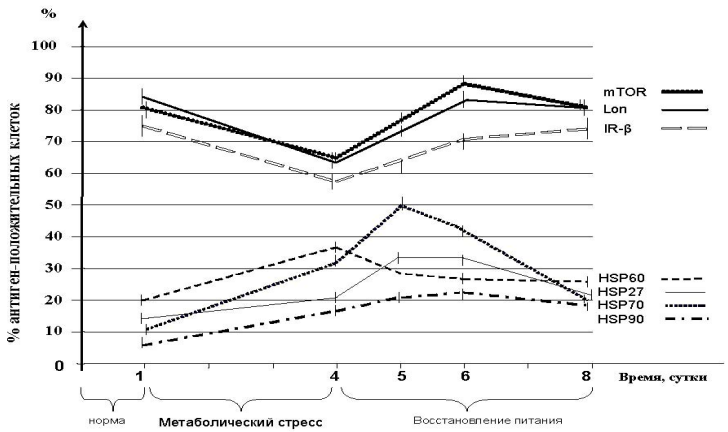


Рис.3. Кинетика экспрессии белков теплового шока, Lon протеазы, киназы mTOR и β-рецептора инсулина при метаболическом стрессе с последующим восстановлением питания.

Изменение метаболизма сфинголипидов под действием фумонизина B1 оказывает влияние на экспрессию многих белков в клетках печени при метаболическом стрессе. Использование дозы фумонизина 5мкг на мышь достаточно для ингибирования 50% активности церамидсинтазы, а также активации нейтральной сфингомиелиназы плазматической мембраны и образованию нового пула церамида, что коррелирует с повышением экспрессии белков, ассоциированных со стрессом (HSP70, HSP60, HSP90, Lon, mTOR). Пример влияния фумонизина B1 на экспрессию киназы mTOR при метаболическом стрессе приведен на рис.4.

По нашим данным именно церамид, образованный в результате распада сфингомиелина, взаимодействует с сигнальными путями белков теплового шока и mTOR. Это утверждение основано на том, что при ингибировании церамидсинтазы под действием фумонизина в клетке накапливаются сфингозин и сфинганин в отношении ~1:40. При моделировании эффектов фумонизина смесью сфингозина и сфинганина не было получено идентичного ответа клеток, как это наблюдалось под действием фумонизина B1. Таким образом, можно обсуждать пути взаимодействия HSP, mTOR и церамида.

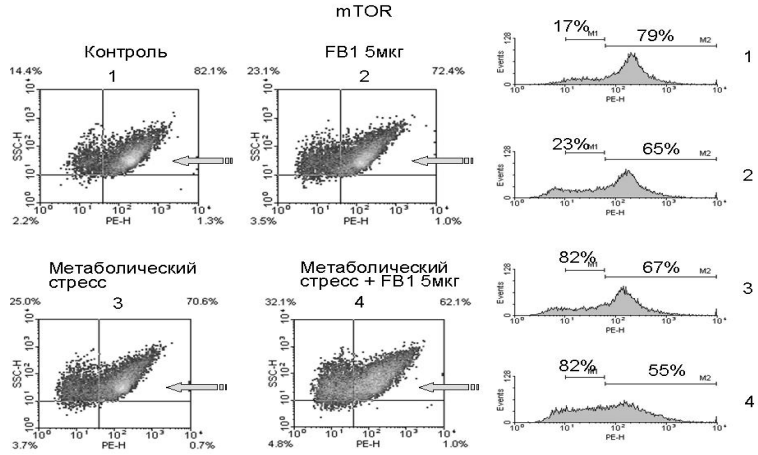


Рис.4. Влияние фумонизина B1 на изменение экспрессии киназы mTOR в клетках печени при метаболическом стрессе (по данным проточной цитометрии).

Заключение. Полученные нами данные указывают на то, что при метаболическом стрессе изменения экспрессии белков в клетке носят системный характер и определяются длительностью стресса. Восстановление нормальной жизнедеятельности организма после резкого нарушения метаболизма приводит к повторной активации стрессовых сигнальных путей. Изменение метаболизма сфинголипидов под действием фумонизина B1, которые обусловлены нарушением биосинтеза церамида *de novo*, активацией нейтральной сфингомиелиназы плазматической мембраны и образованием соответствующего пула церамида, работающего как вторичный мессенджер, играет роль в регуляции проведения сигналов в клетке, сопряженных с молекулярными шаперонами HSP60, HSP70, HSP90, а также с сигналами митохондриальной протеазы Lon и энергозависимой киназы mTOR.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Martin J. et al.* //Biochem. Biophys. Res. Commun. (2008) 372(4): 578-83;
2. *Yang X. et al.* //J. Anim. Sci. (2008) 86(14S): E36-50;
3. *Carretero J. et al.* //Oncogene (2007) 26(11): 1616-25;
4. *Gwinn D., Shackelford D,. Egan D.* //Mol. Cell (2008) 30(2): 214-26;
5. *Huang J.et al.* //Mol. Cell Biol. (2008) 28(12): 4104-15;
6. *Watanabe R. et al.* //Int. J. Mol. Med. (2007) 19(3): 475-83;
7. *Ozcan U. et al.* //Mol. Cell (2008) 29(5): 541-51;
8. *Ostling P. et al.* //J. Biol. Chem. (2007) 282(10): 7077-86;
9. *Shimamoto S. et al.* //J. Biol. Chem. (2008) 283(42): 28246-58;

10. *Dudley A. et al.* //Cell Commun. Signal. (2004) 2(8): 1478-781;
11. *Lai H. et al.* //Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. (2007) 292(1): E292-7.

ИЗМЕНЕНИЕ ДЕФОРМАЦИОННЫХ И ТРАНСПОРТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ РАЗВИТИИ АПОПТОЗА

Миндукшев И.В.[1,2], Кривошлык В.В.[2], Добрылко И.А.[1], Гончаров Н.В.[3], Вивуланец Е.В.[3], Песочинская С.С.[1], Кривченко А.И.[1]

[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, СПб
[2] НПФ «ЛЮМЭКС», СПб
[3] НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека МЗ РФ, СПб

В силу того, что эритроциты млекопитающих не содержат ядра и митохондрий, наличие у этих клеток апоптоза долгое время не предполагалась. В 2001 году выходит статья Bratosin D и совт. [1], в которой прямо заявлено о наличие у зрелых эритроцитов апоптоза. В этой работы, представлены данные, свидетельствующие о гибели эритроцитов по апоптозному типу. При обработке эритроцитов кальциевым ионофором (A23187), вызывающий повышение внутриклеточной концентрации кальция, через несколько часов отмечаются основные признаки апоптоза. Клетки меняют форму (переходят в эхиноциты) и уменьшаются в объеме (*cell shrinkage*), наблюдается блеббинг мембраны, фосфатидилсерин переходит в наружный мембранный слой. Еще один интересный факт, приведенный в данной работе, указывающий на развитие апоптоза у эритроцитов, – это захват макрофагами апоптозных эритроцитов. Макрофаги постоянно выделяют особый гликопротеин MFG-E8, который специфически связывается с фосфатидилсерином на поверхности клеток, впадающих в апоптоз. Образующиеся комплексы фосфатидилсерина с MFG-E8 и служат теми метками, по которым узнают будущих самоубийц. Далее, начиная с 2002г значительная часть работ по исследованию апоптоза эритроцитов выполнена в Тюбингенском Университете (Германия) группой исследователей в отделе Florian Lang. С 2003 по 2008г этой группой исследователей опубликовано более двух десятков статей, посвященных апоптозу эритроцитов [2-6]. В эритроцитах установлены два сигнальных пути включения апоптоза.

Первый путь: активация циклооксигеназы, образование PGE_2, формирование и активация катионных каналов. Гиперосмотический шок и выход Cl^- вызывает образование (через циклооксигеназу) простагландина E_2 (PGE_2). PGE_2 вызывает активацию кальций

проницаемых неселективных катионных каналов (NSC – NonSelective cation Channel) и входу ионов кальция в клетку. Те же или схожие каналы активируются при окислительном стрессе. Истощение энергетических ресурсов (глюкозное голодание) приводит к снижению уровня глутатиона (GSH), ослабляя антиоксидатную защиту эритроцитов, вследствие чего также активируются NSC-каналы. Открытие этих каналов (посредством PGE_2) и повышение $[Ca^{2+}]$ приводит к активации калпаина (Ca^{2+}-зависимая цистеиновая эндопептиза), – активация этого белка, не требуется для фосфатидилсериновой перестройки, но играет значительную роль в деградации цитоскелета. Кроме того, увеличение $[Ca^{2+}]$ способствует стимуляции эритроцитарной скрамблазы (scramblase) и приводит к везикуляции мембраны. Помимо этого влияния на фосфотидилсериновую перестройку, увеличение цитозольного кальция стимулирует Ca^{2+}-чувствительные K^+ каналы (Gardos-channel). Последующая гиперполяризация клеточной мембраны, приводит в параллельному выходу ионов хлора и калия, как следствие, выходу воды и сокращению клетки (cell shrinkage).

Второй путь: образование PAF и стимуляция сфингомиелиназы. Сжатие эритроцитов (erythrocyte shrinkage) вызывает активацию фосфолипазы A_2 (PLA_2) и последующее образование фактора активации тромбоцитов (PAF – platelet activating factor). PAF активирует сфингомиелиназу, что приводит к деградации сфингомиелина и образованию проапоптотического сфинголипида – церамида. Частично из-за образования церамида, PAF вызывает переход фосфатидилсерина на поверхность клетки. Далее PAF активизирует Ca^{2+}-чувствительные K^+-каналы («Gardos» каналы), делая их более чувствительными для стимуляции ионов кальция цитоплазмы Передача сигналов через PAF, однако, не обязательно связана с повышением $[Ca^{2+}]$, по крайней мере, частично развитие апоптоза эритроцитов опосредуется С6-церамидом.

Представленный механизм апоптоза эритроцитов, сделанный F. Lang с сотр. дает достаточно полное представление, но требует некоторых добавлений. Окислительный стресс является одним из наиболее частых системных воздействий, оказываемых на эритроциты. Такие радикалы как, супероксид и оксид азота, а также продукт их взаимодействия – пероксинитрит, играют ключевую роль в окислительном стрессе. P. Matarrese и сотр. [8] показали, что в эритроцитах пероксинитрит индуцирует ряд последующих изменений: 1) окисление оксигемоглобина в метгемоглобин, 2) цитоскелетную перестройку, 3) ультраструктурные изменения, 4) изменения экспрессии полосы 3 и уменьшение экспрессии гликофорина А, 5) увеличение активности таких протеаз как катепсин Е и μ-калпаиа, 6) активация каспазы 2 и каспазы 3, и 7) экстернализация фосфатидилсерина. Важно отметить, что в этой работе рассматриваются новые «участники

события». Процесс апоптоза сопровождается нарастанием активности не только калпаина, но и ряда других цистеиновых и аспартиловых протеаз. Образование метгемоглобина может являться ключевым процессом, запускающим апоптоз. И наконец, изменяется структура (и/или функция) и количество двух транспортных белков: гликофорина и полосы 3. Гликофорин А ответственен за транспорт глюкозы. Посредством белка полосы 3 (Cl^-/OH^--обменник или Cl^-/HCO_3^-обменник) обеспечивается транспорт двуокиси углерода (CO_2). Помимо транспортных функций оба белка играют значительную роль в архитектуре клетки. Именно при участии этих мембранных белков цитоскелет (посредством спектрина, анкирина, белка 4.1, тропомиозина) скреплен с мембранной [7], чем обеспечиваются уникальные деформационные характеристики эритроцитов. Таким образом, можно предполагать, что развитие апоптоза, вызывающее ультраструктурные изменения, приводит к ухудшению деформационных и транспортных характеристик эритроцитов. Дополнительным аргументом в пользу этого положения является работа Mandal D. и соавторов [9], показавших, что каспаза-3 (белок экспресированный при апоптозе) осуществляет протеолиз N-терминального цитоплазматического домена полосы 3, посредством которого осуществляется связывание обменника с цитоскелетными белками.

Материалы и методы. 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 методом малоуглового светорассеяния на лазерном анализаторе размеров частиц «ЛАСКА-1К» (НПФ «ЛЮМЭКС» СПб) [10].

Результаты и обсуждение. На рис.1 представлена кинетика развития апоптоза эритроцитов при действии на эти клетки 1мкМ иономицина, представленная динамикой изменения интенсивности светорассеяния в диапазоне углов от 1 до 8 градусов. Первоначально наблюдается фаза уменьшения объема. Средний объем клеток (MCV) уменьшается почти на 20% (рис.1б). Эритроциты, по своей морфоформе, идентифицируются как эхиноциты: клетки с шипами (the spikes) одинаковой формы, которые распределены равномерно по поверхности (микрофотография на рис.1а слева). Далее через 1.5ч после первичного сокращения объема клеток, наблюдается их последующая трансформация: эритроциты восстанавливают первоначальный объем (он даже становится выше начального), при этом эхиноциты трансформируются в сферизованные клетки с шероховатой мембранной

(микрофотография на рис.1а справа), при микроскопировании эритроциты способны образовывать агрегаты. Следует отметить эту фазу трансформации эритроцитов, при которой наблюдается восстановление объема клеток. В настоящее время широкое применение в клинической практике приобрели Гематологические Анализаторы, которые позволяют определить средний объем эритроцитов (MCV). Считается, что данный показатель позволяет выявлять патологические изменения эритроцитов при дифференциальной диагностике анемий. Но как мы видим из наших данных, эритроциты могут иметь объем соответствующий нормальным клеткам, но при этом быть явно трансформированными (развивается апоптозная программа гибели). Далее, через 3 часа, апоптотическая программа продолжает развиваться: средний объем клеток уменьшается, за счет увеличения доли мелких клеток (и/или частиц), распределение клеток по объему расширяется (данные не показаны).

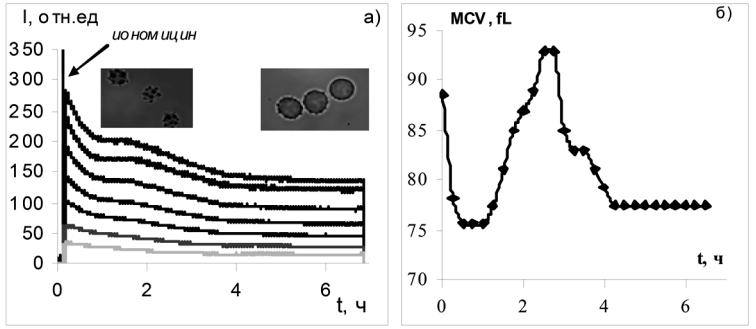


Рис.1. Кинетика апоптоза эритроцитов. На рис.1а показана динамика изменения интенсивности светорассеяние в диапазоне углов от 1 до 8град. После действия 1мкМ иономицина. Представлены микрофотографии клеток через 1ч. и через 3.5ч. На рис.1б представлена динамика изменения среднего объема клеток (MCV).

Были проведены эксперименты по гипоосмотической нагрузке эритроцитов, находящихся в разной фазе развития апоптоза. На рис.2 представлены данные по изменению MCV для контроля и для эритроцитов после обработки иономицином через 1час (эхиноциты) и через 3.5 часа (сферизованные эритроциты с шероховатой мембранной). Контрольные эритроциты до осмотичности порядка 130mOsm ведут себя как идеальные осмометры, быстро отслеживая осмотичность среды: наблюдается обратная зависимость объема клеток от осмотичности. При более низкой осмотичности эта зависимость перестает выполняться, клетки гемолизируют, достигнув критичного объема около 150fL. Совершенно иная картина наблюдается, для эритроцитов, в которых развивается апоптоз. Уже через 1ч после обработки иономицином,

эритроциты (эхиноциты) практически не изменяют свой объем, даже при уменьшении тоничности среды в два раза. При еще большом разбавлении среды, клетки немного увеличивают свой объем, но даже при гипосмотичности среды меньше 80mOsm/L (среда разбавлена почти в 4 раза!) эти клетки не гемолизируют. Аналогично ведут себя клетки после 3.5ч экспозиции с иономицином. Хотя их первоначальный объем выше (чем даже для контроля), эти клетки также слабо увеличивают объем в гипотоничной среде, и также не гемолизируют при значительном разбавлении среды, т.е. клетки становятся очень ригидными.

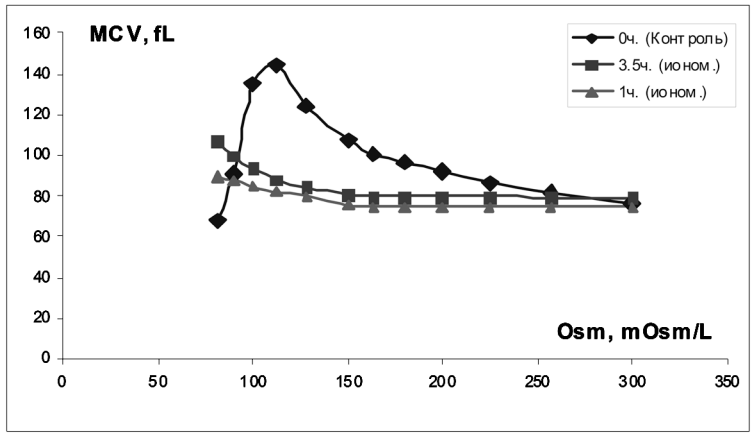


Рис.2. Изменение среднего объема эритроцитов при гипосмосмотической нагрузке. Показаны данные для контрольных эритроцитов и эритроцитов, обработанных иномицином (через 1 и 3.5 часа).

Для оценки активности Cl^-/HCO_3^-обменника был применен следующий «прием». Эритроциты помещали в изотоничную среду, в которой ионы натрия были заменены ионами аммония. В этих условиях, защелачивание внутриклеточного pH, приводит к активации данного обменника, осуществляющего вывод гидроксил-анионов (и/или HCO_3^-) и входу хлорид-анионов, что неизбежно приводит к набуханию клеток.

На рис.3 представлена кинетика изменения сигнала интенсивности светорассеяния в 4 градусном угле. Контрольные эритроциты быстро набухают (первичное повышение сигнала) и достигнув критического объема около 160fL гемолизируют. (Кинетические данные по изменению распределения клеток по объему не приведены). Более 90% эритроцитов гемолизирую к концу процесса. В условиях аммонийной нагрузки, в эритроцитах обработанных иономицином, уже через 1час, наблюдается резкое снижение скорости набухания клеток, процент гемолизированных клеток меньше 50%. Через 3.5 часа после обработки иономицином,

активность Cl^-/HCO_3^-обменника у эритроцитов слабо выражена (клетки незначительно увеличивают объем), но при этом процент гемолизированных эритроцитов несколько выше, чем для клеток с 1часовой экспозицией с иономицином, по-видимому, за счет неустойчивости к этой нагрузке эритроцитов с шероховатой мембранной.

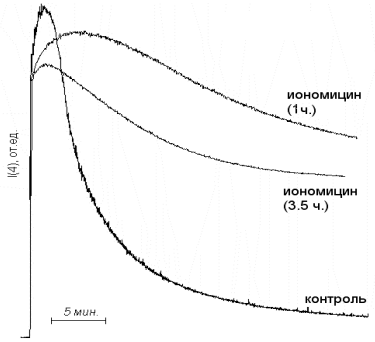


Рис.3. Кинетика гемолиза эритроцитов при аммонийной нагрузке. Представлены данные по изменению сигнала интенсивности светорассеяния в 4 градусном угле для контрольных эритроцитов и эритроцитов, обработанных иномицином (через 1 и 3.5 часа).

Т.о. можно заключить, – при развитии апоптоза у эритроцитов, клетки становятся ригидными (проявляют значительную устойчивость к осмотической нагрузке) и у них резко снижаются транспортные характеристики по обмену (переносу) двуокиси углерода.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Bratosin D. et al.* // Cell Death Differ. (2001) 8: 1143-56;
2. *Lang K.S. et al.* // Cell Death Differ. (2003) 10: 249-56;
3. *Lang P. A. et al.* //Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2003) 285: 1553-60;
4. *Lang K.S. et al.* //Cell Death Differ. (2004) 11: 231-43;
5. *Lang PA. et al.* //Cell Death Differ. (2005) 12(5): 415-28;
6. *Lang F. et al.* //Acta Physiol. (2006) 187(1-2): 191-8;
7. *Lux S.E., J. Palek*. //Blood: Principles Practice Hematology. Lippincott (1995): 701-1801;
8. *Matarrese P. et al.* //FASEB J. express article (2005);
9. *Mandal D. et al.* //JBS (2005) 280 (47): 39460-7;
10. *Mindukshev I.V. et al.* //Spectroscopy (2007): 21(2): 105-20.

УЧАСТИЕ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ NF-kB И SAPK/JNK В В РЕГУЛЯЦИИ ОТВЕТА КЛЕТКИ НА СТРЕСС

Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Хренов М.О., Новоселова Т.В., Лунин С.М.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Введение. Роль белков теплового шока для поддержки структуры и функционирования белков в условиях клеточного стресса, определяемая их шаперонной активностью, хорошо известна (*Beere*, 2005). Молекулярные взаимодействия между белками теплового шока и сигнальными белками чрезвычайно важны для нормального функционирования системы сигнальной трансдукции в клетке. Известно, что для белка теплового шока Hsp90 субстратами являются некоторые сигнальные белки, такие как, тирозин киназы, рецепторы стероидных гормонов, Raf-1 киназа и др. [1]. Кроме того, было установлено, что один из мажорных белков теплового шока, Hsp70, подавляет активность фактора транскрипции NF-κB [2], осуществляя, таким образом, свою защитную функцию при апоптозе. Другим проявлением антиапоптозной активности Hsp70, является, очевидно, его способность подавлять активность стресс-киназы JNK [3]. С другой стороны, тепловой шок способен активировать JNK-киназу, что может приводить к интенсификации программы клеточной гибели [4].

Необходимо подчеркнуть, что все вышеописанные эффекты были продемонстрированы на трансформированных клетках в условиях теплового шока, как основного индуктора апоптоза. Между тем, очень мало известно о взаимной регуляции семейства белков теплового шока и сигнальных белков в нормальных клетках, причем как в обычных условиях, так и в условиях стресса, не связанного с повышением температуры. Понятно, что такие сведения могли бы быть очень полезными для разработки стратегии лечения различных заболеваний, при которых наблюдается массовое поражение клеток и клеточных систем, и терапия должна быть направлена, прежде всего, на снижение уровня апоптоза. Целью данной работы было выяснение влияния низкоинтенсивных неионизирующих излучений на продукцию сигнальных белков, включая NF-κB, phNF-κB, IκBα, SAPK/JNK, а также на экспрессию некоторых белков теплового шока в нормальных лимфоцитах мышей. Кроме того, целью настоящей работы было изучение стрессового ответа клетки в условиях, когда активность белка теплового шока Hsp90 была подавлена гелданамицином. Интерес к этому антибиотику объясняется тем, что гелданамицин, связываясь с высокой аффинностью с АТФ-связывающим сайтом белка теплового шока 90, подавляет его активность [5]. В качестве модели стресса использовали воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения, которое, как было показано нами ранее, индуцирует стрессовый ответ клетки [6].

Результаты и их обсуждение. При исследовании действия низкоинтенсивного лазерного света (гелий-неоновый лазер, 638нм, 12×10^{-3}Дж/см^2, НИЛИ) на суспензию лимфоцитов селезенки была обнаружена значительная активация фосфорилирования SAPK/JNK в клетках. Облучение лимфоцитов низкоинтенсивными ЭМИ СВЧ (8-18ГГц, частотная модуляция 1Гц, экспозиция 1ч, интенсивность 1мкВт/см^2) также приводило к повышению экспрессии фосфорилированной формы этой протеинкиназы.

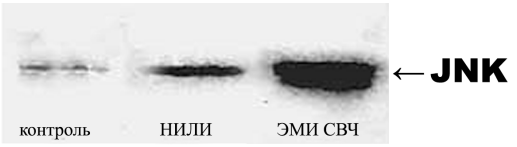


Рис.1. Экспрессия Phospho-SAPK/JNK в лимфоцитах, подвергнутых воздействию лазерного света и ЭМИ СВЧ (фотография блота).

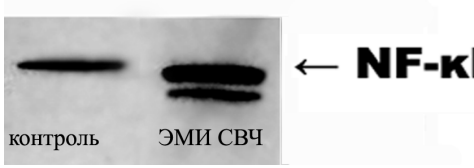


Рис.2. Экспрессия транскрипционного фактора NF-kB в лимфоцитах, подвергнутых воздействию ЭМИ СВЧ (фотография блота).

Следует отметить, что ЭМИ СВЧ, в сравнении с НИЛИ, оказывало более значительный стимулирующий эффект на продукцию Phospho-SAPK/JNK (рис.1). При воздействии на клетки ЭМИ СВЧ (время экспозиции 1ч) наблюдали двукратное повышение содержания в клетках NF-κB (рис.2), при этом содержание других исследованных белков – phospho-NF-κB и IκB-α также увеличивалось по сравнению с контролем.

Итак, впервые получены сведения, демонстрирующие роль низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ как активатора транскрипционного фактора NF-κB, что указывает на стрессовый характер воздействия электромагнитных волн сантиметрового диапазона на изолированные спленоциты. С другой стороны, воздействие низкоинтенсивного лазерного света не вызывало активации изучаемых сигнальных белков, более того, показано, что красный лазерный свет ингибирует продукцию NF-κB и регуляторного белка IκB-α.

Поскольку в клетке имеется такая мощная система защиты клетки от повреждающих воздействий, как семейство белков теплового шока, было целесообразно выяснить влияние ингибитора активности Hsp90 – гелданамицина (ГА) на продукцию некоторых белков теплового шока, включая и Hsp90, активность которого подавляется ГА. Эта работа была

проведена с использованием той же биологической модели (лимфоциты селезенки мыши), причем в экспериментах использовали как покоящиеся клетки, так и лимфоциты, стрессированные воздействием на них низкоинтенсивного лазерного света.

Было исследовано влияние гелданамицина на продукцию белков теплового шока из разных семейств – Hsp70, Hsp25 и Hsp90 – в норме и при воздействии на клетки низкоинтенсивного лазерного света. При этом измеряли количество этих белков в целых клетках и в отдельных внутриклеточных структурах лимфоцитов (для Hsp70 и Hsp25). Важно отметить, что все использованные в работе дозы лазерного излучения относятся к диапазону сверхслабых доз, которые не могли вызвать сколько-нибудь заметного повышения температуры среды, в которой культивировали клетки. Результаты измерения относительного количества белков теплового шока приведены в таблице.

Табл. Экспрессия белков теплового шока в лимфоцитах и во внутриклеточных мембранах лимфоцитов, подвергнутых облучению лазерным светом или обработанных гелданамицином, а также при сочетании этих двух факторов.

Белки	Облучение		ГА+облучение			
	контроль	60 с	контроль	ГА	ГА+60 с	ГА+180 с
Hsp70 целые клетки	100±18	*221±30	63±7	*100±11	§65±11	112±17
цитоплазма	27±3	25±4		*100±17	§68±8	
мембрана	41±5	47±7		*100±23	110±14	
цитоскелет	22±4	*48±8		*100±15	§74±9	
Hsp25 целые клетки	100±11	*195±28	120±16	100±13	§65±7	
цитоплазма	51±6	*100±15		*100±16	§74±8	
мембрана	17±3	*126±17		*100±14	§74±5	
цитоскелет	93±13	*381±58		*100±18	§302±61	
Hsp90 целые клетки	100±12	108±14	73±11	100±9	§130±12	§165±18

Все значения – средние данные денситометрии из 3-4 независимых экспериментов, рассчитанные в процентах от контроля или в процентах от образцов, обработанных гелданамицином (ГА). Контроль – культивируемые интактные клетки. Для всех белков, определяемых в целых клетках, в правой и левой колонках показаны результаты разных серий экспериментов, со своими значениями контроля. Для Hsp70 и Hsp25 во внутриклеточных структурах все измерения проводили одновременно, с – время экспозиции клеток. *-достоверное отличие от контроля; $p<0.05$; §-достоверное отличие от клеток, обработанных ГА, $p<0.05$.

Продукция Hsp70. Несмотря на отсутствие тепловых эффектов использованных доз лазерного излучения, в облученных клетках наблюдали повышение продукции Hsp70, особенно значительное после экспозиции клеток в течение 180с, примерно до 350% от контроля

(таблица). Это, несомненно, свидетельствует о стрессовом ответе клеток при их облучении *in vitro* слабым лазерным светом. Интересно, что инкубация контрольных клеток с гелданамицином в течение 6-ти часов также вызывала повышенную экспрессию Hsp70. В том случае, когда клетки перед облучением были предварительно обработаны ГА, эффекты лазерного облучения были в значительной степени модифицированы. При этом, если обработка необлученных клеток ГА усиливала продукцию Hsp70, то в облученных клетках этот антибиотик снижал уровень экспрессии Hsp70 практически до нормального уровня. Важно отметить, что такая закономерность изменения экспрессии Hsp70 при обработке клеток гелданамицином была характерна для белка цитоплазмы и цитоскелета, как показано в таблице. Действительно, ГА повышал количество Hsp70 в цитоплазме и в цитоскелете контрольных лимфоцитов в 3-4 раза, но предварительная обработка ГА облученных клеток приводила, напротив, к снижению уровня Hsp70 в этих клеточных структурах. Следует отметить, что эффекты лазерного облучения на целых клетках и на внутриклеточных структурах не были полностью симметричными. Так, из всех исследованных структур, облучение вызывало увеличение количества Hsp70 только в цитоскелете.

Продукция Hsp25. Измерение продукции Hsp25, относящегося к семейству малых белков теплового шока, показало, что экспозиция в течение 60 с вызывает увеличение количества белка, как в целых клетках, так и во всех субклеточных структурах (табл.). Обработка ГА не вызывала значительного изменения количества Hsp25 в целой клетке, но в мембране и цитоплазме клеток количество этого белка было достоверно увеличено после инкубации необлученных клеток в присутствии ГА. В том случае, когда после обработки ГА клетки подвергались воздействию низкоинтенсивного лазерного света, присутствие ГА предотвращало активацию синтеза Hsp25, в результате чего количество Hsp25 уменьшалось во всех структурах лимфоцитов, за исключением цитоскелета.

Продукция Hsp90. Оценка количества белка Hsp90 в клетках, облученных лазерным светом, показала, что, в отличие от Hsp70, лазерный свет не индуцирует синтез этого белка. Более того, отмечена тенденция к снижению продукции Hsp90 при лазерном облучении (таблица). Обработка необлученных клеток ГА приводит, как ни парадоксально, к увеличению его продукции в лимфоцитах. По-видимому, ГА ингибирует активность Hsp90, но не угнетает новообразование этого белка, что, возможно, указывает на компенсаторный механизм синтеза Hsp90 в этих условиях. Влияние ГА на продукцию Hsp90 в облученных клетках носит более сложный характер. Так, ГА увеличивает продукцию этого белка в лимфоцитах после их экспозиции в течение 60с.

Таким образом, среди исследованных белков теплового шока при воздействии низкоинтенсивного лазерного света индуцируется экспрессия Hsp70 и Hsp25, но не Hsp90. На первый взгляд это может означать, что Hsp90 не участвует в ответе клетки на слабое лазерное излучение. Однако, при подавлении активности Hsp90 гелданамицином синтез этого белка в клетке увеличивается после облучения клеток лазерным светом.

Таким образом, в работе впервые показано, что низкоинтенсивные электромагнитные излучения вызывают стрессовый ответ в нормальных лимфоцитах мышей, стимулируя активность, по крайней мере, 2-х сигнальных каскадов. Эта активация может быть предотвращена в присутствии гелданамицина, когда происходит значительное уменьшение экспрессии NF-κB, его фосфорилированной формы pNF-κB и белка, подавляющего его активность, IκB-α (данные не показаны). Кроме того, присутствие ГА в среде культивирования клеток вызывало заметное снижение количества протеинкиназы SAPK/JNK. Получены доказательства влияния гелданамицина на развитие стрессового ответа животных клеток в ответ на воздействие низкоинтенсивного лазерного света, которое осуществляется путем регуляции уровня продукции белков теплового шока Hsp70, Hsp25 и Hsp90 в изолированных лимфоцитах и в их внутриклеточных структурах. Это указывает на возможность использования ГА и его нетоксичных производных при терапии ряда заболеваний, сопряженных с высоким уровнем апоптоза в клеточных системах, причем мишенью этих препаратов могут служить короткоживущие регуляторные белки протеосомного каскада.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента НШ-2741.2008.4 и Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Craig E.A., Welssman J.S., Horwicht A.L.* //Cell (1994) 78: 365-72;
2. *Ran R. et al.* //Gens Develop. (2004) 18: 1466-81;
3. *Gabai V.L. et al.* //FEBS Lett. (1998) 438: 1-4;
4. *Gabai V.L., Sherman M.Y.* //J. Appl. Physiol. (2002) 92: 1743-8;
5. *Chavany C. et al.* //J. Biol. Chem. (1996) 271: 4974-7;
6. *Novoselova E.G. et al.* //Photoderm. Photoimmun. Photother. (2006) 22: 33-38.

РОЛЬ Ca^{2+} И РЕАКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ ГИБЕЛИ АЦИНАРНЫХ КЛЕТОК

Одинокова И.В.[1,2], Херманн К.[2], Гуковская А.С.[2], Евтодиенко Ю.В.[1]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Универиситет Калифорнии, Лос-Анджелс

Введение. Ионы Ca^{2+} являются важнейшим регулятором функционирования ацинарных клеток поджелудочной железы. Стимуляция ацинарных клеток физиологическими дозами холецистокинина или других регуляторов секреции приводит к локальному краткосрочному увеличению концентрации Ca^{2+} вследствие его освобождения из эндоплазматического ретикулума. Формируются так называемые Ca^{2+} волны, которые, распространяясь по клетке, вызывают освобождение пищеварительных ферментов из энзиматических гранул [1]. Супермаксимальные дозы гормонов, желчные кислоты или производные этанола вызывают продолжительное увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле, что приводит к внутриклеточной активации протеаз, формированию вакуолей и последующей гибели ацинарных клеток. Механизмы гибели ацинарных клеток до сих пор полностью не изучены. На различных моделях экспериментального панкреатита было показано, что ацинарные клетки гибнут как по некротическому, так и по апоптотическому пути, причем сложность течения панкреатита зависит от соотношения этих двух типов гибели [2,3]. Некроз является наименее предпочтительным механизмом гибели ацинарных клеток, поскольку в этом случае происходит разрыв плазматической мембраны и выход внутриклеточного содержимого в межклеточное пространство, что в итоге приводит к многократному усилению некротического ответа [4]. Апоптотическая гибель ацинарных клеток, которая характеризуется конденсацией хроматина, сжатием клетки, активацией специфических протеаз и внутриклеточной деградацией белков, является менее разрушительной для железы в целом [4]. Таким образом, целью многих исследователей в данной области является изучение механизмов, лежащих в основе развития двух вышеназванных типов гибели ацинарных клеток поджелудочной железы при развитии панкреатита, а также поиск путей, позволяющих сдвинуть соотношение апоптоз/некроз в сторону апоптоза [5].

Митохондрии вносят огромный вклад в регуляцию распространения физиологических кальциевых сигналов в ацинарных клетках [1]. Кроме того, в ряде работ было показано, что митохондрии принимают участие в формировании ответа на патологические стимулы и вовлечены в регуляцию начальных стадий гибели ацинарных клеток

путем апоптоза или некроза [6-8]. Ранее было показано, что выход цитохрома *c* из митохондрий является ключевым событием, приводящим в дальнейшем к активации каспаз и апоптозу ацинарных клеток [6]. В наших исследованиях на изолированных митохондриях поджелудочной железы было продемонстрировано, что Ca^{2+} играет двоякую роль: низкие концентрации Ca^{2+} вызывали усиление выхода цитохрома *c* из митохондрий, тогда как высокие концентрации приводили к деполяризации митохондриальной мембраны и ингибированию выхода цитохрома *c* [9]. Также обнаружено, что ингибирование продукции реактивных форм кислорода (РФК) митохондриями приводило к угнетению выхода цитохрома *c*, а экзогенно добавленные РФК стимулировали его [9]. Нам представляется важным показать, как согласуются данные, полученные на изолированных митохондриях, с процессами, происходящими в ацинарных клетках поджелудочной железы. В этой связи целью настоящей работы было исследование митохондриальных механизмов инициации клеточной гибели в опытах *in vitro* на первичной культуре ацинарных клеток, стимулированных супрафизиологическими дозами холецистокинина (ССК).

Методы. Ацинарные клетки были изолированы с использованием стандартной процедуры инкубации ткани поджелудочной железы в присутствии коллагеназы [6]. Для получения *in vitro* модели панкреатита изолированные ацинарные клетки культивировали в присутствии супрафизиологических доз ССК (100нМ) в течение 3 часов. Образование РФК оценивали по изменению флуоресценции специальных зондов DHR123 и DCFDA с помощью конфокального микроскопа [9]. Содержание цитохрома *c* в цитоплазматической и мембранной фракциях измеряли методом Вестерн-блот анализа [6]. Активность каспазы 3 определяли с помощью флуоресцирующего субстрата Ac-DEVD-AMC согласно [7]. Апоптоз ацинарных клеток измеряли методом флуоресцентной микроскопии с использованием красителя Хехст-33342 [6,7], процент апоптотических клеток вычисляли по отношению числа клеток, окрашенных положительно, к общему числу клеток.

Результаты. Ранее несколькими группами исследователей было показано, что супрамаксимальные дозы ССК индуцируют выход цитохрома *c* из ацинарных клеток и последующую активацию каспазы 3, приводящую к апоптотической гибели клеток [2-6]. Для определения роли Ca^{2+} в этих процессах мы использовали тапсигаргин, ингибитор Ca^{2+}-АТФазы эндоплазматического ретикулума, который вызывает продолжительное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ и, таким образом, имитирует действие ССК. Как показано на рис.1А, инкубация ацинарных клеток с тапсигаргином в течение 3 часов стимулирует выход цитохрома *c*, активацию каспазы 3 и увеличение числа апоптотических клеток. Однако, стоит отметить, что эти эффекты значительно ниже тех, которые

проявляются в результате обработки клеток холецистокинином. Кроме того, в присутствии внутриклеточного хелатора Ca^{2+}, BAPTA-AM, выход цитохрома *c*, активность каспазы 3 и апоптоз, индуцированный ССК, существенно снижались (рис.1Б). Полученные результаты показывают, что стойкое продолжительное увеличение концентрации внутриклеточного кальция запускает апоптотическую гибель клеток. Также приведенные данные позволяют сделать заключение, что Ca^{2+} не является единственным сигналом, медиирующим апоптоз в ацинарных клетках. На основании данных, полученных нами ранее на изолированных митохондриях поджелудочной железы [9], мы предположили, что другим сигналом, запускающим апоптоз в ацинарных клетках, являются реактивные формы кислорода. Действительно, было обнаружено, что в клетках, стимулированных супрамаксимальными дозами ССК, наблюдается повышенная продукция РФК, тогда как обработка клеток тапсиграгином не влияет на этот параметр (рис.1В).

Одним из главных источников РФК в клетках являются митохондрии [10]. Для выявления роли митохондриальных РФК в инициации гибели ацинарных клеток мы использовали ротенон, ингибитор дыхательного комплекса I, который стимулирует образование РФК митохондриями [11,12]. Показано, что ротенон увеличивает уровень РФК в ацинарных клетках приблизительно в 3 раза (рис.2А). Соответственно, в клетках, обработанных ротеноном, наблюдается рост выхода цитохрома *c*, активности каспазы 3 и увеличение числа апоптотических клеток (рис.2Б). При сравнении данных, представленных на рисунках 1 и 2, можно заметить, что изменения апоптотических сигналов в клетках, обработанных ротеноном, сопоставимы по величине с изменениями, вызванными ССК. Более того, при инкубировании ацинарных клеток с протонофором СССР, вызывающим снижение митохондриального потенциала и ингибирование продукции РФК, наблюдалось полное угнетение выхода цитохрома *c*, активации каспазы 3 и апоптоза как в отсутствии, так и в присутствии супрамаксимальных концентраций ССК (рис.2Б).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что РФК играют одну из основных ролей в ССК-индуцированном апоптозе ацинарных клеток. Наши результаты согласуются с работами группы Петерсена, в которых было показано, что прооксидант менадион повышает уровень РФК и стимулирует апоптоз в ацинарных клетках [13].

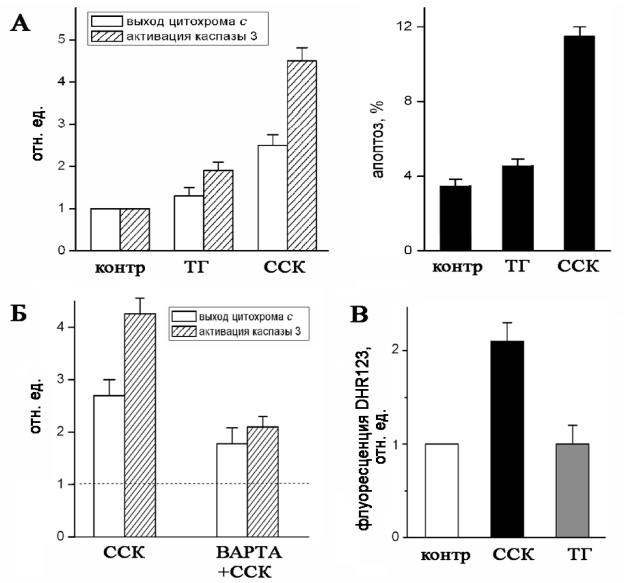


Рис.1. Ca^{2+}-зависимый и независимый механизмы ССК-индуцированной гибели ацинарных клеток. А – ацинарные клетки инкубировали в течение 3 часов в отсутствии (контр) и присутствии 100нМ ССК или 1мкМ тапсигаргина (ТГ). Б – ацинарные клетки преинкубировали 30мин в присутствии ДМСО или 50мкМ ВАРТА-АМ, затем клетки отмывали и инкубировали 3 часа в присутствии ССК. А,Б - изменения выхода цитохрома с и активности каспазы 3 представлены относительно контроля. В – клетки, меченые флуоресцентным зондом DHR123 (5мкМ), инкубировали в течение 15мин. в отсутствии (контр) и в присутствии ССК или тапсигаргина (ТГ). Продукцию РФК измеряли как интенсивность флуоресценции DHR123, нормализованную на число клеток в поле микроскопа.

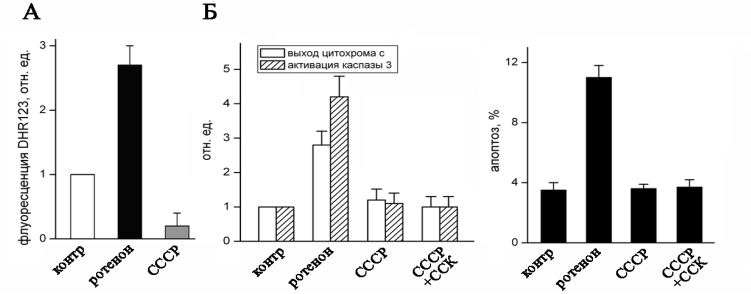


Рис.2. Влияние митохондриальных РФК на апоптоз в ацинарных клетках. Ацинарные клетки инкубировались в отсутствии (контр) и присутствии 2мкМ ротенона, 5мкМ СССР (±100нМ ССК) в течение 15мин. (А) или 3 часов (Б). Измерения параметров продукции РФК, выхода цитохрома *c*, активации каспазы 3 и апоптоза проводились как описано на рис.1.

Таким образом, в данной работе мы подтвердили данные, полученные нами ранее на изолированных митохондриях поджелудочной железы, и показали, что (1) ССК-индуцированное повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} медиирует выход цитохрома *c* из митохондрий, активацию каспазы 3 и апоптоз; (2) повышение митохондриальных РФК стимулирует выход цитохрома и апоптоз ацинарных клеток; (3) диссипация мембранного потенциала предотвращает ССК-индуцированный апоптотический ответ.

Работа поддержана грантом РФФИ №09-04-00739.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Voronina S. et al.* //Acta Physiol. (2009) 195(1): 161-9;
2. *Lerch M.M., Adler G.* //Int. J. Pancreatol. (1994) 15(3): 159-70;
3. *Kaiser A.M. et al.* //Am. J. Physiol. (1995) 269(5): 1295-304;
4. *Bhatia M.* //Am. J. Physiol. Gastroint. Liv. Physiol. (2004) 286(2): 189-96;
5. *Pandol S.J. et al.* //Gastroenterology (2007) 132(3): 1127-51;
6. *Gukovskaya A.S. et al.* //J. Biol. Chem. (2002) 277(25): 22595-604;
7. *Mareninova O.A. et al.* //J. Biol. Chem. (2006) 281(6): 3370-81;
8. *Voronina S.G. et al.* //J. Biol. Chem. (2004) 279(26): 27327-38;
9. *Odinokova I.V. et al.* //Gut. (2009) 58(3):431-42;
10. *Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Starkov A.A.* //Biochem. (2005) 70(2): 200-14;
11. *Fiskum G. et al.* //Ann. NY Acad. Sci. (2003) 991: 111-9;
12. *Li N. et al.* //J. Biol. Chem. (2003) 278(10): 8516-25;
13. *Criddle D.N. et al.* //J. Biol. Chem. (2006) 281(52): 40485-92.

БЛОКИРОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ИЗ *E.COLI* ЭКЗОГЕННЫМ БТШ70 НА МОДЕЛИ ЭНДОТОКСИЧЕСКОГО ШОКА У КРЫС

Остров В.Ф.[1], Слащева Г.А.[1], Евгеньев М.Б.[2], Мурашев А.Н.[1]

[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино
[2]Институт молекулярной биологии РАН, Москва

По данным литературы только в США ежегодно регистрируют сепсис примерно у 700.000 пациентов. Из них каждый третий случай (210.000) заканчивается летальным исходом [1]. С 1979 по 2000г количество случаев сепсиса увеличилось на 8,7% [2].

Сепсис – это тяжелое заболевание, которое развивается при проникновении в системный кровоток эндотоксических липополисахаридов (LPS), которые являются компонентом клеточной стенки Грам(-) бактерий. Молекулы LPS связываются с LBP (LPS-связывающий белок) и взаимодействуют с рецепторным комплексом CD14+TLR4+MD2 на поверхности моноцитов. В результате происходит синтез и секреция в кровь большого количества цитокинов, физиологические эффекты которых и определяют клиническую картину.

В клинической диагностике не существует единого теста на сепсис т.к. это динамично развивающийся патологический процесс, проходящий несколько стадий от системной воспалительной реакции до септического шока. Поэтому о тяжести заболевания судят по изменениям в физиологических системах организма. Наиболее чувствительными являются показатели гемодинамики, системы гемостаза и биохимии крови.

Одним из свойств белков теплового шока с молекулярной массой 70кДа (БТШ70) является способность образовывать (АТФ-зависимым путем) динамичные комплексы с различными молекулами. Из литературных данных известно, что в экспериментах *in vitro* БТШ70 обладают способностью связываться с CD14 [3], TLR [4] и MD-2 рецепторами [5]. Возможность блокирования этих рецепторов представляется перспективным направлением в исследовании средств терапии и профилактики септических патологий. Целью данного исследования является изучение *in vivo* влияния экзогенного БТШ70 на токсические эффекты LPS из *E.coli*.

В эксперименте использовали свободных от патогенной микрофлоры самцов крыс Sprague-Dawley массой 300-350г. Сформированы следующие группы: 1. Животным внутривенно вводили LPS из *E.coli* (модель эндотоксического шока) в дозе 2мг/кг (n=18). 2-3. Животным за 10 минут до (n=16) и через 10 минут после (n=7) LPS внутривенно вводили рекомбинантный человеческий БТШ70 в дозе 266 мкг/кг. 4. Животным внутривенно вводили БТШ70 в дозе 266мкг/кг (n=6).

Регистрировали параметры гемодинамики (ср. АД и ЧСС), показатели гемостаза (протромбиновое и тромбопластиновое время гемокоагуляции, время фибринолиза, концентрация фибриногена), показатели биохимии крови (содержание в плазме альбумина, глюкозы, креатинина, общего белка, билирубина, триглицеридов), выживаемость животных.

Было показано, что у животных в 1-й и 3-й группах развиваются характерные признаки септического шока: системная гипотензия, тахикардия, нарушения гемокоагуляции и фибринолиза, изменения параметров биохимии крови. Во 2-й группе БТШ70 блокирует

токсические эффекты LPS и предотвращает развитие патологических изменений в физиологических системах организма животного. При этом сам БТШ70 (3-я группа) не оказывает влияния на изучаемые параметры. Таким образом, БТШ70, возможно, конкурирует с LPS за связывание с рецепторами, однако сам не способен запускать синтез цитокинов. Эти результаты не подтверждают предположение о цитокиноподобной функции БТШ70, описанной в работах Tsan, Gao [6] и Asea [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Angus D.C. et al.* //Crit. Care Med. (2001) 29: 1303-10;
2. *Martin G.S. et al.* //N. Engl. J. Med. (2003) 348: 1546-54;
3. *Asea A. et al.* //Nature Medicine (2000) 6: 435-42;
4. *Asea A. et al.* //J. Biol. Chem. (2002) 277 (17): 15028-34;
5. *Triantafilou M., Triantafilou K.* //Biochem. Soc. Trans. (2004) 32: 636-9;
6. *Tsan M.F., Gao B.* //Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2004) 286 (4): 739-44;
7. *Asea A. et al.* //Cell Stress Chaperones (2000) 5(5): 425-31.

ЭФФЕКТЫ МИТОХОНДРИАЛЬНО-АДРЕСОВАННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ И ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ПОЧКИ. МЕХАНИЗМЫ НЕФРОПРОТЕКЦИИ

Плотников Е.Ю.[1], Певзнер И.Б.[1], Янкаускас С.С.[1], Кирпатовский В.И.[2], Казаченко А.В.[2], Зоров Д.Б.[1]

[1]НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[2]ФГУ Научно-исследовательский институт урологии Росмедтехнологий, Москва

Нарушения функции почек различного генеза являются распространенной клинической патологией, часто угрожающей жизни больного. Несмотря на прогресс в развитии методов терапии, не уменьшается количество пациентов с ишемической острой почечной недостаточностью (ОПН), высока смертность от этого состояния [1]. При почечной недостаточности возникает необходимость замещения функции поврежденного органа путем гемодиализа или трансплантации почки, что серьезно ухудшает качество жизни больного [2] и является крайне затратным с экономических позиций. Развиваясь у трети пациентов реанимационных отделений, ОПН представляет собой крайне тяжелое осложнение множества заболеваний, нередко с летальным исходом. Во

многом это связано с отсутствием эффективного лечения ишемической ОПН.

Показано, что основным звеном патогенеза ишемической ОПН являются митохондрии, генерирующие в условиях ишемии/реперфузии (И/Р) активные формы кислорода (АФК). Однако митохондрии являются центральной фигурой не только повреждающих, но и защитных сигнальных путей, и именно исследование их функционирования в условиях различных почечных патологий может помочь в составлении целостной картины регуляции выживания или гибели клетки в ходе развития окислительного стресса.

Мы исследовали нефропротекторные технологии, в основе которых лежит повышение толерантности почки к окислительному стрессу, направленное на снижение тяжести повреждения в условиях его развития. Основными средствами для достижения этой цели являются фармакологические препараты с антигипоксическим и мембранопротекторным действием и методы физиологического и фармакологического прекондиционирования клеток почки. Исследовались защитные эффекты митохондриально-адресованных антиоксидантов 10-(6'-пластохинонил) децилтрифосфония (SkQ1) и 10-(6'-пластохинонил) децилродамина (SkQR1), а также фармакологического и ишемического прекондиционирования.

Результаты и обсуждение. Данные, полученные при окрашивании срезов почки красителем TMRE, свидетельствуют о значительном падении $\Delta\psi$ в митохондриях почки после ишемии реперфузии: относительная интенсивность флуоресценции TMRE снизилась на 60% по сравнению с контрольной почкой. Такое снижение может быть вызвано в частности индукцией в митохондриях неспецифической проницаемости внутренней мембраны.

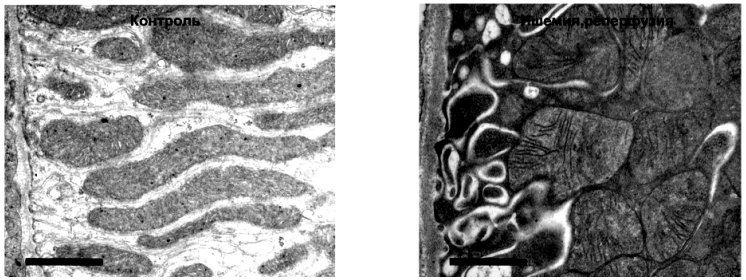


Рис.1. Электронные микрофотографии контрольной почки и почки после И/Р демонстрируют набухание митохондрий в клетках почки после И/Р. Шкала 1мкм.

Изучение морфологического состояния митохондрий показало значительные изменения структуры митохондрий после И/Р (рис.1). Электронная микроскопия выявила набухание митохондрий в клетках почек, подвергшихся И/Р. По сравнению с нормальной ультраструктурой митохондрий в контрольной почке, после ишемии митохондрии имели увеличенный объем матрикса, часто становились плохо различимыми структуры крист (рис.1).

После И/Р в клетках почечной ткани образовывалось вдвое больше АФК чем в контрольной почке (рис.2). Это указывает на развитие окислительного стресса в клетках, подвергшихся И/Р, и может объяснять фрагментацию митохондрий, поскольку основным ее индуктором, как сказано выше, являются АФК. Методом двойного окрашивания клеток почки TMRE и DCF было показано, что продукция АФК происходит преимущественно в митохондриях.

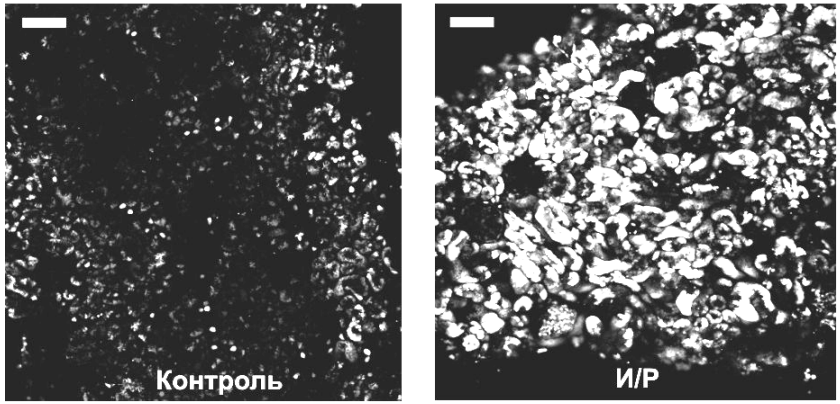


Рис.2. Генерация АФК в срезах почки крысы, окрашивание DCF. Шкала100мкМ.

После внутрибрюшинной инъекции LiCl (50мг/кг) перед ишемией почки, деполяризация митохондриальных мембран в клетках канальцев, вызываемая И/Р, значительно снижалась. Обработка Li^+ перед ишемией почки приводила также к снижению окислительного стресса. Прямым доказательством того, что действие ионов лития направлено на активность GSK-3 в клетках почки, является тот факт, что инъекция LiCl приводила к накоплению фосфорилированной формы GSK-3, для которой известно, что она неактивна [3].

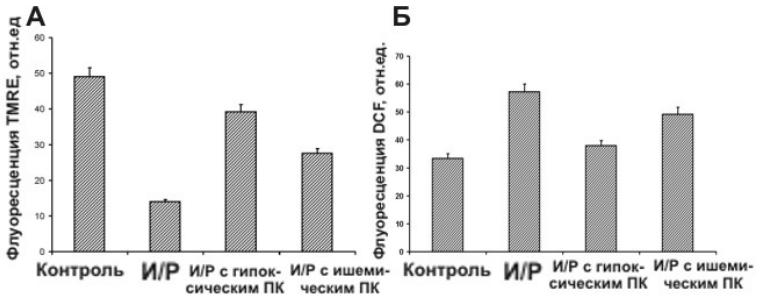


Рис.3. Эффект ПК на функциональное состояние митохондрий в клетках почки. А – мембранный потенциал митохондрий; Б – продукция АФК (окрашивание с помощью TMRE и DCF, соответственно). И/Р проведена после ишемического или гипоксического прекондиционирования.

Изучение влияния ионов лития на функциональное состояние ишемизированной почки у животных *in vivo* показало, что введение хлорида лития в дозе 10мг за час до 60-минутной ишемии значительно улучшало функциональные параметры почки, наблюдаемые после ишемии. Выявлено, что показатели эндогенного креатинина крови после перенесенной ишемии составляли более 140мкМ по сравнению с 40мкМ в контроле. На фоне предварительного введения хлорида лития уровень креатинина уменьшался до 60мкМ. Концентрация мочевины крови, также значительно повышенная после перенесенной ишемии, на фоне введения LiCl на 3 сутки снижалась до нормы.

Затем было исследовано влияние гипоксического и ишемического прекондиционирования (ПК) на пост-ишемические изменения в ткани почки. ПК является наиболее эффективным способом защиты, снижающим клеточную гибель, вызываемую И/Р. Мы сравнивали эффекты вызываемого ионами лития фармакологического ПК, ишемического ПК, вызываемого краткими эпизодами ишемизации отдельного органа, и действие гипоксического ПК, вызываемого короткими периодами гипоксии у животного.

Показано, что митохондриальный мембранный потенциал $\Delta\psi$ после И/Р (30% от контроля) частично восстанавливался при ишемическом ПК (до 56%), тогда как гипоксическое ПК сохраняло более высокие значения $\Delta\psi$ (78% от контроля). Продукция АФК в почках, подвергнутых ишемическому ПК, была более низкой по сравнению с почками после И/Р. Гипоксическое ПК вдвое снижало индуцированную И/Р продукцию АФК (рис.3).

Детальное исследование механизмов, лежащих в основе гипоксического ПК, выявило ряд взаимосвязанных сигнальных путей, повышающих устойчивость клеток почки к ишемии. Выявлено, что уже

через 3 суток гипоксического ПК в почках крыс более чем вдвое повышается количество эритропоэтина. Кроме того, при гипоксическом ПК в клетках почки увеличивается количество фосфорилированной формы митохондриальной GSK-3β. При введении эритропоэтина в дозе 100МЕ/кг массы тела животного выявлено выраженное увеличение пула фосфо-GSK-3β в клетках почки. Таким образом, действие гипоксической тренировки реализуется, скорее всего, через каскад сигналов: гипоксия вызывает повышение эритропоэтина в ткани почки, а эритропоэтин индуцирует фосфорилирование GSK-3β, как это показано при ПК сердца [4].

Далее были детально исследованы сигнальные пути, ассоциированные с митохондриями и гибелью клеток при ишемии. В качестве защитных агентов использовались ионы лития и инсулин, а также митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1 [5]. Выявлено, что при воздействии на культивируемые клетки почки крыс 24-часовой ишемии с последующей реоксигенацией в течение 24 ч гибель клеток превышала 80% (рис.4). При инкубации клеток почки с различными концентрациями SkQ1 в течение 5 сут с последующей 24-часовой ишемией и реоксигенацией в течение 24ч гибель клеток снижалась. Выявлены достоверные защитные эффекты SkQ1, которые проявлялись при его присутствии в среде в концентрациях 31, 62, 125 и 250нм (рис.4). В результате инкубации клеток почки с инсулином и ионами лития мы также наблюдали выраженный защитный эффект на культуру клеток почки, которая находилась в условиях ишемии/реоксигенации. Как видно из рис.4, количество живых клеток после ишемии/реоксигенации увеличилось более чем вдвое при инкубации с 3мМ LiCl. Аналогичное увеличение устойчивости клеток к И/Р наблюдалось при инкубации в ходе ишемии с 120нм инсулина. Таким образом, можно заключить, что и ионы лития, и инсулин, и митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1 являются агентами, защищающими клетки почки от гибели, вызванной И/Р.

Окрашивание культивируемых клеток с помощью Аннексин V-ФИТЦ показало, что спустя 24ч после ишемии в культуре наблюдается значительное увеличение количества апоптотических клеток по сравнению с контролем (рис.4, внизу). В случае предобработки клеток ионами лития, инсулином или SkQ1 количество апоптотических клеток после ишемии сокращалось почти вдвое.

При изучении морфологического состояния митохондрий клеток почки обнаружено, что через 15мин реоксигенации после 24-часовой ишемии митохондрии клеток оказываются значительно фрагментированы. Фрагментация митохондрий наблюдалась на ранних стадиях после ишемии/реоксигенации, а ее предотвращение обеспечивает лучшую выживаемость клеток при данных условиях. Такие агенты, как

антиоксидант (SkQ1), ингибитор GSK-3 (LiCl) и сигнальная молекула (инсулин) оказались одинаково эффективными для защиты как от фрагментации митохондрий, так и индуцированной клеточной гибели.

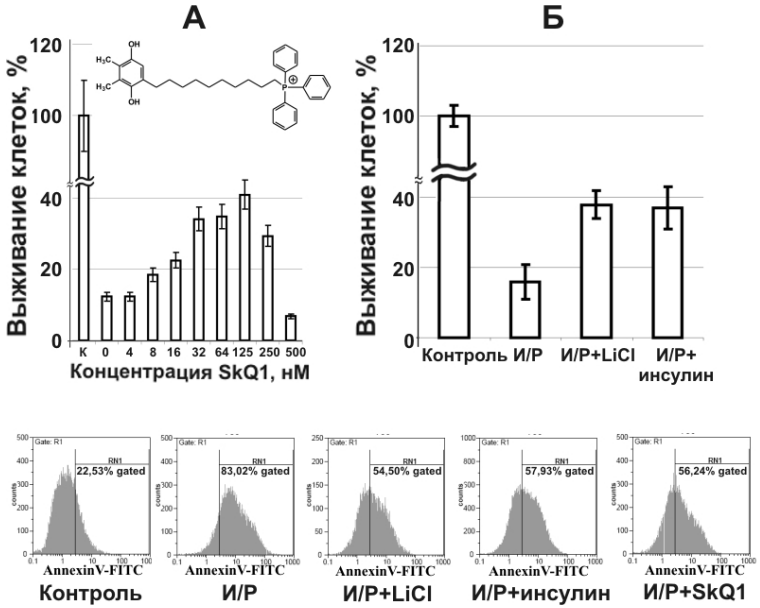


Рис.4. Защита от апоптотической гибели после ишемии/реоксигенации (И/Р) культивируемых клеток почки. А – действие SkQ1 при 5-дневном культивировании, Б – действие инсулина (120нМ) и LiCl (3мМ) непосредственно перед ишемией на выживание клеток почечных канальцев. Внизу: увеличение популяции Аннексин V-положительных клеток при И/Р и предотвращение этого эффекта предобработкой LiCl, инсулина и SkQ1.

После 40мин почечной ишемии ex vivo с последующей реоксигенацией было найдено, что продукция АФК значительно возрастает (рис.5). Однократная внутрибрюшинная инъекция животным антиоксиданта SkQR1 (1мкМоль/кг) за сутки до ишемии вызывала частичную нормализацию уровня АФК. Инъекция того же количества других аналогичных антиоксидантов, SkQ1 или MitoQ (рис.5) не оказывала статистически значимого эффекта. Ишемия единственной почки с последующей реоксигенацией вызывала гибель большинства крыс к 4 суткам после операции. В то же время, предварительное введение SkQR1 или SkQ1 почти полностью предотвращало гибель экспериментальных животных.

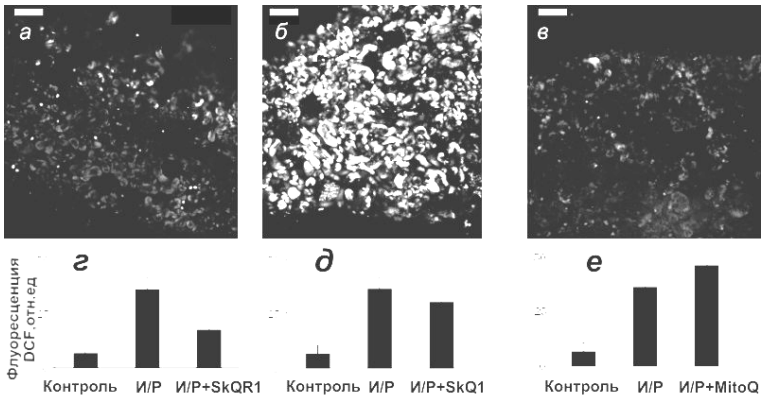


Рис.5. Генерация АФК в срезах почки, определяемая по флуоресценции DCF. *а* – контроль, *б* – почка после 40мин ишемии с последующей 10мин реперфузией, *в* – почка крысы, получавшей 1мкмоль/кг в день SkQR1 перед ишемией. Шкала 100мкМ. *г,д,е* – средняя продукция АФК в почке.

Таким образом, показано нарушение работы митохондрий клеток почки при И/Р. Обнаружено, что ишемическое и фармакологическое прекондиционирование вызывают ингибирование киназы GSK-3β, снижают повреждение митохондрий и генерацию активных форм кислорода и, в конечном счете, защищают почку от повреждения.

Исследование влияния митохондриально-адресованных антиоксидантов показало их высокую эффективность в предотвращении окислительного стресса в почечных клетках после ишемии и защите почки от повреждения. Эти соединения уменьшают гибель клеток почечного эпителия, снижают выраженность пост-ишемической почечной недостаточности и повышают выживание животных с острой почечной недостаточностью.

Работа поддержана грантом РФФИ №08-04-01667 и Центром Митоинженерии МГУ

ЛИТЕРАТУРА

1. *Himmelfarb J. and Ikizler T.A.* //Kidney Int. (2007) 71, 971-6;
2. *Mucsi I. et al.* //J. Nephrol. (2008) 21, S84-91;
3. *Nishihara M. et al.* //Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (2006) 291, H748-55;
4. *Sutherland C., Leighton I.A., Cohen P.* //Biochem. J. (1993) 296, 15-9;
5. *Скулачев В.П.* //Биохимия (2007) 72, 1385-96.

АНОМАЛЬНЫЙ ОСМОС И РЕГУЛЯЦИЯ ОБЪЕМА КЛЕТКИ РАННЕГО ЭМБРИОНА МЫШИ ПРИ ГИПОТОНИИ

Погорелова М.А.[1,2], Гольдштейн Д.В.[3,4], Погорелов А.Г.[2,5], Голиченков В.А.[1]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[2]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[3]ЗАО «РеМеТэкс», Самара
[4]ГУ Медико-генетический центр РАМН, Москва
[5]Пущинский государственный университет

Ряд ключевых функций клетки являются мишенью осмотического шока: синтез белков [1], экспрессия генов [2], клеточная смерть [3]. Для дифференцированных клеток в культуре показано восстановление их объема при гипотонии [4]. В ряде обзоров обсуждаются причины регуляторного ответа на осмотический шок [5,6-8]. Однако закономерности осмотического поведения, наблюдаемого для культур, не применимы к клетке раннего эмбриона из-за особенности ее мембранного транспорта. Изучение реакции бластомера на анизотонические условия оставалось невозможным по причине отсутствия метода измерения его объема, Для решения данной задачи нами разработана технология микротомографии посредством лазерной сканирующей микроскопии (LSM) с последующей трехмерной (3DR) реконструкцией клетки [9-10]. Результаты количественной микротомографии двухклеточного эмбриона мыши при разных осмотических условиях показаны на рисунке 1.

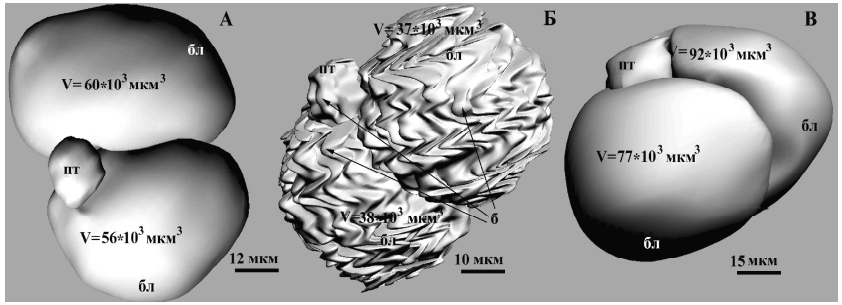


Рис.1. 3-DR изображение эмбриона. (А) сразу после выделения, (Б) 120 минут в среде, содержащей 200мМ NaCl, (В) 15 минут в среде, содержащей 60мМ NaCl. бл – бластомер, пт – полярное тельце, б – выросты, V – объем бластомера.

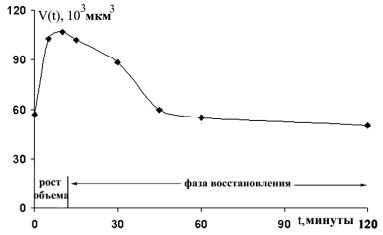


Рис.2. Изменение со временем объема бластомера 2-х клеточного эмбриона мыши в растворе Дюльбекко, содержащем 60мМ NaCl.

На рис.2 приведена кинетическая кривая, описывающая осмотическое поведение эмбриональной клетки в течение гипотонии. Видно (рис.2), что осмотический ответ бластомер протекает в две фазы. В начале клетка набухает, но затем стремится восстановить исходный размер. В фазе увеличения объема поведение бластомера описывается линейным законом Вант Гоффа с коэффициентом проницаемости для воды 0.40мкм/(мин×атм), что близко по значению к величине, определенной для ооцита мыши [11]. После максимального набухания наступает фаза аномального поведения, когда наблюдается регуляторное уменьшение клеточного объема (рис.2). В эту компенсаторную реакцию клетки вовлекаются различные механизмы, включая: аномальный осмос, электроосмос, изменение термодинамических характеристик цитоплазматической воды, например, знак ее гидратации. Наши данные (не приводятся) свидетельствуют о том, что адаптация эмбриональной клетки к гипотонии не зависит от Na^+/K^+-АТРазы или изменения изоэлектрической точки белка (pH 6.4). Аномальное поведение бластомера в гипотонических условиях отменяется на фоне действия Цитохалазина Б.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №08-04-01761а, Бел-08-04-90053а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Anbari K., Schultz R. M.* //Mol. Reprod. (1993) 35: 24-8;
2. *Benzeev A.* //Bioassays (1991) 13: 207-12;
3. *Cohen G.M. et al.* //Biochem. J. (1992) 286: 331-4;
4. *Rosenberg H.M., Buckhold Shank B., Gregg E.C.* //J. Cell. Physiol. (1972) 80: 23-32;
5. *Macknight A. D.* //Renal Physiol. Biochem. (1988) 11: 114-41;
6. *Hoffmann E.K., Simenson L.O.* //Physiol. Rev. (1989) 69: 315-88;
7. *Lang F. et al.* //Physiol. Rev. (1998) 78: 248-306;
8. *Mongin A.A., Orlov S.N.* //Pathophysiol. (2001) 8: 77-88;
9. *Погорелова М.А. и др.* //ДАН (2008) 418: 712-4;
10. *Pogorelov A.G., Pogorelova V.N.* //J. Microsc. (2008) 232: 36-43;
11. *Gao D.Y. et al.* //Biophys. J. (1996) 71: 443-50.

ПОИСК ГЕНОВ-ИНГИБИТОРОВ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Синяева Ю.А.[1], Соколов С.С.[2], Северин Ф.Ф.[2]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва
[2]НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва

Как и многоклеточные организмы, клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обладают способностью включать каскад программированной клеточной смерти (ПКС). На данный момент для дрожжей показано несколько естественных и искусственных индукторов апоптоза. К ним относятся: высокие концентрации феромона, перекись водорода, уксусная кислота, сахара, а также некоторые фармакологические препараты [1]. В нашей лаборатории было показано, что амиодарон (2-бутил-3-бензофуранил-4-[2-(диэтиламино)-этокси]-3,5-дийодофенил-кетон гидрохлорид) способен индуцировать апоптоз у дрожжей по тому же пути, что и естественный индуктор – половой феромон, но с большей эффективностью [2]. На основе этого эффекта амиодарона нами была разработана методика для отбора дрожжей с нарушениями в апоптотическом механизме. К настоящему времени в литературе описан широкий ряд проапототических дрожжевых генов (*AIF1, NMA111, YCA1, YSP1, YSP2*) [3]. Однако, до сих пор очень мало известно о генах, кодирующих антиапоптотические белки дрожжей. В данной работе с использованием амиодарона в качестве индуктора апоптоза был проведен поиск генов, негативно регулирующих ПКС дрожжей *S. cerevisiae*.

На первом этапе работы на основе штамма *S. cerevisiae* W303-1A (MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3,112, GAL, psi^{+}) мы получили коллекцию дрожжей, гиперэкспрессирующих различные гены. Для этого штамм W303-1A был трансформирован библиотекой генов *S. cerevisiae* на основе мультикопийной плазмиды pYEp13. Далее данная коллекция была обогащена клонами устойчивыми к амиодарон-индуцируемому апоптозу. Это было сделано тремя последовательными циклами индукции апоптоза 80мкМ амиодароном до выживания 1-3% с последующим ростом в течение суток на среде без амиодарона. Отобранные штаммы были проверены на чувствительность к амиодарону, устойчивыми мы считали штаммы, превосходящие по выживаемости дикий тип не менее чем в три раза. Из устойчивых клонов были выделены плазмиды, содержащие гиперэкспрессированные гены. Было подтверждено, что устойчивость к амиодарону в отобранных штаммах обусловлена наличием выделенных плазмид (путем перепроверки устойчивости к амиодарону штамма W303-1A, трансформированого плазмидами-интереса).

Табл.1. Список, выявленных генов увеличивающих устойчивость дрожжей *S. cerevisiae* к индукции апоптоза.

Ген	Кодируемый продукт
YPK1	серин/треонин киназа
TRR1	тиоредоксин редуктаза
MCD1	Когезин
DOT6	функция неизвестна
PDE2	цАМФ фосфодиэстераза
REC8	Когезин
OCA4	белок, необходимый для репликации вируса Brome mosaic virus в *S. cerevisiae*
RGS2	негативный регулятор цАМФ сигнального пути
SLG1	компонент стресс-активируемого киназного пути PKC1-MPK1
HPT1	Фосфорибозилтрансфераза
MBR1	митохондриальный белок

На следующем этапе были определены нуклеотидные последовательности вставок, содержащихся на плазмидах, которые были проанализированы с помощью базы данных Saccharomyces Genome Database SGD (http://www.yeastgenome.org). Результаты представлены в табл.1.

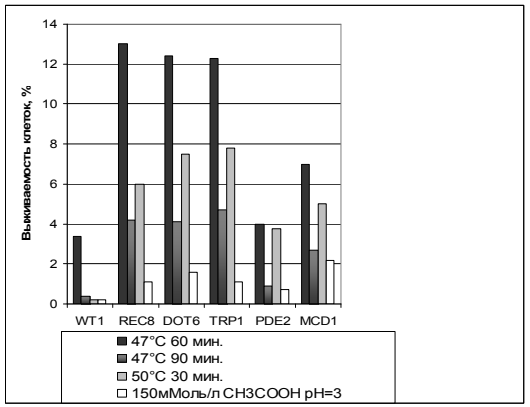


Рис.1. Сравнение устойчивости штаммов к индукции апоптоза.

Показано, что клетки, гиперэкспрессирующие гены *DOT6, MCD1, REC8, TRP1, PDE2* более устойчивы, чем клетки дикого типа и к другим видам индукции апоптоза: тепловому шоку и к ацетату с pH=3, что свидетельствует об антиапоптотической роли данных генов (рис.1). *MCD1* и *REC8* кодируют когезины. Ранее было показано, что фрагмент когезина Mcd1 играет проапоптоическую роль [4]. Поэтому мы

предполагаем, что соотношение интактного к расщепленному когезину в некоторых условиях может играть роль переключателя апоптоза дрожжей *S. cerevisiae* .

Работа поддержана грантом РФФИ №07-04-00223.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Severin F. et al.* //Curr. Biol. (2002) 12: R233-5;
2. *Pozniakovsky A.I. et al.* //J. Cell. Biol. (2005) 168: 257-69;
3. *Sokolov S. et al.* //BBA (2006) 1757: 1366-70;
4. *Yang H. et al.* //Mol. Biol. Cell (2008) 19: 2127-34.

РЕГУЛЯЦИЯ ВОДНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЛАВНЫХ КЛЕТОК СОБИРАТЕЛЬНЫХ ТРУБОК ПОЧКИ В УСЛОВИЯХ ГИПООСМОТИЧЕСКОГО ШОКА

Соленов Е.И.[1,2], Батурина Г.С.[1], Иляскин А.В.[1,2], Каткова Л.Е.[1]

[1]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
[2]Новосибирский государственный университет

Клетки почечного эпителия находятся в постоянном контакте с канальцевой жидкостью, осмотическое давление которой изменяется в широких пределах. Наиболее опасна для клеток гипотоническая среда, поскольку в результате возрастания объема клетки может произойти разрушение плазматической мембраны. Клетки почечного эпителия в условиях диуреза подвергаются гипоосмотическому воздействию, со стороны канальцевой жидкости, в состоянии антидиуреза в этих клетках значительно возрастает трансцеллюлярный поток воды, что также может нарушать осмотический баланс этих клеток. Для функционирования в условиях осмотически нестабильной среды, клетки должны обладать эффективной регуляцией клеточного объема.

В настоящей работе исследовали кинетику изменения объема главных клеток собирательных трубок наружного медуллярного вещества почки (OMCD) в процессе адаптивной реакции на гипоосмотический шок, который создавали фосфатно-солевым раствором (PBS), разбавленным в 2 раза дистиллированной водой. Водную проницаемость определяли по скорости нарастания объема клеток в гипоосмотической среде [1]. Изменения объема клеток регистрировали с помощью флуоресцентного метода [2]. Для оценки достоверности различий независимых выборок применяли t-критерий Стьюдента. Все величины выражены как M±m.

Впервые определены кинетические характеристики этой реакции дифференцированных клеток, полученных из зрелой почки методом микродиссекции. В результате исследования было показано, что гипоосмотический шок вызывает быстрое снижение водной проницаемости плазматической мембраны этих клеток. В гипоосмотической среде активируется защитный механизм клетки, определяющий регуляторное снижение объема (RVD). Адаптации клетки к гипоосмотической среде, наступающей после регуляторного снижения объема, сопутствует значительное снижение водной проницаемости плазматической мембраны. На снижение водной проницаемости клеток указывает то, что характерные времена возрастания объема в гипотонической среде значительно увеличиваются после первого осмотического шока (τ=0.25±0.03 и 0.81±0.09с, (n=7), p<0.01) (рис.1).

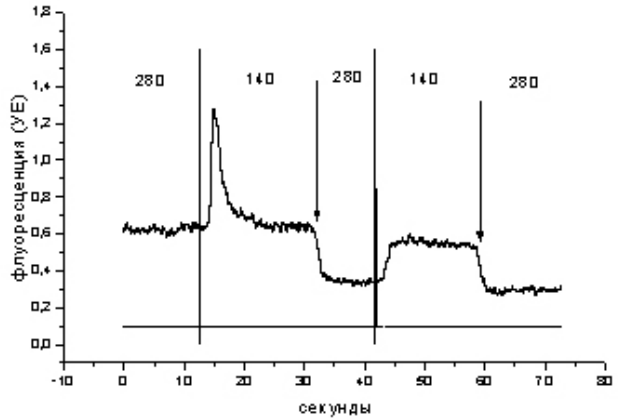


Рис.1. Изменение объема главных клеток собирательных трубок почки при последовательном воздействии гипотонических шоков. Профиль флуоресценции Calcein. Вертикальные линии – синхронизирующие сигналы момента подачи гипоосмотической среды, стрелки – переход к изотонической среде. Оси: абсцисс – секунды; ординат – условные флуоресценции единицы.

Механизм быстрого снижения в настоящее время не исследован. Можно предположить, что гипотонический шок ускоряет интернализацию водных каналов и, возможно, тормозит их встраивание в плазматическую мембрану. Методом Western blot показали, что в препаратах плазматических мембран клеток подвергавшихся гипотоническому шоку есть тенденция к снижению содержания водных каналов формируемых аквапорином AQP2 (рис.2).

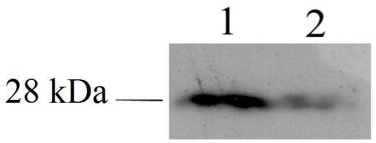


Рис.2. Содержание белка водного канала AQP2 во фракции мембран OMCD почки крыс (Western blot анализ). 1 – до гипоосмотического шока; 2 – после гипоосмотического шока.

Известно, что гипоосмотический шок способен вызывать повышение концентрации внутриклеточного кальция [3]. Определенную роль в процессах регуляции водной проницаемости этих клеток играют механизмы зависимые от концентрации внутриклеточного кальция [4]. В этой связи, в работе исследовали реакцию на осмотический стресс клеток у которых повышение концентрации внутриклеточного кальция было заблокировано хелатором BAPTA. Хелатирование внутриклеточного кальция приводит к снижению пика клеточного объема при первичном шоке и значительному снижению скорости RVD на что указывает возрастание характерного времени регуляторного снижения объема клеток в гипоосмотической среде (τ=1.3±0.3с n=8 и 8.5±1.8с n=6, $p<0.01$, в контроле и после хелатирования внутриклеточного кальция). У таких клеток, если судить по величине характерного времени набухания, осмотический шок не вызывает дальнейшего снижения водной проницаемости (τ=1.11±0.12с n=14 и 1.15±0.08с n=14). Учитывая ингибирующий эффект хелатирования внутриклеточного кальция на скорость RVD, можно думать, что в его механизме в главных клетках, определенную роль может играть Maxi K канал, активность которого зависит от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [5,6].

Резюмируя, можно предположить, что обнаруженный эффект быстрого снижения водной проницаемости эпителиальных клеток в среде с низким осмотическим давлением имеет адаптивное значение. Клетки с пониженной водной проницаемостью в меньшей степени набухают при гипоосмотическом шоке и соответственно меньше подвержены риску разрушения. Очевидно, что кальций играет значительную роль в регуляции клеточного объема. Можно предположить, что кальций зависимые процессы, участвующие в регуляции транспорта воды и осмолитов, в частности калия, различны в нормальных условиях и в условиях гипоосмотического шока. В настоящее время остается неясным в полной мере, какие процессы в клетке определяют эффективность регуляции клеточного объема при гипоосмотическом шоке, но резкое снижение водной проницаемости в этот момент, позволяет думать, что даун-регуляция водных каналов плазматической мембраны, является важным звеном этого механизма.

Работа выполнена при поддержке: РФФИ №08-04-00541, №09-04-00197), «Ведущие научные школы» НШ-1647.2008.4

ЛИТЕРАТУРА

1. *Соленов Е. И., Батурина Г. С., Иванова Л. Н.* //Росс. Физиол. Журн. (2001) 87(7): 965-72;
2. *Ходус Г.Р. и др.* //Росс. Физиол. Журн. (2006) 95(5): 626-32;
3. *Hoffmann E.K. et al.* //Physiol. Rev. (2009) 89: 193-277;
4. *Solenov E. et al.* //Am. J. Physiol. Cell. Physiol. (2004) 286: C426-32;
5. *Wehner F.* //Contrib. Nephrol. (2006) 152: 25-53;
6. *Woda C.B. et al.* //Am. J. Physiol. Renal Physiol. (2001) 49: 786-93.

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРООКСИДАНТОВ НА КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE,* ОБРАБОТАННЫХ МУТАГЕНОМ МЕТИЛМЕТАНСУЛЬФОНАТОМ

Сорокин М.И.[1], Смирнова Е.А.[2], Кнорре Д.А.[2], Северин Ф.Ф.[2]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[1]НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Токсический эффект метилирующего агента метилметансульфоната (ММС) на дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* опосредован его действием на ДНК. Инкубация с ММС вызывает метилирование геномной ДНК, которое впоследствии приводит к образованию неспаренных оснований, двух- и одноцепочечных разрывов молекулы ДНК, вызывает остановки репликации, повреждения репликационной вилки. Делеционные мутанты по репарационным ферментам обладают повышенной чувствительностью к метилирующим агентам. К таким мутантам относятся, например, делеционные мутанты по ферментам, обеспечивающим репарацию двухцепочечных разрывов ДНК за счет гомологичной рекомбинации, для которой необходимо наличие двойного набора ДНК [1,2], а также делеционные мутанты по ферментам, репарирующим неспаренные основания ДНК [2].

Действие ММС также приводит к увеличению концентрации активных форм кислорода (АФК), основным источником образования которых в клетке является митохондрия [3]. Мы решили выяснить, является ли повышение концентрации АФК следствием прямого действия ММС на митохондрию или ответом клетки на обнаружение поврежденного генетического материала. Для этого была проведена серия опытов по измерению выживания клеток дрожжей, обработанных ММС, на разных стадиях клеточного цикла в присутствии как прооксидантов, так и антиоксидантов.

Прежде всего мы убедились, что и в наших экспериментальных условиях основной мишенью ММС является ДНК. В пользу этого свидетельствовали, во-первых, повышенная смертность под действием ММС (10мМ) клеток *Saccharomyces cerevisiae*, синхронизированных гидроксимочевиной в S стадии клеточного цикла, относительно асинхронной культуры клеток (рис.1). Это, возможно, объясняется наличием в большинстве синхронизированных в S стадии клеток репликационных вилок, повреждение которых летально. Во-вторых, повышенная выживаемость клеток *Saccharomyces cerevisiae,* синхронизированных в G2/M стадии клеточного цикла нокодазолом, относительно асинхронной культуры клеток (рис.1), также свидетельствует о возможности репарирования поврежденной ММС ДНК гомологичной рекомбинацией и, следовательно, о том, что повреждение генетического материала является ключевым параметром при ответе клетки на действие ММС.

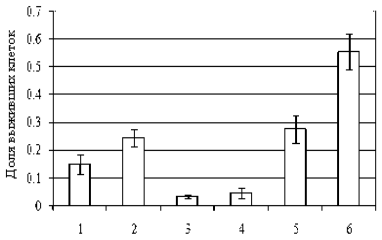


Рис.1. Действие С12-ТРР на клетки дрожжей в различных фазах клеточного цикла. Продолжительность прединкубации с нокодазолом и гидроксимочевиной-2 часа. Продолжительность последующей инкубации с ММС (10мМ) – 2 часа. 1. Асинхронная культура (без пред-инкубации). 2. Асинхронная культура +С12-ТРР (10мкМ). 3. Культура клеток в S стадии клеточного цикла. 4. Культура клеток в S стадии клеточного цикла +С12-ТРР (10мкМ). 5. Культура клеток в G2/M стадии клеточного цикла. 6. Культура клеток в G2/M стадии клеточного цикла +С12-ТРР (10мкМ).

Далее мы показали, что додецилтрифенилфосфоний (С12-ТРР, 10мкМ) повышает выживаемость клеток дрожжей, обработанных ММС. С12-ТРР может выступать как в роли митохондриально направленного разобщителя, так и в качестве прооксиданта (неопубликованные данные). Чтобы определить, какой из этих эффектов ММС обуславливает его защитное действие, мы исследовали действие разобщителя (FCCP) и других прооксидантов (менадиона и амиодарона) на выживаемость клеток, обработаных ММС. Мы показали, что ни одна из испробованных концентраций разобщителя (0,1-10мкМ) не предотвращает гибели клеток, обрабтанных ММС. В то же время амиодарон и менадион снижали токсический эффект ММС в той же степени, что и С12-ТРР. Это свидетельствует о том, что в данных экспериментальных условиях эффект С12-ТРР связан с его прооксидантным действием. В пользу этого

предположения также говорит тот факт, что токоферол, являющийся антиоксидантом, ингибировал защитный эффект С12-ТРР.

Далее мы исследовали зависимость защитного эффекта С12-ТРР от стадии клеточного цикла дрожжей. Было показано, что С12-ТРР повышает выживаемость клеток *Saccharomyces cerevisiae* в ответ на действие ММС как в асинхронной, так и в синхронизированной в стадии G2/M клеточного цикла, культуре (рис.1). Причем эффект додецилтрифенилфосфония на мутантный штамм *Saccharomyces cerevisiae* с делецией гена супероксиддисмутазы-2 гораздо более ярко выражен, чем наблюдалось в диком типе. Следовательно, С12-ТРР индуцирует образование АФК, которые обладают защитным действием, при чем это действие или прямое (инактивация ММС), или же косвенное (стимуляция защитных ресурсов клетки). Как показано на рис.1, при инкубации синхронизованных в S-стадии клеток с ММС, положительного эффекта додецилтрифенилфосфония обнаружено не было (рис.1).

Таким образом, наиболее вероятным является косвенное действие: С12-ТРР стимулирует защиту от двухцепочечных разрывов ДНК, стимулируя образование АФК, но не влияет на защиту уязвимой ДНК вилки репликации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Chlebowicz E., Jachymczyk W.J.* //Mol. Gen. Genet.(1979) 167(3):279-86;
2. *Lundin, C. et al.* //Nucleic Acids Res. (2005) 33: 3799-811;
3. *Rowe L.A., Degtyareva N., Doetsch P.W.* //Free Radic Biol. Med. (2008) 45(8):1167-77.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ВТОРОЙ ИЗОФОРМЫ ТРАНСФЕРРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА В ВЫЗВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ ПАДЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ТРАНСФЕРРИНА В КРОВИ

Сухомлин Т.К., Шаталин Ю.В., Ермаков Г.Л., Поцелуева М.М.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Снижение уровня трансферрина (Тф) в крови при острых и хронических заболеваниях – явление известное, хотя пока и не объясненное. Нами было обнаружено пороговое падение уровня Тф в экспериментальной модели рака, т.е. в плазме крови животных с трансплантированной в брюшную полость асцитной опухолью (рис.1). Снижение уровня Тф в плазме крови можно объяснить переносом этого

белка в асцит, где его концентрации начиная со второго дня эксперимента увеличивается. Но амплитуда изменения концентрации Тф в плазме крови не может быть объяснена исключительно его транспортом из крови в асцит по градиенту концентрации, поскольку на поздних стадиях развития опухоли концентрация Тф в плазме крови становится ниже, чем в асците (уровень, показанный пунктирной линией). В этой работе мы приводим феноменологическую модель для объяснения «парадоксального» падения уровня Тф крови. Суть гипотезы в том, что в условиях окислительного стресса усиливается процесс захвата Тф железосеквестрирующими клетками посредством второй изоформы трансферринового рецептора (ТфР2). Механизм усиления захвата и физиологический смысл этого явления обсуждаются ниже.

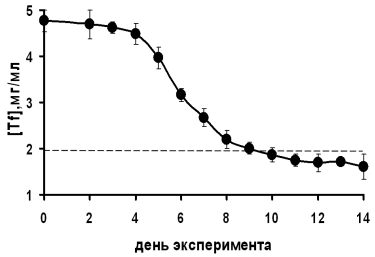


Рис.1.

Парадоксальность снижения уровня Тф в условиях обострения окислительного стресса в экспериментальной модели рака [1-2] как и при других патологиях состоит в том, что снижается концентрация белка с антиоксидантной активностью. При этом экспрессия других железо-ругулирующих белков изменяется закономерно, т.е. экспрессия белков, способствующих понижению концентрации свободного железа и/или сотношения двух- и трехвалентного железа, усиливается, а экспрессия белков, способствующих повышению уровня железа, наоборот, снижается. В частности, экспрессия ферритина увеличивается, а трансферринового рецептора 1 уменьшается. Таким образом, падение уровня Тф в крови в условиях окислительного стресса на первый взгляд представляется нецелесообразными и поэтому вызывает недоумение.

В условиях окислительного стресса железо-содержащие белки интенсивно разрушаются и подток ионов железа как внутри клеток, так и в физиологических жидкостях увеличивается. При этом в случае одновременного присутствия перекиси водорода и супероксид-радикала ионы железа катализируют реакции цикла Хабер-Вейса (рис.2, верхняя часть схемы) [3]. В этом цикле особенно опасна реакция Фентона (взаимодействие двухвалентного железа с перекисями), в которой

образуются высокоактивные гидроксил-радикалы, ответственные за необратимое окисление белков и липидов. Таким образом, ионы свободного железа усиливают окислительный стресс. Причем это усиление имеет место и внутри клеток, и снаружи. Значит, антиоксиданная система должна быть ориентирована таким образом, чтобы одновременно предотвращать железо-индуцированное окисление белков и липидов и внутри, и снаружи клетки. Во внеклеточных средах основная роль буфера по железу принадлежит Тф.

Тф связывает железо обратимо и с высоким сродством. Это его свойство позволяет Тф выполнять две его взаимосвязанные функции: (1) поддержание низкой (безопасной) концентрации свободного железа во внеклеточных жидкостях; (2) перенос железа между тканями организма. Снижение уровня Тф в крови должно неизбежно снизить эффективность обеих функций. Поэтому естественно было бы ожидать увеличения, а не снижения его концентрации по крайней мере пока у организма достаточно ресурсов для синтеза белков. Мы предполагаем, что уровень Тф в крови понижается вследствие подключения дополнительных регуляторных механизмов, цель которых – предотвратить негативные последствия высвобождения дополнительного количества ионов железа в условиях окислительного стресса.

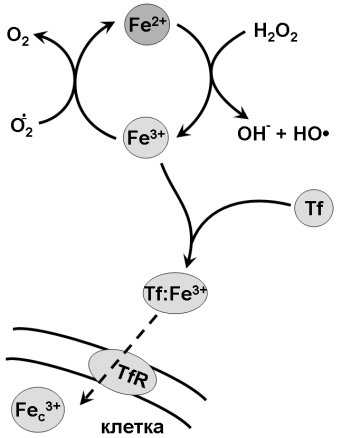


Рис.2. Тф противостоит Fe-зависимому образованию гидроксил-радикалов

Внутриклеточная регуляция большинства клеток при окислительном стрессе направлена на уменьшение потока железа внутрь клеток (подавление экспрессии TfR1) и на повышение железосеквестрирующей емкости клетки (активация экспрессии ферритина). Одновременно активируется (гепсидином) деградация ферропортина, белка, через который двухвалентное железо

высвобождается из клеток. В результате поток железа между клетками и тканями ослабляется, но зато его опасность как катализатора внутриклеточного железо-индуцированного окисления биополимеров ослабляется.

Поскольку наша задача – найти объяснение снижению Тф в плазме крови в условиях окислительного стресса – мы концентрируемся на механизмах захвата клетками железа и Тф.

Основной механизм накопления клетками железа – опосредованный ТфР1 эндоцитоз связанного с ним Тф (Тф:Fe и Тф:Fe_2). В условиях окислительного стресса экспрессия TfR1 подавляется (рис.3) посредством окислительно-восстановительной сигнализации – в ответ на повышение концентрации железа в клетке, на гипоксию (через фактор индуцированный гипоксией), на окислительный стресс, на медиаторы воспаления. Следовательно, со стороны большинства клеток организма не приходится ожидать серьезного участия в понижении уровня внеклеточного Тф при системных заболеваниях.

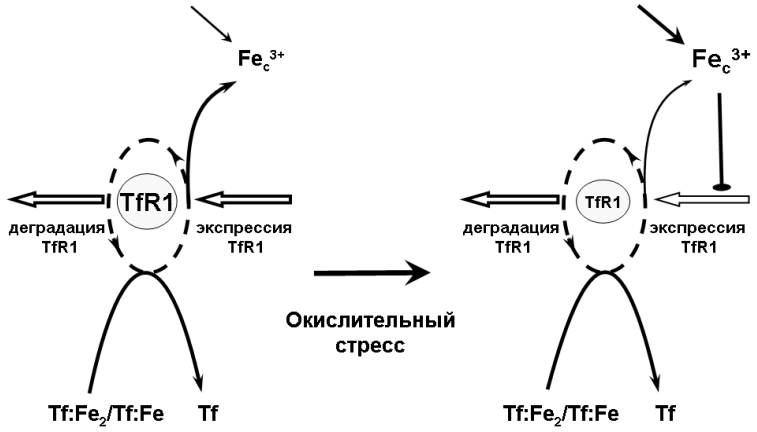


Рис.3. Механизм подавления экспрессии ТфР1 в условиях окислительного стресса.

Следовательно, механизм снижения уровня Тф в плазме крови следует искать в ТфР1-независимом захвате Тф. Поскольку в нашей экспериментальной модели рака период порогового снижения уровня трансферрина [2] совпадает с фазой развития опухоли, в которой порогово увеличивается РФК-генерирующая активность фагоцитов крови [1], искомый механизм захвата трансферрина должен активироваться развитием окислительного стресса, точнее, его последствиями. Для этой роли идеально подходит вторая изоформа трансферринового рецептора

(ТфР2), которая была впервые клонирована всего 10 лет назад [4]. Хотя механизмы регуляции и биохимические свойства ТфР2 исследуются интенсивно на клеточных линиях и отдельных популяциях клеток, его физиологическая роль и механизмы ее реализации достоверно пока не установлены. Мы предполагаем, что именно ТфР2 служит сенсором и преобразователем внешнего сигнала окислительного стресса, закодированного в значении насыщения трансферрина железом.

Суммируя результаты экспериментальных исследований по ТфР2 на разных типах клеток, мы предполагаем следующую последовательность преобразований в клетках, предназначенных для противостояния железо-индуцированному окислению биомолекул:

1. Активация неспецифического иммунитета – миграция, праймирование, активация и увеличение численности популяций фагоцитов в крови и тканях – повышает скорость выделения свободного (хелатированного, несвязанного с Тф) железа. Это повышение потока может до некоторых пор и не проявляться в повышении общей концентрации железа в плазме и концентрации свободного железа - пока суммарная активность ТфР1 и минимального базового количества ТфР2 компенсируют этот поток.

2. Со временем вызванное окислительным стрессом насыщение клеток железом подавляет экспрессию мРНК ТфР1 через сенсор внутриклеточного железа – железо-регулируемый белок. КоличествоТфР1 снижается и поток железа в клетки через этот рецептор уменьшается (рис.3). В итоге повышение уровня внеклеточного железа в комплексе с ослаблением его потока в клетки через ТфР1 приводит к повышению насыщения Тф железом с нормальных 10 в пределе до 100%.

3. Параллельно в процессе повышения уровня насыщения трансферрина железом, начинает активнее работать ТфР2, сродство которого к Тф:Fe_2 существенно выше, чем к другим состояниям Тф (Тф:Fe и апоТф). На этой стадии принципиально важно специфическое свойство ТфР2 – бифазная зависимость связывания Тф:Fe_2 клетками, которая выражается в том, что изотерма связывания Тф:Fe_2 с клетками при 37^{o}C не имеет насыщения в условиях стандартных экспериментов по связыванию и поэтому при высоких концентрациях Тф (>50нМ) наблюдается линейный рост Тф:Fe_2 связанного с клетками [5]. Эта линейная составляющая изотермы в действительности соответствует накоплению Тф во внутриклеточных везикулах [5].

4. Мы предполагаем, что накопление Тф в везикулах, принимающих участие в цикле эндоцитоза, осуществляется благодаря его обратимому связыванию с пока неустановленным мембранным Тф-связывающим белком или белковым комплексом, поскольку Тф, захваченный посредством ТфР2, не подвергается деградации в течение нескольких часов. Наиболее вероятным кандидатом на роль такого

Тф-связывающего комплекса представляется фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), Тф-связывающий фермент, который, как было показано на макрофагах и моноцитарных линиях, выполняет роль третьего ТфР в условиях пониженного содержания железа во внеклеточной среде [6].

5. Если наше предположение верно и GAPDH:Тф сопутствует ТфР2 в цикле эндоцитоза, то, благодаря ее более высокой локальной концентрации и более низкому сродству к Тф (120нМ), по сравнению с ТфР2 (25нМ), она может поддерживать в везикулах концентрацию Тф достаточную для полной занятости ТфР2. Это обстоятельство может объяснить экспериментально обнаруженный факт стабилизации ТфР2 за счет уменьшения скорости его деградации при высоких концентрациях Тф:Fe_2. Мы полагаем, что эта стабилизация обусловлена тем, что деградирует только свободная форма ТфР2, в то время как накопленный в везикулах Тф обеспечивает занятость рецепторов Тф. Этот механизм стабилизации ТфР2 – наша рабочая гипотеза (рис.4), которую предполагается проиллюстрировать с помощью математического моделирования.

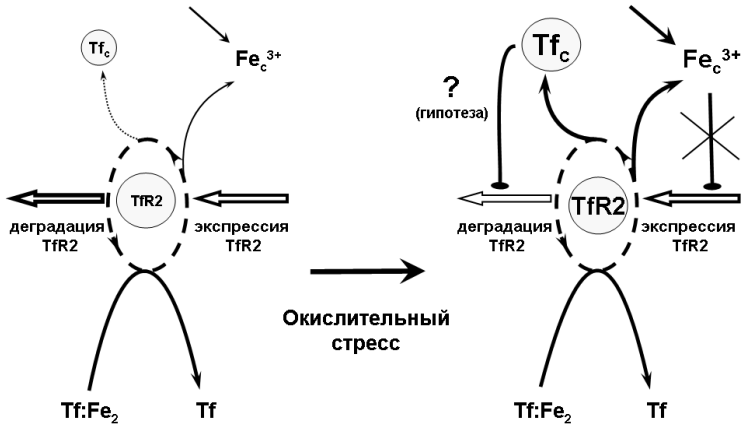


Рис.4. Механизм опосредованного ТфР2 накопления внутриклеточного Тф и гипотетический механизм стабилизации ТфР2 в условиях окислительного стресса.

6. Накопление Тф в клетках (а значит снижение его количества во внеклеточных жидкостях) одновременно служит дополнительным фактором, повышающим степень насыщения Тф железом, что приводит к дальнейшей активации цикла ТфР2 и его стабилизации.

Следует отметить, что роль ТфР2 не сводится только к функции сенсора на внеклеточное железо и его захвата при повышенном содержании железа (окислительный стрессе, воспаление или нарушения гомеостаза железа). В работах последних лет [7] показано, что именно через ТфР2 передается в клетку (гепатоцит) сигнал о необходимости экспрессии гепсидина, ключевого регуляторного белка, активирующего деградацию ферропортина. Возможно, и этим важность ТфР2 не ограничивается, но в любом случае ключевым моментом адаптации ТфР2-экспрессирующих клеток к окислительному стрессу является Тф-зависимая стабилизация ТфР2, гипотетический механизм которой мы в этой работе изложили.

Работа поддержана грантами аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» №2.1.1/6663 и №2.1.1/6872 а также грантом Рособразования по тематическому плану ЕЗН №1.4.08.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Поцелуева М. М. и др.* //Цитология (1999) 41(2): 162-6;
2. *Шаталин Ю.В.* //Кандидатская диссертация (2008);
3. *Kruszewski M.* //Mutation Res.(2003) 531: 81-92;
4. *Kawabata H. Et al.* //J. Biol. Chem. (1999) 274(30): 20826-32;
5. *Robb A.D., Ericsson M, Wessling-Resnick M.* //Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2004) 287(6): C1769-75;
6. *Raje C.I. et al.* //J. Biol. Chem. (2007) 282(5): 3252-61;
7. *Gao J. et al.* //Cell Metab. (2009) 9(3): 217-27.

ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70 НА АКТИВАЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭНДОТОКСИНА

Юринская М.М.[1], Винокуров М.Г.[1], Зацепина О.Г.[2], Гарбуз Д.Г.[2], Гужова И.В.[3], Рожкова Е.В.[2], Евгеньев М.Б.[2]

[1]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[2]Институт молекулярной биологии РАН, Москва
[3]Институт цитологии РАН, СПб

В механизме развития сепсиса и эндотоксинового шока, вызванного грамотрицательными бактериями, важную роль играют миелоидные клетки крови, участвующие в регуляции механизмов врожденного иммунитета. Активатором патологических процессов в

организме человека при сепсисе являются компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахариды (LPS, эндотоксины) [1]. В распознавании липополисахаридов участвуют специфические рецепторы клеток-мишеней, такие как CD14, β_2-интегрины (CD11/CD18), которые совместно с Toll-like рецептором и другими белками и рецепторами образуют рецепторный комплекс при активации клеток-мишеней эндотоксинами [2].

В патогенезе воспалительных заболеваний (в том числе и сепсиса) ключевая роль принадлежит нейтрофилам. LPS вызывают активацию нейтрофилов (увеличивают продукцию активных форм кислорода и экспрессию β_2-интегринов [3]) и увеличивают продолжительность жизни циркулирующих в кровяном русле этих клеток, ингибируя их апоптоз. Ингибирование апоптоза нейтрофилов является одной из причин неэффективного клиренса этих клеток из тканей и, вследствие этого, повреждения тканей при воспалении.

При воспалительных заболеваниях наблюдается увеличение экспрессии белков теплового шока (HSP). Эндотоксины увеличивают синтез и накопление HSP в различных миелоидных клетках, в частности HSP70, играющего важную роль в механизмах защиты клетки и организма в целом от теплового и других видов стресса [4]. В последнее время было показано, что экзогенный HSP70 млекопитающих оказывает защитное действие на клеточные культуры [5] и увеличивает выживаемость животных в модели эндотоксинового шока [6].

В работе исследовано действие экзогенного рекомбинантного белка теплового шока HSP70 на активацию и апоптоз нейтрофилов при действии эндотоксина *E. coli* (LPS).

Нейтрофилы выделяли из периферической крови здоровых доноров с помощью метода дифференциального центрифугирования на 2-х слойном градиенте фиколла-верографина (1,119 и 1,077). Жизнеспособность, экспрессию CD11b/CD18 рецепторов и апоптоз нейтрофилов определяли методом проточной цитофлуориметрии. Праймирование нейтрофилов и регистрацию активных форм кислорода проводили методом хемилюминесценции [7]. Ген рекомбинантного человеческого белка HSP70 был клонирован для дальнейшей экспрессии под полиэдриновым промотором в бакмиду, как описано в [8]. Рекомбинантный белок, экспрессированный в клетках шелкопряда (Spodoptera), очищали на Ni-NTA колонках согласно рекомендациям производителя (QUIAGEN, Ni-NTA Superflow BioRobot Hand Book).

В первой серии экспериментов проанализировали действие рекомбинантного (HSP70) белка теплового шока на продукцию активных форм кислорода (АФК), генерируемых нейтрофилами в ответ на действие 1мкМ N-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (fMLP) (рис.1). Инкубирование нейтрофилов с LPS (30мин) значительно увеличивало

величину хемилюминесценции клеток по сравнению с контролем (рис.1,*1*). HSP70 несколько увеличивал продукцию АФК нейтрофилами (рис.1,*2а*) по сравнению с контрольными нейтрофилами (рис.1,*1а*). Значения ХЛ нейтрофилов в присутствии HSP70 и полимиксина В практически не отличались от ХЛ контрольных клеток (рис.1). Предварительное инкубирование нейтрофилов в течение 5мин с HSP70 (перед добавлением LPS) значительно снижало величину ХЛ клеток по сравнению с активацией в присутствии только LPS (рис.1,*2б*).

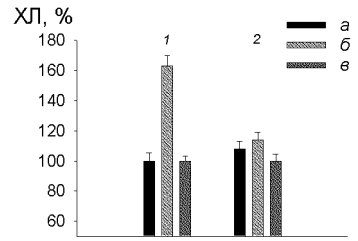


Рис.1. Действие HSP70 на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами. 1-контрольные клетки; 2-HSP70 (1мкг/мл). а – без LPS, б – в присутствии LPS (20нг/мл); в - в присутствии полимиксина В (20мкг/мл).

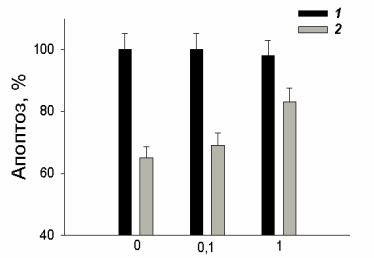


Рис.2. Действие HSP70 на апоптоз нейтрофилов в отсутствии (1) и присутствии (2) LPS. По оси абсцисс – концентрация HSP70 (мкг/мл). Апоптоз контрольных клеток принят за 100%.

Во второй серии экспериментов было исследовано действие HSP70 на экспрессию CD11b/CD18 рецепторов нейтрофилов при действии эндотоксинов. Сам по себе HSP70 лишь незначительно увеличивал экспрессию исследованных рецепторов. Предварительное инкубирование нейтрофилов с 1мкг/мл HSP70 в течение 5мин несколько снижало эндотоксин-индуцированное увеличение экспрессии CD11b/CD18 рецепторов нейтрофилов.

В третьей серии экспериментов было исследовано действие HSP70 на апоптоз нейтрофилов в присутствии эндотоксина. Показали, что LPS в концентрации 100нг/мл ингибировал апоптоз контрольных нейтрофилов (принят за 100%) на 35%, что хорошо согласуется с данными работы [7]. HSP70 в концентрации 1мкг/мл незначительно ингибировал апоптоз нейтрофилов (рис.2). Предварительное инкубирование нейтрофилов с HSP70 (в концентрации 0,1 и 1мкг/мл) оказывало достоверный защитный эффект на эндотоксин-индуцированное ингибирование апоптоза нейтрофилов (рис.2).

Ключевым механизмом активации клеток-мишеней при действии эндотоксинов является достаточно быстрое взаимодействие последних со специфическими рецепторами этих клеток. Анализ кинетики защитного действия HSP70 на образование АФК нейтрофилами при воздействии LPS по регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции показал, что максимальное ингибирование эндотоксин-индуцированной активации происходит через 4-5мин после введения HSP70. Неполное ингибирование эндотоксин-индуцированной активации нейтрофилов исследованным HSP70 может быть связано с наличием примесей LPS в препарате рекомбинантного белка, т.к. под действием полимиксина В (антибиотика, связывающего LPS) происходит снижение ХЛ нейтрофилов до значений контрольных клеток (рис.1, *1в, 2в, 3в*).

При действии эндотоксинов происходит увеличение экспрессии β_2-интегриновых CD11b/CD18 рецепторов [3]. Эти рецепторы содержат специфическую область связывания LPS [9]. Предполагается, что эти рецепторы, как и CD14 рецепторы, осуществляют передачу эндотоксинов от LPS-связывающего белка к Toll-like-подобным рецепторам клеток-мишеней [10]. Исследование взаимодействия различных HSP с CD11b рецепторами показало, что эти рецепторы связывают и HSP70 [11]. После связывания HSP с рецепторами происходит их интернализация в клетку. Также происходит интернализация и молекул LPS, связанных с рецепторным комплексом эндотоксинов.

Именно эти процессы, по-видимому, обуславливают неполное ингибирование эндотоксин-индуцированной экспрессии CD11b рецепторов при действии исследованных экзогенных HSP70. Большая эффективность защиты исследованным препаратом HSP70 нейтрофилов от действия LPS на продукцию АФК, по-видимому, обусловлена тем, что регистрируется суммарная продукция АФК (снаружи и внутри клеток).

Снижение LPS-индуцированной продукции АФК при действии HSP70 и некоторое снижение экспрессии рецепторов адгезии может указывать на взаимодействие исследованных белков с рецепторами эндотоксинов. В пользу этого предположения свидетельствуют данные по увеличению экспрессии HSP70 и TlR4 в липидных микродоменах миелоидных клеток при действии эндотоксинов [12]. При сепсисе наблюдается увеличение экспрессии различных белков теплового шока, в том числе и HSP70 [13].

Ингибирование апоптоза нейтрофилов под действием эндотоксинов происходит вследствие взаимодействия различных сигнальных путей регуляции апоптоза этих клеток с сигнальными путями от рецепторов эндотоксинов [14].

Таким образом, в заключение можно отметить, что рекомбинантный белок теплового шока HSP70 значительно уменьшает эндотоксин-индуцированное увеличение продукции активных форм кислорода и ингибирование апоптоза нейтрофилов человека. Полученные результаты позволяют предположить, что защитное действие исследованных белков, вероятно, реализуется на уровне сборки мембранного рецепторного комплекса нейтрофилов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rietschel E.T.* //FASEB J. (1994) 8: 217-25;
2. *Leon C.G., Tory R., Jia O.* //Pharmaceutical Res. (2008) 25(8): 1751-61;
3. *Detmers P.A., Zhou D., Polizzi E.* //J. Immunol. (1998) 161(4): 1921-9;
4. *Tsan M.F., Gao B.* //Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2004) 286(4): 739-44;
5. *Guzhova I.V., Arnholdt A.C., Darieva Z.A.* //Cell Stress Chaperones (1998) 3(1): 67-77;
6. *Kustanova G.A., Murashev A.N., Karpov V.L.* //Cell Stress Chaperones (2006) 11(3): 276-86;
7. *Винокуров М.Г. и др* //Бюлл. Эксп. Биол. Мед. (2006) 147(8): 136-8;
8. *Luckow V.A. et al.* //J. Virol. (1993) 67(43): 44695-703;
9. *Wright S.D. et al.* //J. Exp. Med. (1989) 169: 175-83;
10. *Ingalls R.R., Monks B.G., Jr R.S.* //J. Immunol. (1998) 161: 5413-20;
11. *Binder R.J. et al.* //J. Immunol. (2000) 165: 2582-7;
12. *Cuschieri J., Billigren J., Maier R.V.* //J. Leul. Biol. (2006) 80(6): 1289-97;
13. *Hashiguchi N. et al.* //J. Trauma (2001) 51(6): 1104-9;
14. *Anwar S., Whyte M.K.* //Exp. Lung Res. (2007) 33(10): 519-28.

***

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА Ca^{2+} И МЕТАБОЛИЗМА АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА.

Каймачников Н.П.[1,2], Маркевич Н.И.[2]

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

Митохондрии участвуют в формировании ответов цитозольного Ca^{2+} на различные внеклеточные сигналы тем, что они поглощают часть Ca^{2+}, поступающего в цитозол из эндоплазматического ретикулума и из внеклеточной среды, а на спаде ответа выделяют его в цитозоль, то есть играют роль буфера. Поглощаемый Ca^{2+} регулирует ряд митохондриальных процессов, и его избыточное накопление может приводить к гибели клетки в результате апоптоза, который зависит от открывания большой поры во внутренней митохондриальной мембране (permeability transition pore или PTP). Эта пора активируется несколькими факторами, к числу которых относятся матриксный Ca^{2+}, деполяризация мембраны и активные формы кислорода (АФК или reactive oxygen species, ROS), генерируемые дыхательной цепочкой митохондрий [1]. Так как Ca^{2+} активирует производство NADH дегидрогеназами цикла Кребса и может в нескольких местах регулировать дыхательную цепочку, а АФК-открываемая PTP проводит Ca^{2+}, то возникает сложная система взаимодействия Ca^{2+} с АФК, котораяе требует применения модельного подхода. Ранее были предложены детальные модели митохондриального транспорта ионов [2] и окислительного фосфорилирования [3], но их взаимодействие не рассматривалось.

В настоящей работе разработана математическая модель, учитывающая два компартмента: митохондриальный матрикс и межмембранное пространство (ММП). В модели внешний Ca^{2+} поступает в ММП, откуда поглощается в матрикс через унипортер, и матриксный Ca^{2+} (Ca^{2+}_m) удаляется через Ca^{2+}/H^+-обменник, доминирующий в клетках печени. Уравнение скорости унипортера учитывает его классическую кинетику по Ca^{2+} с коэффициентом Хилла равным 2, измерявшуюся на изолированных митохондриях, а также увеличение скорости с ростом трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi$) вследствие увеличения проводимости канала и электрогенности транспорта Ca^{2+}. Для константы полуактивации унипортера принято относительно низкое значение

0.5мкМ, которое позволяет более адекватно описать данные по динамике ответа [Ca^{2+}_m] на стимуляцию рецепторов [4]. Транспорт электронов и транслокация H^+ комплексами I, III и IV (C1, C3, C4) описаны уравнениями из работы [3]. Принято, что C1 образует матриксные АФК пропорционально концентрации NADH, а комплекс C3 производит АФК в ММП пропорционально потоку через этот комплекс. Матриксные АФК частично деактивируютя и частично выходят в ММП, где также происходит их инактивация и выход во внешнюю среду через вольт-зависимый анионный канал. Инактивация частично обеспечивается взаимодействием АФК в ММП с окисленной диссоциированной формой цитохрома с (CytC), которая переводится при этом в восстановленную форму. Для PTP учитывается активация посредством Ca^{2+}_m, АФК и деполяризацией, переводящее ее в состояние низкой проводимости, в котором PTP проницаема для Ca^{2+} и H^+. На основании литературных данных, в модели ионы Ca^{2+} (помимо достаточно хорошо известной активации восстановления $NAD^+ \rightarrow NADH$), ингибируют C1 и C4, способствуют диссоциации комплекса CytC с кардиолипином митохондриальной мембраны и активируют F_1F_0-АТРазу. Модель имеет вид 11 дифференциальных уравнений, описывающих поведение во времени: 1) [Ca^{2+}] в ММП, 2) [Ca^{2+}_m], 3) [NADH], 4) концентрации восстановленного QH_2, 5) концентрации восстановленного CytC в комплексе с кардиолипином, 6) концентрации восстановленного CytC в ММП, 7) концентрации окисленного CytC в ММП, 8) [АФК] в матриксе, 9) [АФК] в ММП, 10) доли открытых каналов PTP, 11) $\Delta\Psi$. В последнее уравнение помимо токов, создаваемых упомянутыми выше транспортными процессами, включены также ток утечки и анионный ток. Значения pH в матриксе и в ММП считались фиксированными.

Численный анализ поведения переменных модели в зависимости от концентрации внешнего Ca^{2+} (в цитоплазме или в инкубационной среде) для случая стационарного состояния показывает, что модель хорошо объясняет литературные экспериментальные данные [5] по генерации АФК в митохондриях в присутствии сукцината как источника электронов для дыхательной цепи. В частности, модель демонстрирует уменьшение АФК при увеличении внешнего Ca^{2+} в отсутствие каких-либо ингибиторов дыхательной цепи (рис.1). Как видно из рис.1, ингибирующее действие Ca^{2+} на АФК связано с ингибированием скорости производства АФК комплексом I (рис.1B). Механизм этого ингибирования можно объяснить следующим образом. Образование АФК в комплексе I пропорционально концентрации восстановленных пиридиновых и флавиновых нуклеотидов, восстановление которых происходит за счет хорошо известного механизма обратного переноса электронов, который очень чувствителен к изменениям мембранного потенциала. Как видно из рис.1A, увеличение Ca^{2+} приводит к

деполяризации мембраны и, как следствие, к падению скорости образования АФК комплексом I. Интересно, что при этом скорость образования АФК комплексом III немного увеличивается (рис.1B), но сильное падение скорости образования АФК комплексом I обеспечивает общее падение скорости образования АФК в митохондриях.

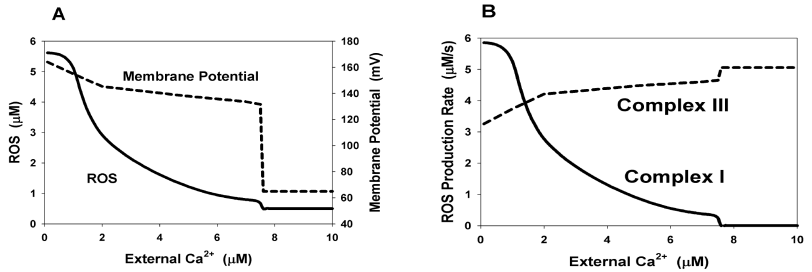


Рис.1. Внешний Ca^{2+} ингибирует образование АФК в митохондриях в присутствии сукцината без NAD-восстанавливающих субстратов. A. Зависимость стационарной концентрации АФК и мембранного потенциала от внешнего Ca^{2+}. B. Зависимость стационарных скоростей генерации АФК комплексами I и III.

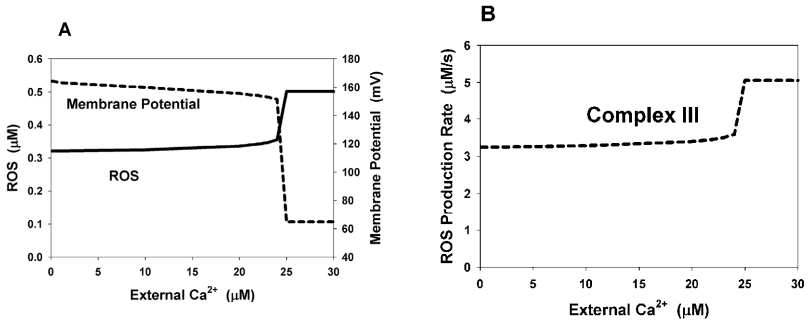


Рис.2. Внешний Ca^{2+} активирует образование АФК в митохондриях в присутствии сукцината при ингибировании комплекса I. A. Зависимость стационарной концентрации АФК и мембранного потенциала от внешнего Ca^{2+}. B. Зависимость стационарной скорости генерации АФК комплексом III.

Влияние Ca^{2+} на образование АФК в присутствии сукцината изменяется с ингибирующего на активирующее в условиях ингибировния комплекса I, то есть ингибирования обратного переноса электронов (рис.2). Как видно из рис.2A, стационарная концентрация АФК увеличивается при увеличении концентрации внешнего Ca^{2+}, хотя при этом по-прежнему происходит деполяризация мембраны. Это связано с тем, что отсутствует генерация АФК комплексом I, а скорость

образования АФК комплексом III растет с увеличением концентрации внешнего Ca^{2+}, то есть при деполяризации мембраны (рис.2B). Особо стоит отметить сильное, на 80-100мВ, скачкообразное уменьшение мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий при увеличении внешнего Ca^{2+}. Это связано с сильным автокаталитическим процессом открывания PTP, которая активируется при деполяризации мембраны, вызывая большой выходящий поток анионов из матрикса, что приводит к дальнейшей деполяризации мембраны, большему открыванию PTP и дальнейшему увеличению потока анионов.

Модель также исследовалась в нестационарном режиме при воздействии кратковременных импульсов внешнего Ca^{2+}. Установлено, что типичные максимальные значения $[Ca^{2+}_m]$ не менее 1мкМ достигаются при амплитуде внешних импульсов 10мкМ и выше. Это может реализовываться *in vivo* за счет близкого прилегания митохондрий к эндоплазматическому ретикулуму или к плазматической мембране, откуда Ca^{2+} поступает в микрообласть и достигает высокой концентрации с последующей быстрой (за несколько секунд) диссипацией градиента.

Работа поддерживалась грантом NIH K25 AA016604.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gunter T.E., Sheu S.-S.* //Biochim. Biophys. Acta (2009);
2. *Pohilko A.V., Ataullakhanov F.I., Holmuhamedov E.L.* //J. Theor. Biol. (2006) 243: 152-69;
3. *Beard D.A.* //PloS Comput. Biol. (2005) 1(4): E36;
4. *Черных А.М. и др.* //Биофизика (2004) 49(3): 511-8;
5. *Komary Z., Tretter L., Adam-Vizi V.* //BBA (2008) 1777: 800-7.

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ НАДН ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ В ИНТАКТНЫХ И ПЕРМЕАБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТКАХ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Круглов А.Г.[1,2], Соловьева М.Е.[1], Никифорова А.Б.[1,2], Кудрявцев А.А.[1,2], Лавровская В.П.[1,2], Теплова В.В.[1]

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

В последние годы появляется все больше работ, свидетельствующих о важной роли различных НАДН и НАДФН оксидоредуктаз во внутриклеточной сигнализации, включающей

активацию/инактивацию гормонов, генерацию активных форм кислорода (АФК), изменение редокс статуса клеток с последующей активацией редокс-зависимых факторов транскрипции [1-4]. НАД(Р)Н оксидоредуктазы внешней мембраны митохондрий (ОММ) представляют особую группу ферментов, расположенных в непосредственной близости от белков-компонентов неспецифической митохондриальной поры (mPTP) и способных к мощной генерации АФК в присутствии некоторых физиологических или искусственных акцепторов [5-7]. Ранее мы установили, что НАДН оксидоредуктаза ОММ способна быстро восстанавливать и активировать некоторые катионные акцепторы, что приводит к немедленному открыванию mPTP, малочувствительному к действию классических антагонистов поры [6,7]. Однако, физиологическая роль НАД(Р)Н оксидоредуктаз ОММ, и даже их природа не являются окончательно установленными [8-10]. Этому есть несколько причин. Во-первых, из-за отсутствия специфических антител и селективных ингибиторов не было предложено методов специфической оценки активности указанных систем в целой клетке. Во-вторых, при выделении митохондрий из клеток и тканей часто происходит нарушение целостности митохондриальных мембран, что при взаимном загрязнении фракций приводит к появлению неспецифической НАДН оксидоредуктазной активности и неверной интерпретации результатов [10]. В настоящей работе мы предлагаем и теоретически и экспериментально обосновываем метод полуколичественной оценки активности НАДН оксидоредуктазы внешней мембраны митохондрий интактных и пермеабилизованных клеток. Метод основан на цитометрической регистрации диметилбиакридена (ДБА), флуоресцентного продукта двухэлектронного восстановления люцигенина (Люц), и использует структурную особенность митохондриальной организации: близость сайтов одноэлектронного восстановления Люц (НАДН оксидоредуктаза ОММ) и сайтов последующего окисления катион-радикала (цитохром с оксидаза).

Методы. Митохондрий печени крыс (RLM) выделяли методом дифференциального центрифугирования [11]. При выделении отбирали аликвоты из препаратов печеночного гомогената, грубой цитозольной фракции, грубой микросомальной фракции, грубой митохондриальной фракции и RLM отмытых 1-3 раза (RLM_{1-3}). Концентрацию белка измеряли с использованием биуретового метода [12]. Среда измерения включала (мМ): 125 KCl, 20 маннитол, 10 HEPES, 2 KH_2PO_4, 5 глутамат и 5 малат (pH 7.35, 30^{o}C). Двухэлектронное восстановление Люц до ДБА регистрировали спектрофотометрически, по снижению абсорбции при 368нм (Uvikon 923 (Kontron Instruments, USA)), и флуориметрически, Ex. 488нм, Ем. 513нм, (Cary Eclipse (Varian Australia Ply LTD, Australia). Локализация сайтов флуоресценции ДБА и MitoTracker Red

осуществлялась с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Germany), с использованием следующих полос возбуждения (лазеры) и эмиссии: 543 и 560-664нм (MTR), 488 и 500-540нм (ДБА), 405 и 415-480нм (Люц). Протокол для цитометрического исследования активности НАДН оксидоредуктазы ОММ в пермеабилизованных клетках включал следующие этапы. 1) Клетки отмывали средой инкубации RLM, содержащей 1мМ EGTA, считали и добавляли в пробирки (20000-200000клеток/образец), содержащие 0.0005-0.004% (конечная концентрация) дигитонин (1), а также 100мкМ Люц (2); Люц, антимицин А (Ant A) (0.5мкг/мл) и 1мМ NaCN (3), Люц, Ant A и 250мкМ НАДН (4); Люц, Ant A, НАДН и NaCN (5 и 6). Образцы инкубировали 20 (1-5) и 40мин (6) с постоянным покачиванием. 3) Клетки отмывали 2 раза средой инкубации RLM. 4) Накопление ДБА оценивали с использованием проточного цитометра PAS III (Partec, Germany) (Ex. 488нм (аргоновый лазер), Ем. 520-560нм (FL1)).

Результаты и обсуждение. На рис.1А (кривая 2) показано, что добавление цианида к RLM, инкубируемым в стандартной среде, содержащей Ant A (1мкг/мл), 250мкМ НАДН и 100мкМ Люц, приводило к резкому ускорению снижения концентрации Люц (A_{368}) в среде [13]. Анализ спектров флуоресценции (возбуждения и эмиссии) митохондриальных суспензий, инкубировавшихся в течении 30мин в данных условиях (рис.1В) показал, что интенсивность флуоресценции (500-560нм) при возбуждении при 430 и 488нм возрастала в ~ 4-5 и 50 раз, соответственно (кривые 2, 2а и 3, 3а). Максимум эмиссии смещался с ~505нм к 511-513нм. В спектре возбуждения (кривая 1а) (эмиссия 520нм) появлялось интенсивное плечо при длине волны>480нм. Эти изменения свидетельствуют о накоплении в митохондриальной суспензии продукта двухэлектронного восстановления Люц-ДБА [14,15].

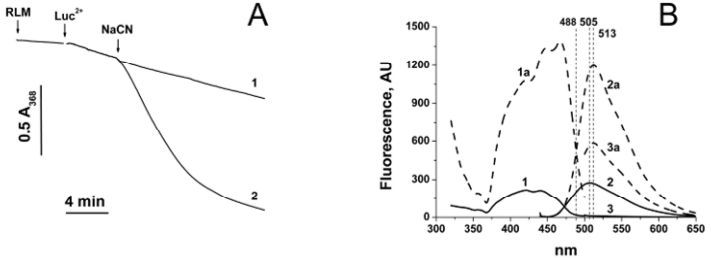


Рис.1. Снижение концентрации люцигенина (А) и накопление ДБА (В) в суспензии RLM, вызванное добавлением 1мМ NaCN. А – RLM (0.5мг/мл) инкубировали, как описано в тексте. Где указано, добавлен Люц (Luc^{2+}) и NaCN (кривая 2). В. Спектры возбуждения (1, 1а) и эмиссии (2, 2а и 3, 3а) митохондриальных суспензий сразу после добавления цианида (1-3) и через 30мин инкубации (1а-3а).

В таблице 1 представлены данные по накоплению ДБА в различных препаратах митохондрий (гомогенат (Homo), грубая цитозольная фракция ($Super_1$), грубая микросомальная фракция ($Super_2$), грубая митохондриальная фракция (RLM_0) и RLM отмытых 1 и 3 раза ($RLM_{1,3}$)) в присутствие или отсутствие НАДН и ингибиторов дыхательной цепи. Как видно из данных таблицы, в отсутствие НАДН, накопление ДБА в суспензиях, содержащих дышащие RLM (Luc) и RLM с блокированной дыхательной цепью (Luc+AntA+NaCN) было минимальным во всех препаратах. НАДН-зависимое накопление ДБА в микросомальной фракции в присутствии одного Ant A и Ant A в комбинации с NaCN было практически одинаковым. Во фракциях RLM накопление ДБА в присутствие обоих ингибиторов было существенно выше, чем в присутствие одного Ant A, и доля Ant A-зависимого накопления снижалась с повышением чистоты митохондриального препарата. В RLM_3, содержащих лишь незначительное количество микросом, она составляло около 10% от накопления в присутствии обоих ингибиторов. Пересчет накопления ДБА на количество белка во фракции показал, что митохондрии вносят основной вклад в двухэлектронное восстановление Люц. Полученные данные показывают, что цианид достаточно специфично активирует продукцию ДБА НАДН оксидоредуктазой ОММ, но не другими оксидоредуктазами. Механизм активации, по-видимому, связан с блокированием одноэлектронного окисления катион-радикала Люц цитохром *c* оксидазой [16].

Табл.1. Накопление ДБА в препаратах митохондрий в различных условиях инкубации.

Условия инкубации	[a]Относительна скорость накопления ДБА, % (УЕ/мг белка/ч)					
	Homo	$Super_1$	$Super_2$	RLM_0	RLM_1	RLM_3
Luc	0.62±0.91	0.56±0.25	1.16±3.6	0.67±0.32	1.84±1.56	0.64±0.15
+AntA+NaCN	ND	0.4±0.08	ND	ND	ND	0.7±0.12
+AntA+NADH	29.4±6.0	22.0±7.3	102±17	44±12.5	29.3±4.8	11.6±0.7
+AntA+NaCN +NADH	100 (317±5)	100 (178±2)	100 (30.6±8)	100 (730±74)	100 (751±65)	100 (789±45)
[b]Накопление ДБА в препарате	297473± 53489	93279± 12087	12705± 3488	74825± 7585	61732± 5343	56729± 3236

УЕ-условные единицы флуоресценции; [a]-относительный прирост флуоресценции ДБА. 100% увеличение флуоресценции соответствует числу УЕ/мг белка/ч в скобках; [b]-общее накопление ДБА в препарате (УЕ/ч).

Исследования локализации сайтов накопления ДБА в клетках HEp-2 с помощью конфокального микроскопа показало, что сайты флуоресценции ДБА и MitoTracker Red, совпадают, т.е. находятся в митохондриях (не показано).

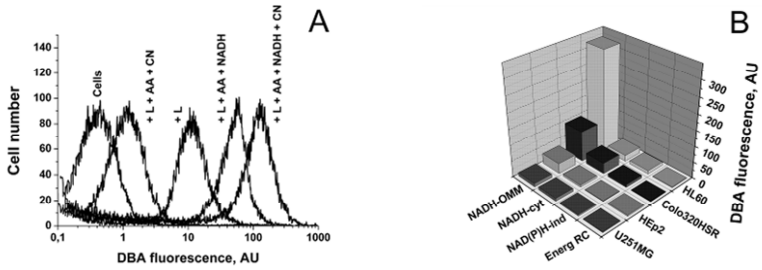


Рис.2. Стандартные кривые распределения клеток HEp-2 по флуоресценции ДБА (A) и паттерны люцигенин редуктазной активности (2ē) клеточных оксидоредуктаз в различных клеточных линиях (B). A. Где указано, образцы инкубировали с люцигенином (+L), Ant A (AA), NADH, и NaCN (CN). B. Люцигенин редуктазна активность дыхательной цепи (Energ RC), НАДН-независимых цитозольных ферментов (NADH-ind), микросомальных и цитозольных НАДН оксидоредуктаз (NADHcyt) и НАДН оксидоредуктаз ОММ (NADH-OMM) оценивали, как описано в тексте. Представленные данные есть средние±стандартная ошибка трех независимых экспериментов ($n \geq 3$).

Использование протокола описанного в «Методах» позволяет разделить вклад НАДН оксидоредуктаз ОММ и других клеточных систем в двухэлектронное восстановление Люц в интактных и пермеабилизованных клетках. На рис.2А приведены стандартные кривые распределения пермеабилизованных клеток HEp-2 по интенсивности флуоресценции ДБА. На рис.2Б показаны стандартные паттерны Люц редуктазной активности различных оксидоредуктаз в клетках линий HL 60, Colo 320 HSR, HEp-2 и U251 MG. Расчет активности проводили по медианам распределения клеток. Логично утверждать, что количество ДБА, произведенного НАДН оксидоредуктазой ОММ является разностью общего накопленного ДБА (Luc+AntA+CN+NADH) и ДБА произведенного микросомальными и цитозольными оксидоредуктазами (Luc+AntA+NADH). Продукция ДБА в отсутствие НАДН отражает активность дыхательной цепи RLM с высоким $\Delta\Psi_m$ (Luc) или активность цитозольных НАДН-независимых систем (Luc+AntA+CN). Полученные паттерны могут быть использованы для исследования роли НАДН оксидоредуктазы ОММ в различных физиологических и патологических процессах, а также для оценки вклада этой системы в цитотоксический эффект некоторых ксенобиотиков.

Работа поддержана грантом РФФИ №08-04-01240-а

ЛИТЕРАТУРА

1. *Penning T.M., Byrns M.C.* //Ann. NY Acad. Sci. (2009) 1155: 33-42;
2. *Brandes R.P., Schröder K.* //Curr. Opin. Lipidol. (2008) 19: 513-8;
3. *Dworakowski R. et al.* //Biochem. Soc. Trans. (2006) 34: 960-4;
4. *Ogier-Denis E., Mkaddem S.B., Vandewalle A.* //Semin. Immunopathol. (2008) 30: 291-300;
5. *Moreno S.N., Mason R.P., Docampo R.* //J. Biol. Chem. (1984) 259: 6298-305;
6. *Kruglov A.G., Teplova V.V., Saris N.-E.L.* //Biochem. Pharmacol. (2007) 74: 545-56;
7. *Kruglov A.G., Subbotina K.B., Saris N.-E.L.* //Free Rad. Biol. Med. (2008) 44: 646-56;
8. *Shimada H .et al.* // Arch. Biochem. Biophys. (1998) 351: 75-81;
9. *Nohl H.* //Biochem. Pharmacol. (1988) 37: 2633-7;
10. *Fraisse L., Rey E., Rigoulet M.* //Biochim. Biophys. Acta (1993) 1143: 190-8;
11. *Johnson D., Lardy H.A.* //Meth. Enzymol. (1967) 10: 94-6;
12. *Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M.* //J. Biol. Chem. (1949) 177: 751-66;
13. *Liochev S.I., Fridovich I.* //Arch. Biochem. Biophys. (1997) 337: 115-20;
14. *Legg K.D., Hercules D.M.* //J. Am. Chem. Soc. (1969) 91: 1902-7;
15. *Totter J.R.* //Photochem. Photobiol. (1964) 3: 231-41;
16. *Afanas'ev I.B., Ostrachovitch E.A., Korkina L.G.* //Arch. Biochem. Biophys. (1999) 366: 267-74.

С12-TPP – МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЙ РАЗОБЩИТЕЛЬ

Маркова О.В., Кнорре Д.А., Смирнова Е.А., Северин Ф.Ф.

НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Митохондрии являются основными источниками активных форм кислорода (АФК) [1]. В.П Скулачевым была выдвинута гипотеза о специальном механизме «мягкого» разобщения, которое достигается путем ограниченного повышения протонной проводимости внутренней митохондриальной мембраны. В соответствии с этой гипотезой, когда потребление кислорода по пути фосфорилирующего дыхания тормозится из-за исчерпания АДФ и накопления АТФ, происходит увеличение внутриклеточной концентрации O_2 и накопление восстановленных переносчиков дыхательной цепи, которые взаимодействуют с кислородом с образованием супероксид-радикала. В данных условиях разобщение ускоряет потребление O_2 и тормозит генерацию АФК [2].

Цель работы состояла в поиске вещества, которое накапливалось бы в митохондриях клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и могло бы вызывать «мягкое» разобщение и тем самым тормозить образование АФК. Известно, что проникающий анион тетрафенилфосфоний (TPP) накапливается в митохондриях [3]. Недавно было показано, что производные тетрафенилфосфония обладают протонофорным эффектом на бислойной мембране.

Мы предположили, что производное TPP – додецилтрифенилфосфоний (C12-TPP) может быть одновременно «мягким» и митохондриально-направленным разобщителем. В настоящей работе показано, что сильный разобщитель FCCP является протонофором как для мембраны митохондрий, так и для плазматической мембраны, а C12-TPP только для митохондриальной мембраны.

Дрожжи выращивали на богатой питательной среде, содержащей 2% рафинозу. Клетки использовали в экспоненциальной фазе роста. Дыхание дрожжевых клеток регистрировали полярографическим методом с помощью кислородного электрода типа Кларка. Среда инкубации содержала 50мМ KH_2PO_4, pH 5.5, субстрат – 0.005% глюкоза. Для того, чтобы действие выбранных веществ на дыхание клеток было более выраженным, часть опытов проводили в присутствии амиодарона, так как нами было показано [4], что амиодарон увеличивает стимуляцию дыхания дрожжевых клеток разобщителем FCCP.

Мы показали, что если к клеткам дрожжей добавить ацетат и снизить pH среды инкубации, то наблюдается снижение скорости дыхания (рис.1).

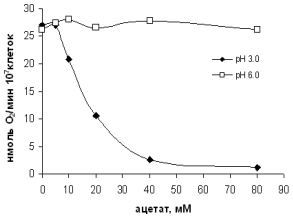


Рис.1. Зависимость скорости дыхания клеток *Saccharomyces cerevisiae* от концентрации ацетата при pH 6.0 и 3.0.

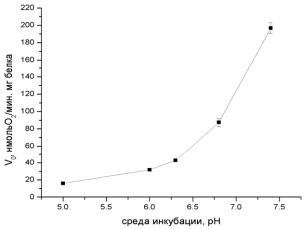


Рис.2. Зависимость скорости дыхания митохондрий, изолированных из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, от pH среды инкубации

Такой же эффект можно получить, если к дышащим клеткам добавить нигерицин. Мы предполагаем, что в обоих случаях снижение скорости дыхания целых клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обусловлено снижением pH цитоплазмы. Чтобы подтвердить это, мы показали, что дыхание изолированных митохондрий будет замедляться по мере закисления среды инкубации митохондрий (рис.2).

На рис.3А показана зависимость скорости дыхания дрожжей от концентрации FCCP при разных значениях pH. При pH=5,5 зависимость достигает насыщения при концентрации разобщителя равной 1мкМ и остается таковой при дальнейшем увеличени концентрации FCCP (кривая 1). При pH 3.5 и 3.0 скорость дыхания снижается при увеличении концентрации FCCP (кривые 2 и 3). Мы полагаем, что при низких pH среды инкубации перенос протонов через плазматическую мембрану приводит к закислению цитоплазмы и, как следствие, ингибированию дыхания.

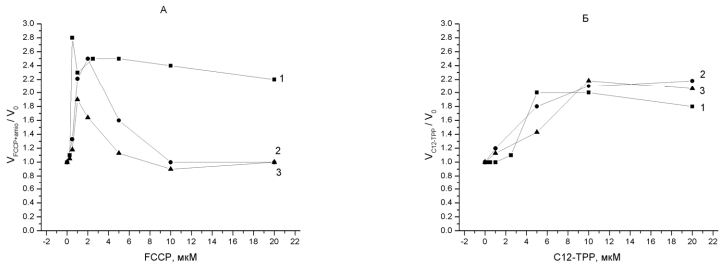


Рис.3 Зависимость скорости дыхания клеток *Saccharomyces cerevisiae* от концетрации FCCP (а) и C12-TPP (б) при различных значениях pH: 5.5 (1), 3.5 (2), 3.0 (3).

На рис.3Б видно, что скорость дыхания дрожжей в присутствии C12-TPP не зависит от pH среды инкубации. Мы полагаем, что это связано с тем, что C12-TPP повышает протонную проводимость исключительно мембраны митохондрий.

Таким образом, мы полагаем, что для клеток дрожжей C12-TPP является митохондриально-направленным разобщителем и может быть использован для предотвращения генерации АФК.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Murphy M.P.* //Biochem. J. (2009) 417(1): 1-13;
2. *Korshunov S.S. et al* //FEBS Lett. (1997) 416: 15-8;
3. *Skulachev V.P. et al*. //Nature (1967) 216: 718-9;
4. *Pozniakovsky A.I. et al*. //J. Cell. Biol. (2005) 168: 257-69.

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА К ГИПОКСИИ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ АКТИВАЦИЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АТФ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА

Миронова Г.Д.[1,2], Шигаева М.И.[1,2], Гриценко Е.Н.[1], Недорубов А.А.[3] Белослудцев К.Н.[1], Мурзаева С.В.[1], Лукьянова Л.Д.[4]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Пущинский государственный университет
[3]Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского
[4]Институт общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

Ишемическая болезнь сердца, провоцируемая гипоксическим состоянием тканей, в настоящее время является широко распространенным заболеванием. Установлено, что активаторы митохондриального и цитоплазматического АТФ-зависимых калиевых каналов (митоК$_{АТФ}$ и цитоК$_{АТФ}$), обладают выраженными кардиопротекторными свойствами [1]. Однако именно митохондриальный канал большинством исследователей считается конечным эффектором данного процесса [2].

Ранее нами был обнаружен природный активатор митоК$_{АТФ}$ -УДФ [3] и показано, что его метаболические предшественники, введенные в кровь, обладают выраженными антиаритмическими и антиишемическими свойствами, а ингибиторы каналов, модулируют эти свойства [4]. Несмотря на то, что сам факт участия этих каналов в защите сердца при ишемии не вызывает сомнения, механизм этого защитного действия до сих пор не ясен. В работе была поставлена задача, изучить функционирование систем транспорта калия и дыхание митохондрий, полученных из органов крыс с различной. резистентностью к гипоксии, а также скорость образования H_2O_2 в митохондриях этих животных в зависимости от степени функционирования митоК$_{АТФ}$. Предполагалось, что использование этих подходов может прояснить роль митоК$_{АТФ}$ канала в предупреждении патологических последствий ишемии

Материалы и методы. В эксперимент были отобраны две группы крыс линии Вистар весом 220-260г, ранжированных по их устойчивости к гипоксии: а) высоко-устойчивые (ВУ), время жизни которых в барокамере на критической высоте 11.5км до 2-го агонального вдоха превышало 10мин; б) низко-устойчивые (НУ) животные, время жизни которых при тех же условиях составляло менее 1,5мин.

Обнаружено, что ВУ крысы, в отличие от НУ, не улучшают параметры выживания в барокамере при их тренировки к гипоксии, поэтому адаптацию к гипоксии проводили на НУ животных. Адаптация

животных к недостатку кислорода проводилась методом нормобарической прерывистой гипоксии.

Эффективность работы митоК$_{АТФ}$ в сердце и печени определяли двумя способами: по скорости АТФ-зависимого ДНФ- индуцированного выхода калия, которую оценивали K^+-селективным электродом в митохондриях сердца и печени [5] и по скорости АТФ-зависимого набухания митохондрий [6]. Количество калия в митохондриях определяли по выходу иона из митохондрий в присутствии Тритона Х-100 с использованием калий селективного электрода [5]. Сопряженное дыхание митохондрий измеряли полярографически, скорость образования H_2O_2 определяли с помощью Амплекса красного [7].

Результаты и обсуждения. В работе установлено, что скорость ДНФ-индуцированного АТФ-зависимого транспорта калия в митохондриях печени и сердца ВУ крыс была значительно выше у НУ (табл.1).

При адаптации НУ к недостатку кислорода путем интервальной гипоксической тренировки скорость ДНФ-индуцированного выхода K^+ из митохондрий увеличивается и приближается к показателям характерным для ВУ. Эффект адаптации на скорость транспорта калия в митохондриях проявляется как на митохондриях печени, так и сердца (табл.1).

Табл.1. Скорость ДНФ-индуцированного транспорта K^+ в митохондриях животных с различной устойчивостью к гипоксии.

Характер устойчивости к гипоксии	Печень		Сердце	
	скорость,мкМ/мин/мг белка	% от НУ	скорость,мкМ/мин/мг белка	% от НУ
НУ	38.17±3.21		51.1±5.35	
ВУ	66.67±5.82	+75%	96.6±7.41	+89%
А	59.3±6.04	+55%	81.2,2±5,31	+59%

Скорость АТФ-зависимого транспорта калия, определяемая как по его ДНФ-индуцированному выходу (табл.1), так и по энергозависимому набуханию митохондрий (табл.2), была в 1.5 раза выше в митохондриях сердца, по сравнению с митохондриями печени. Это соответствует литературным данным о большей плотности митоК$_{АТФ}$ каналов в митохондриях сердца, по сравнению с митохондриями печени [8].

Кроме того, скорость этого транспорта в митохондриях обеих тканей у ВУ крыс выше сравнительно с НУ крысами. Это особенно проявляется на НАД-зависимых субстратах и значительно меньше при окислении сукцината (табл.2). Адаптация НУ крыс ведет к значительному увеличению скорости входа калия в митохондрии, что проявляется на двух типах субстратов.

Табл.2. Скорость энергозависимого входа K^+ (δD/мин/мг белка) в митохондриях сердца и печени крыс с различной устойчивостью к гипоксии.

Ткань	Характер устойчивости к гипоксии	Глутамат (4мМ) +малат (1мМ)		Сукцинат (5мМ)	
		скорость, δD/мин/мг белка	% от НУ	скорость, δD/мин/мг белка	% от НУ
Сердце	НУ	0.575±0.079		0.506± 0.049	
	ВУ	0.910±0.2	+58%	0.574±0.05	+13%
	А	0,872±0,118	+51%	0,672±0,068	+33%
Печень	НУ	0.321±0.018		0.316±0.025	
	ВУ	0.563±0.055	+75%	0.334±0.05	+5.7%
	А	0,519±0,029	+62%	0,531±0,048	+68%

Количество калия в митохондриях печени и сердца ВУ было на 25-30% ниже, чем у НУ животных (рис.1), а адаптация НУ крыс к гипоксии ведет к значительному снижению количества калия в митохондриях как печени, так и сердца. Это означает, что при адаптации организма к гипоксии митохондрии не набухают, как можно было полагать, а даже сокращаются. Следовательно, адаптация к гипоксии ведет к активации не только АТФ-зависимого входа калия, но и выхода калия из митохондрий, обычно осуществляемого системой K^+/H^+ обмена. Из литературы известно, что набухание митохондрий, активируемое входом калия в присутствии валиномицина, активирует K^+/H^+ обмен [9].

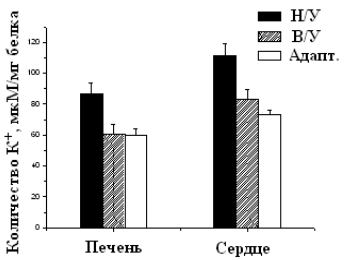


Рис.1. Количество K^+ в митохондриях животных с различной устойчивостью к гипоксии. В/У и Н/У-высоко и низко устойчивые к гипоксии животные, соответственно. Адапт.- адаптированные к гипоксии НУ.

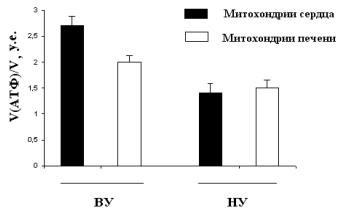


Рис.2. Соотношение скорости образования перекиси водорода в митохондриях ВУ и НУ крыс в присутствии и отсутствии АТФ с субстратами: малат+глютамат.

Таким образом, представленные в работе данные указывают на то, что при адаптации активируется рециклизация калия в митохондриях, т.е. развивается, так называемое, слабое разобщение, которое, как известно,

снижает скорость продукции активных форм кислорода в митохондриях [10].

И действительно, полученные нами данные по измерению сопряженного дыхания в митохондриях исследованных животных показывают, что дыхательный контроль у ВУ животных существенно ниже, чем у НУ, т.е. митохондрии ВУ животных менее сопряжены, что должно приводить к мягкому разобщению.

В данной работе исследовалась также скорость образования перекиси водорода в митохондриях сердца и печени крыс, устойчивых и неустойчивых к гипоксии, в условиях добавления экзогенных субстратов дыхания: малат+глутамат (МГл) с последующим ингибированием митоК$_{АТФ}$ канала с помощью АТФ. Ранее было установлено, что добавление к митохондриям АТФ, в присутствии субстратов дыхания, приводило к увеличению скорости накопления H_2O_2, что снималось активаторами митоК$_{АТФ}$ канала [7]. Последнее обстоятельство позволило авторам предположить, что активация скорости накопления H_2O_2 связана с ингибированием митоК$_{АТФ}$, и сделать вывод, что при работе канала значительно снижаются скорости образования H_2O_2 в дыхательной цепи.

Из таблицы 3 видно, что на эндогенных субстратах в сердце, где по нашим и литературным данным канал более активен, скорость продукции H_2O_2 была меньше у ВУ, по сравнению с той же скоростью у НУ крыс. Следовательно, интактные митохондрии ВУ животных в состоянии покоя меньше накапливают перекисей. В присутствии добавленных субстратов эта скорость увеличивается, но все же остается выше у НУ животных. Ингибирование калиевого канала добавлением АТФ, приводило к увеличению скорости образования H_2O_2 в митохондриях сердца и печени ВУ крыс в 2.7, в печени – в 2 раза соответственно, а в митохондриях сердца и печени НУ крыс в 1.4-1.5 раза (рис.2). Эти показатели, косвенно позволяющие сравнить скорость работы канала у разных видов животных [8], указывают на то, что у ВУ животных активность митоК$_{АТФ}$ значительно выше, чем у НУ крыс, что соответствует приведенным выше в работе данным, полученным при использовании более прямых методов определения активности канала.

Табл.3. Образование перекиси водорода в митохондриях ВУ и НУ животных.

Субстрат, условия	H_2O_2, рмоль на мг белка в мин			
	ВУ		НУ	
	сердце	печень	сердце	печень
-	44	106	60	89
МГл	142	130	159	118
МГл, АТФ 1мМ	381	267	237	175

На основании результатов, полученных тремя независимыми методами, можно сделать следующие выводы:

1) у ВУ животных активность митоК$_{АТФ}$ канала значительно выше, чем у НУ, а адаптация НУ животных к интервальной гипоксии ведет к его активации;

2) митоК$_{АТФ}$ канал более активен в митохондриях сердца, по сравнению с митохондриями печени;

3) при адаптации организма к гипоксии вместе с увеличением активности митоК$_{АТФ,}$ активируется также и система выхода калиия из митохондрий, т.е. увеличивается рециклизация калия в митохондриях;

4) рециклизация калия в митохондриях ведет к их мягкому разобщению, что подтверждается полученными нами данными по снижению дыхательного контроля в процессе адаптации животных к гипоксии;

5) при работе канала (в отсутствие АТФ) скорость образования перекиси в митохондриях сердца ВУ животных ниже, по сравнению с НУ животными.

Вероятно, снижение АФК в митохондриях в условиях активации калиевого цикла способствует защите мембран от их повреждений при гипоксии.

Работа поддержана грантами РФФИ №07-04-00759а, ISTC-3301 и программой «Развитие научного потенциала высшей школы» №3840.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Grover G.J.* //Cardiovasc. Res. (1994) 28(6): 778-2;
2. *Grover G.J., Garlid K.D.* //J. Mol. Cell Cardiol. (2000) 32: 677-95;
3. *Mironova G.D. et al.* //J. Biol.Chem. (2004) 279(31): 32562-8;
4. *Krylova I.B. et al.* //Exper. Gerontol. (2006) 41(7): 697-703;
5. *Baranova O. et al.* //Biochem. (2006) 65(2): 262-7;
6. *Jaburek et al.* //J. Biol. Chem. (1998) 273: 13578-82;
7. *Ferranti R. et al.* //FEBS Lett. (2003) 536: 51-5;
8. *Bajgar R. et al.* //J. Biol. Chem. (2001) 276: 33369-74;
9. *Brierly G.P. et al.* //J. Bioenerg. Biomemb. (1998) 20(2): 229-42;
10. *Korshunov S.S. et al.* //FEBS Lett. (1997) 416: 15-8.

ДЕЙСТВИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО НАПРАВЛЕННОГО АНТИОКСИДАНТА SkQ_1 НА ПРОЦЕСС СТАРЕНИЯ *PODOSPORA ANSERINA*

Ожован С.М.[1], Бакеева Л.Е.[2], Штайер О.В.[3], Камзолкина О.В.[3], Высоких М.Ю.[2]

[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[2]НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва
[3]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Старение как процесс деструктивного типа, ведущий к гибели клетки и всего организма, характерно для большинства эукариот. Однако, до сих пор неясны молекулярные механизмы, определяющие ход этого процесса. В основе некоторых теорий старения лежит гипотеза о том, что окислительный стресс и нарушения, вызванные генерацией АФК, в конечном итоге приводят к накоплению молекулярных дефектов и к гибели организма [1]. Нарушения в работе митохондрий, вызванные окислительным стрессом, считаются причиной сверхпродукции АФК. В настоящее время показано, что митохондриально-направленные антиоксиданты (в т.ч. и SkQ_1) являются эффективными протекторами клеток и их органелл в условиях окислительного стресса и старения [2].

Нитчатый аскомицет *P. anserina* уже несколько десятилетий активно изучается в качестве экспериментальной модельной системы для выявления и объяснения молекулярных механизмов старения [3-6]. Нами было обнаружено, что при выращивании *P. anserina* с добавлением в среду SkQ_1 продолжительность жизни значительно (более, чем в два раза) увеличивается по сравнению с диким типом, выросшим на обычной среде.

Для электронно-микроскопического исследования были взяты кусочки мицелия *P. anserina* в возрасте 18, 25 дней, выращенные на обычной среде, а также 18, 25, 46, 61 дней, выращенные на среде с добавлением 400нМ SkQ_1. Кусочки мицелия фиксировали вместе с агаром парафармальдегид-глутаральдегидным фиксатором на фосфатном буфере, pH=7.4 в течение 2.5ч. Затем материал дофиксировался 2% раствором OsO_4 в воде в течение 2ч. Дегидратация проводилась в возрастающей концентрации спирта (50-96%). Затем пробы заливались в эпоксидную смолу Эпон-812. Ультратонкие срезы (70-80нм) приготавливали на микротоме Leica Ultracut, окрашивали по Рейнольдсу. Пробы анализировали с использованием электроного микроскопа HU-11B «Hitachi».

Зрелый 18-дневный гриб имеет как воздушный, так и субстратный мицелий. Клетки гиф погруженного и воздушного мицелия по своей ультраструктуре не отличаются: по всей длине гиф располагаются вытянутые протяженные митохондрии (рис.1). Стареющий мицелий *P. anserina* на 25-й день резко отличается как на макроскопическом, так и на ультраструктурном уровне (рис.2). Воздушный мицелий практически отсутствует. Клетки гиф погруженного мицелия увеличены по сравнению с 18-дневным мицелием. Цитоплазма клеток полностью заполнена большим количеством хаотично расположенных митохондрий, которые имеют электронно-прозрачный матрикс (рис.2). Кроме этого в цитоплазме клеток 25-дневного мицелия наблюдается увеличение вакуолей, повышенное содержание липидных капель, а также появление ламеллярных тел – характерных ультраструктурных признаков старения *P. anserina*.

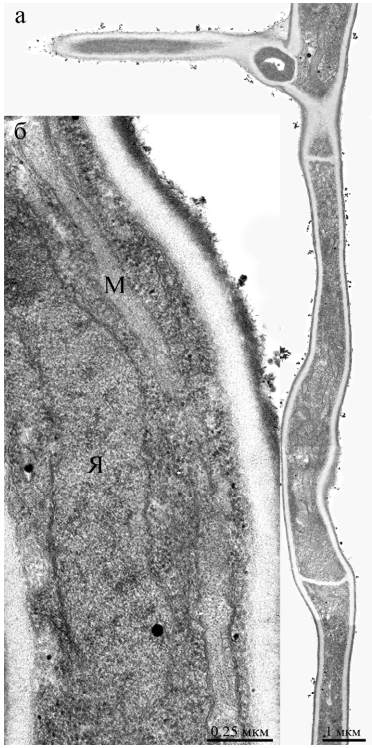


Рис.1. Воздушный мицелий *P. anserina*, 18 дней. а – гифа, б – митохондрия (М) клетки на большем увеличении, Я-ядро.

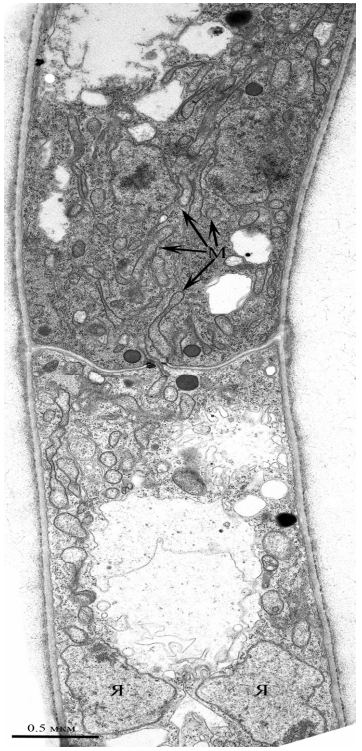


Рис.2. Погруженный мицелий *P. anserina*, 25 дней. М – митохондрии, Я – ядро.



Рис.3. Погруженный мицелий *P. anserina*, выращенный на среде с добавлением 400нМ SkQ_1, 46 дней. а – гифа, б – митохондрии (М) клетки на большем увеличении.

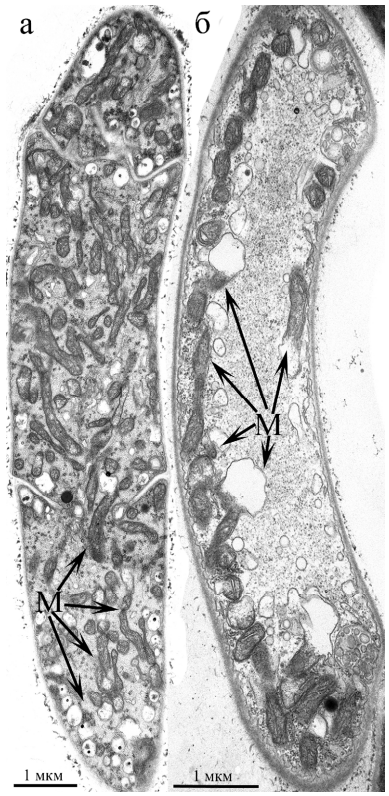


Рис.4. Погруженный мицелий *P. anserina*, выращенный на среде с добавлением 400нМ SkQ_1, 61 день. М – митохондрии.

Гифы *P. anserina*, выращенной на среде с SkQ_1, крупнее, чем без антиоксиданта, цитоплазма менее плотная, содержит вакуоли. Вдоль всей гифы беспорядочно располагаются электроннoплотные, мелкие, с большим количеством крист митохондрии (рис.3), их количество на клетку не превышает десятка. Мицелий *P. anserina,* растившейся на среде с SkQ_1 в течение 25 и 46 дней, не отличается по своей ультраструктуре от 18-дневного мицелия, выращенного при тех же условиях в отсутствие SkQ_1 (рис.3). Однако, на 61 день мы обнаружили гетерогенность в ультраструктуре клеток (рис.4). Часть клеток содержала электроннoплотные, мелкие митохондрии, другие клетки по своей ультраструктуре соответствовали 25-дневному сроку стареющего мицелия *P. anserina*: вся цитоплазма была заполнена большим количеством электронно-прозрачных митохондрий.

Согласно литературным данным, характерными морфологическими признаками старения *P. anserina* являются остановка апикального роста гиф и размножения, редукция воздушного мицелия, а также повышение пигментации [3,6]. Известно также, что старение мицелия сопровождается вакуолизацией цитоплазмы как в клетках растений, так и в клетках грибов [7-9] (рис.2,4). Сферические вакуоли захватывают все больший клеточный объем, сливаются друг с другом и в конечном итоге приводят к лизису клетки [9]. Зачастую клеточная гибель *P. anserina* связана с изменениями в положении септ, накоплением липидных капель и неправильным расположением материала клеточной стенки [9] (рис.2). Помимо этого, были найдены аутофагосомы и аутофагические тела в содержимом цитоплазмы в период гибели клеток мицелия *P. anserina* [9]. Клетки в гифах мицелия *P. anserina* отделены друг от дурга септами. Известно, что когда одна клетка погибает, поры закрываются специальными телами Воронина для предотвращения распространения повреждения и гибели по всему мицелию [9,10].

Старение *P. anserina* четко прослежено в отношении мтДНК: реорганизация митохондриального генома, появление новых кольцевых ДНК элементов (senDNA) в митохондриях [3,11-12], а также повышенный уровень белка PaDnm1, ответственного за деление митохондрий [1,6]. Новая ДНК (senDNA) влияет на респираторную функцию митохондрий. Известно, что добавление ингибиторов синтеза митохондриальных белков удлиняет жизнь *P. anserina* [3,13]. Обработка этидиум бромидом также оказывает омолаживающее действие [3,13]. В таких клетках мтДНК исчезает, аэробный метаболизм сменяется гликолизом, но senDNA не появляется и гриб, хотя и существенно медленнее растущий, живет значительно дольше. Определенные концентрации углеродных соединений, а также использование хлорамфеникола уменьшают вероятность старения и продлевают жизнь мицелия [3,14]. Однако, ранее не было обнаружено соединения, способного надолго отложить или отменить процесс старения у *P. anserina*.

Наши исследования показали, что SkQ_1 в несколько раз увеличивает продолжительность жизни *P. anserina,* при этом сохраняя нативность ультраструктуры клеток: мы не выявили разрушений или деградационных изменений клеток. Наоборот, нами была обнаружена значительная, неизвестная в литературе для *P. anserina* перестройка ультраструктуры клеток.

Полученные нами данные показывают, что при действии SkQ_1 наибольшие структурные изменения претерпевает митохондриальный аппарат клеток *P. anserina*. Специфический характер этих изменений свидетельствует в поддержку предположений о роли окислительного стресса в процессе старения организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Osiewacz H.D.* //Ageing Res. Rev. (2002) 1(3): 425-42;
2. *Anisimov A.N.* //Biochem. (2008) 73(12): 1329-42;
3. *Griffiths A.J.* //Annu. Rev. Genet. (1992) 26: 351-72;
4. *Marcou D.* //Ann. Sci. Natur. Bot. (1961) 11: 653-764;
5. *Rizet G.* //C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. (1953) 137(15): 838-40;
6. *Scheckhuber C.Q. et al.* //Nat. Cell Biol. (2007) 9(1): 99-105;
7. *Levine A. et al.* //Curr. Biol. (1996) 6(4): 427-37;
8. *Havel L. and Durzan D.J.* //Bot. Acta (1996) 109: 268-77;
9. *Pinan-Lucarré B., Paoletti M., Clavé C.* //Sem. Canc. Biol. (2007) 17(2):101-11;
10. *Jacobson D.J., Beurkens K., Klomparens K.L.* //Fungal. Genet. Biol. (1998) 23(1): 45-56;
11. *Jamet-Vierny C., Begel O., Belcour L.* //Cell (1980) 21(1): 189-94;
12. *Begel O. et al.* //Mol. Cell Biol. (1999) 19(6): 4093-100;
13. *Koll F. et al.* //Curr. Genet. (1984) 8: 127-34;
14. *Belcour L., Begel O.* //J. Gen. Microbiol. (1980) 119: 505-15.

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ НА ЛЕКТИН-ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ И ГЕНЕРАЦИЮ H_2O_2 НЕЙТРОФИЛАМИ ЧЕЛОВЕКА

Мухортова А.В.[1], Горудко И.В.[1], Черенкевич С.Н.[1], Тимошенко А.В.[2]

[1]Белорусский государственный университет
[2]Университет Западного Онтарио, Канада, Лондон

Введение. К настоящему времени получен ряд экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что лектины, специфические белки, обладающие свойством обратимо и избирательно связывать углеводы, активно вовлечены в регуляцию воспаления. Так, показано участие лектинов в процессах активации комплемента [1], адгезии лейкоцитов к эндотелию [2], лектинофагоцитоза [3], апоптоза [4], хемотаксиса [5] и др. Недавние исследования выявили присутствие галектинов в атеросклеротической бляшке [6]. Показано также, что ряд цитокинов обладает углеводсвязывающей активностью и эндогенные лектины могут отменять или праймировать их действие. Лектины способны модулировать активность многих типов клеток, участвующих в воспалении, включая Т- и В-лимфоциты, тучные клетки, нейтрофилы, моноциты/макрофаги. Однако особое внимание заслуживает исследование углевод-зависимых механизмов регуляции активности нейтрофилов, принадлежащих к числу центральных участников воспаления и обеспечивающих первичную неспецифическую защиту организма от патогенных микроорганизмов. Взаимодействие лектинов с нейтрофилами запускает целый каскад сигнальных реакций, которые могут инициироваться в местах локализации липидных рафтов, представляющих собой домены плазматической мембраны, обогащенные холестерином, гликолипидами и сфингомиелином. Несмотря на то, что в литературе имеются данные об участии липидных рафтов в процессах окислительного взрыва [7,8], адгезии [8] и апоптоза [9] нейтрофилов, гликобиологический аспект этой регуляции остается малоизученным. Одним из наиболее распространенных способов изучения участия липидных рафтов в функционировании клеток является исследование действия препаратов, которые экстрагируют холестерин из плазматической мембраны, на клеточные ответы. В качестве таких веществ, разрушающих липидные рафты клеток, широкое распространение получили циклодекстрины [10]. В данной работе исследовали влияние β-циклодекстрина (βCD) и метил-β-циклодекстрина (MβCD) на лектин-индуцированную агрегацию и генерацию H_2O_2 нейтрофилами.

Материалы и методы. Исследования проводили с использованием донорской крови, стабилизированной 3,8%-ным раствором цитрата натрия, полученной из Республиканской станции переливания крови МЗ РБ. Нейтрофилы получали путем центрифугирования лейкоцитарной суспензии в градиенте плотности лимфопрепа. Активность фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и содержание общего холестерина в супернатантах нейтрофилов определяли по стандартным методикам с использованием соответствующих наборов фирмы Анализ-Х (Минск, Беларусь).

Кинетику лектин-индуцированной агрегации нейтрофилов изучали по изменению светопропускания клеточных суспензий при длине волны 540нм с помощью агрегометра АР 2110 НПО «СОЛАР». Степень агрегации определяли как максимальное значение светопропускания

клеточной суспензии на агрегационной кривой через 5мин после инициирования процесса агрегации. Продукцию H_2O_2 нейтрофилами регистрировали флуоресцентным методом с использованием скополетина при помощи спектрофлуориметра СОЛАР LSF1211A (Минск, Беларусь). Скорость окисления скополетина определяли как максимальный тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой.

В работе использовали растительные лектины НПК Лектинотест (Львов, Украина): glcNAc-специфичные лектины зародышей пшеницы (*Triticum aestivum*) WGA и корневищ крапивы (*Urtica diooca L.*) UDA, galNAc-специфичный лектин сои (*Glycine hispida*) SBA, man-специфичные лектины из семян канавалии мечевидной (*Canavalia ensiformis*) Con A и из травы белоцветника весеннего (*Leucojum vernum)* LVA, β-gal(1→3)galNAc-специфичный лектин из семян арахиса (*Arachis hypogaea L.*) PNA и лектин из семян фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) PHA-L, обладающий сродством к олигосахаридам сложной структуры,

Результаты и обсуждение. В предварительных экспериментах были подобраны условия, при которых обработка нейтрофилов циклодекстринами приводила к «вымыванию» из них холестерина без нарушения жизнеспособности клеток. Установлено, что инкубирование нейтрофилов в 15мМ растворе βCD в течение 15мин и в 10мМ растворе MβCD в течение 10мин сопровождалось 31%-ым и 48%-ым выходом холестерина в внеклеточную среду (относительно общего выхода холестерина после обработки клеток 0,1% Тритоном X-100). В этих условиях жизнеспособность клеток практически не изменялась: активность ЛДГ в супернатантах нейтрофилов после соответствующей обработки растворами MβCD и βCD составляла 10,4% и 12,4% от активности общего количества фермента ЛДГ после обработки клеток 0,1% Тритоном X-100 (в контрольном эксперименте этот показатель соответствовал 12,9%). При сравнении влияния двух веществ на выход холестерина из клеток более эффективным в отношении разрушения липидных рафтов оказался MβCD, что согласуется с данными литературы [10].

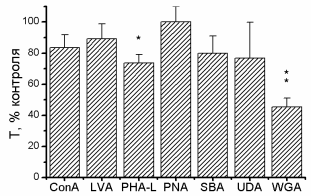


Рис.1. Влияние MβCD на степень лектин-индуцированной агрегации нейтрофилов (2×10^6кл/мл). Лектины использовали в концентрации 50мкг/мл. Клетки инкубировали с 10мМ MβCD в течение 10мин до внесения лектина. *P<0,05; **P<0,02.

На рис.1 представлены данные по влиянию MβCD на агрегацию нейтрофилов, индуцированную лектинами с различной углеводной специфичностью. MβCD ингибировал агрегацию нейтрофилов в ответ на PHA-L и WGA, тогда как агрегация этих клеток под действием других исследованных лектинов (Con A, LVA, SBA, PNA и UDA) не изменялась.

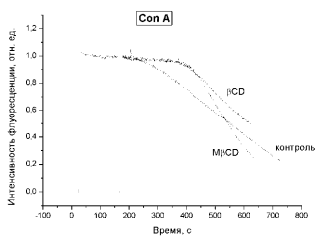


Рис.2. Кинетики Con A-индуцированной генерации H_2O_2 нейтрофилами в присутствии циклодекстринов. Клетки инкубировали с 10мМ MβCD и 15мМ βCD в течение 10мин и 15мин до внесения лектина.

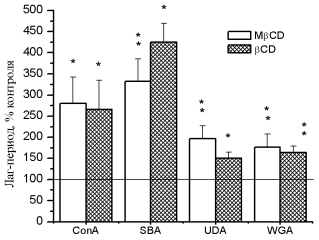


Рис.3. Влияние циклодекстринов на лаг-период лектин-индуцированной генерации H_2O_2 нейтрофилами. Лектины использовали в концентрации 50мкг/мл. Клетки инкубировали с 10мМ MβCD и 15мМ βCD в течение 10мин и 15мин до внесения лектина. * P<0,05; **P<0,02.

Для характеристики процесса лектин-индуцированной генерации H_2O_2 нейтрофилами использовали два параметра: скорость продукции H_2O_2 и длительность лаг-периода этого процесса, которая зависит от скорости сборки функционально активного НАДФН-оксидазного комплекса в плазматической мембране. На рис.2, в качестве примера, представлены типичные кинетические кривые Con A-индуцированной генерации H_2O_2 нейтрофилами, обработанных циклодекстринами. Оказалось, что в присутствии как βCD, так и MβCD наблюдалось увеличение лаг-периода процесса генерации H_2O_2 нейтрофилами, которое сменялось более быстрым окислением скополетина в ответ на стимуляцию такими лектинами, как Con A, SBA, UDA и WGA. Увеличение длительности лаг-периода было более сильным для Con A и SBA в сравнении с UDA и WGA (рис.3). Циклодекстрины полностью ингибировали PNA- и LVA-индуцированную генерацию H_2O_2 нейтрофилами, так что в течение по крайней мере первых 15мин не наблюдалось окисления скополетина. Эти изменения представляются весьма интересными, так как свидетельствуют о нарушении динамики сборки НАДФН-оксидазного комплекса в плазматической мембране

обедненной холестерином, сопряженного однако с последующей лектин-специфической трансактивацией этой ферментной системы. Не исключено, что ключевую роль в этих процессах играет специфическая кластеризация мембранных гликорецепторов [11].

Следует отметить, что при изучении лектин-индуцированной генерации H_2O_2 нейтрофилами была выявлена достоверная положительная корреляция ($r=0,962$; $P<0,001$; $n=7$) между степенью увеличения лаг-периода после обработки клеток βCD и после обработки MβCD. Аналогичная достоверная корреляция ($r=0,923$; $P<0,01$; $n=7$) была получена при исследовании продукции H_2O_2 нейтрофилами после обработки клеток βCD и после обработки MβCD, что подтверждает эффект влияния циклодекстринов на липидные рафты в исследованных ответах нейтрофилов.

Таким образом, ингибирование лектин-индуцированной агрегации в присутствии циклодекстринов и их влияние на генерацию H_2O_2 нейтрофилами свидетельствует о том, что липидные рафты вовлечены в лектин-зависимые ответы нейтрофилов. Механизмы участия липидных рафтов в процессах трансдукции лектиновых сигналов в клетках требуют более детального исследования в будущем с учетом характера взаимодействия лектиновых гликолигандов и соответствующих сигнальных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Avni O. et al.* //J. Immunol. (1998) 160: 6151-58;
2. *Lasky L.A.* //Annu. Rev. Biochem. (1995) 64: 119-39;
3. *Speert D.P. et al.* //J. Clin. Invest. (1988) 82(3): 872-9;
4. *Yang R.-Y., Hsu D.K., Liu F.-T.* //PNAS. (1996) 93: 6737-42;
5. *Matsumoto R. et al.* //J. Biol. Chem. (1998) 273: 16976-84;
6. *Papaspyridonos M. et al.* //Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2008) 28: 433-40;
7. *Shao D., Segal A.W., Dekker L.V.* //FEBS Lett. (2003) 550(1-3): 101-06;
8. *Solomkin J.S. et al.* //Shock (2007) 28(3): 334-8;
9. *Remijsen Q. et al.* //J. Leukoc. Biol. (2009)85: 497-507;
10. *Christian A.E. et al.* //J. Lipid Res. (1997)38: 2264-72;
11. *Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н.* //Успехи Совр. Биол. (1990) 109: 206-18.

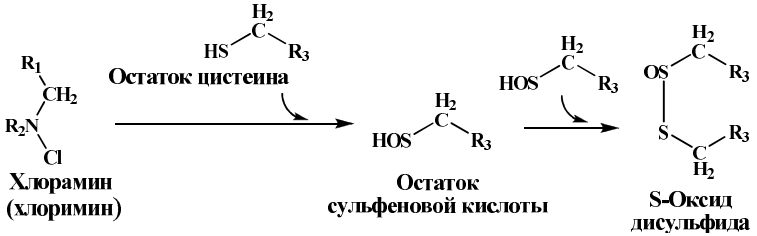
РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ ТРОМБОЦИТОВ РЕАКТИВНЫМИ ОКСИДАНТАМИ, ВЫЗЫВАЮЩИМИ НЕОБРАТИМУЮ МОДИФИКАЦИЮ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АТОМНЫХ ГРУПП В РЕЦЕПТОРАХ

Рощупкин Д.И.[1], Мурина М.А.[2]

[1]ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет Росздрава, Москва

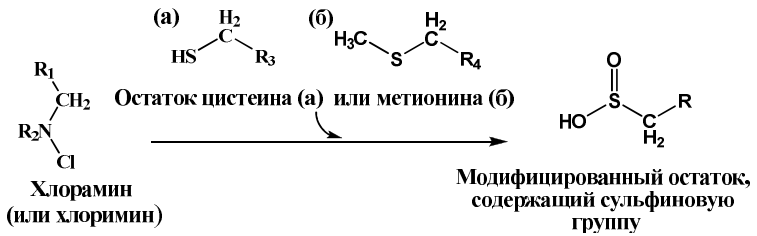
[2]ФГУ «НИИ физико-химической медицины Росздрава», Москва

В клинической практике для получения стойкого терапевтического результата часто необходимы лекарственные соединения, оказывающие необратимое (ковалентное) модифицирующее действие на молекулярные мишени. Легко понять, что такого рода соединения должны быть эффективными для ингибирования тромбоцитов с целью предупреждения внутрисосудистых тромбозов, для борьбы с внутриклеточными инфекциями. Очень важное свойство таких соединений – кумулятивность действия дробных доз. Применение ежедневно небольшой дозы препарата позволяет снизить побочный эффект, а нужный терапевтический результат получают за счет многократного применения терапевтического средства. Широко известные антиагреганты ацетилсалициловая кислота (аспирин), тиенопиридины относятся к категории ковалентных ингибиторов тромбоцитов [1-4]. Нами обнаружен новый класс ковалентных антиагрегантов, имеющих активный хлор: органические хлорамины (производные аминокислот и родственных соединений), органические хлоримины [5-11]. Эти антиагреганты являются соединениями природного типа. Они образуются активированными фагоцитами: в реакции, катализируемой миелопероксидазой, синтезируется гипохлорит (в равновесии с хлорноватистой кислотой), который реагирует с соединениями, имеющими аминогруппу или иминогруппу. Хлорамины и хлоримины вместе с гипохлоритом составляют группу активных форм хлора (реактивные хлорные оксиданты). Выраженная реакционная особенность хлораминов и хлориминов – эффективное окисление серосодержащих атомных групп. На основании данных литературы и общих соображений картину реакций активных форм хлора с серосодержащими группами можно представить в следующем виде. Один из таких процессов – окисление тиолов (цистеина) до сульфеновой кислоты, а затем возможно образование S-оксида дисульфида (схема).



При избытке тиолов происходит образование дисульфидного соединения, в том числе смешанного типа. S-Оксид дисульфида может быть результатом прямого окисления дисульфидов хлорными оксидантами.

При стерических ограничениях в белках серосодержащие группы модифицируются хлорными оксидантами до состояния сульфиновой и далее сульфоновой кислоты.



Для выяснения возможного избирательного взаимодействия активных форм хлора с различными серосодержащими группами в настоящей работе были определены константы скорости реакции ряда хлораминов и хлориминов с метионином, восстановленным и окисленным глутатионом. Для этого исследовали кинетику реакции. На спектрофотометре записывали кинетику уменьшения оптической плотности хлораминов в максимуме спектра поглощения при 254нм (для монохлорпроизводных) и 302нм (для дихлорпроизводных) после введения метионина или глутатиона. Константу скорости реакции (k) рассчитывали по формуле, которая хорошо известна из общих законов кинетики химических реакций: $k=\Delta C/\Delta t(C_1 \cdot C_2)$, $\Delta C=\Delta D/\varepsilon l$, где C_1 и C_2 – концентрация реагирующих веществ; ε – молярный коэффициент поглощения хлорамина; l – длина оптического пути, см; Δt – время, за которое уменьшение оптической плотности (ΔD) смеси реагирующих соединений составляло 10-15%. Суммарные данные представлены в таблице. Видно, что среди изученных хлораминов N,N-дихлортаурин обладает избирательностью взаимодействия с восстановленным глутатионом: его константа скорости на 2-3 порядка более высокая, чем у

других хлораминов. Однако N,N-дихлортаурин обладает наименьшей реакционной способностью по отношению к тиоэфирной группе метионина и дисульфидной группе окисленного глутатиона. С тиоэфирной группой метионина с наибольшей скоростью реагируют N-хлорглицин, N-хлораланин и N-хлоризолейцин.

Табл. Константы скорости реакций хлораминовых производных аминокислот и таурина с серосодержащими группами.

Соединение	Метионин	Глутатион	Глутатион окисленный
N-Хлорглицин	80,1±3,3	14,5±2,48	0,16±0,007
N-Хлораланин	96,5±4,5	–	–
N-Хлорфенилаланин	43,7±2,4	6,6±0,57	0,18±0,018
N-Хлорлейцин	66,3±4,1	–	–
N-Хлоризолейцин	96,8±6,5	–	–
N-Хлортаурин	21,7±2,7	5,9±1,12	0,06±0,004
N-Хлор-N-метилтаурин	15,3±3,2	3,2±1,04	–
N,N-Дихлортаурин	0,22±0,062	$\geq 10^{3}$	0,004±0,0005

Агрегация (основной функциональный процесс) тромбоцитов включает сигнализацию и внутрь клетки, и из цитоплазмы к плазматической мембране. К настоящему времени установлено, что при действии АДФ и некоторых других агонистов существенна целостность сульфгидрильной группы в пуриновом рецепторе (P2Y1 и P2Y12) [12]. Сигнализация из клетки наружу обеспечивает активацию рецепторов фибриногена (гликопротеида IIb/IIIa), так что связывание этими рецепторами молекул фибриногена обеспечивает образование межклеточных молекулярных мостиков. Получены данные о том, что фибриногеновый рецептор тоже содержит тиольные группы и эти группы важны для перехода рецептора в активное состояние [13]. Можно ожидать, что хлорамины способны осуществлять понижающую регуляцию агрегации тромбоцитов за счет окисления сульфгидрильных групп в пуриновом и фибриногеновом рецепторах. Данные по изучению замены остатков цистеина на другие аминокислоты, вызывающей разрыв дисульфидных мостиков в определенном домене (подобном эпидермальному фактору роста), приводит к активации фибриногенового рецептора [14]. Коротковолновый УФ-свет вызывает агрегацию тромбоцитов без агониста [15], вероятно, за счет разрыва дисульфидных связей в фибриногеновом рецепторе. Таким образом, выходит, что путем модификации дисульфидных мостиков можно осуществлять усиливающую регуляцию активности тромбоцитов.

Мы исследовали действие хлораминов и хлориминов на обычную конечную агрегацию (образование крупных агрегатов) тромбоцитов в составе обогащенной тромбоцитами плазме крови (турбидиметрический

метод регистрации), начальную агрегацию (образование мелких агрегатов) тромбоцитов в изолированном состоянии (нефелометрия под малыми углами [16]) и агрегацию тромбоцитов в крови (импедансный метод). Все хлорамины и хлоримины оказывали антиагрегантное действие на нативные тромбоциты при всех трех вариантах регистрации агрегации, вызванной агонистами.

Была изучена способность хлораминов к угнетению агрегацию не только нативных, но активированных изолированных тромбоцитов. N,N-Дихлортаурин в концентрации приблизительно 0,25мМ заметно ингибируют начальную АДФ-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов, предварительно активированных в течение 1-1,5мин введением АДФ (0,1-0,5мкМ). Хлораминовые производные аланина и фенилаланина подавляют коллаген-индуцированную агрегацию нативных и активированных тромбоцитов соответственно в конечных концентрациях 0,02мМ и 0,2мМ. Таким образом, исследуемые хлорамины оказывают антиагрегантное действие на активированные тромбоциты, но этот эффект слабее, чем в случае нативных клеток.

Все данные можно интерпретировать следующим образом. При действии хлораминов в данной концентрации на нативные клетки антиагрегантный эффект является результатом инактивации части рецепторов агониста и фибриногеновых рецепторов. В случае активированных тромбоцитов антиагрегантный эффект слабее, поскольку отражает только инактивацию части фибириногеновых рецепторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Patrono C., et al.* //Chest. (1998) 114: 470-88;
2. *Wu, K.K.* //Semin. Vasc. Med. (2003) 3: 107-12;
3. *Clutton P., Folts J.D., Freedman J.E.* //Pharmacol. Res. (2001) 44: 255-64;
4. *Undas A., Brummel-Ziedin K.E., Mann K.G.* //Blood (2007) 109: 2285-92;
5. *Рощупкин Д.И. и др*. //Биофизика (1995) 40: 569-75;
6. *Мурина М.А. и др.* //Биофизика (1997) 42: 1279-85;
7. *Рощупкин Д.И. и др.* //Физиология человека (1998) 3: 113-20;
8. *Мурина М.А. и др.* //Бюл. Экспер. Биол. Мед. (2002) 134: 444-7;
9. *Мурина М.А. и др.* //Бюл. Экспер. Биол. Мед. (2004) 138: 632-4;
10. *Мурина М.А. и др.* //Бюл. Экспер. Биол. Мед. (2007) Прил.2: 94-100;
11. *Рощупкин Д.И. и др.* //Биофизика (2007) 52: 527-33;
12. *Essex D.W., Li M.* //Curr. Drug. Targets (2006) 7(10): 1233-41;
13. *Manickam N. et al.* //Br. J. Haematol. (2008) 140(2): 223-9;
14. *Kamata T. et al* //Biochem. J. (2004) 378: 1079-82;
15. *Verhaar R. et al.* //Blood (2008) 112(13): 4784-5;
16. *Рощупкин Д.И., Соколов А.Ю.* //Патент РФ №2067764 (1996) 28: 225.

ДИНАМИКА ЛИПОФУСЦИНОВЫХ ГРАНУЛ ПРИ РАЗВИТИИ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМОЙ МАКУЛОДИСТРОФИИ

Сапрунова В.Б.[1], Колосова Н.Г.[2], Бакеева Л.Е.[1]

[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[2]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

В настоящее время исследование процессов старения является одной из актуальных проблем и, в частности, в связи с тем, что старение сопровождается развитием тяжелых возрастзависимых патологий, в том числе возрастной макулодистрофии. Макулодистрофия является основной причиной снижения и потери зрения людьми старшего возраста. В настоящее время становится общепринятой точка зрения, что одну из ведущих ролей в патогенезе данного заболевания играет активация свободнорадикальных процессов [1-7]. В связи с этим чрезвычайно актуальным является вопрос, могут ли митохондриальные антиоксиданты останавливать или хотя бы замедлять развитие патологий и физиологического старения (в частности, митохондриальный антиоксидант – катионный аналог хинона – SkQ1). Одним из основных подходов к решению этой проблемы является ультраструктурное исследование.

Полноценной моделью для исследования механизмов развития макулодистрофии является линия крыс OXYS, созданная в ИЦиГ СО РАН. Установлено, что у крыс OXYS развиваются дистрофические изменения сетчатки, по клиническим проявлениям соответствующие возрастной макулодистрофии у людей [8]. Согласно литературным данным, при возраст-зависимой макулодистрофии происходит значительное повышение уровня липофусцина в клетках пигментного эпителия [9], однако особенности развития этого патологического процесса до сих пор остаются неизвестными.

Целью настоящей работы явился анализ ультраструктуры клеток пигментного эпителия сетчатки крыс OXYS и крыс Вистар, а также анализ действия препарата SkQ1 на ультраструктуру пигментного эпителия.

Работа выполнена на 10 крысах OXYS и 5 контрольных крысах Вистар в возрасте 11 месяцев. Для исследования действия митохондриального антиоксиданта пластохинон-децил-трифенилфосфония (SkQ1) крысы линии OXYS получали препарат ежедневно в течение 68 дней в виде глазных капель, концентрация препарата в которых составляла 250нм. Пигментный эпителий преждевременно стареющих крыс линии OXYS оценивался на наличие и

степень выраженности изменений макулярной области по классификации Кацнельсона (1990).

Пигментный эпителий крыс линии Вистар состоит из одного слоя клеток, на апикальной части которых имеются длинные выросты цитоплазмы – тонкие тяжи, окружающие наружные сегменты палочек. Характерный ультраструктурный признак пигментного эпителия - наличие в апикальной части цитоплазмы большого числа электронно-плотных структур (рис.1). Согласно современным литературным данным [6,10], считается, что эти структуры - липофусциновые гранулы. У исследованных нами крыс линии Wistar в возрасте 11 месяцев без поражений сетчатки электронно-плотные структуры образовывали практически непрерывный равномерный слой в апикальной части клеток пигментного эпителия, однако нам не удалось обнаружить скоплений электронно-плотных структур у основания выростов цитоплазмы, направленных к клеткам палочек. Анализ ультраструктуры данного слоя электронно-плотных образований показал, что он содержит чрезвычайно гетерогенные по своей морфологии структуры. Это, прежде всего, липофусциновые гранулы классической структуры, а также более крупные, вариабельные по размерам, форме и внутренней организации образования. Мы предполагаем, что это взаимопереходные структуры, поскольку можно обнаружить различные переходные стадии между мелкими и крупными образованиями.

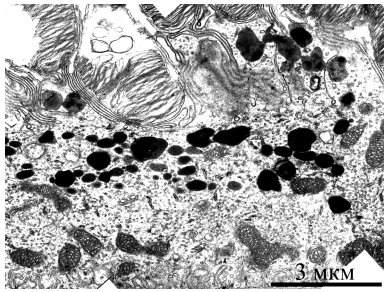


Рис.1. Пигментный эпителий крысы линии Вистар в возрасте 11 месяцев.

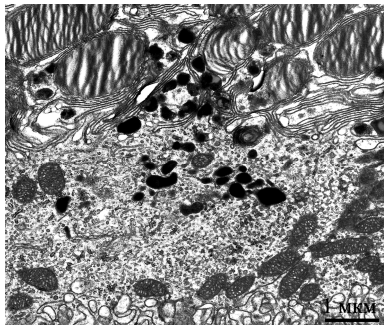


Рис.2. Пигментный эпителий крысы линии OXYS в возрасте 11 месяцев. Видно скопление липофусциновых гранул в апикальных отростках клеток пигменотого эпителия.

Иная ультраструктурная картина характеризует клетки пигментного эпителия крыс линии OXYS в возрасте 11 месяцев с признаками поражения сетчатки равным 2 баллам. Основные изменения пигментного эпителия крыс линии OXYS происходили в апикальной

части клеток: электронно-плотные включения уже не образовывали непрерывный слой. Скопления электронно-плотных мелких тел располагались в основном около основания выростов цитоплазмы клеток пигментного эпителия, направленных к клеткам палочек (рис.2). Электронно-плотные тела заполняли и сами выросты. Необходимо отметить, что практически полностью исчезали фагосомы – фагоцитированные пигментным эпителием обломки наружных сегментов фоторецепторов.

Обнаруженные нами изменения, развивающиеся в клетках пигментного эпителия, очевидно, отражают нарушения функционирования зрительного цикла, которые, вероятно, могут являться, в том числе, и причиной генерации АФК. В норме, в клетках палочек, в процессе фотопревращения родопсина, *транс*-ретиналь в комплексе с фосфатидилэтаноламином переносится через фоторецепторную мембрану в цитоплазму наружного сегмента и далее в клетку пигментного эпителия [2-4]. Неудаленный вовремя из фоторецепторной мембраны диска ретиналь накапливается в ней, а затем взаимодействует с фосфатидилэтаноламином, в результате чего в мембране образуется бис-ретиналиден-фосфатидилэтаноламин (A2E-PE), являющийся предшественником бис-ретинилиден-этаноламина (A2E) – основного флуорофора липофусциновых гранул. Вероятно, в норме липофусциновые гранулы накапливаются в виде сплошного слоя в апикальной части клеток. Однако у OXYS этот процесс нарушен, в результате чего липофусциновые гранулы накапливаются в основании выростов клеток пигментного эпителия, а также заполняют пространство между клетками палочек, тем самым способствуя развитию дальнейших нарушений в функционировании зрительного цикла, поскольку в настоящее время доказано, что липофусциновые гранулы крайне фототоксичны [5]. Практически полное отсутствие фагосом также указывает на нарушения в процессе функционирования фоторецепторного слоя.

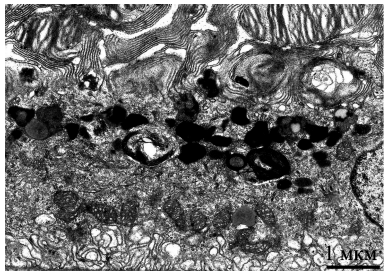


Рис.3. Пигментный эпителий крысы линии OXYS в возрасте 11 месяцев, получавшей лечение каплями SkQ1 (250нм).

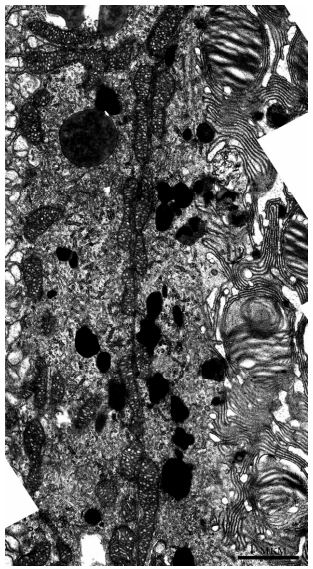


Рис.4. Ультраструктура митохондрий пигментного эпителия сетчатки животных, получавших с каплями препарат SkQ1 (250нМ).

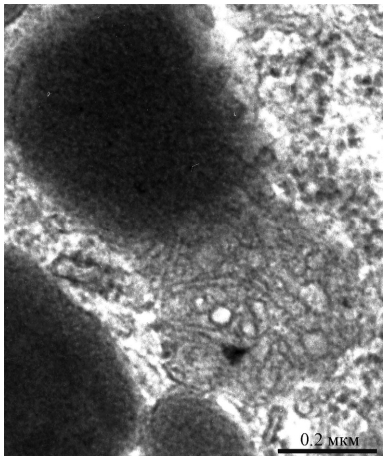


Рис.5. Митохондрия, частично заполненная электронно-плотным материалом.

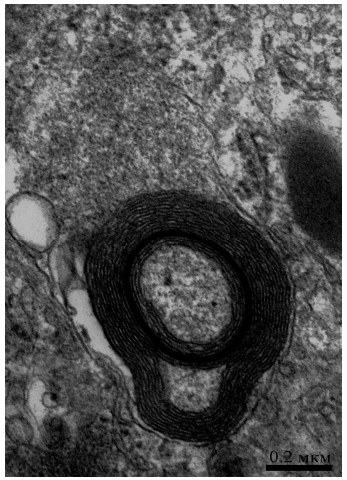


Рис.6. Продольное сечение органеллы, входящей в состав слоя структурных образований в апикальной части цитоплазмы клеток пигментного эпителия животных, получавших с каплями препарат SkQ1 (250нМ).

После лечения животных OXYS в течение 68 дней каплями SkQ1 в концентрации 250нм, поражение сетчатки с 2 баллов было сведено к 0, при этом ультраструктура клеток пигментного эпителия значительно

менялась. В апикальной цитоплазме клеток пигментного эпителия после лечения каплями SkQ1 выявлялось скопление большого числа электронно-плотных структурных образований, которые имели вид мощно развитого, непрерывного, сплошного слоя, проходящего через все клетки пигментного эпителия (рис.3). В то же время в отдельных участках пигментного эпителия мы обнаружили образование второго слоя клеток с мощно развитой системой митохондриального ретикулума. Интересно отметить, что в этом случае электронно-плотные структуры располагались исключительно в верхнем слое клеток пигментного эпителия (рис.4). В литературе эти электронно-плотные структуры рассматривались как лизосомальные. В настоящее же время эти структурные образования определяются как липофусциновые гранулы на разных стадиях формирования [6,10]. Однако результаты наших исследований показывают, что морфология этих структур удивительно разнообразна. В состав слоя действительно входят липофусциновые гранулы на разных стадиях формирования, однако он содержит и другие структуры. Так, в цитоплазме присутствуют электронно-плотные структуры овальной формы, заполненные электронно- плотным веществом. Нам удалось установить, что отдельные из таких органелл являются митохондриями, частично заполненными электронно-плотным материалом (рис.5).

Кроме таких электронно-плотных органелл в состав электронно-плотного слоя включений в апикальной части клеток пигментного эпителия входят органеллы необычной ультраструктуры. Они имеют округлую или сферическую форму, окружены одинарной мембраной. Внутреннее пространство этих структур имеет гранулированный матрикс, заполнено плотно прилегающими друг к другу концентрическими слоями мембран (рис.6). Происхождение и функциональное значение таких образований в настоящее время неизвестно.

Таким образом, у крыс линии OXYS в условиях защитного действия SkQ1 происходит развитие мощного митохондриального аппарата, а также обширного слоя взаимопереходящих плотных структур необычной организации. Можно предположить, что в пигментном эпителии здоровых животных происходят активные процессы распада не только обломков наружных сегментов фоторецепторов, но и износившихся компонентов цитоплазмы. За эти процессы ответственны обнаруженные нами электронно-плотные структуры. В то же время при развитии макулодистрофии эти процессы нарушаются. Обнаруженный нами защитный эффект действия SkQ1 является подтверждением имеющихся литературных данных, что патогенез данного заболевания связан с активацией свободнорадикальных процессов [1-7].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M.* //PNAS USA (1993) 90: 7915-22;
2. *Sun H., Molday R.S., Nathans J.* //J. Biol.Chem. (1999) 274: 8269-81;
3. *Kennedy M.J. et al.* //Neuron (2001) 31: 87-101;
4. *Sun H., Nathans J.* //J. Bioenerg. Biomembr. (2001) 33: 523-30;
5. *Островский М.А.* //Успехи Биол. Химии (2005) 45: 173-204;
6. *Imamura Y., et. al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103: 11282-7;
7. *Suzuki M. et al.* //Mol. Vis. (2007) 23: 13:772-8;
8. *Колосова Н.Г. др.* //Успехи геронтологии (2003) 12:143-8;
9. *Karan G. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005) 102: 4164-9;
10. *Winkler B.S. et al.* //Mol. Vis. (1999) 5: 32.

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И МЕТАБОЛИТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И АСЦИТНОЙ ЖИДКОСТИ ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЯ

Шаталин Ю.В.[1,2], *Наумов А.А.*[1], *Поцелуева М.М.*[1,2]

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

На модели трансплантированной асцитной гепатомы Зайделя было проведено детальное исследование изменений уровня активных форм кислорода в зоне роста опухоли и в плазме крови опухоленосителя. Установлено, что в плазме крови и в зоне роста опухоли складываются различные окислительно-восстановительные условия. Так в плазме крови развивается сильный окислительный стресс, приводящий к возрастанию уровня активных форм кислорода (АФК) и скорости накопления малонового диальдегида, с одной стороны, а с другой – в зоне роста опухоли наблюдается уменьшение концентрации кислорода, уровня АФК и продуктов их повреждающего действия. Такие условия способствуют интенсивному росту опухолевых клеток.

Введение. Имеющиеся в литературе данные и исследования нашей лаборатории позволяют утверждать, что фагоциты (ПМЯЛ и макрофаги), одни из основных компонентов неспецифического иммунитета, вовлечены в защитные механизмы организма, которые активируются при развитии опухоли [1,2,3]. Эта защита осуществляется преимущественно путем наработки и/или секреции фагоцитирующими клетками различных соединений – ферментов и химически активных низкомолекулярных соединений, нацеленных на разрушение опухолевых клеток организма. Эти эффекторные клетки осуществляют свою разрушительную функцию, направленную как на бактерии, вирусы, трансформированные так и опухолевые клетки, благодаря образованию АФК во внеклеточной среде – в плазме крови, в асците и межтканевом пространстве. Однако в определенных условиях опухолевая клетка начинает интенсивно размножаться. Какие условия к этому приводят? В нашей лаборатории было обнаружено увеличение числа полиморфноядерных лейкоцитов, их АФК–генерирующей активности и повреждение здоровых клеток в плазме крови опухоленосителя [4]. В связи с этим является актуальным изучение динамических изменений уровня активных форм кислорода и скорости накопления малонового диальдегида (продукта ПОЛ) в плазме крови и асцитной жидкости в процессе роста опухоли.

Материал и методика. В-глюкоза, люминол, ФМА (форбол-12-миристат-13-ацетат), HEPES, Percoll (Sigma); RPMI-1640, , TRIS·HCl, фикол, верографин, ТБА («Агат-Мед», Россия); гепарин (Спофа, Прага); Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, NaCl, (ДиаКон, Россия), Amplex Red (Sigma).

Объект исследования. В качестве объекта исследования выбрана модель развития асцитной гепатомы Зайделя.

Животные. В экспериментах in vivo использовали крыс-самцов линии Вистар весом 200–220г.

Трансплантированная опухоль. Клетки гепатомы Зайделя (АГЗ) трансплантировали в брюшную полость животного путем введения 1 мл ресуспендированых в солевом буфере клеток в концентрации 1×10^7кл/мл. Продолжительность жизни животного с трансплантированной опухолью составляла 12-14 суток.

Бесклеточную асцитную жидкость и плазму крови получали путем дифференциального центрифугирования асцитной жидкости и крови при 500об/мин в течение 10мин и затем при 14000об/мин в течение 10мин. Далее образцы замораживали при -20°С для последующего анализа.

Определение параметров окислительного стресса в крови и асците. Уровень АФК в асцитной жидкости определяли хемилюминесцентным методом. Для этого в кювету, с добавкой люминола (0,125мкмоль), помещали 0,5мл свежеотобранной асцитной жидкости и регистрировали уровень хемилюминесцентного сигнала в течение 10 минут. Для построения калибровочной кривой к образцу асцитной жидкости (0,5мл) вносили 100мкл 4% глутарового альдегида с целью ингибирования АФК-генерирующей активности фагоцитов. Через 10 минут к образцу добавляли люминол (250мкМ) и регистрировали ХЛ-ответ. Затем к асцитной жидкости добавляли раствор H_2O_2 до концентрации 1нМ-1мкМ и регистрировали ХЛ-ответ для сопоставления с экспериментальными значениями.

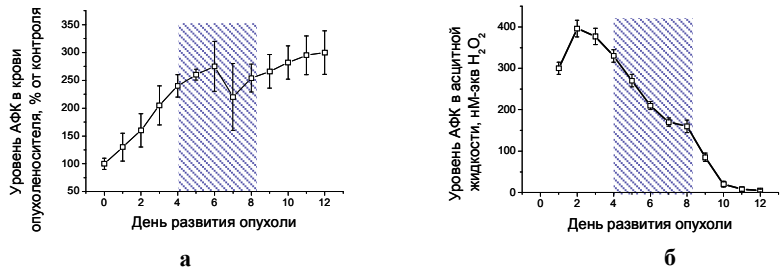
Уровень АФК в крови определяли флуоресцентным методом с использованием в качестве зонда AmplexRed. Образец крови объемом 1мл фиксировали 4% глютаровым альдегидом, добавляли

флуоресцентный зонд в концентрации 10 мкМ, затем инкубировали при 37°С в течение 1 и 2-х часов. Флуоресценцию образцов плазмы крови регистрировали при 570нм [5].

Уровень малонового диальдегида определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты [6].

Результаты и обсуждение. Для описания процессов, протекающих в крови и в асцитной жидкости, период развития опухоли удобно разделить на 3 фазы: начальная (или первая) фаза (1-4 сутки), вторая фаза (5-8 сутки) и третья (или терминальная) фаза (9-12 сутки) развития опухоли. В дальнейшем эти термины будут использованы в работе.

Уровень АФК является результатом как минимум двух разнонаправленных процессов, а именно, наработки АФК фагоцитами и деградации этих соединений антиоксидантами плазмы крови и асцита.



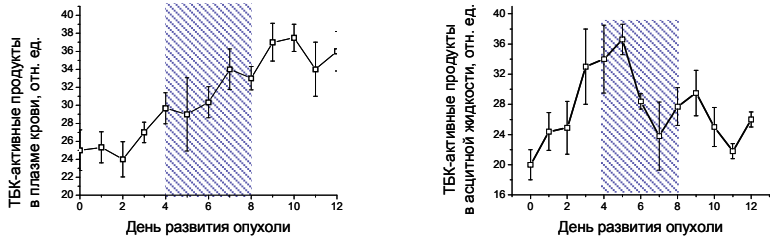
а б

Рис.1. Изменение уровня активных форм кислорода в плазме крови (а) и асците (б) в процессе развития опухоли. (M±m, n=7, p<0,05).

На рис.1а показано, что к середине 2-ой фазы уровень АФК в плазме повышается более, чем в 2,5 раза. Этот результат согласуется с увеличением удельной АФК-генерирующей активности ПМЯЛ крови в 4-5 раз [7] и с увеличением концентрации лейкоцитов в 6-7 раз.

В асците наблюдается возрастание уровня АФК до максимальных значений (до 400нМ H_2O_2) в первой фазе роста опухоли с последующим экспоненциальным снижением до значений, эквимолярных 3-5нМ H_2O_2 (рис.1б).

Развитие окислительного стресса сопровождается накоплением малонового диальдегида, который является одним из продуктов окислительного воздействия АФК на компоненты мембран клеток и внеклеточные липопротеиды. На рис.2а и 2б представлена динамика концентрации малонового диальдегида в плазме крови и в асците соответственно.



а б

Рис.2. Динамика изменения концентрации малонового диальдегида в крови (а) и асците (б) в ходе развития опухоли. (M±m, n=7, p<0,05).

Таким образом установлено, что в процессе развития асцитной опухоли в плазме крови опухоленосителя наблюдается высокий уровень окислительного стресса, что подтверждено увеличением числа фагоцитов и высоким уровнем активных форм кислорода. Последствия этих процессов в плазме проявились в увеличении концентрации продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида). В асците уровень АФК многократно снижается с 390 до 4-5нМ-экв. H_2O_2, что уменьшает концентрацию МДА и создает благоприятные условия для интенсивного роста опухоли.

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*. //Cancer Res. (1989) 49: 528-32;
2. *Kok P.M., van Kessel, Verhoef J.* //Pathobiol. (1990) 58: 249-64;
3. *Pustovidko A., Potselueva M., Evtodienko Y.* //IUBMB Life (2000) 50: 69-73;
4. *Поцелуева М.М. и др.*// Цитология (2005) 47: 1032-8;
5. *Mohanty J.G. et al*. //Immunol. Meth. (1997) 202: 133;
6. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* //Совр. Мет. Биохим. М. (1997): 66-8;
7. *Поцелуева М.М. и др*. //Цитология (1999) 41(2): 162-6.

ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Языкова М.Ю.

Самарский государственный университет

Введение. В основе многих патологических состояний находятся нарушения в продукции и дезактивации активных форм кислорода. Разнообразные факторы внешней среды, такие как избыток токсинов, радиационное загрязнение, ультрафиолетовое облучение, неполноценное питание, витаминно-минеральный дефицит, приводят к накоплению активных форм кислорода и развитию окислительных повреждений. К ним относятся развитие воспалительных и деструктивных процессов, тканевая гипоксия, фиброзное разрастание тканей, клеточная пролиферация и злокачественное перерождение клеток. Накопление активных форм кислорода инициирует перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Перекисное окисление мембранных фосфолипидов является одним из наиболее распространённых механизмов деструкции мембранных структур, приводящее к нарушению нормальной упаковки мембраного бислоя и грозит нарушением целостности клеточной мембраны и структур клетки [2,3]. Окислительный стресс на фоне неблагоприятных факторов внешней среды приводит к дезинтеграции нативных антиоксидантных систем клетки, которые не способны эффективно нейтрализовать активные формы кислорода. В связи с этим для корректировки патологических состояний, связанных с окислительным стрессом, актуальным является использование экзогенных антиоксидантов, одним из которых может стать дигидрокверцетин. Недавно было показано, что дигидрокверцетин не проявляет токсического действия по отношению к клеткам крови, при этом обладает специфической активностью к опухолевым клеткам [7]. Для изучения влияния антиоксиданта на уровень окислительного стресса и на состояние компонентов антиоксидантной и гликолитической систем в качестве клеточной модели нами использовались эритроциты крови человека. Это связано с тем, что данные клетки производят в больших количествах активные формы кислорода и обладают мощной системой антирадикальной защиты, включающей глутатионредуктазную и глутатионпероксидазную системы, супероксиддисмутазу, высокие концентрации каталазы и гемоглобин, обладающий антиокислительной активностью.

Материалы и методы. Объектом исследования служила цельная донорская кровь. Эритроциты получали центрифугированием при 1000g в течение 10 минут. Лейкоцитарную пленку удаляли, а эритроциты трижды промывали 0,9% NaCl. К осажденным эритроцитам добавляли раствор Рингера-Локка. В модельных экспериментах, имитирующих окислительный стресс, использовали 25мМ, 2,5мМ, 0,25мМ растворы $FeSO_4 \times 7H_2O$ и желточные липопротеиды [6]. Пробы инкубировали при 37°С в течение 20 минут, затем определяли содержание метгемоглобина, мембранную проницаемость, скорость поглощения глюкозы, активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Для определения содержания метгемоглобина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы эритроциты подвергали лизису. Мембранную проницаемость определяли колориметрическим методом по изменению оптической плотности при длине волны 540нм в пробе, содержащей 4,5мл физиологического раствора, 5,5мл 0,154М раствора мочевины и 10мкл суспензии эритроцитов до и после полного гемолиза эритроцитов, проведенного добавлением 0,1мл тритона Х-100. Мембранную проницаемость выражали в % по отношению к пробам с полным гемолизом [4]. Содержание метгемоглобина определяли колориметрическим методом по изменению оптической плотности при длинах волн 554нм, 577нм, 630нм в пробах, содержащих 5мл 5мМ фосфатного буфера (рН 7,6) и 20мкл суспензии цельной крови. Процентное содержание метгемоглобина рассчитывали по формуле: $x\%\ MetHв=(E_{630}/\Sigma E_{554,577,630})\times 100\%$ [3]. Скорость поглощения глюкозы определяли глюкозооксидазным методом с помощью стандартного набора реактивов для определения глюкозы Глюко-Стар 250. Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы определяли спектрофотометрическим методом по изменению оптической плотности при длине волны 340нм в пробе объемом 3мл, содержащей 0,1М глициновый буфер рН 8,9; 0,5мМ $НАД^+$; 0,5мМ 3-фосфоглицериновый альдегид и 20мМ арсенат натрия. Активность фермента выражали в мкмоль НАДН/мин/0,5мл осевших эритроцитов.

Результаты. В модельных экспериментах, имитирующих слабый и средний окислительный стресс (0,25мМ и 2,5мМ раствор ($FeSO_4 \times 7H_2O$) достоверных различий в содержании метгемоглобина по отношению к контролю обнаружено не было. Инкубация гетерогенной популяции эритроцитов в течение 20 минут с инициаторами окисления при 25мМ концентрации раствора $FeSO_4 \times 7H_2O$ приводила к увеличению содержания метгемоглобина – 2,5±0,09% (рис.1). Действие дигидрокверцетина на фоне окислительного стресса вызывало снижение концентрации метгемоглобина по отношению к пробам не содержащим дигидрокверцетин – 1,81±0,10%, что вероятно объясняется повышением концентрации доноров SH-групп [8] и стабилизацией метгемоглобинредуктазной системы [4].

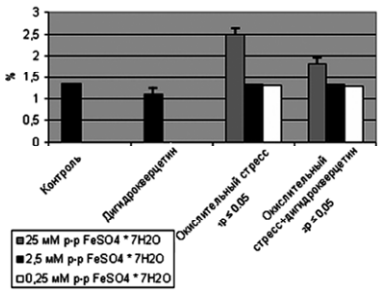


Рис.1. Содержание метгемоглобина, %. 1 – по отношению к контролю, 2 –по отношению к пробам с окислительным стрессом.

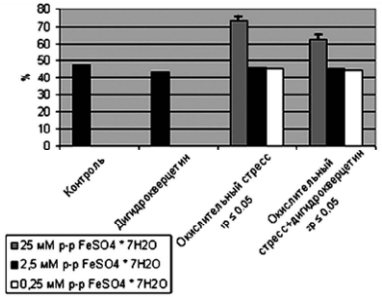


Рис.2. Мембранная проницаемость, %. 1 – по отношению к контролю, 2 – по отношению к пробам с окислительным стрессом.

Одним из интегральных показателей, позволяющих оценить степень деструктивных процессов, вызванных окислительным стрессом, является мембранная проницаемость. В модельных экспериментах, имитирующих слабый и средний окислительный стресс, достоверных различий в показателях мембранной проницаемости обнаружено не было (рис.2). Это связано с тем, что при низких концентрациях окислителя системы антиоксидантной защиты эритроцитов блокируют перекисное окисление липидных компонентов мембран. При сильном окислительном стрессе (25мМ раствор ($FeSO_4 \times 7H_2O$) наблюдали увеличение мембранной проницаемости по отношению к контролю – 73,85±0,17%. Перекисное окисление липидов, сопровождается окислением тиоловых групп мембранных белков. Это приводит к появлению дефектов в липидном слое мембран клеток и образованию пор. Под действием разности электрических потенциалов на мембранах через такие поры в клетки входят ионы натрия. В результате происходит увеличение осмотического давления внутри клеток и их набухание. Это приводит к еще большему повреждению мембран. Накопление свободных радикалов приводит к деструктивному окислению длинноцепочечных углеводородных соединений в клеточных мембранах, в результате чего меняются их свойства [1].

Действие дигидрокверцетина на фоне окислительного стресса приводило к снижению дезинтеграционных процессов в эритроцитах, выражающееся в снижении мембранной проницаемости – 62,50±0,19% по отношению к пробам с окислителем (рис.2). Это может свидетельствовать о том, что дигидрокверцетин оказывает протекторное действие на липопротеины мембран эритроцитов, защищая сопряженные двойные связи от окисления.

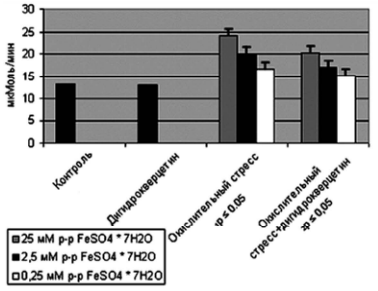


Рис.3. Скорость поглощения глюкозы, мкмоль/мин. 1 – по отношению к контролю, 2 – по отношению к пробам с окислительным стрессом.

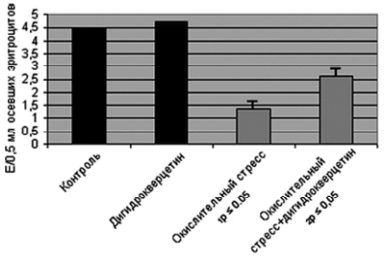


Рис.4. Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, Е/0,5мл осевших эритроцитов. 1 – по отношению к контролю, 2 – по отношению к пробам с окислительным стрессом.

В модельных экспериментах, имитирующих слабый и средний окислительный стресс, было обнаружено увеличение скорости поглощения глюкозы по отношению к контрольным значениям (рис.3), что согласуется с данными Лоу с соавторами [11], показавшими стимулирующее действие пероксида водорода в низких концентрациях на гликолиз в эритроцитах. Увеличение концентрации инициаторов окисления приводило к увеличению поглощения скорости глюкозы, что вероятно связано как с повышением уровня гликолиза, так и с изменением мембранной проницаемости для глюкозы.

Ранее было показано, что дигидрокверцетин оказывает стабилизирующее влияние на мембрану эритроцитов, защищая её от повреждений. По этой причине скорость поглощения глюкозы в условиях совместного действия дигидрокверцетина и окислительного стресса снижается по сравнению с условиями сильного окислительного стресса (20,30±0,04; 17,21±0,03; 15,00±0,02мкмоль/мин) Возможно также, что дигидроквертицин стабилизируя клеточный метаболизм, понижает уровень гликолиза (рис.3).

Другим интересным вопросом является влияние окислительного стресса и дигидрокверцетина на активность гликолитических ферментов. Ранее было показано, что активные формы кислорода ингибируют активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в нейронах [9]. А низкие концентрации H_2O_2 мягко окисляют SH-группы активного центра фермента [10]. В экспериментах, имитирующих сильный окислительный стресс, наблюдалось снижение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (рис.4). Добавление в среду дигидрокверцетина приводило к восстановлению ферментативной активности, которая была

ниже контрольных значений (рис.4). Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа является основным ферментом, определяющим уровень 2,3-дифосфоглицерата в эритроците, поэтому от степени окисления SH-групп активного центра во многом зависит метаболизм эритроцита в целом.

Таким образом действие дигидрокверцетина на фоне окислительного стресса приводило к снижению дезинтеграционных процессов в эритроцитах, выражающееся в уменьшении содержания метгемоглобина, снижении мембранной проницаемости, снижении скорости поглощения глюкозы увеличении активности ГАФД.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бурлакова Е.* //Наука и жизнь (2006) (2): 18-20;
2. *Владимиров Ю.А.* //Природа (1997) (4): 47-54;
3. *Заводник И.Б.* //Молекулярная биология (1992) 26(2): 321-7;
4. *Заводник Н.Б., Лапшина Е.А.* //Биохимия (1996) 61(1): 42-8;
5. *Кадывкина З.М.* //Клиническая медицина (1987) 8: 179-81;
6. *Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О.* //Вестник РАМН (1999) 2: 15-22;
7. *Шаталин Ю.В. и др.* //10-я Междунар. Пущинская школа-конф. молодых ученых (2006);
8. *Шаталин Ю.В.* //Автореферат дисс. к.б.н. Пущино (2008);
9. *Brookes P.S. et al.* //FEBS Letters 416 (1997): 90-2;
10. *Fokina K.V. et al.* //Biochemistry (Moscow) (2000) 65(4): 463-8;
11. *Low P.S., Ratinavelu P., Harrison M.L.* //J.Biol.Chem. (1993) 268:14627-31.

ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА – ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ ФАКТОР РАССЛАБЛЕНИЯ КАРОТИДНЫХ АРТЕРИЙ ГУСЯ

Яковенко И.Н., Жирнов В.В.

Институт биоорганической химии нефтехимии НАН Украины, Киев

Известно, что при стимуляции эндотелия сосудов ацетилхолином помимо $NO^{\bullet}$ освобождаются простациклин (PGI_2) и неизвестная субстанция. Последняя увеличивала электрическую поляризацию клеточной мембраны и таким образом расслабляла гладкомышечные сосудистые клетки преимущественно путем активации в них Ca^{2+}-зависимых K^+ (K_{Ca}) каналов, за что и была названа эндотелиальным гиперполяризующим фактором (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF) [1]. EDHF-компонент эндотелий-зависимого расслабления

может быть выделен для наблюдения только после одновременной блокады образования $NO^{\bullet}$ и PGI_2 и устранен селективными ингибиторами K_{Ca} каналов, такими как тетраэтиламмоний или путем повышения внеклеточной концентрации K^+ до 60мМ [2]. Существуют данные, что эндотелиальная перекись водорода способна функционировать как EDHF в некоторых сосудах [3,4]. Предполагается существование нескольких механизмов EDHF-опосредованного расслабления, в различной степени представленных в разных сосудах и животных.

Цель данного исследования состояла в изучении эндотелий-зависимого расслабления при действии известных ингибиторов клеточной сигнализации и проверке гипотезы о функционировании H_2O_2 в роли EDHF.

Исследования проведены на кольцевых сегментах каротидных артерий гусей и кроликов в изометрическом режиме. Эксперименты проводились при 37°C в модифицированном Кребс-бикарбонатном буфере, содержащем (мМ): 133 NaCl, 4,7 KCl, 10 $NaHCO_3$, 1,38 H_2PO_4, 2,5 $CaCl_2$, 1,2 $MgCl_2$, 10 Hepes, 7,8 глюкозы, pH 7,4. Для изучения эндотелий-зависимого расслабления артерии предварительно сокращали фенилэфрином (ФЭ, 10мкМ) или путем помещения в Кребс-бикарбонатный буфер с эквимолярной заменой 60мМ NaCl на KCl с выходом сосудистого тонуса на устойчивое плато перед добавлением кумулятивных доз ацетилхолина (10^{-9}-10^{-5}М). Для оценки вклада образования EDHF в эндотелий-зависимое расслабление ацетилхолиновую вазорелаксацию регистрировали до и после 30-минутной инкубации сосудистого препарата при совместном действии ингибиторов циклооксигеназы (индометацина, 10мкМ) и NO-синтазы N^G-нитро-L-аргинина (L-NNA, 0,3мМ).

Ацетилхолин вызывал концентрационно-зависимое расслабление предварительно сокращенных ФЭ каротидных артерий гуся и кролика. После механического удаления эндотелия этот медиатор не расслаблял сосуды, что указывает на эндотелий-зависимый механизм ацетилхолиновой вазорелаксации. Сокращенные ФЭ каротидные артерии гуся при совместном действии селективных ингибиторов циклооксигеназы (индометацина, 10мкМ) и NO-синтазы (L-NNA, 0,3мМ) или растворимой гуанилатциклазы (LY83583, 10мкМ) сохраняли мощные ответы релаксации на ацетилхолин (1мкМ). В присутствии индометацина и L-NNA запускаемое ацетилхолином (1мкМ) расслабление сосудов снижалось с 98±1,0 до 74±7,7% от уровня максимального сокращения на ФЭ (10мкМ). Ацетилхолиновая вазорелаксация каротидных артерий гуся в присутствии индометацина также полностью не отменялась неспецифическими ингибиторами гем-содержащих ферментов (гуанилатциклазы, пероксидазы, NO-синтазы и цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ) NaCN (1,5мМ) или Na_2S (1мМ).

В отличие от гуся, ацетилхолиновое расслабление каротидных артерий кролика в присутствии 10мкМ индометацина полностью блокировалось не только L-NNA, NaCN или Na_2S, но и ингибитором растворимой гуанилатциклазы LY83583. Это указывает на исключительно $NO^{\bullet}$-опосредованный механизм ацетилхолиновой релаксации этих сосудов путем активации растворимой гуанилатциклазы. Эффекты Na_2S на эти сосуды были полностью обратимы, т.е. удаление Na_2S из ячейки с изолированным сосудом приводило к быстрому восстановлению исходной величины сосудистого тонуса и ацетилхолиновой вазорелаксации. Хорошо известно, что повышение внеклеточной концентрации K^+ понижает выход K^+ из клетки и таким образом функционально ограничивает влияние калиевых каналов на реактивность и сокращение сосудов. В случае предварительного сокращения сосудистых препаратов кролика путем их помещения в раствор Кребса, в котором 60мМ NaCl эквимолярно замещали на KCl, даже при действии высоких концентраций ацетилхолина (10мкМ) величина расслабления была сравнительно небольшой. После добавления к такому раствору одного из вышеупомянутых ингибиторов L-NNA (0,3мМ), LY83583 (10мкМ), NaCN (1,5мМ) или Na_2S (1мМ) ацетилхолиновая вазорелаксация в сосудах кролика полностью отменялась. Более того, в этом случае ацетилхолин вызывал небольшую вазоконстрикцию, объясняемую прямым действием этого медиатора на мускариночувствительные холинорецепторы гладкомышечных клеток.

Образующиеся цитохром Р-450 монооксигеназами эпоксиэйкозатриеновые кислоты в литературе рассматриваются как EDHF в коронарных артериях свиньи и быка [5,6]. Как отмечено выше, неселективные ингибиторы гем-содержащих белков NaCN и Na_2S не устраняли EDHF-опосредованную релаксацию каротидных артерий гуся, что исключает вероятность функционирования цитохром Р-450 монооксигеназ как EDHF-синтаз в этих сосудах. В литературе также отмечено, что выходящие из эндотелиальных клеток ионы калия и есть EDHF в печеночных артериях крысы, вызывая гиперполяризацию и релаксацию гладкомышечных клеток путем активации в них Na^+/K^+-насоса и K^+ каналов внутреннего тока [7]. В наших исследованиях, комбинированное действие ингибитора Na^+/K^+-насоса уабаина (0,03мМ) с ионами бария (1мМ) не подавляло EDHF-опосредованную вазорелаксацию (табл.).

Дополнительное повышение в физиологическом растворе $[K^+]$ до 20мМ также не вызывало расслабления. Таким образом, возможное локальное увеличение уровня ионов калия между эндотелием и мышечными клетками также не может быть EDHF в исследуемых нами артериях. Роль H_2O_2 как EDHF исследована нами в экспериментах с применением каталазы. В каротидных артериях гуся каталаза

(1000ед./мл) в присутствии индометацина и L-NNA подавляла ацетилхолиновую вазорелаксацию (табл.). Экзогенная H_2O_2 вызывала концентрационно–зависимое расслабление лишенных эндотелия и предварительно сокращенных ФЭ в растворе с физиологическим уровнем K^+ (4,7мМ) каротидных артерий гуся (EC_{50}=75±4мкМ). H_2O_2-вазорелаксация воспроизводилась на одних и тех же сосудистых образцах не менее трех раз с аналогичной EDHF-опосредованной динамикой падения сосудистого тонуса. В аналогичных исследованиях на предварительно сокращенных ФЭ сосудах кролика, H_2O_2 в концентрации до 10мкМ не изменяла, а при 100мкМ, наоборот, вызывала дополнительное повышение сосудистого тонуса (рис.). Это указывает на недостаток в гладкомышечных клетках каротидных артерий кролика внутриклеточных механизмов, участвующих в реализации расслабляющего действия H_2O_2, в отличие от таких же артерий гуся.

Табл. Влияния фармакологических зондов на запускаемое ацетилхолином EDHF-опосредованное расслабление каротидных артерий гуся.

Фармакологические зонды	Максимальная релаксация, %
Отсутствуют	92±3
Каталаза (1000ед./мл)	42±4*
Сахароза (60мМ)	80±7
Уабаин (0,03мМ)+$BaCl_2$ (1мМ)	90±4
2-Меркаптоэтанол (100мкМ)	15±2*
NDGA (10мкМ)	82±4
2–Меркаптоэтанол (100мкМ)+NGDA (10мкМ)	не действует

Все эксперименты выполнены в присутствии индометацина (10мкМ) и L–NNA (0,3мМ). * – достоверные различия относительно контроля ($p<0,05$).

Наблюдаемый эффект H_2O_2 на сосуды кролика не мог быть обусловлен увеличением образования cGMP, поскольку ингибитор растворимой гуанилатциклазы LY83583 (10мкМ) на него не влиял. Таким образом, показано, что ацетилхолин вызывает опосредованное эндотелием расслабление каротидных артерий гуся, которое обладает фармакологическими характеристиками EDHF и запускается ацетилхолином в присутствии комбинации индометацина с L-NNA ($NO^{\bullet}/PGI_2$-независимая вазодилятация). Неполное устранение экзогенной каталазой EDHF может быть обусловлено пространственными и диффузионными ограничениями. В этом случае влияние каталазы на EDHF/H_2O_2 может существенно зависеть от особенностей морфологической организации исследуемых сосудов. Представленные в литературе выводы о том, что EDHF не является H_2O_2, сделанные на основании данных о недостаточно эффективном подавлении каталазой

EDHF в некоторых сосудах [8], на наш взгляд, требуют дальнейшего экспериментального изучения. EDHF-компонент ацетилхолиновой вазорелаксации изучался нами на фоне индометацина, что позволяет исключить циклооксигеназу как EDHF/H_2O_2-синтазу в сонных артериях гуся. Поскольку ингибитор липоксигеназы NDGA существенно не влиял на EDHF-опосредованное расслабление (см. таблицу), образование EDHF/H_2O_2 в исследуемых нами сосудах также не зависит и от этого фермента. На наш взгляд, в сосудах гуся наиболее вероятный источник образования EDHF/H_2O_2 – трансплазматические оксидоредуктазы с негемовыми железо-серными центрами, не подверженные действию NaCN и Na_2S. Возможность участия этих оксидоредуктаз, активирующихся в эндотелиальных клетках при увеличении внутриклеточного Ca^{2+}, требует дальнейшего изучения. Неспособность H_2O_2 вызывать расслабление каротидных артерий гуся, предварительно сокращенных путем повышения внеклеточного уровня K^+ до 60мМ (рис.) свидетельствует о том, что отмеченная выше H_2O_2-зависимая вазорелаксация в растворе с физиологической концентрацией K^+ может быть обусловлена активацией K_{Ca} каналов. Такой механизм межклеточной сигнализации с участием H_2O_2 был показан для гладкомышечных клеток артерий у некоторых животных [9,10]. EDHF-компонент эндотелий-зависимого расслабления каротидных артерий гуся также избирательно блокировался в случае увеличения внеклеточной концентрации K^+. Эти результаты указывают на то, что EDHF также как и экзогенная перекись водорода вызывает расслабление исследуемых сосудов путем активации K_{Ca} каналов. Следовательно, H_2O_2 может рассматриваться как EDHF в каротидных артериях гуся по следующим причинам. Во-первых, H_2O_2-инициированное расслабление и EDHF-компонент ацетилхолиновой вазорелаксации имеют подобную динамику развития реакции и оба отменяются увеличением уровня K^+ в омывающем сосуд физиологическом растворе. Во-вторых, H_2O_2 вызывает расслабление каротидных артерий гуся без эндотелия и этот эффект не может быть обусловлен действием H_2O_2 на эндотелий. В-третьих, H_2O_2 не вызывает расслабление каротидных артерий кроликов, в которых отсутствует собственно $NO^{\bullet}$/PGI_2-независимый компонент ацетилхолиновой вазорелаксации возможно в связи с тем, что K_{Ca} каналы их гладкомышечных клеток слабо подвержены действию H_2O_2. В-четвертых, защита тиоловых групп 2-меркаптоэтанолом (100мкМ) значительно снижает EDHF-компоненту ацетилхолиновой вазорелаксации (табл.). После введения в омывающую сосуд среду комбинации 2-меркаптоэтанола с ингибитором липоксигеназы NDGA, как и в случае сосудов без эндотелия, ацетилхолин не вызывал вазорелаксацию. Последний результат, на наш взгляд, скорее обусловлен

известными антиоксидантными свойствами NDGA [11], поскольку сама NDGA существенно не влияла на EDHF (табл.).

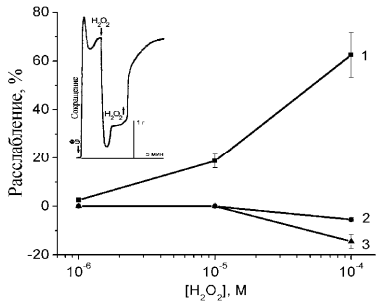


Рис. H_2O_2-вазорелаксации лишенных эндотелия каротидных артерий гуся и кролика. H_2O_2 расслабляла каротидные артерии гуся, предварительно сокращенные ФЭ (10мкМ) при физиологической концентрации внеклеточного K^+ (1) и не влияла на сосуды предсокращенные повышением внеклеточного уровня K^+ до 60мМ (2). H_2O_2 (1-10мкМ) не изменяла тонус сосудов кролика предсокращенных ФЭ (10мкМ) (3). **Вставка:** типичное изменение изометрического сокращения лишенных эндотелия и предсокращенных ФЭ сосудов гуся при действии H_2O_2 (100мкМ).

Перекись водорода не является свободным радикалом и намного более устойчивая молекула, чем $NO^{\bullet}$, но также как и $NO^{\bullet}$ способна проникать через биологические мембраны. Это позволяет H_2O_2 участвовать в межклеточной сигнализации. Функциональная значимость H_2O_2 как эндотелиального расслабляющего фактора, по-видимому, не универсальна для всех сосудов и может варьировать среди артерий различных видов животных. Наши эксперименты на каротидных артериях петуха (неопубликованные данные) показали, что и в этих сосудах также регистрируется мощный EDHF-компонент ацетилхолиновой вазорелаксации. Можно предположить, что EDHF/H_2O_2 в большей степени, чем EDRF/$NO^{\bullet}$ представлен в магистральных сосудах птиц, по сравнению с такими же сосудами млекопитающих и филогенетически принадлежат к наиболее древним медиаторам.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cohen R.A., Vanhoutte P.M.* //Circulation (1995) 92(11)**:** 3337-49;
2. *Nagao T., Vanhoutte P.M.* //J. Physiol. (1992) 445: 355-67;
3. *Matoba T. et al.* //J. Clin. Invest. (2000) 106(12): 1521-30;
4. *Lacza, Z. et al.* //Am. J. Physiol. (2002) 283(1): 406-11;
5. *Hecker M. et al.* //J. Physiol. (1994) 481(Pt2): 407-14;
6. *Fisslthaler B. et al.* //Nature (1999) 401: 493-97;
7. *Edwards G. et al.* //Nature (1998) 396: 26972;
8. *Hamilton C.A. et al.* //Am. J. Physiol. (2001) 280(6), 2451-55;
9. *Thannickal V.J., Kuo L.* //Am. J. Physiol. (2003) 285(6): 2255-63;

10. *Edwards D.H. et al.* //Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2008) 28(10): 1774-81;
11. *Kelly M.R. et al.* //Mutat. Res. (2001) 485(4): 309-18.

ANALYSIS OF SUPEROXIDE FORMATION BY COMPLEXES I AND III

Markevich N.I., Hoek J.B.

Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA

Abstract. The main goal of our studies is to provide a quantitative analysis of ROS production by the mitochondrial respiratory chain by developing a predictive and testable computational model of superoxide formation, to be used in modeling and experimental studies of alterations in the mitochondria associated with the onset of apoptosis. A kinetic scheme of electron transfer from NADH and succinate to O_2 through numerous electron carriers was developed based on an analysis of experimental data from the literature. Electron transfer in Complexes I and III was described in detail to take into account the functional state of electron carriers responsible for bypass reduction of O_2 resulting in superoxide production. A mathematical model was developed that describes the oxidized and reduced states of different carriers and the electron flow through Complexes I, II, III and IV. The model consists of 33 ordinary differential equations. Values of model parameters, rate constants and concentrations of different electron carriers, were obtained from experimental data in the literature on the thermodynamics and kinetics of electron transfer in the respiratory chain.

Introduction. In addition to role of mitochondria as a source of ATP, regulation of apoptosis is a second important function of these organelles. It is linked to their role in generation of reactive oxygen species (ROS) mainly by Complexes I and III of the respiratory chain. Excessive ROS production can result in opening MPT pore in the membrane, release of cytochrome c and other pro-apoptotic proteins, which can initiate apoptosis. Therefore, it is very important to understand how mitochondria produce ROS and regulate ROS production. There are a lot of excellent papers devoted to this topic (for review see [1,2]), however, mechanisms of ROS production and its regulation in the respiratory chain are not completely understood. One of the reasons for that is a complex organization of electron and ion flows in the respiratory chain supporting ROS production, the analysis of which is difficult when based just on experimental studies. Significant added insight into the regulatory features of these flows that could account for numerous available experimental data, sometimes contradictory, is a computational systems biology approach. In this work, we tried to develop a predictive and testable computational model of superoxide formation by Complexes I and III, to be used in modeling and experimental studies of alterations in the mitochondria associated with the onset of apoptosis.

Computational Analysis of the Model. Kinetic scheme of the respiratory chain includes: a) NAD(H), flavine mononucleotide (FMN), sequence of iron-sulfur centers beginning N1a and N3 and ending N2 center, and coenzyme Q in Complex I; b) Succinate, Fumarate and coenzyme Q in Complex II; c) coenzyme Q, non-heme iron-sulfur protein (ISP), cytochromes bL, bH and c1 in Complex III; and d) cytochrome c. Electron transfer in Complexes I and III were described in most detail to take into account electron carriers states responsible for bypass reactions of reduction of O_2 resulting in superoxide anion $O_2^{\bullet-}$ formation.

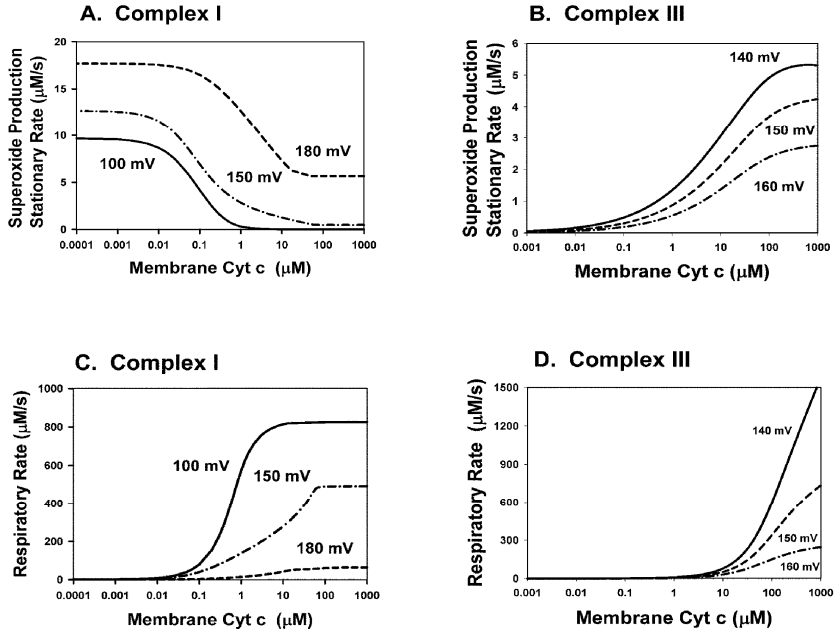


Fig.1. Computer simulated dependence of the rates of superoxide $O_2^{\bullet-}$ production and respiration on Cyt c concentration in the membrane at different membrane potential in complexes I and III. NADH (Fig.1A,C) or succinate (Fig.1B,D) were modeled as substrates of respiration.

The rate of $O_2^{\bullet-}$ generation by complexes I and III depends on the electron flow through the respiratory chain. There are contradictory experimental data on the relationship between the rates of superoxide generation and respiration. This relationship strongly depends on the

experimental conditions. Therefore, production of superoxide by these complexes was studied quantitatively using the mathematical model under conditions close to apoptosis, i.e., inhibition of the respiratory chain resulting from a depletion of cyt *c* in the membrane and an increase in membrane potential. Results show that the presented model accounts for numerous available experimental data and can be used in studies of ROS-dependent alterations in the mitochondria associated with apoptosis. Some computational modeling results on superoxide anion generation by Complexes I and III are presented in Figs.1-3.

These Figures demonstrate a principal difference in the shape of $O_2^{\bullet-}$ formation rate at inhibition of respiration in Complexes I and III. Inhibition of electron flow induces transition of electron carriers to reduced states and it should favor $O_2^{\bullet-}$ generation in both complexes I and III. However, our computational results show that an increase in $O_2^{\bullet-}$ formation at the respiratory chain inhibition (a depletion of cyt c) occurs only in complex I (Fig.1A,C) that is compatible with literature experimental data [3]. By contrast, the complex III rate of $O_2^{\bullet-}$ generation (Fig.1B) follows the respiration rate (Fig.1D) and decreases at a depletion of cyt c to 10-100μM. Quantitative analysis shows that so unusual relation between $O_2^{\bullet-}$ formation rate and respiration can be accounted for as follows. A reduction of O_2 by semiquinone anion $Q^{\bullet-}$ at Qo-site of complex III occurs in the reversible reaction: $bL.Q.^-.ISPH+O_2=bL.Q.ISPH+O_2^{\bullet-}$. Midpoint redox potentials $E_m(O_2/O_2^{\bullet-})$ and $E_m(Q/Q^{\bullet-})$ in Qo-site are approximately equal -150 and -160mV, respectively. That means equilibrium constant of this reaction is close to 1 and $O_2^{\bullet-}$ generation rate strongly depends on concentration of complex bL.Q.ISPH which is the second product (beside $O_2^{\bullet-}$) of this reaction. Concentration of bL.Q.ISPH increases at inhibition of respiration because of a strong increase in reduced ISPH resulting from both a depletion of cyt c and an increase in membrane potential. Thus, a paradoxical decrease in $O_2^{\bullet-}$ generation rate by complex III at inhibition of respiration can be accounted for by an increase in concentration of the second product bL.Q.ISPH of bypass reaction of O_2 reduction to $O_2^{\bullet-}$.

Fig.2A shows the inversely proportional dependence between rates of $O_2^{\bullet-}$ generation and respiration at inhibition of respiration by very high values of membrane potential in Complex I. This is compatible with literature experimental data [4] and repeats inversely proportional dependence at inhibition of respiration by a depletion cyt c in the membrane. Dependence of the $O_2^{\bullet-}$ production rate on membrane potential in Complex III (Fig.2B) is more complex and has non-monotone shape. At very high values of membrane potential the rate of $O_2^{\bullet-}$ generation follows the respiration rate and decreases at an increase in membrane potential for same reasons as in Fig.2. However, the $O_2^{\bullet-}$ production rate increases as membrane potential increases at low values of membrane potential when the respiration rate is saturated. It results

from the potential-dependent step in electron transfer from cytochrome bL to cytochrome bH. An increase in membrane potential results in an increase in reduced bL and semiquinone, as a source of electrons for $O_2^{\bullet-}$ production.

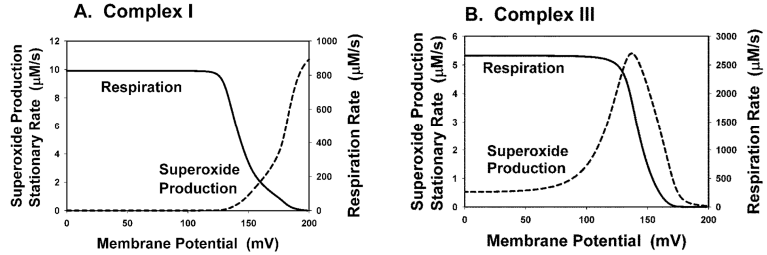


Fig.2. Computer simulated dependence of the rates of superoxide $O_2^{\bullet-}$ production and respiration on membrane potential in complexes I and III. NADH (Fig.2A) or succinate (Fig.2B) were modeled as substrates of respiration.

Fig.3 presents our modeling results of the dependence of the rate of $O_2^{\bullet-}$ production on oxidized Q fraction. Drose and Brandt have shown recently experimentally [5] that an increase in the fraction of reduced ubiquinone above some critical value (about 75%) in the presence of Antimycin A results in a paradoxical decrease in superoxide generation by Complex III. They proposed that oxidized ubiquinone supports superoxide formation at Qo site by acting as a redox mediator to transfer electrons from reduced cytochrome bL onto oxygen in a reverse reaction of Qo site. Taking into account this hypothesis and in order to account for these experimental observations we suggest that coenzyme Q can leave Qo site before electron transfers from bL to bH. This is the reaction: $bL^-.Q.ISPH=bL^-+Q+ISPH$. Fig.3 shows a good quantitative description of non-monotone dependence of the $O_2^{\bullet-}$ production rate on oxidized Q with maximum about 25-30% at this suggestion.

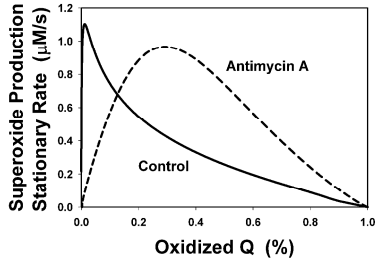


Fig.3. Superoxide anion generation by Complex III is increased by a partially oxidized Q pool in the presence of Antimycin A.

Conclusions

1. A predictive and testable computational model of superoxide $O_2^{\bullet-}$ formation consisting of 33 ordinary differential equations which describes oxidized and reduced states of different carriers and electron flows through Complexes I, II, III and IV was developed. The model includes real parameters, rate constants and concentration of different electron carriers, which were taken from literature experimental data on thermodynamics and kinetics of electron transfer in the respiratory chain. Electron transfer in Complexes I and III was described in more detail to take into account the functional state of electron carriers responsible for bypass reduction of O_2 resulting in superoxide production.

2. Computational analysis of the model has shown that the $O_2^{\bullet-}$ production rates by Complexes I and III depend on the respiratory rate in an opposite manner. Inhibition of the respiratory rate at a depletion of cyt c in the membrane results in an increase in the $O_2^{\bullet-}$ production rate in Complex I and its decrease in Complex III. In other words, the $O_2^{\bullet-}$ production rate in Complex III follows the respiration rate and there is the inversely proportional dependence between rates of $O_2^{\bullet-}$ generation and respiration in Complex I. Dependence of the $O_2^{\bullet-}$ production rate in Complex III on membrane potential is more complex and is non-monotone because of an existence of potential-dependent electron transfer from cytochrome bL to bH.

This work was supported by NIH grants K25 AA016604 (NIM) and R01 AA015311 (JBH).

REFERENCES

1. *Andreyev A.Y., Kushnareva Y., Starkov A.* //Biochemistry (2005) 70(2): 200-14;
2. *Murphy M.P.* //Biochem. J. (2009) 417(1): 1-13;
3. *Kushnareva Y., Murphy A. N., Andreyev A.* //Biochem. J. (2002) 368(2): 545-53;
4. *Starkov A.A., Fiskum G.* //J. Neurochem. (2003) 86(5): 1101-7;
5. *Drose S., Brandt U.* //J. Biol. Chem. (2008) 283(31): 21649-54.

***

СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ МИТОХОНДРИЙ. БИОЭНЕРГЕТИКА

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ Ca^{2+}-ЗАВИСИМЫХ ПОР, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЦИКЛОСПОРИНУ А, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСТОЙЧИВОСТИ ЖИВОТНОГО К ГИПОКСИИ

Белослудцева Н.В., Белослудцев К.Н., Лукьянова Л.Д., Миронова Г.Д.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Открытие неселективной Ca^{2+}-активируемой поры во внутренней мембране митохондрий является одним из ключевых процессов в индукции клеточной смерти, однако механизмы ее образования и регуляции до конца не ясны. В настоящее время принято различать два типа митохондриальных пор. Наиболее хорошо изучена пора, образованная при участии белков внутренней (аденилаттранслокатор, циклофилин Д и другие) и наружной (порин) мембран митохондрий (Mitochondrial Permeability Transition pore – MPT) [1,2]. Открытие такой поры происходит, как правило, в условиях массивной перегрузке клеток ионами Ca^{2+}, и подавляется иммунодепрессантом циклоспорином А (ЦсА). Однако известно, что в некоторых случаях образование митохондриальной поры не ингибируется циклоспорином А. Так, недавно было показано, что низкие концентрации пальмитиновой кислоты (ПК) и Ca^{2+} вызывают открытие короткоживущей ЦсА-нечувствительной поры, механизм образования которой, вероятно, отличается от общепризнанного [3,4]. В нашей лаборатории развивается представление о том, что митохондриальная пора, активируемая пальмитатом и Ca^{2+}, имеет липидную природу. В основе этого предположения лежит тот факт, что ПК обладает способностью связывать Ca^{2+} со сродством, которое на 1-2 порядка выше, чем сродство ненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов и других липидов, и сравнимо со сродством к Ca^{2+} ряда Ca^{2+}-связывающих белков [5]. Механизм образования поры может быть объяснен тем, что связывание анионов ПК с Ca^{2+} в модельной мембране вызывает фазовую сегрегацию жирной кислоты в твердые мембранные домены. Это ведет к фазовому переходу в липидном бислое и формированию самопроизвольно затекающих липидных пор [6].

Открытие этой короткоживущей поры может иметь непосредственное отношение к механизму индукции программируемой клеточной гибели, так как недавно было установлено, что пальмитиновая

кислота является природным активатором апоптоза, и ее добавление к культуре клеток приводит к открытию митохондриальной Ca^{2+}-активируемой поры и выбросу из органелл белков, вызывающих в клетке апоптотические изменения [7]. Напротив, что касается ЦсА-чувствительной митохондриальной поры, то ее открытие рассматривается сейчас как основная причина некроза клеток и массивного повреждения тканей, происходящих при ишемии-реперфузии [8].

Как известно, в условиях гипоксии наблюдается нарушение кальциевого гомеостаза клеток, а также повышение содержания в них свободных жирных кислот, главным образом пальмитиновой, что может являться причиной образования в митохондриях двух вышеописанных типов пор. В то же время установлено, что лабораторные животные различаются по чувствительности к гипоксическим условиям, причем этот признак закреплен генетически [9]. Целью настоящей работы было изучение функционирования митохондриальных ЦсА-нечувствительной пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры и ЦсА-чувствительной поры (МРТ) в зависимости от устойчивости крыс к гипоксии, а также при адаптации животных к недостатку кислорода.

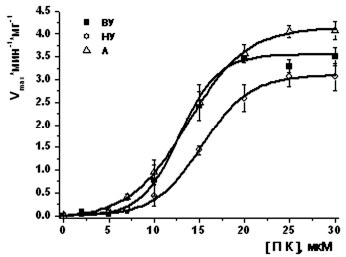


Рис.1. Зависимость скорости пальмитат/ Ca^{2+}-индуцированного набухания митохондрий печени высокоустойчивых (ВУ), низкоустойчивых (НУ) и адаптированных (А) к гипоксии крыс от концентрации ПК. Набухание индуцировалось 5-30мкМ ПК и 30мкМ $CaCl_2$. Приведены средние значения±ошибка средней (n=4-6).

Тестирование животных на устойчивость к гипоксии проводилось в проточной барокамере с контролируемой подачей воздуха [9]. В группу высокоустойчивых к гипоксии крыс были отобраны те животные, которые выдерживали острую гипобарическую гипоксию, соответствующую пребыванию на высоте 11500м в течение 10-15мин до 2-го агонального вдоха. Низкоустойчивые животные выдерживали эту высоту только 1-1.5мин. Проводилась также адаптация к гипоксии низкоустойчивых крыс по схеме интервальной гипоксической тренировки. Для этого низкоустойчивые к гипоксии животные помещались в барокамеру, в которую подавался воздух с концентрацией кислорода в два раза ниже нормы (10% O_2) на 10 минут 5 раз в день с 3-х минутными интервалами. Во время интервалов в камеру подавался воздух с нормальным содержанием кислорода. Процедуру повторяли в

течение 12 дней. Показано, что при адаптации крыс такой тренировкой, время жизни животного при подъеме на высоту, характеризующее общую неспецифическую резистентность крыс, увеличивается после первой тренировки на 20-60%, а в последующие 20 дней превышает исходную резистентность низкоустойчивых животных в 2 раза [9].

В то же время, курсовая тренировка (12 раз) низкоустойчивых животных в условиях нормобарической гипоксии приводила к тому, что скорость пальмитат/Ca^{2+}-индуцированного набухания митохондрий печени адаптированных к гипоксии крыс увеличивалась по отношению к показателям низкоустойчивых животных и достигала значений высокоустойчивых к гипоксии животных.

Противоположный эффект наблюдался при индукции ЦсА-чувствительной МРТ избыточным Ca^{2+} в присутствии 2мМ KH_2PO_4 (таблица 1). Для оценки образования МРТ рассчитывали Ca^{2+} ёмкость митохондрий, определяемую после массивной загрузки органелл дробными добавками $CaCl_2$ (по 20мкМ). После нескольких добавок Ca^{2+}, концентрация внешнего Ca^{2+} в инкубационной среде с митохондриями резко увеличивалась, что свидетельствовало о массивном выходе иона из органелл вследствие открытия МРТ во внутренней митохондриальной мембране.

Табл. Ca^{2+} емкость митохондрий печени и сердца крыс, обладающих разной устойчивостью к гипоксии.

Тип животного в зависимости от устойчивости к гипоксии	Ca^{2+} емкость митохондрий печени, мкМ Ca^{2+}/5мг белка	Ca^{2+} емкость митохондрий сердца, мкМ Ca^{2+}/1мг белка
Высокоустойчивые	364.0±16.7	156.7±37.9
Низкоустойчивые	252.0±46.0	117.5±5.0

*-Приведены средние значения±ошибка среднего (n=4-5).

Из таблицы видно, что Ca^{2+} емкость митохондрий печени и сердца высокоустойчивых животных значительно выше, по сравнению с низкоустойчивыми животными. Это говорит о том, что открытие МРТ поры происходит легче в митохондриях низкоустойчивых крыс, чем в митохондриях высокоустойчивых животных.

Полученные данные указывают на различные механизмы физиологической регуляции исследуемых митохондриальных пор – МРТ и пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры.

Можно предположить, что физиологическая активация короткоживущей пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры в митохондриях печени высокоустойчивых и адаптированных к гипоксии животных является своего рода защитным механизмом, предотвращающим накопление в органеллах активных форм кислорода (АФК) в гипоксических условиях. Для проверки этого предположения были

исследованы скорости образования АФК при индукции пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры в митохондриях печени крыс, обладающих разной устойчивостью к гипоксии (рис.2). Образование АФК измеряли флуориметрически с помощью 10мкМ 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H_2-DCFDA) в присутствии пероксидазы хрена (2ед/мл).

Эксперименты показали, что скорость накопления АФК снижается при образовании поры в митохондриях печени высокоустойчивых крыс, но увеличивается при образовании поры в митохондриях печени низкоустойчивых крыс. При этом начальная (в контроле, без индукции поры) скорость образования АФК митохондриями печени высокоустойчивых крыс была выше, по сравнению с таковой у низкоустойчивых крыс (рис.2).

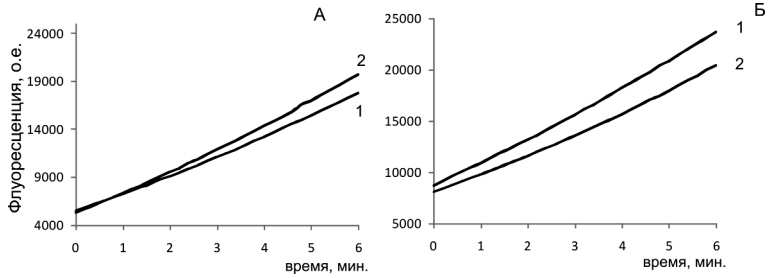


Рис.2. Скорость образования АФК митохондриями низко- (А) и высокоустойчивых (Б) к гипоксии крыс в контроле (без добавок) (1) и после открытия пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры (2). Добавки: 1 – без добавок; 2 – 15мкМ ПК и 30мкМ Ca^{2+}. Среда инкубации содержала 210мМ маннитол, 70мМ сахароза, 5мМ сукцинат калия, 6мкМ ЭГТА, 1мкМ ротенон, 1мкМ ЦсА, 10мМ Хепес-КОН (pH 7,4).

Как известно, образование митохондриями активных форм кислорода лежит в основе гипоксического повреждения тканей. Этот процесс можно предотвратить, вызвав в митохондриях «мягкое» разобщение [10]. Считается, что именно это явление лежит в основе кардиопротекторного действия активаторов митохондриального АТФ-чувствительного K^+ канала при ишемии-реперфузии [11,12]. С другой стороны, мягкое разобщение в митохондриях можно индуцировать микромолярными концентрациями свободных жирных кислот, которые в норме содержатся в мембранах органелл. Показано, что повышенная экспрессия разобщающих белков (UCP-1, 2), осуществляющих перенос через мембрану анионной формы жирной кислоты в цикле разобщения, защищает ткань от повреждения при ишемии-реперфузии [13,14]. Более того, недавно было обнаружено, что ишемическая прекондиция приводит к усилению разобщающего действия жирных кислот [15].

Исходя из полученных в настоящей работе результатов, другим возможным механизмом адаптации животных к гипоксии может быть индукция в митохондриях короткоживущей пальмитат/Ca^{2+}-активируемой поры. Функционирование этой поры совместно с кальциевым унипортером способно вызывать мягкое разобщение [16] и за счет этого предупредить критическое образование АФК в митохондриях, которое является основным разрушающим фактором при гипоксии.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. *Zoratti M., Szabo I.* //Biochim. Biophys. Acta (1995) 1241: 139-176;
2. *Leung A., Varanyuwatana P., Halestrap A.P.* //JBC (2008) 283: 26312-23;
3. *Sultan A., Sokolove P.* //Arch. Biochem. Biophys. (2001) 386: 31-51;
4. *Mironova G.D. et al.* //J. Bioener. Biomembr. (2004) 36: 171-8;
5. *Mironova G.D. et al.* //J. Bioener. Biomembr. (2001) 33: 319-31;
6. *Agafonov A.V. et al.* //J. Membr. Biol. (2007) 215(1): 57-68;
7. *Sparagna G.C. et al.* //Am. J. Phys. Heart Circ. Phys. (2000) 279: 2123-32;
8. *Li Y. et al.* //Biochem. J. (2004) 383: 101-9;
9. *Лукьянова Л.Д.* //Пробл. гипоксии (2004) 156-170;
10. *Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A.* //FEBS Lett. (1997) 416(1): 15-8;
11. *Garlid K. et al.* //Biochim. Biophys. Acta (2003) 1606(1-3): 1-21;
12. *Миронова Г.Д. и др.* //Вестник РАН (2007) 2: 44-50;
13. *Diano S. et al.* //Endocrinology (2003) 144(11): 5014-21;
14. *Hoerter J. et al.* //Circulation (2004) 110(5): 528-33;
15. *Carreira R.S. et al.* //J. Bioenerg. Biomembr. (2007) 39: 313-20;
16. *Mironova G.D. et al.* //J. Bioenerg. Biomembr. (2007) 39: 167-74.

ДОБАВЛЕНИЕ В РАЦИОН СТАРЫМ ГРЫЗУНАМ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ ВОССТАНАВЛИВАЕТ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Бронников Г.Е.[1], *Кулагина Т.П.*[1], *Ариповский А.В.*[2]

[1]Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино
[2]ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

Старение населения развитых стран и «омоложение» ряда заболеваний, которые до недавнего времени считались болезнями пожилого возраста, привлекает все большее внимание к проблемам возрастных изменений. Гипотеза «окислительного стресса», как основной причины повреждения клеток и органов (*Harman D. et al*, 1972) за последние 30 лет стала доминирующей в объяснении возрастных изменений. Известно, что до 80% активных форм кислорода в организме образуется в митохондриях. При нарушении функционирования митохондрий количество перекисных радикалов многократно возрастает *(Sipos I. et al*, 2003). Активные формы кислорода повреждают как белки и липиды, так и митохондриальную ДНК, что блокирует нормальное воспроизведение целого ряда митохондриальных ферментов, часть субъединиц которых кодируется этой ДНК. Накапливающиеся нарушения приводят к дефициту в клетках АТФ, ослаблению функции органов, гибели клеток и старению тканей, а далее к развитию таких болезней как саркопения (потеря мышечной массы), болезнь Паркинсона, диабет второго типа и другие. Поэтому поиск соединений, способных защитить дыхательную цепь митохондрий от повреждающего действия активных форм кислорода является актуальной задачей. Целью данной работы являлось исследование влияния добавок антиоксиданта дигидрокверцетина и ряда растительных масел в рацион старым мышам и крысам на активность ферментов дыхательной цепи митохондрий в мышечной ткани.

Дигидрокверцетин (ДГК), биологически активный полифенол из семейства флавоноидов, является сильным антиоксидантом. Защитное действие ДКГ показано при ряде патологических состояний (*Теселкин Ю.О. и др.*, 1999). Свободные жирные кислоты также способны модулировать образование активных форм кислорода по нескольким механизмам (*Pamplona R. et al*, 2002; *Shonfeld P. and Wojtczak L.*, 2008) Кроме того, введение в рацион животным растительных масел может модифицировать жирнокислотный состав митохондриальных мембран, что может повлечь изменение активности мембранных ферментов. Оливковое масло содержит до 80% мононенасыщенной олеиновой

кислоты, которой свойственен низкий окислительный потенциал. С высоким содержанием этой кислоты связывают защитный эффект оливкового масла (*Trichopoulou A. et al*, 2007; *Quiles J.L. et al*, 2004). Персиковое масло наряду с высоким содержанием олеиновой кислоты (до 70%) содержит более 20% линолевой кислоты. Линолевая кислота является основной полиненасыщенной кислотой в крови и тканях млекопитающих и в значительной степени может подвергаться перекисному окислению. Четыре ацильных остатка линолевой кислоты входят в состав кардиолипина. Этот фосфолипид обеспечивает связь цитохром-*c*-оксидазы с митохондриальной мембраной и абсолютно необходим для ее нормального функционирования (*Musatov A. et al*, 2006). Отличительной особенностью соевого масла является высокое содержание линоленовой кислоты (около 10%), кроме того, в нем содержится до 50% линолевой и 20% олеиновой кислоты. Арахисовое масло содержит более 40% олеиновой и более 30% линолевой жирных кислот. Гидрогенизация масла приводит к восстановлению ненасыщенных жирнокислотных цепей. В экспериментах использованы молодые и старые беспородные мыши популяции Kv:SHK Крюковского центрального питомника и крысы *Wistar* питомника на ст. Столбовая.

Возраст мышей на момент начала получения ДГК и масел составлял 23 месяца, а возраст крыс был в пределах 30-33 месяцев. На протяжении 6 недель мыши получали *per os* порцию водного раствора ДГК (50мкл, 1мг/мл), либо 50мкл оливкового или персикового масла; крысы получали 0.5-0.7мл соевого или гидрогенизированного арахисового масла в течение того же периода. Контрольные старые животные получали аналогичную порцию воды. Молодые контрольные мыши имели возраст 2-3 месяца, крысы – 6-7 месяцев. Активность цитратсинтазы (маркер плотности митохондрий в тканях), NADH-коензим-Q1-оксидоредуктазы (комплекс 1, начало дыхательной цепи митохондрий) и цитохром-*c*-оксидазы (комплекс 4, завершающий фермент дыхательной цепи) в гомогенате четырехглавой мышцы бедра определяли спектрофотометрическим методом. Жирнокислотный состав гомогената мышечной ткани определяли на хроматографах HP5890 (Хъюлетт-Пакард) и Хром-5.

Полученные в наших исследованиях результаты показали, что у старых мышей активность NADH-коензим-Q1-оксидоредуктазы, цитратсинтазы и цитохром-*c*-оксидазы достоверно снижена по сравнению с активностью этих ферментов в скелетных мышцах молодых особей ($P \leq 0.03$, $P \leq 0{,}006$ и $P \leq 0.02$, соответственно, Рис.1). Введение ДГК в рацион старым мышам привело к увеличению активности упомянутых ферментов. Активности цитратсиназы и комплекса 1 имели промежуточные значения между активностями этих ферментов в тканях молодых и старых животных. Активность цитохром-*c*-оксидазы в

мышцах старых мышей под влиянием ДГК восстанавливалась до уровня активности фермента в тканях молодых мышей.

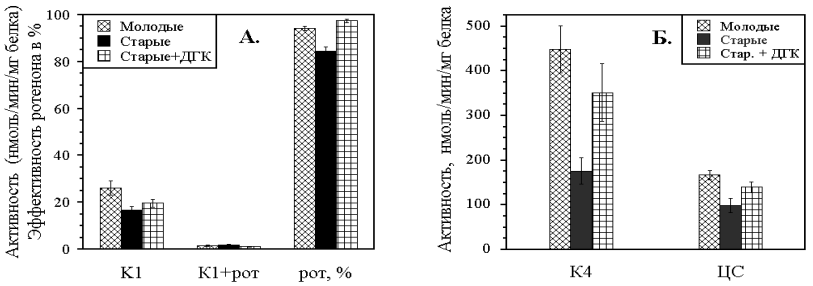


Рис.1. Восстановление активности митохондриальных ферментов в скелетных мышцах старых мышей при добавлении в пищу дигидрокверцетина. (А) комплекс 1 в отсутствие (К1) или в присутствии ротенона (К1+рот) и эффективность ингибитора в %. (Б) цитохром-*c*-оксидаза (К4) и цитратсинтаза (ЦС). Данные представлены как среднее пяти экспериментов±среднеквадратичная ошибка.

Жирнокислотный состав гомогената мышечной ткани контрольных старых мышей и мышей, получавших ДГК, отличался от такового в тканях молодых особей. В мышечной ткани старых мышей достоверно снижалось процентное содержание линолевой кислоты, возрастало процентное содержание стеариновой и докозановых кислот, а также увеличивалось суммарное количество жирных кислот в пересчете на мг белка ткани. Введение ДГК в рацион старым мышам не оказывало значимого влияния на содержание жирных кислот в мышечной ткани. Однако для всех жирных кислот прослеживалась слабая тенденция изменения их содержания в направлении, характерном для жирнокислотного состава мышечной ткани молодых особей.

Механизм действия ДГК на активность митохондриальных ферментов пока неясен. Препарат оказывает ингибирующий эффект на свободнорадикальное окисление как водорастворимых, так и жирорастворимых субстратов (*Теселкин Ю.О. и др.*, 1996), способен проникать внутрь мембранного бислоя и изменять физические свойства мембран. Полагают, что ДГК обладает избирательным сродством к определенным липидам и белкам клеточной мембраны, может инициировать сегрегацию raft-подобных липидных доменов, что влияет на активность мембранно-связанных ферментов (*Tarahovsky Y.S. et al.*, 2008). Введение в рацион старым мышам оливкового и персикового масел не выявило их достоверных эффектов ни на активность дыхательных ферментов митохондрий, ни на жирнокислотный состав гомогената мышечной ткани. Однако при использовании персикового масла прослеживается слабая тенденция как к восстановлению

активности комплекса 1 дыхательной цепи митохондрий, так и к изменению жирнокислотного состава мышечной ткани в направлении, характерном для молодых особей. Не исключено, что для получения значимых эффектов сроки получения животными растительных масел должны быть более длительными.

Интересные результаты были получены при кормлении маслами крыс. В отличие от мышей в мышечной ткани старых крыс наблюдалось значительное снижение активности комплекса 1 и 4, тогда как активность цитратсинтазы оставалась на уровне, характерном для молодых животных. Прием соевого масла привел к полному восстановлению активности комплекса 1 у старых особей (рис.2.), однако активность комплекса 4 у принимавших масло старых крыс оказалась даже ниже, чем у старых особей, не получавших пищевых добавок. Вероятно, высокое содержание в соевом масле полиненасыщенных кислот может способствовать дополнительному образованию значительного количества продуктов перекисного окисления, поскольку активность антиоксидантных систем снижается с возрастом. Повреждение кардиолипина, играющего ключевую роль в поддержании структуры и функции комплекса 4, по литературным данным (*Musatov A. et al.*, 2006) является основной причиной потери активности ферментом. Механизм восстановление активности комплекса 1 при введении в рацион соевого масла остается пока неясным. Возможно, это связано с высоким содержанием не только линолевой, но и линоленовой кислоты, которое характерно для жиров рыб, а также меньшей чувствительностью комплекса 1 к перекисному окислению липидов.

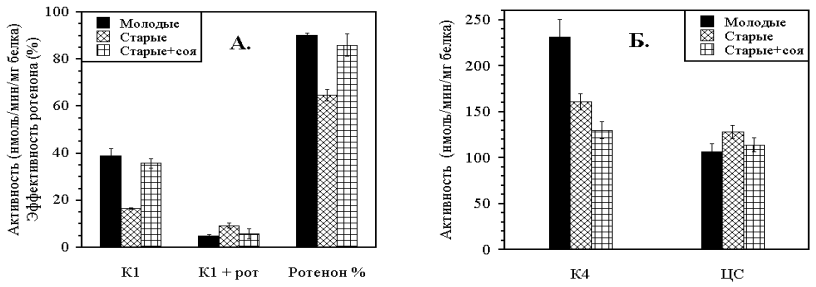


Рис.2. Восстановление активности митохондриальных ферментов в скелетных мышцах старых крыс при добавлении в пищу соевого масла. (А) комплекс 1 в отсутствие (К1) или в присутствии ротенона (К1+рот) и эффективность ингибитора в %. (Б) цитохром-*c*-оксидаза (К4) и цитратсинтаза (ЦС). Данные представлены как среднее трёх экспериментов±среднеквадратичная ошибка.

При кормлении крыс арахисовым маргарином восстановление активности комплекса 1 было статистически значимым, хотя и не 100%, тогда как активность комплекса 4 у старых и молодых особей полностью совпадала. (рис.3.). Чувствительность комплекса 1 к ингибированию ротеноном у крыс, получавших соевое масло или маргарин, восстанавливалась полностью. Активность цитратсинтазы практически не зависела от возраста крыс и их рациона. Полное восстановление активности комплекса 4 при введении в рацион гидрогенизированного арахисового масла может быть связано с высоким содержанием в нем насыщенной стеариновой кислоты (С18:0), что в значительной мере снижает риск дополнительного образования липидных перекисей. Стеариновая кислота входит в состав интегральных липидов цитохром-*c*-оксидазы сердца быка. Она составляет 12% жирнокислотных цепей триглицеридов, которые эффективно стабилизируют субъединичный ансамбль цитохром-*c*-оксидазы. Методом рентгеноструктурного анализа и в модельных экспериментах показана специфическая роль стеариновой кислоты в механизме транспорта кислорода в комплекс 4 (*Shinzawa-Itoh K. et al*, 2007).

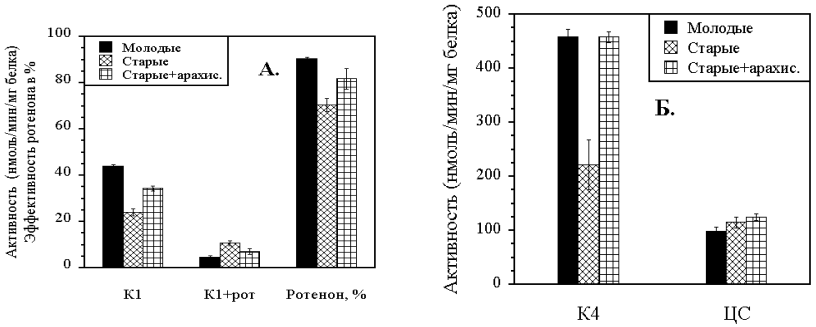


Рис.3. Восстановление активности митохондриальных ферментов в скелетных мышцах старых крыс при добавлении в пищу гидрогенизированного арахисового масла. (А) комплекс 1 в отсутствие (К1) или в присутствии ротенона (К1+рот) и эффективность ингибитора в %. (Б) цитохром-*c*-оксидаза (К4) и цитратсинтаза (ЦС). Данные представлены как среднее трёх экспериментов±среднеквадратичная ошибка.

В публикациях последних трех лет, посвященных исследованию комплекса 4, авторы обсуждают роль специфического взаимодействия липидов с определенными участками субъединиц цитохром-с-оксидазы. Показано, что связывание липидов играет важнейшую роль в поддержании и регуляции активности митохондриального дыхательного комплекса. Оказалось, что белок и жирнокислотные цепи липидов, образующие митохондриальную мембрану, способны формировать

достаточно жесткие и стабильные структуры, где изменение положения жирнокислотных цепей или замена одних типов цепей на другие может приводить к модификации или полной потере активности дыхательным комплексом. Эти проблемы могут быть связаны с нарушением трансмембранного переноса H^+ или канала доставки O_2 в цитохром-с-оксидазу, или потерей взаимодействия между субъединицами 4-го комплекса (*Qin L. et al*, 2007; *Varanasi L. et al*, 2006).

Таким образом, в нашей работе показано, что восстановление активности комплексов 1 и 4 в мышечной ткани старых животных возможно при введении в рацион животным ДГК, соевого или гидрогенизированного арахисового масел даже в финальный период их жизни. Положительный эффект пищевых добавок наблюдался уже после относительно короткого периода кормления животных, что делает их применение весьма перспективным для выяснения конкретных механизмов восстановления активности дыхательных ферментов. В отличие от представленных в этом сообщении результатов, в подавляющем числе публикаций на эту тему эффект пищевых добавок исследуется начиная, практически, со дня рождения животных. Это весьма непрактично, если предполагается в будущем использовать биологически активные добавки для замедления старения людей, так как негативные процессы начинают проявляться в возрасте не ранее 25-30 лет.

Данная работа не была поддержана РФФИ и выполнена на средства авторов.

PBR-МОДУЛИРУЕМОЕ ФОСФОРИЛОРОВАНИЕ БЕЛКОВ В МИТОХОНДРИЯХ АСТРОЦИТОВ

Грачев Д.Е.[1], Крестинина О.В.[1], Бабурина Ю.Л.[1], Райзер Г.[2], Азарашвили Т.С.[1]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Институт нейробиохимии, Магдебург, Германия.

Известно, что астроциты являются звездчатыми нейронами и самостоятельную роль в мозге. Клетки нейроглии не «обслуживают» прочие нейроны, а, по-видимому, связаны с обработкой получаемой информации и образуют собственную сигнальную систему. Несмотря на некоторое сходство функций глиальных астроцитов и нейронов, было показано, что функционирование периферического бензодизепинового рецептора (PBR) в этих клетках отличается от прочих органов. Обнаружено, что препараты, ингибировавшие диазепамсвязывающие

способности PBR в клетках различных тканей, не способны предотвратить связывание [^{3}H]Ro 5-4864, специфического лиганда PBR/TSPO (TSPO – translocator protein, белок-переносчик) с сайтами связывания бензодиазепинов периферического типа астроцитов.

TSPO/PBR – 18кДа белок, экспрессируется в различных органах и тканях [1], первоначально был обнаружен на внешней мембране митохондрий [2], где он располагается в контактный сайтах между внутренней и внешней мембранами [3] и образует тримерный комплекс с митохондриальным порином и переносчиком адениновых нуклеотидов [4], предполагаемыми на тот момент компонентами PTP (permeability transition pore). Однако, все большее число авторов сходится на том, что данный комплекс является комплексом не PTP, а PBR.

В предыдущих работах мы обнаружили, что некоторые мембраносвязанные белки в митохондриях мозга и печени крыс подвержены белковому киназ-зависимому фосфорилированию, которое регулируется вторичными мессенжерами. Кроме того, было показано, что уровень фосфорилирования значительно меняется при Ca^{2+}-индуцированном открытии поры [5-8].

В настоящей работе охарактеризовано функциональное состояние митохондрий астроцитов при помощи одновременной регистрации мембранного потенциала, скорости аккумуляции и выхода Ca^{2+} из митохондрий и скорости потребления кислорода. Используя модифицированный нами метод авторадиографии, мы обнаружили около пяти неизвестных белков митохондрий астроцитов, степень фосфорилирования которых коррелирует с активацией PTP и модулируется лигандами PBR.

Первичные клеточные культуры астроцитов выделяли из мозга новорожденных крыс. Митохондрии астроцитов выделяли по модифицированному нами методу Алмеиды (9).

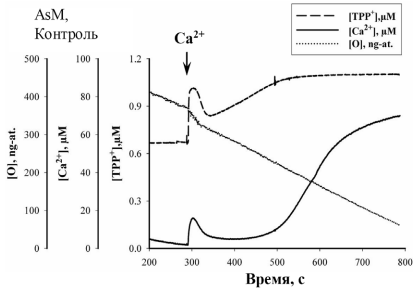


Рис.1. Определение митохондриальных функций при Ca^{2+}-индуцированном открытии PTP. Шкала времени отражает время после добавления митохондрий. Митохондрии (1мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 120мМ KCl, 10мМ Tris-HCl (pH 7.4), 0.4мМ KH_2PO_4, 5мМ сукцинат калия и 2.5мкМ ротенон.

На рисунке 1 показано, что после добавления Ca^{2+} происходит его поглощение и удержание его в митохондриях до достижения «пороговой» концентрации, после чего наблюдается высвобождение

аккумулированного кальция, характеризующего открытие PTP. При этом происходит полное падение мембранного потенциала и освобождение Ca^{2+} из матрикса митохондрий.

Табл.1. Параметры митохондрий изолированных из культуры первичных астроцитов

Емкость Ca^{2+}	Скорость поглощения Ca^{2+}	Скорость выброса Ca^{2+}	V_3/V_4 (RCR)
85±12	45±8	42±11	2.5±0.3

В таблице 1 представлен количественный анализ параметров, характеризующих функциональное состояние изолированных митохондрий астроцитов. Найдено, что пороговое значение Ca^{2+} составляло порядка 85нмоль/мг белка, что намного меньше, чем в несинаптических митохондриях мозга (RBM, 180-210нмоль/мг). Параметры транспорта Ca^{2+} показывали величины близкие к RBM. Соотношение V_3/V_4, характеризующее дыхательный контроль было 2.5, что говорит об интактности мембран изолированных митохондрий астроцитов и сопряженности системы окислительного фосфорилирования.

Так как фосфорилирование мембранных рецепторов, ионных каналов и транскрипционных факторов является ключевым событием внутриклеточной сигнализации, мы сочли необходимым исследовать, какие пептиды, в митохондриях астроцитов способны включать меченый фосфат. В результате были обнаружены ^{32}P-содержащие белки с молекулярными массами 67, 56, 48, 46, 30 и 3.5кДа, отличающиеся по уровню фосфорилирования. Следует отметить, что если 67, 46-48 и 3.5кДа фосфобелки были ранее обнаружены нами и в митохондриях мозга, то 56 и 30кДа белки выявлены только в митохондриях астроцитов. На рисунке 2Б показаны относительные уровни включения ^{32}P в обнаруженные фосфорилируемые белки митохондрий астроцитов. С помощью поликлональных антител к TSPO было продемонстрировано, что в митохондриях астроцитов содержится одна иммунно-реактивная полоса на уровне 18кДа (рис.3), отражающая присутствие только мономерной формы TSPO как было обнаружено и митохондриях мозга [10]. Нами было показано, что белки митохондрий мозга и печени подвергаются фосфорилированию различными протеинкиназами [7,8].Кроме того, в митохондриях обнаружен якорный белок PAP-7, связывающий как PBR, так и ПКА.

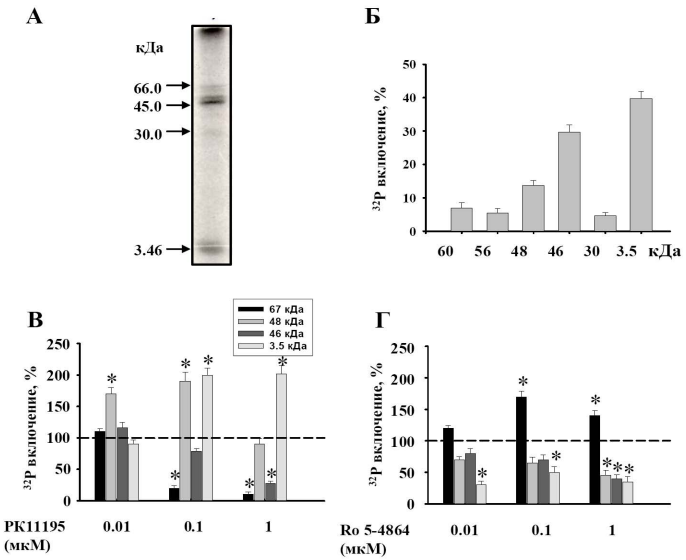


Рис.2. ПААГ-анализ ^{32}P меченных белков в митохондриях астроцитов, инкубированных с [γ-^{32}P]АТР. *Панель А*: Авторадиограмма фосфобелков в митохондриях астроцитов. *Панель Б*: Относительные уровни фосфорилирования (включения ^{32}P в фосфобелки). Степень фосфорилирования белков была посчитана как процент от общего числа фосфо-илированных белков. *Панель В*: относительные уровни фосфорилирования белков с молекулярными массами 67, 48, 46 и 3.5кДа в присутствии РК11195. *Панель Г*: относительные уровни фосфорилирования белков с молекулярными массами 67, 48, 46 и 3.5кДа в присутствии Ro 5-4864.

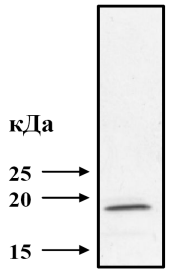


Рис.3. Определение TSPO в митохондриях астроцитов. Аликвоту митохондриальной суспензии разделяли методом электрофореза в денатурирующих условиях с последующим переносом на мембрану (нитроцеллюлоза) методом Вестерн блот и последуюей покраской при помощи поликлональных антител к PBR.

Известно, также, что белки комплекса PBR способны к пост-трансляционному фосфорилированию посредством протеинкиназы А и тирозиновой протеинкиназы [11-15]. Таким образом, в митохондриях существует система, способная регулировать функционирование, в частности PTP, посредством фосфорилирования белков. В связи с этим,

следующим этапом исследований было выяснение влияния высокоаффинных лигандов TSPO/PBR – РК11195 и Ro 5-4864 – на фосфорилирование митохондриальных белков астроцитов. На рисунке 4А представлено изменение уровней фосфорилирования при различных концентрациях РК11195. Видно, что при повышении концентрации РК11195 от 0.1 до 1мкМ уровни фосфорилирования 46 и 67кДа белков заметно снижались. В этих же условиях уровень включения ^{32}P в 48кДа белок и 3.5кДа пептид при концентрации лиганда 0.01мкМ имел незначительный уровень включения ^{32}P, дальнейшее увеличение концентрации РК11195 (0.1-1.0мкМ) вызывало повышение уровня фосфорилирования в два и более раза.

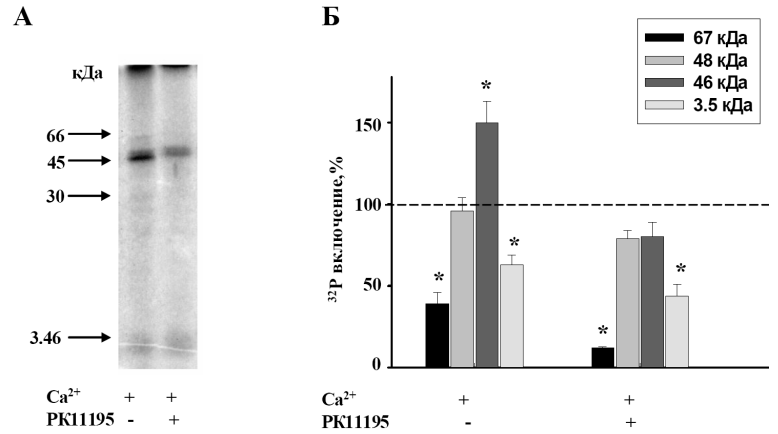


Рис.4. Изменения уровней фосфорилирования белков в присутствии и отсутствии лиганда TSPO/PBR, РК11195 в условиях открытия поры. *Панель А* автоадиограмма фос-форилированных белков в условиях PTP и в присутствии РК11195 в этих условиях. *Панель Б*: диаграмма, отражающая относительные уровни фосфорилирования в митохондриях астроцитов в условиях PTP и в присутствии РК11195 в этих условиях. Фосфорилирование пептидов в интактных митохондриях было взято за 100% (контроль).

На рисунке 4Б показано изменение уровней фосфорилирования при различных концентрациях агониста PBR, Ro 5-4864. При повышении концентрации лиганда в ряду 0.01-1мкМ степень включения ^{32}P в полипептид с молекулярной массой 67кДа увеличивалась. В этих условиях уровень фосфорилирования 48, 46 и 3.5кДа белков уменьшался по сравнению с контролем. Интересно отметить противоположный эффект агониста Ro 5-4864 и антагониста РК11195 на включение ^{32}P в белки митохондрий астроцитов. Полученные данные показывают, что митохондрии астроцитов более чувствительны к бензодиазепинам, но

менее чувствительны к изохинолинам, по сравнению с несинаптическими митохондриями мозга крысы. Таким образом, новая роль TSPO/PBR в митохондриях, может заключаться в модуляции фосфорилирования белков в митохондриях, лежащей в основе регуляторного действия TSPO/PBR.

В своих предыдущих исследованиях мы обнаружили, что РК11195 может воздействовать на фосфорилирование белков при открытии РТР [10], поэтому в данном исследовании мы решили проверить, каким образом РК11195 влияет на фосфорилирование белков в митохондриях астроцитов в присутствии концентраций Ca^{2+}, инициирующих открытие поры. На рисунке 5А приведена авторадиограмма фосфорилированных белков после открытия поры и в присутствии 10нМ РК11195. На рис 5Б показан количественный анализ уровней фосфорилирования фосфобелков в условиях РТР. Видно, что уровень фосфорилирования 67 и 3.5кДа белков значительно снижался при открытии поры, а присутствиие100нМ РК11195 усиливало этот эффект. Степень включения ^{32}P в 48кДа полипептида при этом не изменялась, но в присутствии РК11195 происходило снижение уровня фосфорилирования, приблизительно на 20%. Степень включения ^{32}P в 46кДа фосфопептид при нагрузке Ca^{2+} увеличивалась на 50% по сравнению с контролем, но в присутствии РК11195 включение ^{32}P снижалось. Действующая концентрация изохинолинкарбоксамида оказались в 10 раз ниже для RBM, по сравнению с митохондриями астроцитов.

Анализ полученных результатов и литературных данных по влиянию лигандов TSPO/PBR на фосфорилирование митохондриальных белков позволяют предположить, что TSPO/PBR-зависимая модуляция активностей протеинкиназ и протеинфосфатаз может служить ключевым элементом в TSPO/PBR-индуцируемом каскаде сигнальной трансдукции в митохондриях и клетках.

Авторы выражают глубокую благодарность доктору Строкину М.Л. за предоставленные культуры первичных астроцитов.

Работа поддержана грантами РФФИ №08-04-00723 и BMBF 01ZZ0107

ЛИТЕРАТУРА

1. *Papadopoulos V. et al.* //Trends Pharmacol. Sci. (2006) 27: 402-9;
2. *Anholt R.R. et al.* //J. Biol. Chem. (1986) 261, 576-83;
3. *Gulty M. et al.* //J. Steroid Biochem. Mol. Biol. (1999) 69: 123-30;
4. *McEnery M.W. et al.* //Proc. Natl. Acad. .Sci. USA (1992) 89: 3170-4;
5. *Azarashvily T.S. et al.* //Biochem. Biophys. Res. Comm. (2000) 270: 741-4;
6. *Azarashvili T. et al.* //J. Bioenerg. Biomembr. (2002) 34: 279-84;
7. *Azarashvili T. et al.* //Cell Calcium (2003) 34: 253-9;

8. *Azarashvili T.S. et al.* //J. Neurochem. (2005) 94: 1054-62;
9. *Almeida A., Medina J.M.* //Brain Res. (1997) 764(1-2): 167-72;
10. *Azarashvili T.S. et al.* //Cell Calcium (2007) 42(1): 27-39;
11. *Parola A.L., Yamamura H.I., Laird H.E.* //Life Sci. (1993) 52, 1329-42;
12. *Sardanelli A.M. et al.* //FEBS Lett. (1995) 377(3): 470-4;
13. *Papadopoulos V.* //Endocr. Rev. (1993) 14: 222-40;
14. *Li H. et al.* //Mol. Endocrinol. (2001) 15: 2211-28;
15. *Lui J., Li H., Papandopoulos V.* //J. Steroid. Biochem. (2003) 85: 275-83.

ВЛИЯНИЕ γ-L-ГЛУТАМИЛГИСТАМИНА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Гулидова Г.П., Струкова Е.В.

ЗАО Научно-Производственный Медико-Биологический Центр «ИНДИВИД», Москва

Научные достижения химии и биологии позволяют по-новому, на молекулярно-клеточном уровне подходить к проблемам диагностики состояния здоровья человека и его восстановления. Известна центральная роль энергетического обмена в регуляции процессов метаболизма клетки и выживаемости организма при заболевании.

В регуляции функционирования органов и тканей важная роль принадлежит перекисным соединениям и веществам антиокислительного ряда. Увеличение уровня перекисей в клетках, равно как и снижение антиоксидантов, приводят к нарушению стабильности клеточных мембран и уменьшению активности ферментов.

Влияние биологически активных веществ, в том числе лекарственных препаратов на окислительные и энергетические процессы осуществляются либо путем их непосредственного действия на ферменты дыхательной цепи митохондрий, либо опосредованно – вследствие влияния на структуру и функцию митохондриальных и клеточных мембран, а также изменения их рецепторных структур.

В последние годы появились сведения о новом соединении – γ-L-глутамилгистамине (Витаглутам), синтезированном на кафедре химии и технологии тонких органических соединений МИТХТ им. Д.И. Менделеева (патент №2141968), оказывающем положительное действие на самые разные виды обмена (липид регулирующее, гипогликемическое, антиасматическое, гепатопротекторное, противовирусное, антибактериальное и т.д.). Однако, отсутствуют сведения о влиянии этого соединения на окислительные и энергетические процессы.

Работа посвящена изучению влияния Витаглутама (ВГ, предоставлен фирмой ООО «Фарм Интерпайсиз») на энергетический обмен изолированных митохондрий (МХ) в норме и на фоне воздействия биологически активных компонентов сыворотки крови больного человека, моделирующих нарушение энергетических функций МХ, свойственное больному организму. Кроме того, изучались антиокислительные свойства этого препарата.

Материалы и методы. В работе применён метод индивидуальной оценки особенностей окислительных и биоэнергетических нарушений у пациентов с использованием в тест-системе изолированных МХ, сыворотки крови больных и факторов, нормализующих биоэнергетику МХ, ранее разработанный сотрудниками НП МБЦ «ИНДИВИД» 2.3

В качестве тест-объекта используются МХ изолированные из печени крыс линии Вистар, забитых декапитацией. Выделение митохондрий проводили по методу [2]. Среда выделения содержала: 0,32М сахарозу, 0,02М трис, 0,1мМ ЭДТА и альбумин сывороточный 0,2мг/мл, pH 7,4. Измерение поглощения кислорода МХ производилось полярографическим методом.

Активность окислительных ферментных систем МХ (сукцинатоксидазы и цитохром С: цитохромоксидазы) определяли полярографическим методом. Среда инкубации для определения активности сукцинатоксидазы содержала: 10мМ сукцинат калия, 0,17М сахарозу, 30мМ KCl, 10мМ KH_2PO_4, 0,2мМ ЭДТА, 20мМ трис-HCl, 10^{-6}М ротенон и 75мМ 2,4-динитрофенол, pH-7,4. Для определения активности цитохром С: цитохромоксидазы: 0,17М сахарозу, 30мМ KCl, 10мМ KH_2PO_4, 0,2мМ ЭДТА, 20мМ трис-HCl, 5мМ аскорбат, 0,2мМ тетраметилпарафенилендиамин, антимицин А – 1нг/мл.

Мембраны эритроцитов выделяли стандартным методом из цельной гепаринизированной крови. Об уровне перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по накоплению в среде инкубации ТБК-реактивных продуктов, определяемых по методу [4]. Белок определяли по методу Lowry et al. [5]. Изменение показателей принимали за действительное, когда уровень значимости (Р) по Стьюденту был меньше 0,05. Обследовано 27 человек, больных разными хроническими заболеваниями, из них 16 человек ликвидаторы аварии на ЧАЭС и 11 человек, не подвергавшихся воздействию ионизирующей радиации.

Результаты и обсуждение. Результаты экспериментов по влиянию ВГ на биоэнергетические показатели интактных МХ печени крыс представлены в таблице 1. Как следует из представленных данных, ВГ в концентрациях 2,3мкМ, 23мкМ и 230мкМ практически не изменяет скорость дыхания МХ в 3-ем метаболическом состоянии (V3), имеется тенденция к снижению скорости дыхания в МХ 4-ом метаболическом состоянии (V4). Существенно, что эффективность фосфорилирования (АДФ/О), скорость фосфорилирования (Vфос) и дыхательный контроль

МХ под влиянием Витаглутама (2,3-230мкМ) незначительно повышается на 4,4%, 9,1% и 14,9%, соответственно при окислении сукцината а при окислении глутамата с малатом - на 10,8%, 14,2% и 8,5%, соответственно.

Табл.1. Действие Витаглутама в разных концентрациях на интактные МХ.

Субстрат окисления		N	V_3	V_4	АДФ/О	$V_{фос}$	ДК
Сукцинат	Интактные МХ: а) абс. ед.;	12	165,0±8,2, $\frac{нАт.O_2}{мин\ мгбелка}$	49,2±2,14, $\frac{нАт.O_2}{мин\ мгбелка}$	1,80±0,05, $\frac{нМ\ АДФ}{нАт.O_2}$	281,5±13,0, $\frac{нАт.O_2}{мин\ мгбелка}$	3,34±0,08, усл.ед.
	б) в %.	12	100%	100%	100%	100%	100%
	ВГ (в%) а) 2,3мкМ	12	99,3±1,8%	86,6±2,1%	103,6±2,3%	106,2±2,9%	114,3±3,6%
	б) 23мкМ	12	98,0±1,9%	85,0±2,3%	99,6±2,6%	99,4±3,4%	114,8±3,0%
	в) 230мкМ	2	105,0±9,0%	93,5±3,5%	110,0±12,0%	120,5±5,5%	115,5±9,5%
Глутамат+ малат	Интактные МХ: а) абс. ед;	14	120,9±6,4, $\frac{нАт.O_2}{мин\ мгбелка}$	36,3±2,1, $\frac{нАт.O_2}{мин\ мгбелка}$	2,31±0,06, $\frac{нМ\ АДФ}{нАт.O_2}$	274,5±16,9, $\frac{нАт.O_2}{мин\ мгбелка}$	3,49±0,15, усл.ед.
	б) в %.	14	100%	100%	100%	100%	100%
	ВГ (в %) а) 2,3мкМ	14	99,1±2,5%	92,9±3,5%	107,7±2,6%	108,5±2,8%	110,9±4,7%
	б) 23мкМ	14	103,4±3,2%	95,2±5,8%	109,5±4,0%	115±4,6%	114,2±6,7%
	в) 230мкМ	4	104±4,3%	112,8±6,9%	115,3±12,7%	119,2±8,3%	100,3±7,9%

В таблице 2 представлены результаты экспериментов по влиянию ВГ на окислительный и энергетический метаболизм МХ, нарушенный воздействием сыворотки крови обследуемых. Как следует из представленных данных, сыворотка крови исследуемой группы пациентов при окислении сукцината практически не изменяет ДК и интенсивность потребления кислорода МХ, существенно снижая сопряженность процессов окисления (АДФ/О) на 21% и скорость образования АТФ (Vфос) на 18%. Витаглутам в концентрации 2,3мкМ и 23мкМ оказывают нормализующее действие на энергетический метаболизм МХ, нарушенный сывороткой крови обследуемых пациентов. При этом статистически достоверно повышается сопряженность процессов окисления и образования АТФ (АДФ/О) до 96% и 95%, соответственно, а скорость фосфорилирования (Vфос) до 91% и 90%, соответственно. Скорость дыхания в четвертом метаболическом состоянии снижается под влиянием ВГ в концентрации 2,3мкМ и 23мкМ на 21% и 20%, что указывает на повышение энергизованности МХ.

При окислении глутамата с малатом наблюдается подобная картина: сыворотка крови не изменяет V3, V4 и ДК, достоверно снижая АДФ/О на 21% и Vфос на 26%. ВГ в концентрации 2,3мкМ и 23мкМ нормализует нарушенные биоэнергетические показатели, повышая АДФ до 94% и 92%, соответственно. Скорость фосфорилирования повышается до 83% и 81% при воздействии ВГ в концентрации 2,3мкМ и 23мкМ.

Скорость V4 снижается до 77% и 77%, соответственно. Аналогичный эффект на показатели окисления и образования энергии, нарушенные воздействием сыворотки крови обследованных, оказывают антиоксиданты – дитиотреитол (ДТТ) и ингибиторы АТФаз – хлористый литий (LiCl). Полученные данные свидетельствуют о том, что имеется две основные причины нарушения биоэнергетики МХ при воздействии сыворотки крови пациентов: активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повышение активности митохондриальных АТФазных систем. ВГ оказывает нормализующее действие на активность этих метаболических систем, следствием чего является нормализация функционирования МХ.

Табл.2. Влияние Витаглутама на биоэнергетические показатели митохондрий крыс, на фоне воздействия сыворотки крови обследованных (в % к интактным МХ, принятым за 100%). Обследовано 22 человека.

Показатели	Действие сыворотки, %	Сыворотка+ Витаглутам 2,3мкМ,%	Сыворотка+ Витаглутам 23мкМ,%	Сыворотка+ ДТТ, 250мкМ	Сыворотка+ LiCl, 2мМ
Сукцинат: V_3	102±2,79	97±3,22	95±3,75	93±2,68	96±3,33
V_4	102±3,84	81±3,42*	82±3,34*	85±3,28[1]	81±3,31*
АДФ/О	79±1,28	96±3,07*	95±2,73*	96±2,90*	96±2,79*
Vфос	82±1,83	91±2,78[1]	90±2,68**	92±2,32[1]	91±2,84[1]
ДК	102±1,87	119±3,08	117±3,53	110±2,74	119±3,07
Глутамат+ малат: V_3	94±2,73	88±2,57	87±3,30	85±2,18	88±2,57
V_4	94±3,23	77±2,68*	77±3,52*	77±3,43*	76±2,68*
АДФ/О	79±1,75	94±2,27[1]	92±3,22[1]	98±2,05*	94±2,27*
Vфос	74,±2,36	83±2,35[1]	81±2,57	81±2,25	83±2,34[1]
ДК	100±2,25	116±3,73	114±5,55	111±3,57	116±3,73

*p<0,001 достоверность различий между действием сыворотки и нормализующих добавок, **p<0,05достоверность различий между действием сыворотки и нормализующих добавок, [1]p<0,01 достоверность между действием сыворотки и нормализующих добавок.

В следующей серии экспериментов исследовалось влияние ВГ на уровень ПОЛ в мембранах эритроцитов человека (табл.3). Как следует из представленных данных обследованная группа пациентов разделилась на 2-е подгруппы. В подгруппе 1 уровень ПОЛ в мембранах эритроцитов находится в пределах нормы. В подгруппе 2 наблюдается повышение уровня ПОЛ в 3,5 раза.

ВГ достоверно снижает уровень ПОЛ в мембранах эритроцитов подгруппы №2. При этом более эффективное ингибирующее действие проявляет ВГ в концентрации 2,3мкМ (снижение на 25%) в сравнении с концентрацией 23мкМ (снижение ПОЛ на 13%, не достоверно).

Табл.3. Влияние Витаглутама на уровень ПОЛ в мембранах эритроцитов человека. N= 24 чел.

Уровень ПОЛ		ПОЛ, нМ/мг белка	ПОЛ+Витаглутам 2,3мкМ		ПОЛ+Витаглутам 23мкМ	
			нМ/мг белка	% изменения	нМ/мг белка	% изменения
Здоровые		12,9-27,1				
Больные	подгруппа1(n=7)	17,8±1,4	17,1±1,1	-3,7	17,7±1,4	-1,6
	подгруппа2 (n=17)	62,4±4,1*	45,3±2,8[1]	-25	52,8±3,6	-13

*p<0,001 достоверность различий между 1-й и 2-й подгруппами, [1]p<0,01 достоверность различия при действии Витаглутама 2,3мкМ на содержание МДА во 2-й группе.

Представляло интерес выяснить, на каком участке дыхательной цепочки происходит нарушение окислительных процессов при воздействии сыворотки крови человека и роль ВГ в восстановлении нарушенных функций. Как следует из данных, представленных в таблице 4, ВГ в концентрациях 2,3 и 23мкМ не изменяет активность сукцинатоксидазы и цитохром С: цитохромоксидазы в интактных МХ.

Табл.4. Влияние Витаглутама на активность ферментных систем в митохондриях крыс, на фоне действия сыворотки крови человека. (в процентах к интактным МХ, принятым за 100%).

Фермент	Действие сыворотки % крови	Сыворотка+Витаглутам 2,3мкМ, %	Сыворотка+ Витаглутам 23мкМ, %
Сукцинатоксидаза: Интактные МХ (n=12)	100%	102,9±6,3	101,5±5,2
Больные: подгруппа 1 (13 чел)	101,2±2,7	95,4±3,5	95,2±3,2
подгруппа 2 (9 чел)	76,6±5,0*	84,2±2,4[1]	80,0±4,2
Цитохром С: цитохромоксидаза Интактные МХ (n=9)	100%	107,4±7,4	98,4±6,5
Больные (21человек)	108,4±2,9	107,9±3,1	106,1±3,5

*-p<0,001 достоверность различий в действии сыворотки между 1-й и 2-й подгруппами, [1]p<0,05 достоверность различий между действием сыворотки и нормализацией ВГ 2,3мкМ активности фермента. Подгруппа 1: активность сукцинатоксидазы не меняется под действием сыворотки; Подгруппа 2: активность сукцинатоксидазы снижается под действием сыворотки

По направленности влияния сыворотки крови на активность этих ферментных систем пациенты распределяются на 2-е подгруппы: в подгруппе №1 – сыворотка крови не оказывает ингибирующего действия на активность сукцинатоксидазы, а в подгруппе №2 – значительно, на 24,5% снижается активность этой ферментной системы. ВГ – 2,3мкМ достоверно повышает активность сукцинатоксидазы до 84%, а при его

использовании в концентрации 23мкМ выявляется тенденция к повышению активности этой ферментной системы.

Активность цитохром С цитохромоксидазы не изменяется при воздействии сыворотки крови и ВГ не оказывает влияния на активность этой ферментной системы.

Итак, впервые, установлены следующие факты:

1. Выявлена тенденция к повышению активности интактных МХ под влиянием ВГ (2,3мкМ, 23мкМ, 230мкМ).
2. ВГ (2,3мкМ и 23мкМ) оказывает нормализующее действие на ряд показателей энергетического обмена МХ (V_4, АДФ/О, $V_ф$), нарушенных под влиянием сыворотки крови пациентов с разными нозологическими формами заболеваний.
3. Аналогичный нормализующий эффект на биоэнергетику МХ оказывают антиоксиданты и ингибиторы фосфатаз.
4. ВГ (2,3мкМ) оказывает нормализующее действие на уровень ПОЛ мембран эритроцитов обследуемых пациентов, обладает антиоксидантным действием.
5. Нормализующий эффект ВГ на биоэнергетику МХ определяется его антиоксидантным действием на ПОЛ в МХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Небольсин В.Е., Желтухина Г.А., Евстигнеева Р.П.* //Патент №2141968;
2. *Гулидова Г.П., Полянская Н.П.* //Ж. Невроп. Псих. (1970) 70(8): 1211-21;
3. *Гулидова Г.П., Полянская Н.П.* //Ж. Невроп. Псих. (1973) 73(1): 110-6;
4. *Тимирбулатов Р.А., Селезнев Б.И.*//Лаб. Дело (1981) 4: 209-11;
5. *Lowry O.H. et al.* //J. Biol. Chem. (1951) 193(1): 265-71.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АЛКИЛИРУЮЩИХ СОЕДИЕНИЙ НА МИТОХОНДРИИ: ЭФФЕКТ ОТКРЫВАНИЯ НЕСПЕЦФИЧЕСКОЙ ПОРЫ.

Еремеев С.А.[1], Костава В.Т.[2], Ягужинский Л.С.[3]

[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[2]Институт сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, Москва
[3]НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Решение проблемы химиотерапии злокачественных опухолей, в значительной мере связаны с созданием препаратов, направленно действующих на клетки опухолей. В 80-ые годы большое развитие получили исследования по созданию противоопухолевых агентов алкилирующего типа, которые в значительной мере оправдали свое назначение. В ряду этих агентов были найдены высокоэффективные соединения, в том числе ряда 2-хлорэтиламинов, эффективность и избирательность действия которых была доказана в модельных экспериментах на животных и в клинике. В этой связи для создания новых противоопухолевых веществ обладающих большей избирательностью действия, представляется важным более детально исследовать действие уже известных соединений, показавших себя в клинике как высокоэффективные противоопухолевые вещества. Известно, что алкилирующие соединения действуют не только на ядерный материал клетки – клеточный геном – но также влияют на функции митохондрий [1,2]. В настоящей работе мы продолжили исследования механизма действия соединений этого типа на митохондрии, поскольку направленное повышение избирательности действия противоопухолевых веществ, предполагает детальное знание механизма их влияния на клетку и клеточные органеллы. В настоящей работе исследован механизм разобщающего действия алкилирующего агента на митохондрии. Проверено предположение о том, чтоалкилирующие агенты индуцируют открывание неспецифической поры на мембране митохондрий путем активации перекисных процессов в мембранах этих органелл. В работе было использовано алкилирующее соединение ряда 2-хлорэтиламинов-пара-[ди-(2-хлорэтил)-аминофенилуксусная] кислота (RCH_2Cl) (рис.1).

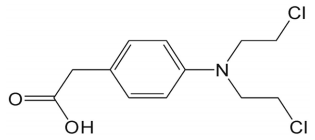


Рис.1. Формула пара-n-[ди-(2-хлорэтил)-аминофенилуксусной] кислоты

Данное соединение обладает очень высокой противоопухолевой активностью в экспериментах на животных и является близким структурным аналогом хлорамбуцила – аналогичного производного фенилмасляной кислоты, которая получила широкое применение в клинике в 60-80-х годах. Соединения этого класса обладают специфическими химическим свойствами – высоким сродством к нуклеофильным группировкам, а также поверхностно активными свойствами – высоким сродством к мембранам, кроме того эти соединения достаточно эффективно гидролизуются с образованием соляной кислоты:

$$RCH_2Cl+H_2O \rightarrow RCH_2OH+H^++Cl^- \qquad (1)$$

Указанные свойства RCH_2Cl позволяют предполагать, что связываясь с поверхностью мембраны и взаимодействуя с водой в зоне

связывания, они должны повышать активность ионов водорода (кислоты) в зоне межфазной границы мембрана-вода, в соответствии с реакцией; создавая локальные pH-градиенты вблизи поверхности мембраны. При этом снижение pH должно резко увеличивать реакционную способность супероксид-радикала, образующегося в мембранах митохондрий за счет их превращения в более реакционноспособную нейтральную форму:

$$O_2^{\cdot} + H^+ \rightarrow O_2^{\cdot}H \qquad (2)$$

Нами было показано, что алкилирующий агент RCH2Cl вызывает эффект стимуляции дыхания при добавлении в суспензию митохондрий в концентрациях 200-300мкМ. Этот эффект снижается при добавлении ингибитора открытия неспецифической поры циклоспорина-А. Таким образом было показано, что данное соединение воздействует на одну из систем транспорта метаболитов и субстратов в митохондриях. Известно, что свободно-радикальные формы кислорода, эффективно стимулируют процесс открывания неспецифической митохондриаль-ной поры. Для подтверждения связи наблюдаемого эффекта открывания поры с кислород-содержащими радикалами, были проведены эксперименты по действую алкилирующего агента на митохондрии в условиях аноксии, когда из суспензии митохондрий полностью удалялся кислород. Процесс открывания поры в данных экспериментах мы регистрировали по скорости выхода ионов калия из матрикса (рис.2). Из рисунка можно видеть, что добавление в суспензию митохондрий соединения (RCH_2Cl) приводит к быстрому выходу ионов калия. В условиях строгой аноксии этот эффект не наблюдается, что однозначно указывает с одной стороны на способность алкилирующего агента индуцировать перекисные процессы, с другой стороны, индуцировать открывание неспецифической поры митохондрий, что, как известно, может быть связано с образованием АФК.

Следующим этапом исследования мы попытались подтвердить механизм усиления перекисного окисления алкилирующими соединениями, который был послулирован выше (см. уравнения 1 и 2). Мы попытались блокировать активацию циклоспрорин-чувствительного дыхания у митохондрий (открывания поры) путем направленного снижения локального градиента кислоты, который должен возникать вблизи поверхности мембран митохондрий при гидролизе соединения (RCH_2Cl). Этого можно добиться путем повышения концентрации буфера в среде инкубации митохондрий. Увеличение буферной емкости среды должно снижать величину локального снижения pH вблизи поверхности мембраны и снимать тем самым протекание реакции 2, и, соответственно, снимать эффективность окислительного процесса приводящего к открыванию поры.

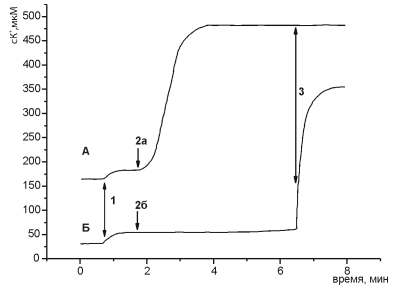


Рис.2. Скорость выхода ионов K^+.в ответ на добавление RCH_2Cl в условиях гипоксии и аноксии. Кривая А – в условиях гипоксии, кривая Б – аноксии. 1 – добавлание митохондрий, 2а и 2б - RCH_2Cl 200мкМ и 1мМ соответственно, 3 – валиномецин и ДНФ.

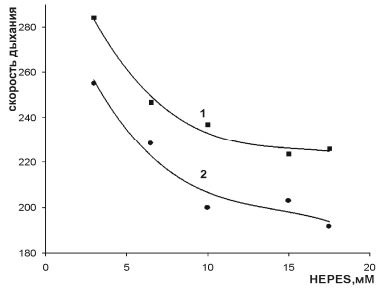


Рис.3. Эффект снижения скорости дыхания митохондрий стимулированного добавлением RCH_2Cl под влиянием высоких концентраций HEPES. Кривая 1 – скорость дыхания, измеренная через 1мин после добавления RCH_2Cl; кривая 2 – скорость, измеренная через 15 минут.

Эксперименты проводились при возрастающих концентрациях буфера (HEPES) при постоянном значении pH среды. Результаты этих экспериментов приведены на рисунке 3, из которого видно, что повышение концентрации буфера, действительно приводит к резкому снижению скорости циклоспорин-чувствительного дыхания. Усиление образования гидроперекисей липидов в мембранах митохондрий, было независимо подтверждено путем прямого полярографического титрования, в опытах гидроперикиси липидов регистрировались в экстрактах мембран митохондрий после добавления алкилирующего агента. Сходный эффект наблюдался на мембранах липосом, сформированных из азолептина.

Таким образом, нам удалось получить экспериментальное подтверждение предложенного нами механизма разобщающего действия алкилирующих агентов, в основе которого лежит следующая цепь событий:

– сорбция препарата на поверхности митохондриальной мембраны;
– гидролиз алкилирующего агента с образованием кислоты (локальное снижение pH в приповерхностном слое митохондриальных мембран);
– активация перекисного процесса в мембранах митохондрий;
– открывание неспецифической поры.

Таким образом в работе удалось показать, что одной из мишеней противоопухолевых алкилирующих агентов, является структура формирующая неспецифическую пору в митохондриях, которая регулирует транспорт субстратов и метаболитов в этих органеллах.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шарышев А.А., Дубинская Е.И., Ягужинский Л.С.* //Биохимия (1980) 45(12): 2121-9;
2. *Шарышев А.А., Новогородова С.А. Ягужинский Л.С.* //Биофизика (1982) 27(1): 52-7.

ФЕНОЗАН КАЛИЯ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА

Жигачева И.В., Евсеенко Л.С.

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

Адаптационные возможности организма определяются его энергетическим статусом. Изменения энергетического метаболизма при действии неблагоприятных факторов направлены на поддержание гомеостаза и могут быть обратимыми. Митохондрии, являясь центром регуляции энергетического обмена, играют важную роль в ответе организма на стрессовые воздействия. Кроме полного 4-х электронного восстановления молекул кислорода до воды в дыхательной цепи митохондрий всегда происходит и неполное одно- и двух электронное восстановление кислорода соответственно до супероксида (O_2) или перекиси водорода [1]. Образование этих активных форм кислорода (АФК) является тонко регулируемым процессом, однако, в условиях стресса продукция АФК в митохондриях резко возрастает [2]. Можно предположить, что основным свойством адаптогенов является снижение чрезмерной продукции АФК, приводящей к активации перекисного окисления липидов в биологических мембранах. Снижение уровня супероксида в мембранах митохондрий может быть достигнуто самыми различными механизмами. Одним из них, по гипотезе В.П. Скулачева является десорбция цитохрома С в межмембранное пространство, способствующие реокислению O_2 в $O_2^{\cdot}$ Десорбированный в межмембранное пространство цитохром С может окислять цитохром B_5, локализованный на внешней поверхности внешней мембраны митохондрий. В результате происходит перенос электронов в обход начальных и средних участков дыхательной цепи митохондрий, то есть в обход тех мест, где возможно образование $O_2^{\cdot}$. Можно предположить, что физиологически активные соединения, обладающие антистрессовыми свойствами, будут активировать перенос электронов по пути нечувствительному к ингибиторам II и III пункта сопряжения. В качестве такого препарата был выбран фенозан калия (калиевой соли 2,6-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-пропионовой кислоты), обладающий

антиоксидантной активностью и, следовательно, предотвращающий окислительное повреждение мембран [3]. Целью исследования было изучить влияние однократного введения 10^{-14}-10^{-5}М фенозана калия на энергетику митохондрий печени крыс.

Материалы и методы. Опыты проводили на крысах линии Вистар весом 120-140г. Митохондрии печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования по стандартной методике [4]. Белок определяли биуретовым методом. Среда выделения митохондрий содержала 0,25М сахарозу, 10мМ Tris-HCl, pH 7,5. Скорости дыхания митохондрий регистрировали кислородным электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации содержала: 0,2М сахарозу, 10мМ Трис-HCl, 2мМ $MgSO_4$, 2мМ KH_2PO_4 , 10мМ KCl, 4мМ глутамат, 1мМ малат. Метиленовые эфиры ЖК получали кислотным метанолизом суммарной фракции структурных липидов митохондриальных мембран и выделяли экстракцией гексаном. Аналитическую тонкослойную хроматографию проводили на силикагеле КСК (5-7мкм) в системе гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (85:15:1). Хроматограммы промывали 10% раствором H_2SO_4 в метаноле. Метиловые эфиры незамещенных жирных кислот анализировали на хроматограф-масс-спектрометре LKB 9000 (Швеция), используя колонку (2000×3мм) с 3% ОУ-101 на Gas-Chrom Q (100-120меш) при программировании температуры от 130 до 210º (3º/мин) и колонку (1500×3мм) с 1.5% ОУ-17 на Gas-Chrom Q при программировании температуры от 200 до 280º (10º/мин). Количественный анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографt Chrom-5 (Чехия), колонка (2500×2мм) с ОУ-275 на Chromatron N-AW (80-100меш) с программированием температуры от 100 до 200º со скоростью 6º/мин. Скорость газа носителя (He)-30мл/мин.

Результаты и обсуждения. Уже через 1 час после введения фенозана калия величина дыхательного контроля по Чансу снижается с 2.9±0.7 до 1.81±0.7 при окислении NAD-зависимых субстратов, а скорости окисления субстратов в присутствии ротенона и антимицина А возрастают с 2.2±0.6 до 7.5±0.2 нмоль O_2/мг белка×мин.. Через 3 часа после введения препарата отмечается восстановление дыхательного контроля до исходной величины., хотя скорости окисления NAD-зависимых субстратов в присутствии ротенона и антимицина А остаются высокими и сохраняются на этом уровне на протяжении 18 часов, что может свидетельствовать об активации альтернативных путей окисления. Активация таких путей окисления приводит к снижению скоростей транспорта электронов на конечном участке дыхательной цепи митохондрий [5]. В связи с этим исследовали скорости переноса электронов в районе цитохромоксидазы. Уже через 30мин. после

введения препарата скорости окисления аскорбата в присутствии ТМФД (тетраметилфенилендиамина) ферментами дыхательной цепи митохондрий печени крыс снижаются в 1,3 раза, через 1 час – в 2,2 раза (табл.1).

Табл.1. Влияние фенозана калия на скорости окисления аскорбата в присутствии ТМФД. (В таблице представлены данные 8 экспериментов).

Группа	Скорости окисления в нмоль O2/мг белка х мин		
	-	800мкМ ТМФД	800мкМ ТМФД+ 5мкМ цито-хром С
Контроль	2,5±0,3	208,1±47,6	336,8±56,0
Фенозан калия 1	1,3±0,3	150,0±30,0	335,5±27,6
Фенозан калия 2	2,8±0,5	94,4±13,0	141,5±10,7
Фенозан калия 3	2,1±0,9	252,5±51, 1	372,0±47,0

Среда инкубации содержала: 0,2М сахарозу, 10мМ HEPES-Tris-буфер (pH 7,5), 2мМ KH_2PO_4,2мМ $MgCl_2$, 10мМ KCl, 5мМ аскорбат, 60мкМ ротенон, 5мкМ антимицин А, 0,5мкМ FCCP (карбонилцианид-р-трифлуорометокси-фенилгидразон). Примечание: вводили 10^{-14}М препарата в/брюшинно. Условные обозначения: Фенозан калия 1-30мин. после инъекции; Фенозан калия 2-1 час после инъекции; Фенозан калия 3-3 часа после инъекции.

Табл.2. Влияние фенозана калия на жирнокислотный состав мембран митохондрий печени крыс (представлены результаты шести опытов).

Группа	Относительное содержание жирных кислот в %.				
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
Контроль	24,6±0,7	2,5±0,1	18,9±0,3	11,4±0,3	15,0±0,4
Фенозан калия 30мин после инъекции	35,4±0,4	5,2±0,2	26,9±0,4	3,2±0,4	10,4±1,0
Фенозан калия 1ч после инъекции	16,5±0,3	1,4±0,1	14,6±0,5	8,9±0,1	18,5±0,1
Фенозан калия 3ч после инъекции	18,4±0,3	2,2±0,6	14,5±0,7	6,9±1,0	26,5±1,7
Группа	Относительное содержание жирных кислот в %.				
	18:3	20:4	Неидендти-фицированные	K_1	K_2
Контроль	4,1±1,3	22,0±0,7	1,5±0,2	1,27±0,10	1,67±0,30
Фенозан калия 30мин после после инъекции	5,0±0,7	12,8±0,1	1,5±0,2	0,58±0,10	0,7±0,03
Фенозан калия 1ч после инъекции	14,8±0,2	18,6±0,2	6,7±0,1	2,04±0,06	2,90±0,10
Фенозан калия 3ч после инъекции	12,2±0,9	16,0±0,5	3,3±1,5	1,8±0,01	3,20±0,40

Отметим, что добавление 5мкМ цитохрома С в среду инкубации митохондрий, выделенных через 30мин после инъекции препарата, приводит к восстановлению скоростей переноса электронов на цитохромоксидазном участке дыхательной цепи. Однако, через час после инъекции добавление цитохрома С в среду инкубации митохондрий не достаточно для восстановления этих показателей. Через три часа после инъекции скорости переноса электронов на конечном участке дыхательной цепи митохондрий возвращаются к норме. Изменения скоростей переноса электронов на терминальном участке дыхательной цепи обусловлены изменениями физико-химических свойств мембран митохондрий. Через 30мин после введения препарата содержание пальмитиновой и стеариновой кислот возрастает в 1,4раза, а олеиновой – снижается в 3, 5 раза. В результате соотношение суммарного количества ненасыщенных кислот к насыщенным падает с 1,27±0,10 до 0,58±0,10. Через 1 час после инъекции в мембранах митохондрий резко увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот и снижается содержание насыщенных. Содержание стеариновой кислоты уменьшается в 1,3 раза, пальмитиновой – в 1,5 раза. В это же время содержание пальмитоолеиновой, линолиевой и линоленовой кислот возрастает в 1,3; 1,2; 3,5 раза соответственно. В результате отношение ненасыщенных кислот к насыщенным растет с 1,27±0,10 до 2,04±0,06.

Следует подчеркнуть, что спустя 1 час после инъекции содержание суммарного количества олеиновой, линоленовой и линолиевой кислот в мембранах митохондрий увеличивается с 30 до 42-45%.При этом вклад линолиевой кислоты в суммарное количество ненасыщенных жирных кислот с 18 углеродными атомами возрастает с 3% в контроле до 33% в опыте. Через 3 часа в суммарной фракции липидов мембран митохондрий процентное содержание насыщенных жирных кислот остается сниженным, а ненасыщенных даже несколько растет. Сходные изменения физико-химических свойств мембран митохондрий наблюдались при адаптации животных к холоду [5].

Изменение физико-химических свойств мембран митохондрий, по-видимому, приводит к обратимым изменениям прочности связывания цитохрома С с внутренней мембраной митохондрий , что находит отражение в скоростях окисления NAD-зависимых субстратов в присутствии ротенона и антимицина А и скоростях переноса электронов на цитохромоксидазном участке дыхательной цепи. Возможно, эти изменения будут обуславливать антистрессовые свойства фенозана калия. Действительно, одноразовое введение препарата животным в дозе 10^{-14}-10^{-5}М на 20-50% повышает выживаемость животных в условиях гипоксии и на 40% – в условиях низкотемпературного стресса.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Скулачев В.П.* //СОЖ (2001) 7(60): 4-10;
2. *Барабой В.А.* //Успехи Современ. Биол. (1991) 111(60): 923-32;
3. *Пальмина Н.П., Кледова Л.В., Панкова Т.В.* //Матер. симпоз. «Механизмы действия сверхмал. доз» М. (2002): 27;
4. *Жигачева И.В., Мохова Е.Н., Скулачев В.П.* //ДАН (1976) 227: 493-6;
5. *Спиридонова В.А., Агуреев А.П., Юськович А.К.* //Биол. Науки (1982) 3: 16-21.

ВОЗРАСТНО-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ ПРИ Ca^{2+}-ИНДУЦИРУЕМОМ ОТКРЫТИИ ПОРЫ

Крестинина О.В., Круглов А.Г., Грачев Д.Е., Бабурина Ю.Л., Мошков Д.А., Санталова И.М., Азарашвили Т.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Митохондрии – это внутриклеточные органеллы, которые обеспечивают клетки энергией и участвуют в различных процессах жизнедеятельности клеток. Согласно накопившимся литературным данным старение связано с митохондриальной дисфункцией, которая вносит вклад в тканевую дегенерацию и этиологию дегенеративных болезней [1-3]. Так как митохондрии играют критическую роль в процессах апоптоза и некроза, то можно предположить, что митохондриальная дисфункция, наблюдаемая при старении, возможно, связана с дисрегуляцией программируемой гибели клеток [3-5]. Известно, что индукция permeability transition pore (PTP) в митохондриях приводит к нарушению целостности внешней мембраны и выходу про-апоптотических белков из межмембранного пространства. Окислительный стресс и повышенная концентрация Ca^{2+} инициируют открытие PTP. Было показано, что при старении увеличивается чувствительность к активации PTP в лимфоцитах, изолированных из селезенки 24-месячных B6 мышей и в митохондриях мозга и печени гибридных B6D2F1 мышей [6,7].

Известно, что митохондрии считаются важным источником реактивных форм кислорода (РФК) и первоначальной их мишенью во время старения. Окислительные повреждения нуклеиновых кислот, белков и липидов, вызванные РФК являются важными факторами в ухудшении функционирования тканей при старении и в возрастно-зависимых дегенеративных заболеваниях [8-14].

В митохондриях мозга старых животных снижается способность производить ATP и скорость перемещения электронов по комплексам дыхательной цепи и увеличивается продукция РФК и азота. Изменения всех этих параметров в итоге приводят к дисфункции митохондрий при старении [13,15-17].

Мазер и Роттенберг показали, что в митохондриях, выделенных из мозга и печени старых (20мес) мышей наблюдалось более низкое значение пороговой $[Ca^{2+}]$ по сравнению с митохондриями мозга и печени молодых мышей. Хаген и сотрудники показали, что митохондрии печени старых крыс имели более низкое значение мембранного потенциала и повышенный окислительный стресс [7,15].

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ параметров функционального состояния митохондрий мозга и печени из молодых (половозрелых 2-3-месячных) и старых (20-22-месячных) крыс, в условиях открытия PTP. С этой целью были определены пороговые концентрации Ca^{2+}, исследованы изменения мембранного потенциала ($\Delta\psi m$), набухания и образования реактивных форм кислорода (РФК) в митохондриях мозга и печени 2-3 месячных и старых (20-22 месяца) крыс в условиях открытия PTP.

Величину трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) в митохондриях оценивали по распределению TPP^+ в термостатируемой ячейке, в которую вмонтированы селективные электроды: TPP^+, Ca^{2+} и 0_2 [18]. Все основные измерения митохондриальных параметров проводили в 10мМ Tris-HCl буфере pH 7,4, содержавшем 120мМ KCl, 0,4мМ KH_2PO_4 (2мМ KH_2PO_4 для митохондрий печени), 5мМ сукцинат калия, 2,5мкМ ротенон.

Высокоочищенные препараты митохондрий мозга выделяли методом дифференцированного центрифугирования в градиенте плотности перкола в среде, содержащей 0.32М сахарозу, 0.5мМ ЭДТА, 0.5мМ ЭГДА, 0.02% БСА (V фракция) и 10мМ Tris-HCl (pH 7.4), по методу Симса [19]. Митохондрии печени выделяли стандартным методом в среде содержащей 250мМ сахарозу, 70мМ маннит, 10мМ Tris-HCl (pH 7.4), 0.01% БСА and 1мМ ЭГТА.

На рисунке 1 показано функциональное состояние митохондрий мозга и печени, изолированных из 2-3 месячных (панель А и В) и 20-22-месячных крыс (панель Б и Г) в условиях открытия PTP. Во всех случаях (в митохондриях мозга и печени молодых крыс) первоначальная добавка Ca^{2+} вызывала короткое обратимое падение $\Delta\psi$, после чего наблюдалось восстановление мембранного потенциала, однако, 3-ая добавка для митохондрий мозга и 2-ая добавка для митохондрий печени вызывали выход Ca^{2+} из митохондриального матрикса и необратимое падение $\Delta\psi$.

В этих же условиях в митохондриях мозга (после 2-й добавки) и печени (после 1-й добавки) старых крыс наблюдалось снижение пороговой $[Ca^{2+}]$ и ускорение открытия поры. Эти результаты хорошо согласуются со сравнительными исследованиями, проводимыми Мазером [7] на изолированных митохондриях мозга и печени молодых и старых гибридных B6D2F мышей. Согласно его и нашим исследованиям при старении наблюдается повышенная чувствительность к активации PTP,

выражающаяся в снижении пороговой концентрации Ca^{2+}, вызывающей инициацию открытия PTP в митохондриях. Это видно на панели 1Д, демонстрирующей количественный анализ параметров PTP, таких как скорость поглощения Ca^{2+} и величина его пороговой концентрации. Видно, что скорости входа Ca^{2+} в митохондриях мозга и печени старых крыс уменьшаются по сравнению с молодыми на 25% и 30% соответственно. Пороговая $[Ca^{2+}]$ снижалась на 50% и 45% по сравнению с контролем.

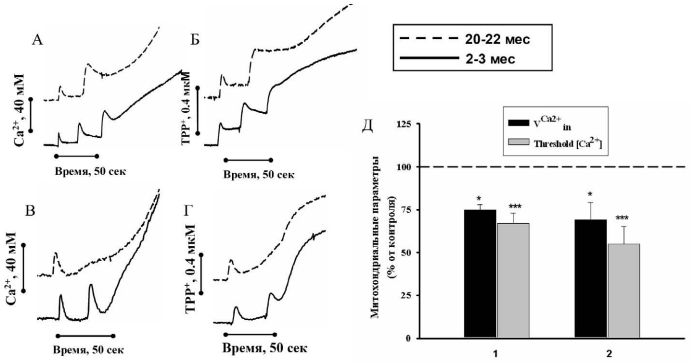


Рис.1. Определение функций митохондрий при Ca^{2+}-индуцируемом открытии неселективной поры (PTP). На панелях А и Б показано изменение выход Ca^{2+} и $\Delta\psi$ в митохондриях мозга молодых и старых крыс, соответственно. Панели В и Г демонстрируют те же параметры в митохондриях печени молодых и старых крыс. Панель Д: 1 – RBM, 2 – RLM Определение скорости входа Ca^{2+} и порогового значения $[Ca^{2+}]$ при Ca^{2+}-индуцируемом открытии поры.

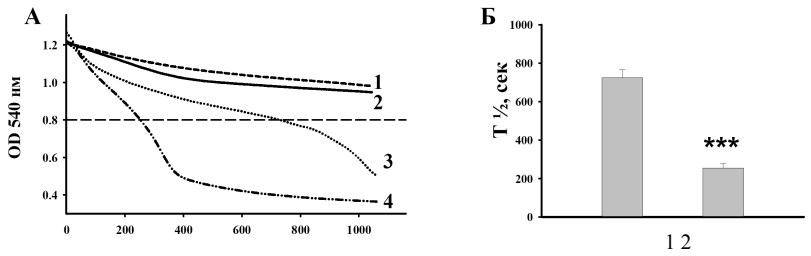


Рис.2. Набухание митохондрий печени в условиях PTP. (А) Кривые 1 и 2 – набухание митохондрий печени контрольных и старых крыс в отсутствие нагрузки кальцием. Кривые 3 и 4 –набухание митохондрий печени молодых и старых крыс в присутствии пороговых концентраций кальция, соответственно. (Б) полу-периоды набухания митохондрий печени, 1 – для митохондрий печени молодых крыс, 2 – для митохондрий печени старых крыс.

Другим параметром функционирования PTP считается Ca^{2+} индуцированное набухание митохондрий. В нашей работе мы провели сравнительный анализ набухания митохондрий печени молодых и старых крыс. На рисунке 2А показано, что в отсутствие Ca^{2+} в среде митохондрии старых крыс не подвержены набуханию, а нагрузка митохондрий пороговой $[Ca^{2+}]$**,** вызывало ускорение набухания митохондрий старых крыс в 3-4 раза (кривая 4), по сравнению с митохондриями молодых крыс (кривая 3). Сравнение полупериодов набухания митохондрий молодых и старых крыс, подтверждающий этот вывод, представлено на рисунке 2Б. Уменьшение пороговой $[Ca^{2+}]$, увеличение скорости выхода $[Ca^{2+}]$ и стимуляция набухания митохондрий старых животных демонстрируют активацию открытия PTP при старении и указывают на существование возрастно-индуцируемой активации открытия PTP, которая, возможно, лежит в основе изменения чувствительности тканей к клеточному повреждению и их гибели во время старения. Известно, что индукция PTP происходит в ответ на окислительный стресс, вызываемый РФК, уровень которых увеличивается при старении. Мы провели сравнительный анализ по определению уровня супероксид аниона и скорости образования H_2O_2 в митохондриях молодых и старых крыс в условиях PTP и обнаружили, что уровень супероксид аниона увеличивается в митохондриях старых крыс и его уровень почти не изменяется при открытии PTP. Ранее было показано, что митохондрии старых крыс имеют более высокую скорость образования РФК, а также была продемонстрирована преобладающая роль I комплекса в возрастно-зависимом увеличении РФК [20-24].

Табл.1. Образование РФК в митохондриях мозга и печени молодых и старых крыс.

Митохондрии	Продукция РФК			
	Максимальный уровень супероксид аниона, (AU)		Максимальная скорость образования H_2O_2 (pmol/min/mg protein)	
	Молодые крысы	Старые крысы	Молодые крысы	Старые крысы
RLM (мх печени)	[a]1±0.46	2.51±0.60 **	[b]1±0.11	0.88±0.14
mPTP	0.97±0.51	2.64±0.33 **	1.62±0.15 *	1.96±0.18 *
RBM (мх мозга)	1.71±0.58	2.87±0.41 **	1.20±0.16	0.93±0.24
mPTP	1.81±0.24	3.21±0.57 **	1.72±0.16 *	1.03±0.09 **

Однако в наших экспериментальных условиях источником образования РФК является комплекс III, так как эксперименты проводили в присутствии ингибитора комплекса I, ротенона. Что касается, скорости образования H_2O_2, то наблюдаемые снижения в образовании H_2O_2, возможно, происходят, благодаря снижению активности комплексов дыхательной цепи при старении [25,26]. Однако, следует отметить двукратное увеличение уровня H_2O_2 в присутствии пороговых $[Ca^{2+}]$ в митохондриях печени старых крыс. Высокий уровень супероксид аниона

в митохондриях старых крыс, а также более низкий уровень H_2O_2 можно объяснить тем, что активность антиоксидантов изменяется в митохондриях из различных органов. Кроме того, уровень митохондриальной Mn-SOD, глютатион пероксидазы и каталазы уменьшается в большинстве органов со старением [27,28]. Возрастно-зависимая активация PTP нашла подтверждение и на структурном уровне. Со старением в митохондриях теряется пластичность мембран, происходит частичное их повреждение без способности к восстановлению, изменяется форма митохондрий.

На фотографиях электронной микроскопии видно, что митохондрии старых животных (Б и Г) содержат меньше крист и они менее компактны. Уменьшение количества крист указывает на снижение площади внутренних мембран, а это означает, что проницаемость внутренних мембран может увеличиваться при более низких пороговых $[Ca^{2+}]$.

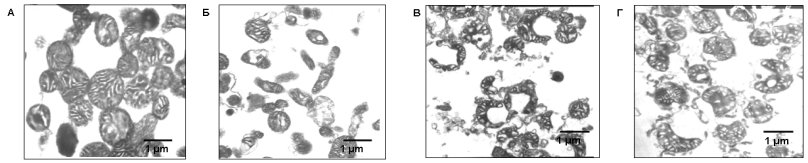


Рис.3. Морфология митохондрий мозга и печени молодых (А и В) и старых крыс (Б и Г).

Суммируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что митохондрии из старых животных морфологически изменены таким образом, что в них облегчается индукция и функционирование PTP, продуцируется высокий уровень супероксид аниона и сниженная продукция H_2O_2, что может приводить к инициации программируемой гибели клеток, вовлекая митохондрии в процесс старения.

Работа поддержана грантами РФФИ №08-04-00723, №08-04-01240; НШ №217.2008.4

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wallace D.C., Shoffner J.M., Trounce I.* //BBA (1995) 1271: 141-51;
2. *Beal M.F.* //Ann. Neurol. (1995) 38: 357-66;
3. *Papa S., Skulachev V.P.* //Mol. Cell. Biochem. (1997) 174: 305-19;
4. *Kroemer G., Dallaporta B., Rescfe-Rigon M.* //PNAS (1998) 60: 619-42;
5. *Bossy-Wetzel E., Green D.R.* //Mutation Res. (1999) 434: 243-51;
6. *Rottenberg H., Wu S.* //Biochem. Biophys. Res. Comm. (1997) 240: 68-74;
7. *Mather M. Rottenberg H.* //Biochem. Biophys. Res. Comm. (2000) 273: 603-8;
8. *Shigenaga M.K., Hagen T.M., Ames B.N.* //PNAS (1994) 91: 10771-8;
9. *Miquel J., Fleming J.* //Mod. Aging Res. (1986) 8: 51-74;

10. *Kitagawa T. et al.* //Biol. Reprod. (1993) 49: 730-6;
11. *Luft R.* //Biochim. Biophys. Acta (1995) 1271: 1-6;
12. *Harman D.* //J. Gerontol. (1956) 11: 298-306;
13. *Gerschman R. et al.* //Science (1954) 119: 623-6;
14. *Stadtman E.R.* //Science(1992) 257:1220-4;
15. *Hagen T. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1997) 94: 3064-9;
16. *Kwong L, Sohal R.* //Arch. Biochem. Biophys. (2000) 373: 16-22;
17. *Navarro A, Boveris A.* //Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2007) 292: 670-86;
18. *Azarasvili et al.* (2005);
19. *Sims N.R.* //J. Neurochem. (1990) 55: 698-707;
20. *Gredilla R. et al.* //Ann. NY Acad. Sci. (2004) 1019: 333-42;
21. *Sanz A., Pamplona R., Barja G.* //Antiox. Redox Sig. (2006) 8(3-4): 582-99;
22. *Sanz A. et al.* //J. Bioenerg. Biomembr. (2005) 37(2): 83-90;
23. *Petrosillo G. et al.* //Neurochem. Int. (2008) 53(5):126-31;
24. *Kudin A.P., Malinska D., Kunz W.S.* //BBA (2008) 1777(7-8): 689-95;
25. *Kumaran S. et al.* //Chem. Biol. Interact. (2004) 148(1-2): 11-8;
26. *Dencher N.A. et al.* //Ann. NY Acad. Sci. (2007) 1100: 291-8;
27. *Carrillo M.C. et al.* //Mech. Ageing Dev. (1992) 65(2-3): 187-98;
28. *Meng Q. et al.* //Mech. Ageing Dev. (2007) 128(3): 286-92.

АНТИСТРЕССОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ ГУСЕНИЦ ВОСКОВОЙ МОЛИ ПО РЕАКЦИЯМ МИТОХОНДРИЙ И НЕЙТРОФИЛОВ

Литвинова Е.Г., Овсепян А.А., Захарченко М.В., Захарченко А.В., Федотчева Н.И., Кондрашова М.Н.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Спиртовый экстракт гусениц восковой моли *Galleria mellonella* в народной медицине использовался как противотуберкулезное средство. Позднее известным врачом-гомеопатом С.А. Мухиным было обнаружено также кардиопротекторное действие препарата. Нами на основе спиртового экстракта гусениц разработана биологически активная добавка (БАД) «Натуральный экстракт доктора Мухина» (НЭДМ) и получен сертификат на ее производство и реализацию. Помимо подтверждения в экспериментах на животных кардиопротекторного действия, выявили также иммунопротекторный, адаптогенный, геропротекторный эффекты [1,2,3]. *In vitro* и *in vivo* показана высокая антиоксидантная активность экстракта гусениц [4]

В данной работе представлены результаты исследования антистрессорного действия экстракта гусениц. Исследования проводились на разработанной нами модели физиологического стресса на животных перед достижением зрелости (см. в этом сб. *Захарченко М.В. и*

др.), а также при внутрибрюшинном введении адреналина. Действие стресса исследовали по реакциям митохондрий (активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и α-кетоглутаратдегидрогеназы (КДГ), а также Ca^{2+}-емкости митохондрий) и нейтрофилов по (спонтанной и индуцированной зимозаном хемилюминесценции).

Материалы и методы. Эксперименты проводили на крысах линии Вистар возраста 6-ти недель, весом до 200г. Опытные животные ежедневно в течение восьми дней получали 0,25мл или 1мл НЭДМ, нанесенных на хлеб и высушенных на воздухе для удаления спирта. Животных подвергали 30 минутному иммобилизационному стрессу (ИС), отсаживая в камеру, ограничивающую движение. Стресс индуцировали также введением животным адреналина 0,5мг/кг веса внутрибрюшинно за 30мин до забоя. Животных усыпляли в герметичной камере, предварительно заполненной углекислым газом. Через 15-25с у животных происходила остановка дыхания, однако работа сердца продолжалась, тогда крысу быстро извлекали из камеры, декапитировали, и собирали кровь на предварительно охлажденное часовое стекло. Из крови готовили мазки на одноразовых предметных стеклах. Обработку мазков крови проводили цитобиохимическим методом, включающим новый более точный способ расчета активности СДГ и КДГ по восстановлению красителя нитросинего тетразолия (НСТ) [5].

Измерение иммунной функции нейтрофилов проводили путем регистрации хемилюминесценции цельной крови, индуцированной зимозаном [6] на хемилюминометре ХЛ-111. Одновременно в отдельной пробе регистрировали спонтанную хемилюминесценцию. Интегральную интенсивность хемилюминесценции, выраженную в условных единицах, определяли, вычисляя площадь под кривой хемилюминесценции.

Ca^{2+}-емкость митохондрий в гомогенате печени, измеряли по изменению мембранного потенциала в ответ на последовательные добавки ионов кальция в концентрациях 20-50мкМ. Мембранный потенциал митохондрий измеряли $ТФФ^{+}$-селективным электродом с компьютерной регистрацией [7].

Результаты. При возбуждении адреналином в 2,5 возрастает активность СДГ, одновременно происходит ингибирование КДГ. При кратковременном иммобилизационном стрессе увеличивается активность как СДГ, так и КДГ. Прием НЭДМ снижает активность СДГ и предотвращает ее повышение при стрессе. НЭДМ, как и стресс увеличивает активность КДГ, однако при действии стресса на животных, получавших НЭДМ, активность КДГ приближается к контролю (рис.1).

НЭДМ предотвращал изменение Ca^{2+}-емкости митохондрий печени крыс при введении адреналина и при 30 минутном иммобилизационном стрессе (рис.2А и Б).

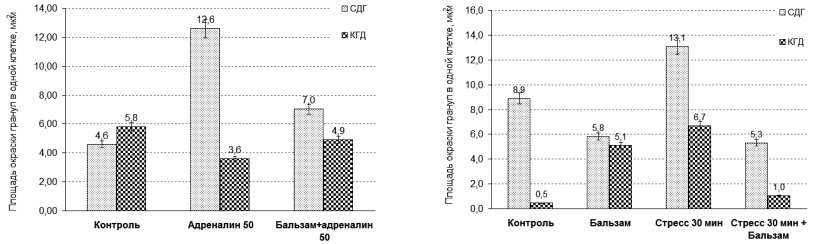


Рис.1. Изменение активности ферментов (площадь окраски гранул формазана НСТ, мкм^2) в лимфоцитах контрольных и получавших НЭДМ крыс при введении 100мкг адреналина (А) и при 30мин стрессе (Б). Субстраты – янтарная кислота 5мМ; α-кетоглутарат 5мМ.

При этом введение адреналина и кратковременный иммобилизационный стресс оказывали противоположное действие на Ca^{2+}-емкость (снижение и увеличение, соответственно). Устойчивость митохондрий к ионам кальция снижается после введения адреналина и увеличивается при введении НЭДМ (рис.2А). Индуцированная ионами кальция пора ингибируется циклоспорином А. Таким образом, более высокая способность митохондрий к аккумуляции ионов кальция показывает повышение устойчивости митохондрий печени крыс, получавших НЭДМ, к открытию поры и следовательно, устойчивости к стрессу и клеточной гибели. При более мягком стрессе – 30 минутной иммобилизации, в отличие от введения адреналина, кальциевая емкость, увеличивается. При этом у животных, получавших НЭДМ, в отличие от контрольных животных, стресс не изменяет кальциевую емкость. При иммобилизационном стрессе НЭДМ также оказывал протекторное действие, предотвращая вызванное стрессом повышение кальциевой емкости.

Известно, что стресс изменяет клеточный состав крови и состояние кроветворных органов [9]. Мы исследовали действие стресса и НЭДМ на клеточный состав и активность нейтрофилов в цельной крови (рис.3А,Б).

При 30 минутном иммобилизационном стрессе на 20% снижалась люминолзависимая хемилюминесценция крови в ответ на зимозан (рис.3А). Снижение могло быть вызвано изменением числа нейтрофилов и снижением их активности. На рис.3Б видно, что при стрессе снижается именно число нейтрофилов (на 30%). При этом число лимфоцитов практически не изменяется. Таким образом, наблюдаемые при стрессе изменения хемилюминесценции связаны с изменением клеточного состава крови. Эти изменения предотвращались при приеме НЭДМ. При стрессе, вызванном введением адреналина, индуцированная зимозаном хемилюминесценция крови и количество нейтрофилов, в отличие от кратковременного иммобилизационного стресса, увеличиваются (рис.4А,Б). Повышение хемилюминесценции не такое высокое, как повышение числа нейтрофилов, что, по-видимому, связано с

обнаруженным нами снижением активности отдельных нейтрофилов при действии адреналина. Иммобилизационный стресс и, в большей степени, адреналин повышали спонтанную хемилюминесценцию крови. Повышение спонтанной хемилюминесценции также предотвращалось приемом НЭДМ, что может отчасти быть связано с его антиоксидантным действием.

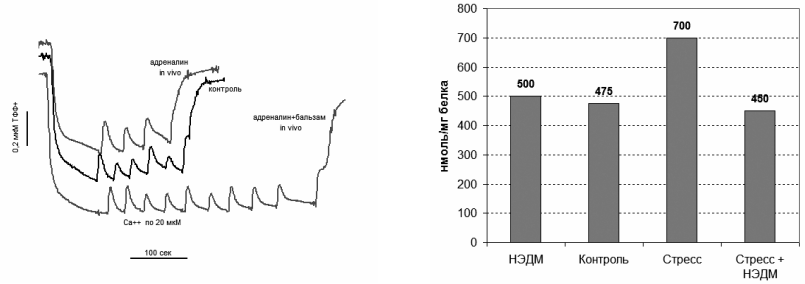


Рис.2. Влияние НЭДМ на Ca^{2+}-емкость митохондрий, при внутрибрюшинном введении адреналина (слева) или при 30 минутном иммобилизационном стрессе

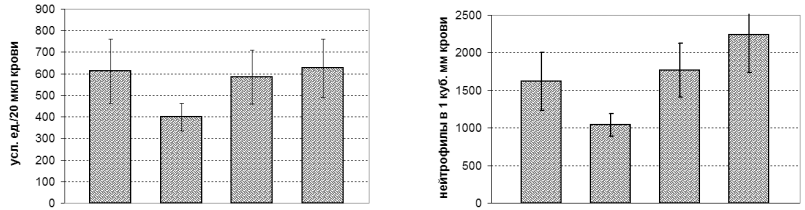


Рис.3. Влияние 30 минутного иммобилизационного стресса и НЭДМ на люминолзависимую хемилюминесценцию цельной крови (А) и количество нейтрофилов в крови (Б). Представлены средние значения 6 экспериментов

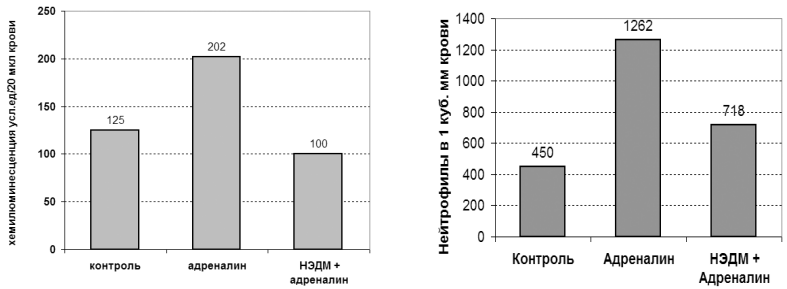


Рис.4. Люминолзависимая хемилюминесценция (А) и количество нейтрофилов в крови крыс (Б) через 30 минут после внутрибрюшинного введения 0,5мг/кг адреналина контрольным животным, или животным после недельного курса введения НЭДМ (1мл/200г веса). Представлены данные одного из экспериментов.

Таким образом, при 30-минутном иммобилизационном стрессе и при стрессе, вызванном введением адреналина НЭДМ предотвращал изменения, вызванные стрессом, нормализуя активность ферментов СДГ и КДГ и Ca^{2+}-емкость митохондрий, а также клеточный состав крови. Проведенные исследования показали, что экстракт гусениц восковой моли при курсовом приеме оказывает антистрессорное действие, предотвращая или ослабляя действие стресса на митохондрии и на клетки крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rachkov A.K., Spiridonov N.A., Kondrashova M.N.* //J. Pharm. Pharmacol. (1994) 46: 221-5;
2. *Спиридонов Н.А. и др.* //«Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве», Пущино (1996): 187-95;
3. *Литвинова Е.Г. и др.* //Матер. X съезда ФИТОФАРМ (2006): 219-23;
4. *Сирота Т.В. и др.* //Конф. «Биоантиоксидант», М. (2002): 528-30;
5. *Кондрашова М.Н. и др.* //Патент №2007143021/15 (047111);
6. *Сафронова В.Б. и др.* // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. (2003) 136 (9): 295-8;
7. *Fedotcheva N.I. et al.* //Toxycology Lett. (2008) 180: 182-8;
8. *Кондрашова М.Н., Григоренко Е.В.* //Ж. Общ. Биол. (1985) 4: 516-26;
9. *Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И.* //Стресс и система крови. М. (1983) 240с.

СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ СУКЦИНАТА В РЕАКЦИЯХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ГИПОКСИИ

Лукьянова Л.Д.

НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

Митохондрии участвуют в важнейших внутриклеточных регуляторных процессах: 1) аэробном синтезе энергии; 2) обмене энергии и контролируемом поддержании энергозависимых внутриклеточных процессов; 3) сенсорной функции, позволяющей дифференцировать изменения содержания кислорода в окружающей среде; 4) компенсаторных реакциях, связанных с формированием срочных и долгосрочных реакций адаптации при гипоксии, определяющих резистентность организма в этих условиях 5) транскрипционной активности, направленной на стабилизацию образования гипоксического белкового фактора HIF-1 и генов, обеспечивающих длительную

адаптацию организма к низким pO_2; 6) рецепторной функции, отражающей участие митохондрий в реакциях межклеточной сигнализации.

В большинстве случаев необходимый результат достигается через активацию сукцинатоксидазного окисления, что позволяет рассматривать сукцинат, как сигнальную молекулу. Анализу и доказательству этого предположения посвящена данная работа.

1. Сукцинат и сопряженный с ним синтез энергии.

В нормоксических условиях работа дыхательной цепи, как правило, связана с окислением NAD-зависимых субстратов – основного поставщика восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи через митохондриальный комплекс I (МФК I), вклад которого, оцениваемый по потреблению кислорода, в интактных клетках, может составлять до 55-65%. Тем не менее 25-30% митохондриального дыхания в этих условиях связано с окислением сукцината, содержание которого в матриксе митохондрий невелико (0.2-0.4мМ) [17]. Соотношение двух путей окисления зависит главным образом от свойств основного фермента МФКI – NADH-цитохром с оксидоредуктазы, кинетические характеристики которого тканеспецифичны и резко различаются у интактных животных с неодинаковой чувствительностью к гипоксии. Так в неокортексе высокоустойчивых к гипоксии крыс (ВУ) значения V_{max} и K_m (NADH) этого фермента в нормоксических условиях достоверно выше, чем у низкоустойчивых (НУ) крыс (табл.1), что определяет, видимо, неодинаковую у двух типов животных окислительную способность NAD-зависимого участка дыхательной цепи и соотношение активностей МФК I/МФК II [4]. Различия в этом соотношении имеются и в миокарде ВУ и НУ крыс [3,4]. Существование различий в кинетических свойствах ферментов дыхательной цепи у ВУ и НУ крыс свидетельствует о том, что данное явление генетически детерминировано, а энергетический обмен включается в качестве одного из ведущих факторов, определяющих формирование индивидуальной резистентности организма.

В гипоксических условиях происходит регуляторное репрограммирование работы дыхательной цепи: подавление электронтранспортной функции МФК I [3,4,6,9,25,27,28] и активация МФК II [3-5,10,24,34]. Вклад сукцинатоксидазного окисления в дыхание и синтез энергии резко возрастает [3-5,7,11,12,18,24,35] и при наличии избытка субстрата может достигать 70-80%. Содержание сукцината в тканях при этом увеличивается на порядок (4-7мМ). [13,17]. Источником эндогенного сукцината в этих условиях в разных тканях могут быть трансаминазные реакции, обращение цикла Кребса и реакции окислительного декарбоксилирования, активация цикла Робертса.

Табл.1. Кинетические характеристики митохондриальных ферментов (МФК) в неокортексе низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии крыс до гипоксических тренировок (нормоксия) и после курсового применения гипобарической гипоксии (10% O_2, 25 тренировок). (максимальная активность – V_{max}, ед.опт.плотн.×мин$^{-1}$×мг$^{-1}$ белка) и значения кажущейся K_m (×10^{-5}М).

МФК	параметр	нормоксия, абсол. знач.		нормоксия ВУ/НУ %	после курсовой адаптации к гипоксии		
		НУ	ВУ		НУад/ НУн%	ВУад/ ВУн%	ВУад/ НУад%
НЦР	V_{max}	0,061	0,14	234**	273**	70*	60*
	K_{max}	2,90	13,30	460**	458**	41**	38**
СЦР	V_{max}	0,10	0,11	110	120	100	92
	K_{max}	116,00	132,00	114	100	102	116
ЦО	V_{max}	0,67	0,77	110	165*	137	95
	K_{max}	1,67	3,33	200*	199**	85	85

НЦР – NADH-цитохром с оксидоредуктаза; СЦР – сукцинат-цитохром с редуктаза; ЦО – цитохром с оксидаза. ад – адаптация; н – нормоксия. *-P<0,01; **-P<0,001.

Согласно нашим данным, снижение эффективности работы МФК I и активация МФК II на начальных стадиях гипоксии – взаимосвязанный регуляторный процесс, представляющий собой один их этапов (компенсаторный) фазного развития нарушений энергетического обмена в этих условиях (рис.1,2). Он направлен на использование энергетически более эффективного в условиях гипоксии сукцинатоксидазного пути окисления субстратов (МФК II). Очевидно, что ему предшествует кратковременная активация МФК I (рис.1). Процесс коррелирует у НУ крыс с увеличением резистентности животных к острому гипоксическому воздействию [5,24]. Если изменения кинетических параметров МФК II отсутствуют, как это имеет место в неокортексе ВУ животных, формирования резистентности не происходит.

Применение сукцинат-содержащих препаратов перед гипоксическим воздействием или сразу после него, а также при многочисленных патологиях, сопровождающихся ингибированием МФК I и активацией МФК II, предупреждает или ослабляет нарушения синтеза АТФ и оказывает нормирующее действие на параметры аденилатного пула, а также на жизненно важные функции организма, увеличивает резистентность последнего к дефициту кислорода. Это определяет антигипоксические и энерготропные эффекты таких препаратов, например, как мексидол, и их особое место в фармакологии и в практической медицине [3,4б].

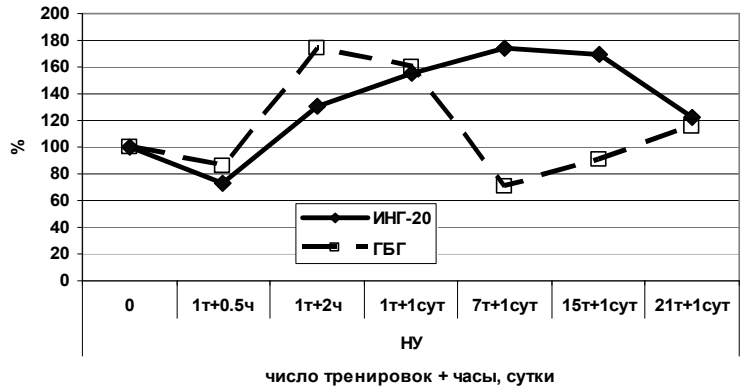


Рис.1. Влияние курсового применения гипобарической гипоксии ГБГ (10% O_2) и интервальной нормобаричской гипоксии ИНГ (21 тренировка) на динамику K_m ротенончувствительной НАДН-цитохром *c*- редуктазы в неокортексе НУ крыс. Уменьшение его значений через 30мин после окончания гипоксического воздействия отражает снижение эффективности работы фермента

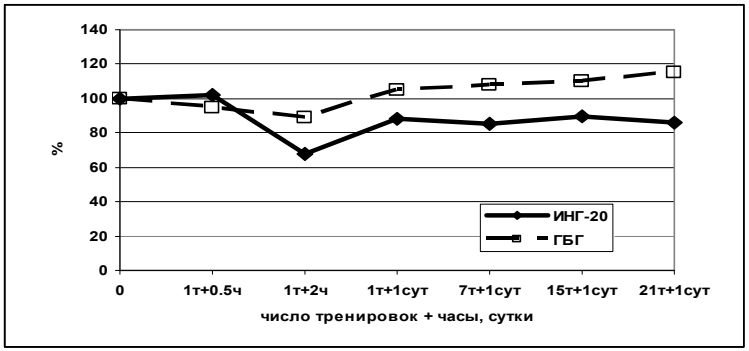


Рис.2. Влияние курсового применения ГБГ и ИНГна динамику K_m сукцинат-цитохром с-редуктазы в неокортексе НУ крыс. Уменьшение значений K_m сукцинат-цитохром с-редуктазы отражает увеличение сродства фермента к субстрату – сукцинату, и говорит об увеличении эффективности работы фермента через 2 ч после воздействия.

2. О связи окисления сукцината при гипоксии с эффектами прекондиционирования и транскрипционной активностью. Увеличение образования сукцината при гипоксии сопровождается его аккумуляцией в цитозоле и в крови [13,16,17,19,21,22]. Это позволяет сукцинату принимать участие в важнейших внутриклеточных процессах, например, в транскрипционной активности специфического гипоксического

фактора HIF-1α, ответственного за экспрессию более 70 генов адаптации [29,33]. Сукцинат является ингибитором пролилгидроксилазных реакций, осуществляющих в цитозоле в нормоксических условиях протеасомальную деградацию HIF-1α. Увеличение концентрации сукцината при гипоксии и его появление в цитозоле способствует стабилизации HIF-1α и запуску трансляционных и транскрипционных процессов, ответственных за формирование как срочных, так и долгосрочных механизмов адаптации. Сопряжение активации МФК II и образования HIF-1α после гипоксического воздействия доказано [6,8,14,32].

Согласно нашим данным, через 2ч после однократного действия как интервальной нормобарической, так и других форм гипоксии, увеличение содержания HIF-1α в неокортексе НУ крыс коррелировало со снижением эффективности работы МФК I (рис.1), усилением эффективности работы МФК II (рис.2) при сохранении интактности ЦО, и сопровождалось многократным увеличением резистентности животных к острой гипоксии. При отсутствии активации сукцинатоксидазного окисления (неокортекс ВУ крыс) HIF-1α не определялся, и увеличения резистентности не происходило. Введение НУ крысам в этот период сукцинатсодержащих препаратов резко увеличивало переносимость животными острого гипоксического воздействия, ускоряло формирование срочной резистентности. Наоборот, у ВУ животных, у которых отсутствовала активация МФК II, сукцинатсодержащие препараты не влияли на резистентность. Триггерная роль сукцината в запуске адаптивных процессов, связанных с HIF-1α, проявлялась в первые 3 суток после гипоксического воздействия, что коррелировало с максимальным увеличением эффективности работы МФК II (рис.2). Следовательно, на стадии прекондиционирования сукцинат участвует в формировании срочных компенсаторных реакций и этот процесс совпадает с активацией МФК II и подавлением НАДН-оксидазного окисления.

Сукцинат-зависимая стабилизация HIF-1α в начальный период гипоксии необходима и для запуска долгосрочных механизмов адаптации, после чего роль МФК II уменьшается. Это может быть связано с тем, что в процессе долгосрочной адаптации появляются новые изоформы основного фермента МФК I с новыми кинетическими свойствами, повышающие эффективность его работы в условиях гипоксии (табл.1) и восстанавливающие электронтранспортную функцию NAD-зависимого пути окисления. Сохранение высокой активности МФК II в таких условиях может препятствовать этому процессу. И действительно, в результате длительной адаптации к гипоксии происходило восстановление кинетических параметров фермента до фоновых значений (табл.1) [3,4].

3. Роль сукцината в трансмембранной сигнальной функции и межклеточных взаимодействиях. Недавно установлено, что сукцинат является специфическими лигандом рецептора GPR91, локализованного в плазматической мембране [15] и филогенетически близкого к субсемейству пуринергических рецепторов P_2. Сукцинат-зависимая экспрессия рецептора индуцирует его интернационализацию. GPR91 обнаружен более, чем в 20 тканях и спектр его локализации постоянно расширяется. Наибольшей способностью к его экспрессии при гипоксии обладают почки (корковый слой и дистальные трубочки), а также печень, селезенка, тонкая кишка, мочевой пузырь. Экспрессия GPR91 сукцинатом, сопряжена с медиированием двух сигнальных путей: G_i/G_o и G_q, и сопровождается индуцированным высвобождением $[Ca^{2+}]_i$. В настоящее время доказана регуляторная роль GPR91 в сосудисто-почечной гипертензии, заболевании, тесно связанном с атеросклерозом, диабетом и почечной недостаточностью. Сукцинат-индуцированная гипертензия вовлекает ренин-ангиотензиновую систему. Этот процесс отсутствует у GPR91-дефицитных крыс [11,23]. Сукцинат-зависимая экспрессия GPR91 после ишемического повреждения показана: в нейронах ганглиев ретины, где она ответственна за продукцию различных ангиогенных факторов, включая и VEGF [31]; в дендритах нейронов GPR91, где она участвует в иммунных реакциях и выполняет роль сенсора иммунных нарушений, контролируя процесс отторжения трансплантата [30]; в звездчатых клетках печени [11].

Имеются и другие рецепторные пути, в которых сукцинат выступает. как сигнальная молекула. Так установлена регуляторная связь симпатической системы с сукцинатом, а парасимпатической – с α-кетоглутаратом [1,20]. Показано, что стимуляция физиологических функций адреналином включает избирательную активацию СДГ, а сукцинат, действующий в микромолярных концентрациях, является сигнальной молекулой, стимулирующей выделение адреналина и норадреналина.

Наконец, имеются данные о том, что МФК II включается в экспрессию генов глутамат- и допаминергических систем сигнализации [26].

Таким образом, ответная реакция организма на гипоксию, первично реализующаяся на субклеточном митохондриальном уровне через активацию МФК II, способствует инициации каскада сукцинат-зависимых взаимодействующих регуляторных механизмов, формирующихся как на клеточном, так и системном уровнях и контролирующих поддержание метаболического гомеостаза организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кондрашова М.Н.* //Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. М.(1989): 51-66;
2. *Кондрашова М.Н.* //Вопр. Биол. Мед. Фарм. Химии (2002) (1):1-7;
3. *Лукьянова Л.Д.* //Бюлл. Эксп. Биол. Мед. (1997) 124(9): 244-54;
4. *Лукьянова Л.Д.* //Проблемы гипоксии: молекул., физиол. и клин. аспекты. М. (2004): а)5-31; б)275-295;
5. *Лукьянова Л.Д.* //Патогенез (2008) 3: 3-13;
6. *Agani F.H. et al*. //JBC (2000) 275(46): 35863-67;
7. *Aithal H.N., Ramasarma T*. //Indian J. Exp. Biol. (1968) 6(3):179-80;
8. *Chavez J.C. et al.* J. Appl. Physiol. (2000) 89(5): 1937-42;
9. *Feldkamp T. et al.* //Am. J. Renal. Physiol. (2003) 286(4): 749-59;
10. *Caseda R. et al.* //Neurosc. Lett. (2001) 301(3): 171-4;
11. *Correa P.R. et al*. //J. Hepatology (2007) 47 (2): 262-69;
12. *Goldberg N.D., Passonneau J.V., Lowry O.H.* //J. Biol. Chem. (1966) 241(17): 3997-4003;
13. *Gurley S.B., Le T.H., Coffman T.M.* //Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. (2002) 67: 451-7;
14. *Jones N.M., et al*. //Neurosci. Lett. (2006) 404 (1-2): 72-7;
15. *He W. et al.* //Nature (2004) 429: 188-93;
16. *Heinen M. et al.* //Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (2007) 293: 1400-7;
17. *Hems D.A., Brosnan J.T.* //Biochem. J. (1970) 120: 105-11;
18. *Hohl C. et al.* //Arch. Biochem. Biophys. (1987) 259(2): 527-35;
19. *Komaromy-Hiller G. et al*. //Ann. Clin. Lab. Sci. (1997) 27(2): 163-8;
20. *Kondrashova M.N., Doliba N.M.* //FEBS Lett. (1989) 243:153-5;
21. *Krebs H.A*. //Adv. Enzyme Regul. (1970) 8: 335-53;
22. *Kushnir M.M. et al*. //Clin. Chem. (2001) 47: 1993-2002;
23. *Lavoie J.L., Sigmund C.D.* //Endocrinology (2003) 144: 2179-83;
24. *Lukyanova L.D. et al*. //Adapt.Biol. Med. (2008) 5: 245-60;
25. *Maklashinas E. et al.* //BBA Bioenergetics (2002) 1556(1): 6-12;
26. *Napolitano M. et al*. //Neurobiol. Dis. (2004) 15(2): 407-14;
27. *Robinson. B.H.* //Bioch. Biophys. Acta (1998) 1364:271-86;
29. *Rouslin W., Millard R.W.* //J. Mol. Cell. Cardiol. 1980, 12: 639-45;
30. *Rubic T. et al.* //Nat. Immunol. (2008) 9(11): 1261-9;
31. *Sapieha P. et al.* //Nature Medicine (2008) 14: 1067-76;
32. *Selak M.A. et al.* //Cancer Cell (2005) 7: 77-85;
33. *Semenza G.* //Bioch. Pharmacol.(2000) 59: 47-53;
34. *Taegmeyer H.* //Circ. Res. (1978) 43: 808-15;
35. *Weinberg J.M. at al.* //PNAS (2000) 97(3): 2826-31.

РЕГИСТРАЦИЯ НЕРАВНОВЕСНО СВЯЗАННЫХ ИОНОВ ВОДОРОДА НА ВНЕШНЕЙ ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАНЫ МИТОПЛАСТОВ

Моисеева В.С.[1,2], Мотовилов К.А.[1,3], Юрков В.И.[1], Лобышева Н.В.[1,4], Ягужинский Л.С.[1]

[1]НИИ Физико-химической биологии им. Белозерского МГУ им. Ломоносова, Москва
[2]Физический факультет МГУ им. Ломоносова, Москва
[3]Химический факультет МГУ им. Ломоносова, Москва
[4]НИИ Цитохимии и молекулярной фармаколгии, Москва

Настоящая работа посвящена изучению механизма функционирования системы окислительного фосфорилирования митохондрий. Известно, что мультиферментные системы клетки могут работать в двух качественно различных состояниях – в диссоциированном, когда ферменты работают независимо друг от друга, и в состоянии суперкомплекса (метаболона), когда ферменты тесно контактируют друг с другом. В первом случае продукты реакции выбрасываются в объем водной фазы, из которой избирательно захватываются активным центром следующего по цепи фермента. При образовании суперкомплекса промежуточные продукты-субстраты не выбрасываются в объем водной фазы, а передаются по метаболической цепи от фермента к ферменту «из рук в руки». В случае мембранной системы окислительного фосфорилирования митохондрий ключевым промежуточным продуктом окислительных реакций является ион водорода, который обеспечивает перенос свободной энергии окислительных реакций, протекающих в дыхательной цепи, на АТФ-синтазный комплекс.

Ранее в нашей лаборатории лаборатории с помощью препаратов митохондрий, равномерно меченных ковалентно присоединенным pH-зондом (ФИТЦ), было показано, что с внешней стороны внутренней мембраны митохондрий при работе протонных помп возникает фракция неравновесно связанных ионов водорода в присутствии разобщителя, а также в условиях синтеза АТФ.

Настоящая работа имеет своей целью получить независимое подтверждение данным, полученным с помощью pH-зонда, найти прямое доказательство образования «слоя» неравновесно связанных ионов водорода на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий, который возникает в условиях работы дыхательных протонных помп.

В этой работе предпринята попытка зарегистрировать увеличение положительного заряда на поверхности сопрягающей мембраны, вызванное включением работы протонных помп, прямым

электрофоретическим методом по изменению величины Z-потенциала митопластов.

Величину зета-потенциала митопластов, суспендированных в жидкой среде инкубации, измеряли с помощью прибора Malvern Zetasizer Nano system, который, определяя их электрофоретическую подвижность.

Первая часть работы была направлена на отработку методики получения препаратов митопластов, не содержащих митохондрий и сохраняющих высокую активность дыхательных протонных помп.

Контроль функциональной активности митопластов проводился полярографическим методом путем измерения скорости разобщенного дыхания. Чистота препарата определялась двумя методами: 1) полярографически, путем сопоставления скоростей разобщенного дыхания митопластов в средах с низкой и высокой ионной силой; 2) спектрофотометрически, путем определения содержания цитохрома *c* в митопластах.

Критерием чистоты препарата митопластов являлось отсутствие дыхания в среде с высокой ионной силой (120мМ KCl), поскольку в таких условиях из митопластов (в отличие от митохондрий) полностью удаляется один из переносчиков дыхательной цепи – цитохром *c* (рис.1).

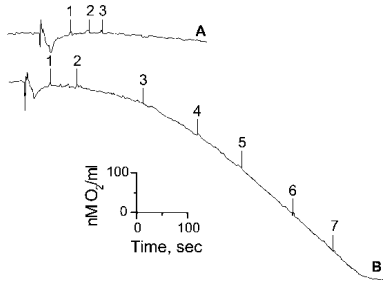


Рис.1. Дыхание митопластов: А) в среде с низкой ионной силой; Б) в среде с высокой ионной силой (120мМ KCl). Добавки: 1 – ротенон, 2 – сукцинат, 3-7 – пентахлорфенол (конечная концентрация пентахлорфенола 5мкМ). Отсутствие дыхания, связанное с выходом цитохрома *c* в присутствии 120мМ KCl, является подтверждением отсутствия внешней мембраны у органелл.

Полнота выхода цитохрома *c* из митопластов в среде с высокой ионной силой была независимо проконтролирована в ходе спектрофотометрических измерений содержания цитохрома *c* в митопластах в средах с низкой и высокой ионной силой (рис.2).

Обычно мы использовали полностью разобщенные препараты митопластов, которым в каждом опыте добавлен пентахлорфенол.

В работе определяли зета-потенциал митопластов в условиях электрофореза. Электрофорез проводился в средах, содержащих субстрат дыхания – сукцинат, поэтому, посуществу, измерения проводились при стационарном режиме работы дыхательных протонных помп митопластов, то есть в условиях, при которых ранее в нашей лаборатории регистрировалось возникнове-ние фракции нерав-новесно связанных

ионов во-дорода с внешней стороны сопрягающей мембраны митохондрий с помощью pH-зонда [1-4].

Мы ожидали, что катали-затор, повышающий скорость реакции диссоциации поверхностно связанных ионов водорода в митопластах, приведет к снижению положительного заряда на мембране (фактически, мы ожидали увеличение имеющегося отрицательного заряда на внешней поверхности мембраны митопластов). Также в опытах проводился полярографический контроль чистоты и активности митопластов.

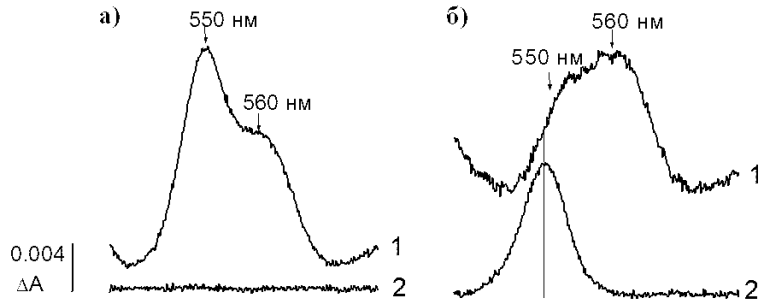


Рис.2. Спектр оптического поглощения: 1 – митопластов, 2 – надосадочной жидкости. а – среда с низкой ионной силой, б – среда с высокой ионной силой (120мМ KCl). Стрелками отмечены максимумы поглощения цитохромов *c* (550нм) и *b* (560нм).

Сопоставлялись результаты экспериментов, проведенных в присутствии 3мМ и 20мМ катализатора (буфера HEPES). Всего было проведено пять больших серий измерений (на пяти препаратах митопластов, выделенных из печени пяти разных крыс). Данные, приведеные в таблицах I-V, показывают, что во всех пяти экспериментах на функционирующих митопластах (дыхательные протонные помпы функционируют) были получены достоверные различия между значениями зета-потенциала в присутствии 3мМ и 20мМ катализатора (HEPES), разница составила 2-4,5мВ.

Статистическая обработка результатов была проведена двумя способами: по величине стандартного отклонения и по критерию значимости Стьюдента, с помощью которого контролировалась достоверность различий во всех опытах с 3мМ и 20мМ HEPES.

Параллельно в качестве контроля исследовалось влияние катализатора на Z-потенциал нефункционирующих митопластов в средах с тем же составом, но в присутствии ингибитора второго комплекса теноилтрифторацетона (ТТФА), который подавляет активность сукцинатдегидрогеназы и, соответственно, функционирование дыхательных протонных помп. Добавлялся также ротенон.

Удалось получить достоверные данные, свидетельствующие о том, что при работе дыхательных протонных помп на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий (точнее на внешней мембране митопластов) возникает избыточный положительный поверхностный заряд, который снижается в присутствии катализатора реакции отрыва ионов водорода. Таким образом, была решена основная задача работы (табл.1).

Табл.1. Опыт – влияние катализатора (буфера HEPES) на величину ζ -потенциала митопластов в условиях функционирования дыхательных протонных помп. Контроль – влияния повышения концентрации катализатора на величину ζ -потенциала нефункционирующих митопластов в условиях ингибирования работы протонных помп.

опыт ζ-потенциал функционирующих митопластов, mV		контроль ζ-потенциал нефункционирующих митопластов, mV	
3мМ HEPES	20мМ HEPES	3мМ HEPES	20мМ HEPES
-19,9	-23,5	-18,8	-21,9
-21,1	-23,9	-21,6	-22,0
-20,9	-23,6	-24,6	-24,1
-19,6	-24,4	-22,5	-23,0
-19,8	-25,8	-22,9	-21,1
-19,3	-25,4	-21,8	-22,8
-20,3	-25,2	-20,0	-22,6
-20,2	-24,7	-20,4	-20,8
Среднее значение и стандартное отклонение: -20,1±0,6	Среднее значение и стандартное отклонение: -24,6±0,9	Среднее значение и стандартное отклонение: -21,6±1,8	Среднее значение и стандартное отклонение: -22,3±1,1
критерий значимости: α=0,05 t=0,00000002560699169 различия достоверны		критерий значимости: α=0,05 t=0,361664755816075 различия не достоверны	

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yaguzhinsky L. S., Yurkov V. I., Krasinskaya I. P.* //Biochim. Biophys. Acta. (2006) 1757(5-6): 408-14;
2. *Krasinskaya I. P., Lapin M. V., Yaguzhinsky L. S.* //Febs Lett. (1998) 440(1-2):223-5;
3. *Krasinskaya I. P. et al.* //Biochemistry (Mosc). (1997) 62(4):364-70;
4. *Krasinskaya I. P. et al.* //FEBS Lett. (1984) 167(1): 176-80.

О СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ I-III В УСЛОВИЯХ ПЕРЕХОДА СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В РЕЖИМ ЛОКАЛЬНОГО СОПРЯЖЕНИЯ

Мотовилов К.А.[1,2], Колесова Г. М.[1], Ягужинский Л.С.[1]

[1]НИИ Физико-Химической Биолонии им. Белозерского
МГУ им. Ломоносова, Москва
[2]Химический факультет МГУ им. Ломоносова, Москва

В нашей лаборатории исследуется явление полиморфизма митохондрий. Сравнительно недавно было закончено описание двух качественно различных режимов работы ключевого звена системы окислительного фосфорилирования – системы сопряжения электронного транспорта и реакции синтеза АТФ в митохондриях. Один из этих режимов соответствует модели Митчелла и отвечает диссоциированной форме мультиферментной системе окислительного фосфорилирования; второй – соответствует модели Вильямса и, очевидно, обусловлен переходом системы в состояние суперкомплекса, при котором ферменты дыхательной цепи и АТФ-синтетеза образуют единую структурно-функциональную систему – так называемы метаболон . Переход между указанными состояниями контролируется системой объёмной регуляции митохондрий, существование которой обнаружил Халестрап [1,2] при исследовании электрон-транспортной системы и подтверждено нами при исследованиях системы сопряжения дыхания и фосфорилирования митохондрий [3]. Переход системы в режим локального сопряжения в гипотонических условиях наблюдается при увеличении объёма матрикса митохондрий в условиях низкоамплитудного набухания [3].

В настоящее время в ряде лабораторий проводятся интенсивные исследования, направленные на выделение и идентификацию суперкомплексов, включающих отдельные фрагменты дыхательной системы митохондрий. Были выделены крупные метаболны, состоящие из различных дыхательных комплексов [4,5]. На настоящем этапе представлялось важным изучить специфические особенности функционирования дыхательных комплексов митохондрий при двух вышеуказанных режимах работы системы сопряжения. В данной работе проводилось сравнительное исследование функционирования электрон-транспортной системы в полностью разобщенных митохондриях, которое осуществлялось в изотонических и гипотонических условиях.

Конкретной задачей настоящей работы явилось выявление различий локализации лимитирующих стадий в системе электронного траспорта митохондрий, функционирующих в режамах локального и делокализованного сопряжения. Поиск лимитирующей стадии проводился методом ингибиторного анализа с помощью ингибиторов, взаимодействующих с центрами связывания CoQ в комплексах II и III. Известно, что в линейных полиферментных системах для определения лимитирующей стадии был разработан метод, теория и практика которого приведена в работах [6,7]. Этот метод, однако, не пригоден в нашем случае, поскольку комплекс III является существенно нелинейной системой. Метод двойного ингибиторного анализа также оказался неприемлем для наших исследований, поскольку, согласно рабоете [8], связывание ингибитора в центре P существенно изменяет взаимодействие второго ингибитора с центром N. В связи с этим выявление лимитирующих стадий в электронтранспортной цепи проводилось нами полуэмпирическим методом – путём детального титрования дыхания митохондрий низкими концентрациями миксотиазола и антимицина. Этот метод был успешно применён авторами работы [7] для выявления лимитирующих стадий в дыхательной системе митохондрий. Он позволяет идентифицировать два предельных состояния функционирующей полиферментной системы. Первое состояние – когда данный конкретный фермент в данных конкретных условиях не контролирует скорость её функционирования, и второе состояние – когда фермент вносит существенный вклад в контроль скорости её работы. Соответственно, в первом случае при добавлении низких концентраций ингибитора скорость работы мультиферментной системы не меняется или меняется очень незначительно;. во втором случае, согласно принятой модели, уже сколь угодно низкие концентрации ингибитора должны снижать наблюдаемую скорость функционирования системы. Особое внимание в наших исследованиях было уделено изучению изменений относительной активности P и N центров комплекса III, который, согласно работе [6], может функционировать в режиме flip-flop механизма. Результаты ингибиторного анализа приведены на рис.1.

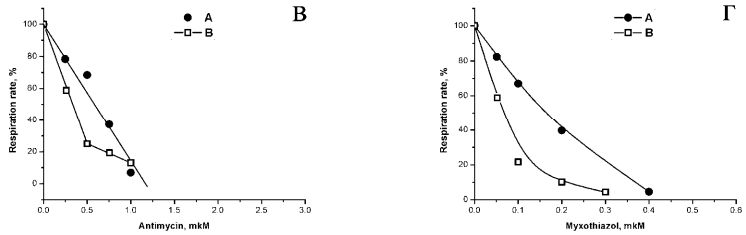


Рис.1. Титрование дыхания полностью разобщенных митохонд-рий печени антимицином (а,в) и миксотиазолом (б,г) в условиях окисления малата в изотонии (а,б) и гипотонии. Кривые, обозна-ченные черными точками (А), получены в отсутствии ТТФА. Кривые, обозначенные квадратами (В), получены при подавлении активности второго комплекса добавлением ТТФА (8мкМ).

В настоящей работе были обнаружены следующие особенности функционирования электрон-транспортной цепи разобщенных митохондрий, наблюдающиеся в условиях делокализованного (рис.1а,б) и локального сопряжения (рис.1в,г) в изо и гипотонических средах инкубации соответственно.

1. Обнаружено, что в изотонических средах комплекс III лимитирует дыхательную активность в митохондриях. Это видно из данных рис.1а (кривая А); можно видеть, что антимицин в этих условиях в низких концен-трациях резко снижает дыхательную актив-ность.

2. Как видно из сопоставления рис.1а,б, функционирование комплекса III по flip-flop механизму не может реализоваться в изотонических средах (в условиях делокализованного сопряжения). Можно видеть, что в отличие от ингибитора N-центра антимицина, миксотиазол (ингибитор P-центра) в низких концентрациях не ингибирует Q-цикла и, следовательно, жесткое сопряжение работы P,N центров в этом случае отсутствует. В условиях нашего эксперимента при окислении малата синтезируется субстраты комплексов II и I. В связи с полученными результатами представлялось важным изучить влияние ингибиторов комплексов на относительную активность P, N центров. Поскольку обе этих дегидрогеназы могут одновременно взаимодействовать с комплексом III, что должно накладывать отпечаток на характер функционирования Q-цикла. Чтобы упростить систему активность комплекса II была подавлена ТТФА, который был предварительно внесен до добавления субстрата дыхания – малата. В этих условиях ТТФА не вызывает снижения скорости работы электрон-транспортной системы. Наблюдаемая скорость окисления малата в присутствии ингибитора СДГ не только не снижалась, но возрастала на 15-20%. Можно было бы заключить поэтому, что окисление сукцината в условиях нашего эксперимента не происходит. Однако, как показали эксперименты по титрованию дыхания ингибиторами комплекса III (рис.1а и 1б, кривые В), подавление активности СДГ оказывает существенное влияние на систему электронного транспорта. Оно вносит качественные изменения в работу комплекса bc_1.

3. Таким образом, было обнаружено, что комплекс II управляет функционированием bc_1-комплекса. Как это видно из рис.1а,б, в присутствии ТТФА (8мкМ) – ингибитора комплекса II изменяется лимитирующая стадия в работе Q-цикла. Из рис.1а (кривая В) можно видеть, что ингибитор N-центра антимицин в низких концентрациях практически не влияет на скорость дыхания, но при этом ингибитор P-центра – миксотиазол – эффективно снижает скорость дыхания в низких концентрациях (рис.1б, кривая В).

4. Нами были поставлены аналогичные серии экспериментов в гипотонических условиях, результаты которых представлены на рис.1в,г.

Можно видеть, что в этом случае низкие концентрации ингибиторов обоих центров Q-цикла – миксотиазола и антимицина – эффективно контролируют скорость функционирования третьего комплекса (рис.1в, кривая А и рис.1г, кривая А), ингибируя дыхание митохондрий в низких концентрациях. В таких условиях работа P, N центров Q-цикла должна быть жестко сопряжена и может протекать по flip-flop механизму.

5. В гипотонических условиях ингибитор второго комплекса ТТФА качественно не изменяет харатера функционирования комплекса III. Добавление этого ингибитора усиливает эффективность действия миксотиазола и антимицина (рис.1в, кривая В и рис.1г, кривая В).

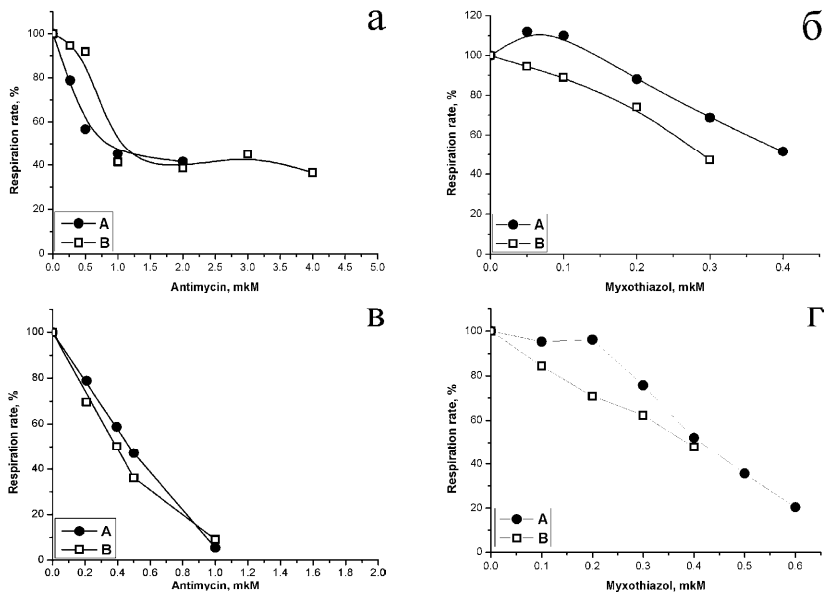


Рис.2. Титрование дыхания разобщенных митохондрий печени (условия дурохинонового шунта) антимицином (а,в) и миксотиазолом (б,г) в изотонических условиях. Кривые, обозначенные черными точками (А), получены в условиях, когда активность второго комплекса не подавлена. Кривые, обозначенные прозрачными квадратами (В), получены при подавлении активности второго комплекса ТТФА 8мкМ. Данные для рисунков а,б были получены в изотонических условиях, а данные для рисун-ков в,г были получены в гипотонических условиях.

Для того, чтобы определить возможное влияние первого комплекса на функционирование комлпекса III, был проведен аналогичный ингибиторный анализ на митохондриях, в которых активность NADH-дегидрогеназы была подавлена ротеноном. При этом в

систему был добавлен дурохинон, который выполнял роль искусственного шунта, осуществляющего перенос электронов от NADH (ДТ-диафоразы) на комплекс III. Результаты ингибиторного анализа, проведенного на такой системе в изотонических условиях, качественно совпадали с результатами предыдущей серии экспериментов, проведенной в отсутствии ротенона (рис.2а,б). Однако, в гипотонических условиях при блокировании комплекса I ротеноном (но не комплекса II) нарушается жесткое взаимодействие между центрами P и N (рис.2в,г кривые А). В гипотонических условиях, если в системе одновременно присутствуют ингибиторы комплексов I и II (ротенон и ТТФА соответственно), низкие концентрации ингибиторов обоих центров Q-цикла (антимицина и миксотиазола) эффективно подавляли разобщенное дыхание митохондрий (рис.2в,г).

Следовательно, на этой модели в определённых условиях P, N-центры Q-цикла также могут функционировать в режиме жесткого сопряжения. Таким образом, в работе было показано, что при переходе к условиям, в которых система окислительного фосфорилирования функционирует в условиях локального сопряжения, происходят глубокие качественные изменения в механизме функцио-нирования комплека III, при этом качественно изменяется харатер взаимодействия комплекса III с комплексами I и II. Анализ полученных данных, приведённых на рис.1,2, позволяет говорить о том, что в определённых условиях комплексы I, II, III могут функционировать как сопряженная система.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Whipps D.E., Halestrap A.P.* //Biochem. J. (1984) 221(1): 147-52;
2. *Halestrap A.P.* //Biochim. Biophys. Acta. (1989) 973(3): 355-82;
3. *Krasinskaya I.P. et al.* //FEBS Lett. (1984) 167(1): 176-80;
4. *Stuart R.A.* //J. Bioenerg. Biomembr. (2008) 40(5): 411-7;
5. *Genova M.L. et al.* //Biochim. Biophys. Acta (2008) 1777(7-8): 740-6;
6. *Kacser H., Burns J.A.* //Rate of Control of Biological Processes. London (1973): 65-104;
7. *Taylor R.W. et al.* //J. Biol. Chem. (1994) 269(5): 3523-8;
8. *Covian R., Trumpower B.L.* //Biochim. Biophys. Acta (2008) 1777(9): 1079-91.

ДВИЖЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СЕТИ *N. CRASSA* В ПРОЦЕССЕ ВЕРХУШЕЧНОГО РОСТА

Потапова Т.В., Бойцова Л.Ю., Голышев С.А., Горячева А.Е.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Вегетативный мицелий плесневого гриба *Neurospora crassa* осваивает пространство с помощью верхушечного роста (ВР) – сложного процесса, требующего координированной работы большого числа внутриклеточных органелл в верхушечной зоне [1-3]. ВР гиф *N. crassa* представляет собой формирование трубки диаметром 10-20мкм с жесткими хитиновыми стенками, проталкивание ее вперед и заполнение цитоплазмой и органеллами. Механизм ВР основан на направленном транспорте везикул, содержащих необходимые ферменты и молекулы-предшественники, и их слиянии с верхушечной мембраной (около 40000 событий в секунду). Такая эффективность – результат согласованной работы сотен клеток гифы, находящихся на расстоянии до 6000мкм от зоны роста, достигаемый за счет протяженной системы актиновых филаментов и микротрубочек [4]. В экзоцитозе и эндоцитозе везикул большую роль играют ионы Ca^{2+}. Большой интерес представляет выяснение механизмов обеспечения локальных энергетических потребностей процессов, происходящих в апикальной зоне гифы, с учетом того, что митохондрии, как известно, не способны быстро формироваться *de novo*.

Непосредственно в верхушке гифы *N. crassa* разными методами выявляется высокая концентрация митохондрий. На основании оценки интенсивности дыхания и характера окрашивания специфическими флуоресцентными зондами выдвинуто предположение, что митохондрии в верхушечной зоне не выделяют АТФ, а работают только как регуляторы концентрации ионов кальция [5]. Это предположение хорошо согласуется с нашими экспериментальными и теоретическими модельными оценками электрической гетерогенности гифы *N. crassa*, характерной особенностью которой является неспособность молодых верхушечных клеток на участке около 200мкм поддерживать высокий уровень мембранного потенциала без электрической связи через септальные поры с более взрослыми клетками [6,7].

По данным наблюдений с помощью высокоразрешающей микроскопии за распределением прижизненных флуоресцентных зондов большинство внутриклеточных органелл в гифах – нитевидные или трубчатые структуры, которые фрагментируются при стрессовых воздействиях [8]. По современным представлениям в клетках дрожжей и

мицелиальных грибов митохондриальные сети способны перемещаться с помощью элементов цитоскелета – микротрубочек или микрофиламентов [9]. Охарактеризован ряд генов, отвечающих за синтез специфических белков-посредников, которые обеспечивают эффективные взаимодействия митохондриальных структур с цитоскелетом [10], и убедительно продемонстрирована роль этих белков путем создания соответствующих мутантных организмов, в том числе, температурно-зависимых.

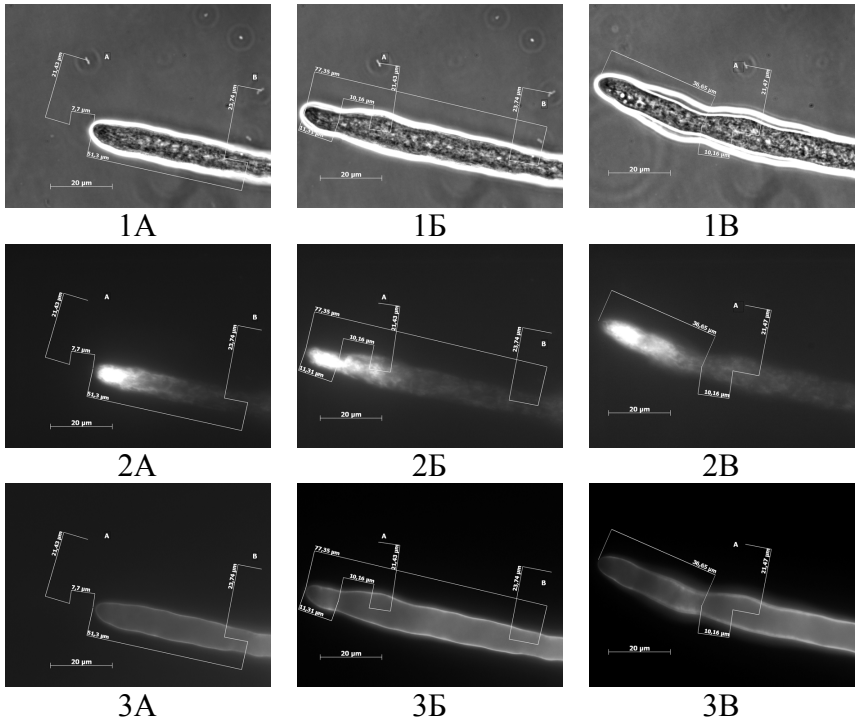


Рис.1. ВР гифы *Neurospora*, предварительно окрашенной *MitoTracker Red.* Интервал между кадрами (А) и (Б) – 4мин 14с, между (Б) и (В) – 5мин 38с. На фото представлены: (1) фазовоконстрастные изображения; (2) сигналы *MitoTracker Red*; (3) сигналы *Calcofluor white*. Масштаб – 20мкм.

Нам удалось наблюдать *in vivo* характерные особенности перемещения митохондриальной сети в процессе ВР гиф *N. crassa* с помощью флуоресцентного зонда *MitoTracker Red*, который, благодаря способности прочно связываться с митохондриальными белками, обычно используют для изучения фиксированных клеток. Культуры выращивали на агаризованной среде Фогеля и готовили для микроскопических

наблюдений, как описано в [11]. *MitoTracker Red* (5-10мкМ; Molecular Probes, США) наносили на поверхность мицелия и смывали через 10мин жидкой средой. Участок верхушечной зоны мицелия, обработанный *MitoTracker Red*, вырезали вместе с агаром и переносили мицелием вниз на стеклянное дно камеры для микроскопирования в каплю флуоресцентного маркера клеточной стенки *Calcofluor white* (15мкМ, «Sigma», США), как описано в [11].

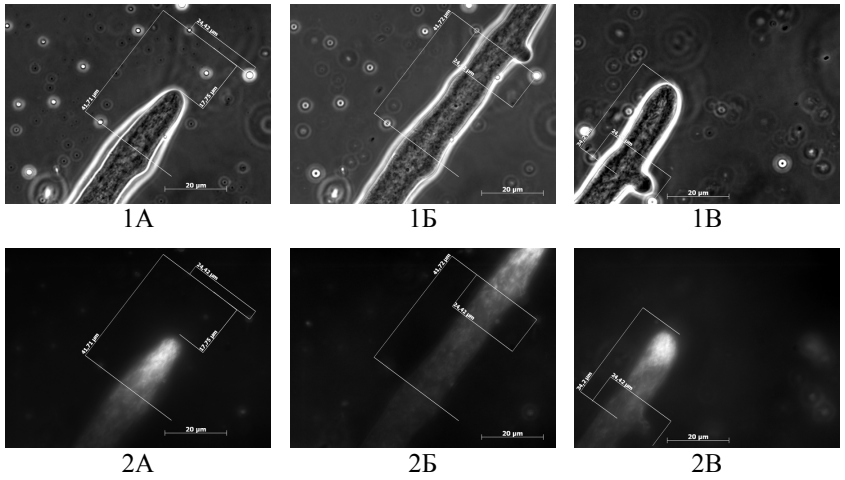


Рис.2. Боковое ветвление в ходе ВР гифы *Neurospora*, предварительно окрашенной *MitoTracker Red.* Интервал между кадрами (А) и (Б) – 6мин 20с, между (Б) и (В) – 1мин 13с. На фото представлены: (1) фазовоконстрастные изображения; (2) сигналы *MitoTracker Red*. Масштаб – 20мкм.

Препараты изучали и фотографировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), управляемого программным комплексом Axiovision 4.5 (Carl Zeiss Imaging) и оборудованного объективами Plan-Neofluar 10x (NA 0,5) и 100x (NA 1,3). Для возбуждения и регистрации флуоресценции *Calcofluor white* использовали наборы фильтров DAPI (возбуждающий фильтр 365/12нм, делительное зеркало 395нм, запирающий фильтр 379нм); для *MitoTracker Red* – Cy3 (546/12, 580 и 590нм, соответственно). Параллельно регистрировали фазово-контрастное изображение. Для регистрации изображений использовали цифровую камеру ORCA II ERG-2 (Hamamatsu Photonics, Япония). Масштаб результирующих изображений – 14,93 пикселя на один микрон. Анализ изображений осуществляли с помощью программы AxioVision LE.

В ходе экспериментов ВР гиф несколько замедлялся по сравнению с нормой (20-30мкм/мин при 24°С), кроме того иногда отклонялась от идеальной трубчатая форма гифы. Тем не менее, мы наблюдали удлинение гиф и их ветвление, как путем раздвоения верхушки (рис.3), так и путем образования боковых выростов (рис.2,4). Сигналы *Calcofluor white* обнаруживались как ярко светящиеся контуры гифы и септальных перегородок, сигналы *MitoTracker Red* – как внутригифальные нитчатые структуры, переплетающиеся в сеть с образованием ярко светящегося сгустка («шапочки») непосредственно в зоне ВР. Положение «шапочки» соответствует области повышенной концентрации митохондрий [4,8]. В наших опытах наблюдалось (рис.1-4) перемещение «шапочки» вместе с удлинением гифы. Размеры «шапочки» и положение ее относительно верхушки при этом практически не изменялись.

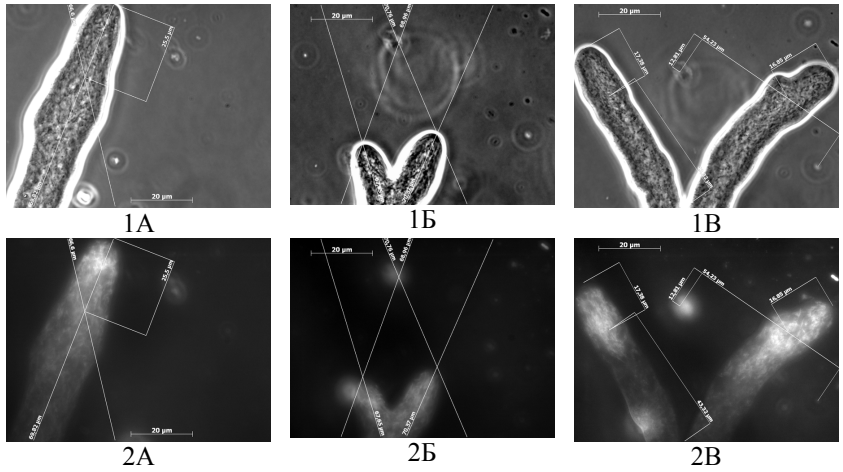


Рис.3. Раздвоение верхушки гифы *Neurospora*, предварительно окрашенной *MitoTracker Red.* Интервал между кадрами (А) и (Б) – 1мин 33с, между (Б) и (В) – 3мин 41с. На фото представлены: (1) фазовоконстрастные изображения; (2) сигналы *MitoTracker Red*. Масштаб – 20мкм.

В боковых выростах, возникавших на удалении от гифальной верхушки, свечение не наблюдалось (рис.2). При раздвоении верхушки (рис.3) или возникновении точки ветвления вблизи «шапочки», окрашенной маркером, в новой верхушке обнаруживалось свечение (рис.3,4).

Полученная экспериментальная модель может оказаться полезной для изучения механизмов энергообеспечения ВР, принципов самосборки субклеточных структур, взаимодействий митохондриальной сети с цитоскелетом.

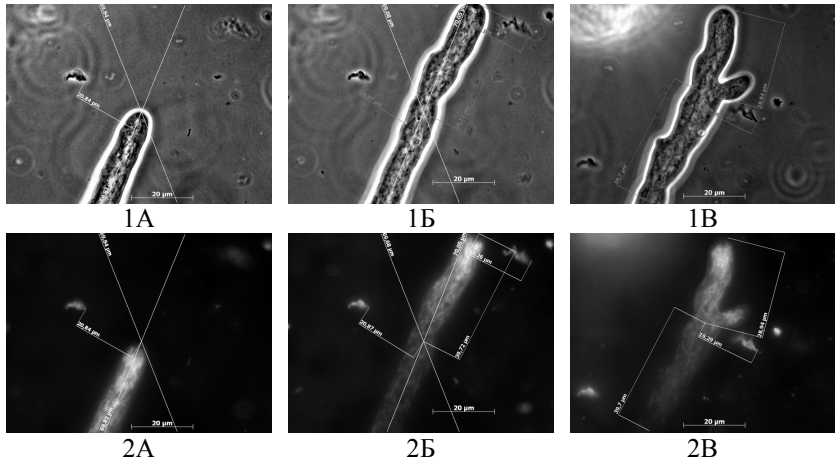


Рис.4. Боковое ветвление вблизи верхушки гифы *Neurospora*, предварительно окрашенной *MitoTracker Red.* Интервал между кадрами (А) и (Б) – 6мин 23с., между (Б) и (В) – 5мин 34с.. На фото представлены: (1) фазовоконстрастные изображения; (2) сигналы *MitoTracker Red*. Масштаб – 20мкм.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Потапова Т.В.* //Биол. мембраны (2006) 23 (6): 436-52;
2. *Davis. R.H.* //Neurospora: Contributions Model Organism. Oxford (2000) 498p;
3. *Borkovich K.A. et al.* //Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2004) 68 (1): 1-108;
4. *Trinci A.P.J. et al.* //Mycota I. Growth, Diff. Sexual. Berlin-Heidelberg (1994): 175-93;
5. *Levina N.N., Lew R.R.* //Fung. Genet. Biol. (2006) 43 (1): 65-74;
6. *Potapova et al.* //FEBS Lett. (1988) 241 (12):173-6;
7. *Асланиди К.Б. и др.* //Биол. Мембраны (1996) 13 (1): 29-39;
8. *Hickey P.C. et al.* //Meth. Microbiol. (2005) 34: 63-87;
9. *Fuchs et al.* //J. Cell Sci. (2002) 115: 1931-7;
10. *Prokisch H. et al.* //Mol. Biol. Cell (2000) 11 (9): 2961-71;
11. *Потапова Т.В. и др.* //Биол. Мембраны (2008).

ЦИКЛОСПОРИН А-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ РАЗОБЩАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ БЕЗ УЧАСТИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

Самарцев В.Н., Рыбакова С.Р., Кожина О.В., Марчик Е.И.

Марийский государственный университет, Йошкар-Ола

Циклоспорин А, нейтральный липофильный циклический ундеканпептид, известный как эффективный иммуносупрессор, в качестве лекарственного средства широко применяется при трансплантации органов и при некоторых аутоиммунных заболеваниях [1]. В митохондриях печени млекопитающих циклоспорин А связывается с высоким сродством с пепетидил-пролил *цис-транс* изомеразой (другое название циклофилин D), и такое специфическое взаимодействие препятствует индукции кальций-зависимой неспецифической проводимости внутренней мембраны митохондрий (открытие поры) уже при его концентрации 100-150пмоль/мг белка [2]. Благодаря этой уникальной способности циклоспорин А часто используется в качестве инструмента при исследовании механизма гибели клеток в связи с индукцией кальций-зависимой неспецифической проводимости внутренней мембраны митохондрий [3]. Недавно нами установлено [4], что наряду с карбоксиатрактилатом и глутаматом циклоспорин А в концентрации 5мкМ способен ингибировать стимулируемое лауратом дыхание митохондрий. Ресопрягающие эффекты циклоспорина А, карбоксиатрактилата и глутамата аддитивны, и эти соединения, действуя одновременно, способны полностью подавить разобщающую активность лаурата [4]. Было предположено, что в митохондриях печени в протонофорном разобщающем действии жирных кислот, наряду с ADP/ATP антипортером и аспартат/глутаматным антипортером, принимает участие особая система, чувствительная к циклоспорину А, но не связанная с циклофилином D [4]. Необходимы дальнейшие исследования по выяснению механизма разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени и, в частности, составляющей разобщения, чувствительной к действию циклоспорина А.

Опыты проводили на митохондриях, выделенных из печени белых половозрелых крыс массой 250г и месячных крысят массой 50г общепринятым методом дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью БСА, как подробно описано ранее [5]. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при температуре 25^{o}C с помощью кислородного электрода Кларка и полярографа LP-9. Среда инкубации содержала 250мМ сахарозу, 10мМ сукцинат калия, 0,5мМ EGTA, 3мМ $MgCl_2$, 10мМ Mops-KOH (pH 7,4). При исследовании разобщающего действия пальмитата в полярографическую ячейку сразу после митохондрий (~1,1мг/мл) добавляли ротенон (2мкМ) и олигомицин (2мкг/мл), далее через 2мин после этого 30мкМ пальмитат, далее через 1,5мин. – 1мкМ карбоксиатрактилат, через 1,5мин – 3мМ аспартат и еще через 1,5мин – 7мкМ циклоспорин А. Мембранный потенциал митохондрий оценивали по распределению тетрафенилфосфония [5]. Для количественной оценки протонофорной разобщающей активности пальмитата, как было обосновано ранее [6], использована величина удельной разобщающей активности пальмитата (V_{Pal}), определяемая как увеличение скорости дыхания митохондрий пальмитатом, отнесенное к его концентрации по формуле: $(J_u\text{-}J_o)/[U]$, где J_o и J_u – скорости дыхания (нМ O_2/мин) соответственно до и после добавления пальмитата, $[U]$ – его концентрация (мкМ). Ранее величина V_{Pal} рассматривалась как состоящая из трех частей – чувствительной к карбоксиатрактилату, чувствительной к глутамату (или аспартату) и нечувствительной ни к одному из этих реагентов (V_{Ins}) [6]. В настоящей работе, в связи с обнаруженным эффектом циклоспорина А подавлять нечувствительное к действию карбоксиатрактилата и глутамата (аспартата) разобщение, эта величина рассматривается как третья составляющая разобщения – чувствительная к действию циклоспорина А (V_{Cs}).

В работе был применен пальмитат как анион одной из наиболее распространенных природных жирных кислот. Нами показано, что митохондрии печени месячных крысят по сравнению с митохондриями взрослых крыс имеют более высокую скорость дыхания как в контролируемом состоянии, так и в присутствии пальмитата [6]. Это в полной мере подтверждается в настоящей работе (табл.1). Разобщающее действие пальмитата в том и в другом случае эффективно подавляется карбоксиатрактилатом и аспартатом (табл.1), что свидетельствует об участии в разобщении ADP/ATP антипортера и аспартат/глутаматного антипортера. Полное подавление разобщающего действие пальмитата достигается при последующем добавлении циклоспорина А (табл.1).

В митохондриях печени месячных крысят пальмитат стимулирует дыхание в существенно большей степени, чем в митохондрий взрослых крыс ([6] и табл.1). И в этом случае полное подавление разобщающего действие пальмитата достигается при последующем добавлении циклоспорина А (табл.1). Необходимо отметить, что составляющая разобщающего действия пальмитата, чувствительная к циклоспорину А, не обусловлена индукцией этой жирной кислотой кальций-зависимой неспецифической проницаемости митохондрий (открытие поры). В пользу этого утверждения можно привести следующие доводы: во-первых, разобщающее действие пальмитата наблюдается в присутствии хелатирующего агента для ионов кальция ЭГТА, во-вторых,

карбоксиатрактилат ингибирует стимулируемое пальмитатом дыхание (табл.1), в то время как в условиях открытия поры – наоборот, усиливает дыхание [7], в-третьих, ресопрягающий эффект циклоспорина А в наших условиях проявляется при концентрации существенно большей, чем та, в которой он эффективно препятствует открытию поры. Как видно из табл.2, величины составляющих разобщающей активности пальмитата V_K и V_{Asp} приблизительно одинаковы в митохондриях печени взрослых крыс и крысят, в то время как величина составляющей разобщения V_{Cs} значительно больше в митохондриях крысят.

Табл.1. Сравнение скорости дыхания митохондрий печени крыс массой 250г и крысят массой 50г в присутствии пальмитата и при последующем добавлении карбоксиатрактилата, аспартата и циклоспорина. Добавки: 30мкМ пальмитата (Пальм), 1мкМ карбоксиатрактилата (Катр), 3мМ аспартата (Асп), 7мкМ циклоспорина (ЦС). Здесь и далее в табл.2 приведены средние значения±стандартная ошибка среднего. *p<0,01 (критерий Стьюдента).

Добавки	Скорость дыхания (нмоль O_2/мин на 1мг белка)	
	Митохондрии крыс массой 250г (n=6)	Митохондрии крысят массой 50г (n=6)
Без добавок	10,8±0,3	15,9±0,9*
Пальм	24,3±0,8	37,4±2,0*
Пальм+Катр	18,2±0,8	29,2±1,3*
Пальм+Катр+Асп	13,4±0,5	23,6±1,3*
Пальм+Катр+Асп+ЦС	10,8±0,3	15,9±0,9*

Табл.2. Сравнение разобщающей активности пальмитата (V_{Pal}), а также составляющих частей разобщающей активности пальмитата: чувствительной к карбоксиатрактилату (V_K), чувствительной к аспартату (V_{Asp}) и чувствительной к циклоспорину А (V_{Cs}) в митохондриях печени крыс массой 250г и крысят массой 50г. Добавки, как в табл.1.

Символы	Разобщающая активность (нмоль O_2/мин на 1мкМ пальмитата)	
	Митохондрии крыс массой 250г (n=6)	Митохондрии крысят массой 50г (n=6)
V_{Pal}	544±19	735±13*
V_K	249±13	276±20
V_{Asp}	194±5	189±9
V_{Cs}	101±4	267±11*

Таким образом, проведенные исследования показали, что в митохондриях печени разобщающее действие жирных кислот полностью подавляется при совместном действии карбоксиатрактилата, аспартата и циклоспорина А. Можно было бы полагать, что чувствительная к циклоспорину А структура, наряду с ADP/ATP антипортером и с аспартат/глутаматным антипортером, формирует третий путь возвращения протонов в матрикс при участии жирных кислот. Однако, в отличие от карбоксиатрактилата и аспартата (или глутамата), циклоспорин А в указанной выше концентрации не влияет на мембранный потенциал митохондрий в присутствии жирной кислоты как при добавлении его до карбоксиатрактилата и аспартата (или глутамата), так и при добавлении его после этих агентов (данные не приведены). Следовательно, этот третий путь разобщающего действия жирных кислот по своему механизму сильно отличается от первых двух. Полученные результаты позволяют предположить, что стимуляция дыхания митохондрий печени жирными кислотами обусловлена, помимо их протонофорного действия при участии ADP/ATP антипортера и аспартат/глутаматного антипортера, еще и активацией транспорта электронов по дыхательной цепи без снижения мембранного потенциала. Полученных данных недостаточно для объяснения механизма стимуляции дыхания пальмитатом без изменения мембранного потенциала. В настоящее время имеются лишь фрагментарные данные о подобном действии на митохондрии некоторых веществ – так называемых отключателей (decaplers), общих и местных анестетиков [8], а также некоторых монокарбоновых [8] и дикарбоновых жирных кислот [5].

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы министерства образования и науки РФ «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010г)» №2.1.1/4556.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schreiber S.L., Crabtree G.R.* //Immunol. Today (1992) 13(1): 136-42;
2. *Halestrap A.P., Davidson A.M.* //Biochem. J. (1990) 268(1): 153-60;
3. *Kong J.Y., Rabkin S.W.* //Biochim. Biophys. Acta (2000) 1485(1): 45-55;
4. *Самарцев В.Н., Кожина О.В., Рыбакова С.Р.* //Биол. Мембр. (2008) 25(3): 191-5;
5. *Маркова О.В., Бондаренко Д.И., Самарцев В.Н.* //Биохимия (1999) 64(5): 679-85;
6. *Самарцев В.Н. и др.* //Биохимия (2004) 69(6): 832-42;
7. *Мохова Е.Н., Хайлова Л.С.* //Биохимия (2005) 70(2): 197-202;
8. *Rottenberg H.* //Biochim. Biophys. Acta (2000) 1018(1): 1-17.

РОЛЬ ЦИННАМОВОЙ И БЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ В ДИСФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ ПРИ СЕПСИСЕ

Теплова В.В.[1], Федотчева Н.И.[1], Белобородова Н.В.[2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Научный центр сердечно-сосудистой хирургии
им. А.Н. Бакулева РАМН, Москва

Основной причиной летальности при тяжелых формах сепсиса, возникающего при длительных инфекционных и воспалительных заболеваниях, послеоперационных осложнениях и травмах является возникновение и развитие полиорганной недостаточности. Прогрессирующее развитие синдрома полиорганной недостаточности при сепсисе затрагивает такие важные органы, как легкие, сердце, печень, почки, мозг. В настоящее время установлено, что индуцированное сепсисом развитие полиорганной недостаточности связано с нарушением метаболизма кислорода и активацией анаэробного метаболизма, происходящими на фоне нормального содержания кислорода в тканях [1,2]. Это явление, называемое «цитопатическая гипоксия», сопряжено с патологическим снижением аэробного метаболизма в органах и тканях [1-4]. Наиболее вероятной причиной этих нарушений может быть дисфункция митохондрий, в результате которой происходит переключение клеточного метаболизма с аэробного митохондриального на анаэробный гликолитический с повышением в крови больных концентрации лактата. Было обнаружено, что при сепсисе снижается активность ключевых митохондриальных ферментов цикла трикарбоновых кислот и переноса электронов по дыхательной цепи. В биоптатах скелетной мышцы обнаружено снижение скорости окисления НАД-зависимых субстратов, ингибирование I комплекса дыхательной цепи (НАДН- убихинон оксидоредуктазы) и пируват дегидрогеназы [5,6], а в биоптатах сердечной мышцы – ингибирование IV комплекса дыхательной цепи (цитохром оксидазы) митохондрий [7,8]. Другая группа митохондриальных дефектов, возникающих при сепсисе, связана с истощением антиоксидантов в матриксе митохондрий. При ряде патологий, в том числе и при сепсисе, возрастает продукция оксида азота (NO), повышение концентрации которой приводит к образованию пероксинитрита ($ONOO^-$) и ингибированию им аконитазы и H^+-АТФ-азы [1,5-7]. В настоящее время предполагается, что именно NO может иметь большое значение в дисфункции митохондрий при сепсисе, так как NO является конкурентным по отношению к кислороду ингибитором цитохром оксидазы. Блокируя транспорт электронов по дыхательной цепи, NO способствует образованию супероксида, и соответственно

пероксинитрита, который в свою очередь приводит к модификации структуры и функции различных митохондриальных белков.

Таким образом, анализ литературных данных указывает на ключевую роль митохондрий в развитии септического синдрома. Однако, причины и механизмы митохондриальной недостаточности, обнаруживаемой при сепсисе, остаются невыясненными. Ранее нами было установлено, что при тяжелых формах сепсиса происходит накопление низкомолекулярных фенольных кислот, продуктов аэробного и анаэробного метаболизма клинически значимых бактерий *K. pneumonia, E. coli, S. aureus, S. marcesceus, E. cloacae, S. epidermis*, что приводит к нарушению нормального функционирования митохондрий. Наиболее выраженные изменения наблюдались для гидроксифениллактата, уровень которого при сепсисе возрастал почти на два порядка, от 0,47 до 33,2мкМ, а также фенилацетата, фениллактата, фенилпропината и гидроксифенилацетата, концентрации которых увеличивались от минимальных значений, равных 0,68мкМ в норме, до максимальных 14,3мкМ при сепсисе. Нами было показано, что в высоких концентрациях (0,2-1мМ) эти фенольные кислоты вызывают снижение скорости окисления НАД-зависимых субстратов. В значительно меньших концентрациях (0,01-0,1мМ) они влияют на индуцированное менадионом открытие неспецифической, циклоспорин- чувствительной поры и продукцию активных форм кислорода [9]. К этому классу низкомолекулярных фенольных кислот относятся бензойная кислота (фенилформат) и циннамовая кислота (фенилакрилат), а также гидроксилированные (2,4-дигидроксибензоат) и амино (2-аминобензоат) производные бензоата. В данной работе показано влияние этих соединений на мембранный потенциал, дыхание, окислительное фосфорилирование и кальций транспортирующую способность митохондрий. Обнаружено, что ингибирование дыхания и снижение мембранного потенциала под действием бензойной и циннамовой кислот происходит с участием окисления тиоловых групп.

Результаты и обсуждения. Так как увеличение уровня фенольных кислот при сепсисе может приводить к дисфункции митохондрий, мы исследовали их влияние на основные митохондриальные функции. Исследование влияния фенольных кислот на митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$) показало, что значительное снижение мембранного потенциала наблюдалось только под действием циннамовой и бензойной кислот в концентрациях 50 и 100мкМ соответственно, тогда как, даже при более высоких концентрациях, 2,4-дигидроксибензоат и 2-аминобензоат не оказывали заметного влияния на $\Delta\Psi_m$ (рис.1А). Было обнаружено, что циннамовая и бензойная кислоты снижают $\Delta\Psi_m$ митохондрий, окисляющих НАД- зависимые субстраты (рис.1Б, кривая 1) и не влияют на мембранный потенциал, поддерживаемый окислением

сукцината (рис.1Б, кривая 2). Снижение $\Delta\Psi_m$ под действием циннамовой кислоты частично восстанавливалось дитиотриэтолом (ДТТ), а последующее добавление менадиона приводило к полному восстановлению $\Delta\Psi_m$ (рис.1Б, кривая 1). Полученные данные указывают на участие в эффекте циннамовой кислоты двух процессов – окисления тиоловых групп и ингибирования I комплекса дыхательной цепи. Как видно на рис.1В падение мембранного потенциала под действием ротенона, ингибитора I комплекса дыхательной цепи, полностью восстанавливается менадионом. Однако последующее добавление циннамовой кислоты индуцирует снижение $\Delta\Psi_m$, которое может быть восстановлено ДТТ и сукцинатом. Эти данные наглядно демонстрируют SH-зависимое действие циннамовой кислоты. На основании этих данных можно также сделать вывод о том, что циннамовая кислота действует не только на I комплекс дыхательной цепи, но и на другие ферменты.

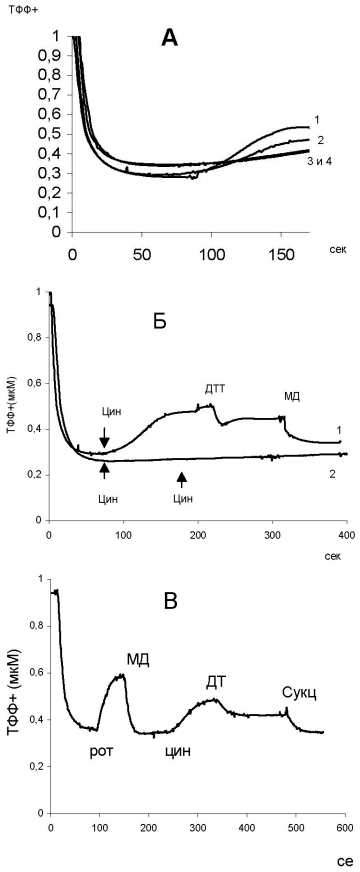


Рис.1. Влияние фенольных кислот на мембранный потенциал митохондрий. А - сравнение действия циннамовой (1), бензойной (2), 2,4-дигидроксибензойной (3) и 2-аминобензойной (4) кислот. Б, кривая 1 – снятие эффекта циннамовой кислоты (50мкМ) дитиотриэтолом (DTT, 1мМ) и менадионом (МД, 25мкМ); кривая 2 – отсутствие влияния циннамовой кислоты (две добавки по 100мкМ) на митохондриальный мембранный потенциал, поддерживаемый окислением сукцината (4мМ). В – SH-зависимость действия циннамовой кислоты. Инкубация митохондрий (1,2мг белка/мл среды инкубации) проводилась в среде 125мМ KCl, 10мМ HEPES, 1,5мМ фосфат, pH 7,25, субстраты окисления пируват (4мМ) и малат (2мМ).

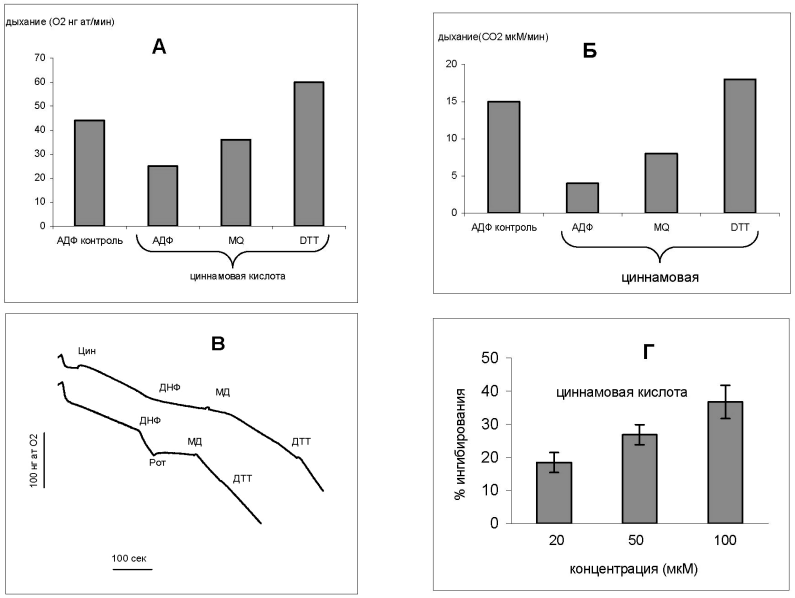


Рис.2. Влияние циннамовой кислоты на АДФ-стимулируемое и разобщенное дыхание митохондрий. А – ингибирование дыхания циннамовой кислотой (50мкМ) и снятие ингибирования менадионом (МД, 50мкМ) и дитиотриэтолом (DTT, 1мМ); Б – то же, с регистрацией дыхания по образованию CO_2; В – сравнение действия ротенона (рот) и цинамовой кислоты (Цин) на разобщенное дыхание митохондрий, ДНФ 50мкМ, рот 2мкг/мл, циннамовая кислота 100 мкМ, (МД, 50мкМ, DTT, 1мМ); Г – концентрационная зависимость ингибирующего действия циннамовой кислоты на дыхание митохондрий. Инкубация митохондрий (2,5мг белка/мл среды инкубации) проводилась в 125мМ KCl, 10мМ HEPES, 1,5мМ фосфате, pH 7,25, при окислении пирувата (4мМ) и малата (2мМ) в присутствии 0,2мМ АДФ.

Исследование влияния циннамовой и бензойной кислот на скорость дыхания митохондрий показало, что они действуют как на фосфорилирующее, так и на разобщенное дыхание. Как показано на рис.2, циннамовая кислота ингибирует фосфорилирующее дыхание, которое определялось по поглощению кислорода (рис.2А) и по выходу CO_2, который образуется в результате декарбоксилирования пирувата пируватдегидрогеназой (рис.2Б). Видно, что образование CO_2 ингибируется даже в большей степени, чем фосфорилирующее дыхание. Менадион и ДТТ снимали это ингибирование дыхания и активировали образование CO_2. Необходимо отметить, что эффект циннамовой

кислоты отличается от действия ротенона, ингибитора I комплекса дыхательной цепи. Если действие ротенона полностью снималось менадионом, и при последующем добавлении ДТТ не происходило активации дыхания, то ингибирующее действие циннамовой кислоты снималось менадионом только частично и полностью снималось только последующей добавкой ДТТ (рис.2В). Концентрационная зависимость действия циннамовой кислоты на дыхание митохондрий показано на рис.2Г. Аналогичное действие оказывала и бензойная кислота, но при более высоких концентрациях.

В таких же концентрациях циннамовая и бензойная кислоты значительно снижают способность митохондрий аккумулировать кальций (рис.3А). Оценка кальциевой емкости митохондрий показала, что 2,4-дигидроксибензоат (ДБ) и 2-аминобензоат (АБ) либо совсем не меняли кальциевую емкость митохондрий, либо снижали ее очень незначительно, в то время как бензойная (Б) и в большей степени циннамовая кислоты (Ц) приводили к снижению кальциевой емкости более чем в два раза (рис.3Б).

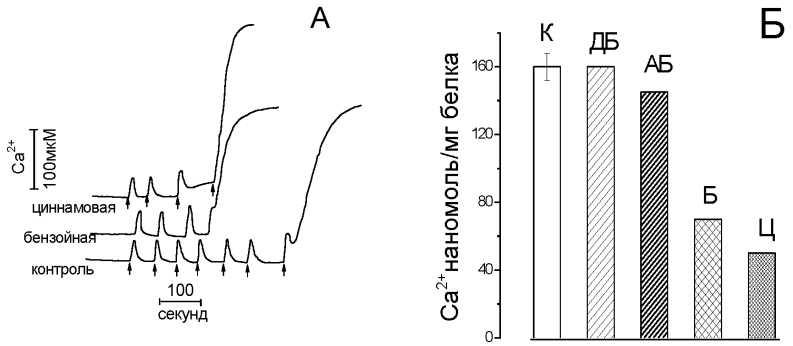


Рис.3. Влияние фенольных кислот на кальциевую ёмкость митохондрий. А – оригинальные записи транспорта ионов кальция в митохондрии в контроле и в присутствии циннамовой (50мкМ) и бензойной (100мкМ) кислот. Стрелками указаны добавки $CaCl_2$ по 50мкМ. Б – кальциевая ёмкость митохондрий в контроле (К) и в присутствии 100мкМ 2,4-дигидроксибензойной (ДБ), 100мкМ 2-аминобензойной (АБ), 100мкМ бензойной (Б) и 50мкМ циннамовой кислоты (Ц). Инкубация Митохондрии (2мг белка/мл) инкубировали в среде 125мМ KCl, 10мМ HEPES, 1,5мМ фосфат, pH 7,25, субстраты окисления пируват (4мМ) и малат (2мМ).

Полученные результаты показывают, что низкомолекулярные фенольные кислоты оказывают токсическое действие на митохондрии. Из тестированных в данной работе фенольных кислот токсичными являются циннамовая и бензойная кислоты. Оба соединения ингибируют

дыхание и окисляют тиоловые группы, что следует из снятия ингибирования менадионом и ДТТ. Совместное действие менадиона и ДТТ необходимо для полной активации дыхания и восстановления мембранного потенциала митохондрий в присутствии этих фенольных кислот.

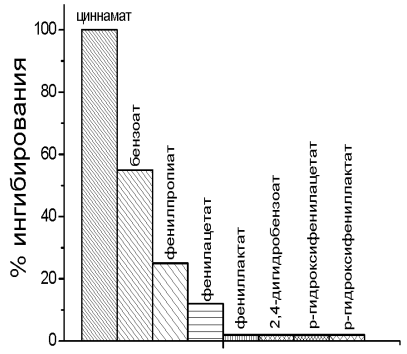


Рис.4. Сравнение токсичности фенольных кислот микробного происхождения на функции митохондрий. За 100% принято ингибирование НАД-зависимого дыхания митохондрий циннамовой кислотой. Концентрации фенольных кислот 100мкМ.

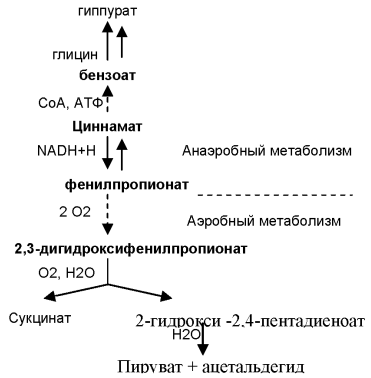


Рис.5. Схема метаболизма циннамовой кислоты. Ингибирование окисления пирувата, наблюдаемое по образованию CO_2, указывает на то, что кроме I комплекса дыхательной цепи, ингибированию подвергается и фермент пируватдегидрогеназа. Вероятно, к ингибированию этого фермента приводит окисление циннамовой кислотой тиоловых групп, так как SH-группы кофактора фермента– дигидролипоевой кислоты, играют ключевую роль в поддержании его активности.

Суммируя эти результаты и полученные ранее данные о действии на митохондрии других фенольных кислот микробного происхождения можно сделать вывод о токсичности тех из них, которые являются продуктами анаэробного метаболизма ароматических соединений (рис.4). Эти соединения могут легко подвергаться взаимопревращению. На рис.5 представлена схема метаболизма циннамовой кислоты, как наиболее токсичной из тестированных фенольных кислот. В анаэробных условиях циннамовая кислота может метаболизировать в бензойную или фенилпропионовую кислоты. В аэробных условиях при последовательном оксигенировании фенилпирувата образуются гидроксилированные производные, которые затем дециклизируются с

образованием сукцината и пирувата, которые могут использоваться бактериями для собственного роста. Оба эти пути характерны для большого класса клинически важных микроорганизмов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №09-04-01236-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pinsky M.R.* //Contrib. Nephrol. (2007) 156: 47-63;
2. *Fink M.P.* //Crit. Care (2002) 6:4 91-9;
3. *Sriskandan S., Altmann D.M.* //J. Pathol. (2008) 214(2): 211-23;
4. *Protti A., Singer M.* //Crit. Care (2006) 10(5):228-35;
5. *Crouse, E.D.* //Mitochondrion (2004) 4: 729-41;
6. *Levy R.J.* //Shock (2007) 28: 24-8;
7. *Levy R.J., Deutschman C.S*. //Crit. Care Med. (2007) 35(9): 468-75;
8. *Larche J. et al.* //J. Am. Coll. Cardiol. (2006) 48: 377-85;
9. *Fedotcheva N.I. et al.*. //Toxicol. Lett. (2008) 180: 182-8.

МЕТАБОЛИТЫ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ЦИТОПАТИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Федотчева Н.И.[1], Теплова В.В.[1], Оленин А.Ю.[2], Белобородова Н.В.[2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, Москва

Нарушение функций митохондрий является одним из комплексных патологических процессов, которыми сопровождаются многие заболевания, включая сепсис. Сепсис характеризуется снижением аэробного и активацией анаэробного метаболизма на фоне нормального содержания кислорода в тканях. Это явление, называемое «цитопатическая гипоксия», сопряжено с патологическим снижением аэробного метаболизма в органах и тканях [1,2]. Клеточный метаболизм при этом смещается в сторону анаэробного гликолиза, доказательством чего является повышение в крови больных концентрации лактата, конечного продукта анаэробного гликолиза. Дисфункцией митохондрий может объясняться тот факт, что гипервентиляция кислородом эффективна только на ранних стадиях сепсиса и становится неэффективной при длительном сепсисе с синдромом полиорганной недостаточности [1,2].

При индуцированном сепсисе у животных и на биоптатах больных описаны нарушения функций митохондрий, которые имели

тканеспецифичный характер и зависели от стадии сепсиса. Наиболее выраженные патологические изменения, сопровождающиеся снижением скорости дыхания и увеличением продукции активных форм кислорода, наблюдались на поздних стадиях сепсиса. По разным данным, при сепсисе было обнаружено ингибирование I участка дыхательной цепи митохондрий в биоптатах скелетной мышцы, ингибирование IV участка дыхательной цепи митохондрий в биоптатах сердечной мышцы, ингибирование пируват дегидрогеназы в скелетной мышце и увеличение продукции активных форм кислорода в митохондриях печени и сердца [3-5]. На основании этих данных можно предположить, что изменения концентраций эндогенных метаболитов цикла трикарбоновых кислот могут служить биомаркерами дисфункции митохондрий и анаэробного метаболизма. В связи с этим нами были проанализированы имеющиеся на настоящий момент данные об изменении концентраций митохондриальных метаболитов и лактата в тканях, клетках и крови при различных патологических состояниях.

Табл.1. Концентрации метаболитов цикла трикарбоновых кислот и лактата в сыворотке крови в норме и патологии. Сводная таблица по литературным данным [6-12].

Метаболит	Норма и патология	Концентрация метаболита (мМ)	Метод, ссылка
Цитрат	норма	0,087-1,3	Энзим. [6]
	Ацидоз	0,180-4,3	
Изоцитрат	норма	0,021	Энзим [6]
	Ацидоз	0,141	
альфа-кетоглутарат	норма	0,039	Энзим [6]
	Ацидоз	0,274	
сукцинат	норма	0,045	Энзим. [6]
	Ацидоз	0,179	Энзим.[6]
	Норма	0,005-0,020	LC-MS [7]
лактат	норма	0,3-0,6-1,0	Энзим. [6,8]
	ацидоз	5,0	Энзим. [6]
	гипоксия	16	Энзим. [9]
	сепсис	28,9	Энзим. [10]
	сепсис	2,1-4,0	Энзим. [8]
	пневмония	0,6-1,64	Энзим. [11]
	дефицит фумаразы	1,2-1,6	Энзим. [12]

В таблице 1 суммированы имеющиеся в литературе данные о содержании метаболитов цикла трикарбоновых кислот в крови в норме и при патологиях, сопровождающихся гипоксией и ацидозом. Для сравнения приведены концентрации лактата как биомаркера этих состояний. Можно видеть, что при этих патологиях возрастает не только уровень лактата, но и уровень метаболитов цикла трикарбоновых кислот

– цитрата, изоцитрата, 2-кетоглутарата и сукцината. При ацидозе их концентрации в сыворотке увеличиваются в 5-20 раз по сравнению с нормой. Особый интерес с точки зрения развития цитопатической гипоксии представляют данные, демонстрирующие, что дисфункция митохондрий, связанная с дефицитом митохондриального фермента фумарат гидратазы, приводит к значительному повышению уровня лактата в крови. При сепсисе концентрация лактата в крови варьирует, по разным данным, от 2 до 29мМ [7-11]. При этом, как было недавно продемонстрировано, низкий уровень лактата от 0 до 2мМ, средний – от 2,1 до 3,9мМ и высокий – от 4мМ и выше, ассоциировались с 15%, 25% и 38% смертностью, соответственно [8].

В таблице 2 представлены сводные литературные данные о концентрации метаболитов цикла трикарбоновых кислот и лактата в тканях и клетках. Как видно из этих данных в тканях и клетках концентрации метаболитов цикла трикарбоновых кислот повышаются при физических нагрузках, гипоксии, мутациях соответствующих ферментов.

Табл.2. Концентрации метаболитов цикла трикарбоновых кислот и лактата в тканях и клетках. Сводная таблица по литературным данным [13-19].

метаболит	**Ткань**	**Концентрация метаболита (мкм/кг)**	**Метод, ссылка**
лактат	печень	1410	Энзим. [16]
	печень, гипоксия	2500	Энзим. [16]
сукцинат	мышца	98	Энзим. [15]
	мышца, гипоксия	250	Энзим. [14]
	сердце	214	Энзим. [13]
	мышца биоптат	150	Энзим. [14]
	мышца биоптат физ.нагрузка	1000	Энзим. [14]
альфа-кетоглутарат	мышца	50	Энзим. [15]
	сердце	26	Энзим. [13]
фумарат	мышца	50	Энзим. [14]
	мышца, гипоксия	109	Энзим. [14]
	сердце	58	Энзим. [13]
	Клетки	Концентрация метаболита	
Сукцинат	Клетки почки, экстракт	0,120 мМ	GCMS [17]
	Клетки почки, мутации СДГ, экстракт	0,450 мМ	
Сукцинат	фибробласты	40 нмол/мг белка	ЯМР [18]
	Параганглиома, экстракт	517 нмол/мг белка	GCMS [19]

Ранее нами было установлено, что при тяжелых формах сепсиса происходит накопление низкомолекулярных фенольных кислот, продуктов аэробного и анаэробного метаболизма клинически значимых бактерий *K. pneumonia, E. coli, S. aureus, S. marcesceus, E. cloacae, S. epidermis*, что приводит к нарушению нормального функционирования митохондрий. Мы предполагаем, что при сепсисе накапливаются и другие микробные метаболиты, такие как низкомолекулярные компоненты дыхательной цепи, синтезируемые бактериями для собственного анаэробного дыхания, а также метаболиты цикла трикарбоновых кислот, избыточное образование которых стимулирует переключение метаболизма клетки с аэробного на анаэробный. В наших исследованиях определение метаболитов цикла трикарбоновых кислот в крови больных сепсисом проводилось методом хромато-масс-спектрометрии. Подготовка проб включала в себя превращение карбоновых кислот в триметилсилильные производные [20,21]. Были протестированы группа больных и группа доноров по 7-10 пациентов в каждой группе. Больные были с признаками системного воспаления на фоне документированной бактериемии или очага инфекции. По сравнению со здоровыми донорами в группе больных наблюдалось снижение содержания всех идентифицированных в образцах метаболитов цикла трикарбоновых кислот (рис.1). Концентрации пирувата и фумарата снижались в 2,5 раза, альфа-кетоглутарата (КГЛ) и сукцината почти в 3 раза и малата – в 10 раз.

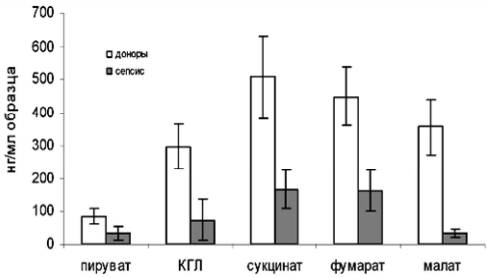


Рис.1. Изменения концентраций метаболитов цикла трикарбоновых кислот и пирувата в крови больных с сепсисом. Концентрации даны в нанограммах в 1мл обработанного образца крови.

Полученные результаты показывают тотальное снижение концентраций метаболитов цикла трикарбоновых кислот в крови больных с сепсисом. Эти параметры существенно отличаются от тех, которые характерны для состояний гипоксии и ацидоза. Можно предположить, что при сепсисе эти параметры могут изменяться в зависимости от стадии заболевания, так как подобное снижение концентрации метаболитов более свойственно для гипометаболических состояний, которые характеризуются снижением общего метаболизма, снижением потребления кислорода и общим торможением функций [22].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №09-04-01236-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pinsky M.R.* //Contrib. Nephrol. (2007) 156: 47-63;
2. *Fink M.P.* //Crit. Care (2002) 6: 491-9;
3. *Protti A., Singer M.* //Crit. Care (2006) 10(5): 228-35;
4. *Levy R.J.* //Shock (2007) 28: 24-8;
5. *Brealey D., Singer M.* //Curr. Infect. Dis. Rep. (2003) 5: 365-71;
6. *Forni L.G. et al.* //Crit. Care (2005) 9(5): R591-5;
7. *Kushnir M.M. et al.* //Clin. Chem. (2001) 47(11): 993-2002;
8. *Trzeciak S. et al.* //Inten. Care Med. (2007) 33(6): 970-7;
9. *Rozier M.D., Zata V.J., Ellsworth M.L.* //Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (2007) 292(6): H3038-42;
10. *Elias R.M., Cuvello-Neto A., da Costa M.C.* //ASAIO J. (2009) 55(1): 123-5;
11. *Park M. et al.* //Clinics (2006) 61(1): 47-52;
12. *Bourgeron T. et al.* //J. Clin. Invest. (1994) 93: 2514-8,
13. *Sharma N. et al.* //J. Physiol. (2005) 562(2): 593-603;
14. *Gibala M.J. et al.* //J. Physiol. (1997) 502 (3): 703-13.;
15. *Panchal A.R. et al.* //Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (2001) 281(4): H1613-20;
16. *Russell R.R., Taegtmeyer H.* //J. Clin. Invest. (1992) 89(3): 968-73;
17. *Selak M.A. et al.* //Cancer Cell (2005) 7(1): 77-85;
18. *Brière J.J. et al.* //Hum. Mol. Genet. (2005) 14(21): 3263-9;
19. *Pollard P.J. et al.* //Hum. Mol. Genet. (2005) 14(15): 2231-9;
20. *Белобородова Н.В. и др.* //Клинич. Лаборат. Диагн. (2006) 2: 3-6;
21. *Khodakova A., Beloborodova N.* //Crit. Care (2007) 11(4): 5;
22. *Serkova N.J. et al.* //Physiol. Genomics. (2007) 31(1): 15-24.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКА 57кДа И ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ЕГО ПРИНАДЛЕЖНОСТИ К СИСТЕМЕ АТФ-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА КАЛИЯ В МИТОХОНДРИЯХ

Шигаева М.И.[1,2], Гриценко Е.Н.[1], Павлик Л.Л.[1], Недорубов А.А.[3], Мошков Д.А.[1,2], Миронова Г.Д.[1,2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
[2]Пущинский Государственный университет
[3] Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского

АТФ-чувствительные каналы внутренней мембраны митохондрий (митоК$_{АТФ}$) были обнаружены в начале 90-х годов методом пэтч-кламп [1], однако, еще в 1981 году в нашей лаборатории из внутренней мембраны митохондрий сердца быка был выделен K^+-транспортирующий белок [2], который, как было нами показано позднее, при встраивании в бислойные липидные мембраны (БЛМ) способен формировать АТФ-чувствительные калиевые каналы [3].

Структура цитоК$_{АТФ}$ в настоящее время достаточно хорошо изучена. В его состав входят субъединицы двух типов: KIR (inward rectifying K^+ channels) – субъединица, формирующая пору канала, и SUR (sulphonyl urea receptor) – регуляторная субъединица, придающая каналу чувствительность к модуляторам [4,5]. Считается, что нативный цитоплазматический К$_{АТФ}$ канал представляет собой комплекс из четырех KIR и четырех SUR субъединиц [6]. Однако механизмы молекулярного взаимодействия KIR и SUR в настоящее время окончательно не выяснены.

В связи с наличием у обоих каналов общих ингибиторов и активаторов существует гипотеза о возможном сходстве их структуры. Ранее нами была разработана рабочая модель структуры митоК$_{АТФ}$ канала, в соответствии с которой в его состав также входит четыре канальных субъединицы, имеющих выпрямляющие характеотстики, названных нами митоKIR [7]. При реконструкции в БЛМ белок-канал обладает АТФ-чувствительной K^+-транспортирующей активностью. Проведенный нами двумерный электрофорез в ПААГ-геле показал, что эта канальная субъединица является белком с молекулярной массой 57кДа.

Целью настоящей работы было выявление возможной общности в структуре канальных субъединиц митоК$_{АТФ}$ и цитоК$_{АТФ}$ а также доказательство принадлежности белка с м.м. 57кДа к митохондриальной системе АТФ-зависимого транспорта K^+.

На белок-канал (м.м. 57кДа), выделенный из печени крысы, были получены поликлональные антитела (АТ) с высоким титром (1:50000). Они были очищены методом аффинной хроматографии с использованием Белка А из *Staphylococcus aureus*. При этом титр практически не изменился.

Специфичность АТ к белу с м.м. 57кДа определяли методом Western-blot-анализа. В суспензий митохондрий печени и сердца полученные антитела связывались только с белком (рис.1), находящимся в районе 57кДа, что свидетельствует об их высокой специфичности.

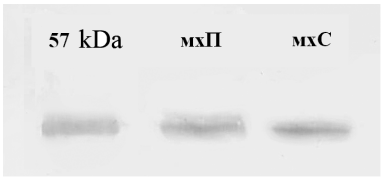


Рис.1. Western-blot-анализ митохондрий печени и сердца крысы. мхП – митохондрии печени, мхС-митохондрии сердца, 57кДа – очищенный K^+-транспортирующий белок с м.м. 57кДа (канальная субъединица митоК$_{АТФ}$).

Для проверки наличия общности между митохондриальным белком с м.м. 57кДа и канальной субъединицей цитоплазматического канала, был проведен Western-blot-анализ с использованием коммерческих антител к канальной субъединице цито$К_{АТФ}$ KIR6.2 (анти-KIR6.2).

В ходе анализа было показано, что анти-KIR6.2 не дают реакции преципитации ни с очищенной канальной субъединицей мито$К_{АТФ}$ (м.м. 57кДа), ни с суспензиями митохондрий печени и сердца. Следовательно, коммерческие антитела к KIR6.2 не связываются с канальной субъединицы мито$К_{АТФ}$. Это свидетельствует о низкой гомологии между канальными субъединицами мито$К_{АТФ}$ и цито$К_{АТФ}$, если она вообще существует.

Полученные нами антитела к белку-каналу с м.м. 57кДа были использованы для ингибирования АТФ-зависимого транспорта ионов калия в митохондриях печени и сердца крыс. Контролем служили очищенные IgG сыворотки крови неиммунизированных кроликов, а также антитела к белку с м.м. 57кДа, подвергнутые кипячению в течение 5 минут. Очищенные антитела к белку-каналу с м.м. 57кДа использовали для ингибирования АТФ-зависимого выхода ионов $К^+$ из митохондрий в присутствии 2,4-динитрофенола (ДНФ), а также энергозависимого набухания, отражающих работу мито$К_{АТФ}$.

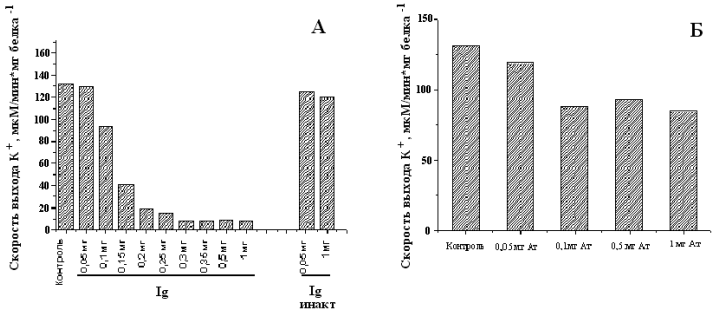


Рис.2. Ингибирование антителами к белку м.м. 57кДа ДНФ-индуцированного выхода $К^+$ из митохондрий печени (А) и сердца (Б) крысы. Среда инкубации: сахароза 170мМ, маннитол 80мМ, Tris-HCl 10мМ, pH 7,4.

На двух моделях было показано, что очищенные АТ ингибируют АТФ-зависимый транспорт калия. При этом полученные антитела хорошо ингибировали этот транспорт в митохондриях печени, из которых выделен белок для иммунизации животного (рис.2А), но гораздо слабее влияли на этот транспорт в митохондриях сердца (рис.2Б.). Инактивированные кипячением Аа, также как и иммуноглобулины

преиммунной сыворотки, практически не оказывали влияния транспорт $К^+$ в митохондриях обоих тканей. Следует подчеркнуть, что полученные АТ к белку-каналу с м.м. 57кДа практически не влияли на параметры дыхания митохондрий печени и сердца крыс.

Представленные результаты свидетельствуют, что полученные АТ являются высоко специфичными к мито$К_{АТФ}$, который, по-видимому, обладает некоторой тканеспецифичностью. Отсутствие влияния АТ на дыхание митохондрий позволяет сделать вывод, что они оказывают свое действие непосредственно на мито$К_{АТФ}$. Следовательно, можно утверждать, что исследуемый нами белок с м.м. 57кДа действительно является каналообразующей субъединицей АТФ-чувствительного канала внутренней мембраны митохондрий.

Недавно нами, в результате проведенного MS-MALDI-TOF/TOF-анализа было показано, что белок с м.м. 57кДа на 54% гомологичен белку-предшественнику кальретикулина (база данных NCBI) (рис.3).

```
  1 MLLSVPLLLG  LLGLAAADPA  IYFKEQFLDG   DAWTNRWVES  KHKSDFGKFV
 51 LSSGKFYGDQ  EKDKGLQTSQ  DARFYALSAR   FEPFSNKGQT   LVVQFTVKHE
101 QNIDCGGGYV  KLFPGGLDQK  DMHGDSEYNI   MFGPDICGPG   TKKVHVIFNY
151 KGKNVLINKD  IRCKDDEFTH  LYTLIVRPDN   TYEVKIDNSQ   VESGSLEDDW
201 DFLPPKKIKD  PDAAKPEDWD  ERAKIDDPTD   SKPEDWDKPE   HIPDPDAKKP
251 EDWDEEMDGE  WEPPVIQNPE  YKGEWKPRQI   DNPDYKGTWI   HPEIDNPEYS
301 PDANIYAYDS  FAVLGLDLWQ  VKSGTIFDNF   LITNDEAYAE   EFGNETWGVT
351 KAAEKQMKDK  QDEEQRLKEE  EEDKKRKEEE   EAEDKEDEDD   RDEDEDEEDE
401 KEEDEEDATG  QAKDEL
```

Рис.3. Аминокислотная последовательность белка-предшественника кальретикулина. Участки структуры белка-предшественника, совпадающие с последовательностями, имеющимися в белке с м.м. 57кДа, выделены серым цветом.

Вероятно, белок с м.м. 57кДа является конечным продуктом систем посттрансляционной модификации данного белка-предшественника. Также было обнаружено, что у белка с м.м. 57кДа достаточно высокая (44%) гомология с белком кальрегулином, выделенным из печени крысы и относящимся к семейству кальретикулинов.

Возможно, исследуемый нами белок, гомологичный кальретикулину, проходит альтернативные стадии посттрансляционных модификаций и созревания при биосинтезе. Это, вероятно, позволяет ему встраиваться во внутреннюю мембрану митохондрий беспрепятственно и без значительных потерь энтропии и внутренней энергии при смене гидрофильной среды на гидрофобную. Не исключено также дополнительное стерическое и физико-химическое влияние на химические свойства и конформацию со стороны компонентов мембраны митохондрий. Учитывая все вышесказанное, на данном этапе

исследования структуры митоК$_{АТФ}$, можно утверждать лишь, что белок с м.м. 57кДа является белком, обладающим высокой степенью структурной и функциональной гомологии с кальретикулином.

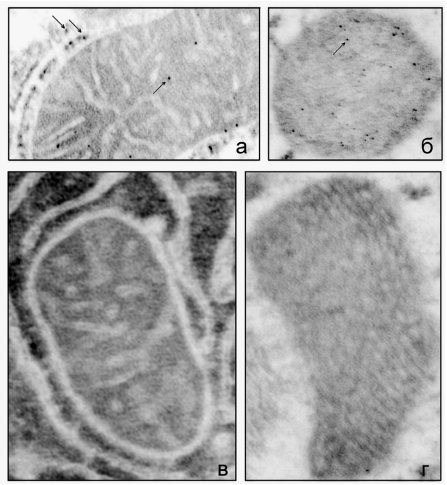


Рис.4. Локализация белка с м.м. 57кДа в митохондриях (места локализации проявляются в виде черных гранул диаметром 10нМ, а также указаны стрелками). А,В – митохондрии печени (использованы антитела к белку с м.м. 57кДа и к KIR6.2 соответственно); Б,Г – митохондрии сердца (использованы антитела к белку с м.м. 57кДа и к KIR6.2 соответственно). Титр всех использованных АТ был 1:50.

Для доказательства локализации белка с м.м. 57кДа во внутренней мембране митохондрий было проведено электронно-микроскопическое исследование срезов тканей печени и сердца с использованием АТ на белок с м.м. 57кДа. Идентификации эндогенного белка-канала и его связывание с АТ проводились с помощью вторичных антител, меченых коллоидным золотом (диаметр гранул – 10нм). Как видно из рисунка 4, такого рода гранулы золота локализуются во внутренней мембране митохондрий как печени (рис.4А), так и сердца (рис.4Б), причем в сердце их больше, что соответствуют данным о большей плотности митоК$_{АТФ}$ каналов в митохондриях сердца. Локализуются эти каналы ближе к месту контакта внутренней и внешней мембраны митохондрий, что особенно проявляется с митохондриях сердца (рис.4Б). Такие же гранулы (рис.4А) обнаружены и в ретикулюме, особенно в месте его слияния с мембраной митохондрий, что подтверждает выявленную нами методом MS-MALDI-TOF/TOF – анализа общность в структуре изучаемого белка с микросомах кальретикулином (м.м. 55кДа).

В контрольных экспериментах, где были использованы только вторичные АТ, гранулы коллоидного золота не были выявлены. Использование антител к канальной субъединице цитоплазматического К$_{АТФ}$ канала – KIR6.2 не обнаружило наличия этого белка-канала в митохондриях (рис.4В,Г). Т.о., полученные результаты показали отсутствие общности в структуре KIR6.2 и изучаемого нами митохондриального белка-канала.

Приведенные в настоящей работе данные позволяют подтвердить, высказанное нами ранее предположение (7), что белок с м.м. 57кДа относится к митохондриальной системе АТФ-зависимого транспорта калия и вместе с известными в литературе глибенкламид-связывающими белками митохондрий [8,9] входит, вероятно, в состав митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала, являясь его канальной субъединицей (митоKIR).

Работа поддержана грантами РФФИ №07-04-00759а, ISTC-3301 и программой «Развитие научного потенциала высшей школы» № 3840.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Inoue I. et al.* //Nature (1991) 352: 244-7;
2. *Миронова Г.Д. и др.* //Биофизика (1981) 26(3): 451-7;
3. *Paucek P. et al.* //J. Biol. Chem. (1992) 267(36): 26062-9;
4. *Tucker S.J. et al.* //Nature (1997) 387: 179-83;
5. *Yokoshiki et al.* //Am. J. Physiol. (1998) 274(43): C25-37;
6. *Clement J. et al.* //Neuron (1997) 18: 827-38;
7. *Mironova G.D. et al.* //J. Biol.Chem. (2004) 279(31): 32562-8;
8. *Szewczyk A., Marban E.* //Trends Pharmacol. Sci. (1999) 20: 157-61;
9. *Jaburek et al.* //J. Biol. Chem. (1998) 273: 13578-82.

***

СИГНАЛИЗАЦИЯ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И У ПРОКАРИОТ

ОСОБЕННОСТИ АРХЕАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ХЕМОТАКСИСА

Алатырев А.Г., Галева А.В., Пятибратов М.Г., Федоров О.В.

Институт белка РАН, Пущино

Введение. Регуляция подвижности архей в общих чертах сходна с бактериальной. Система хемотаксиса передает сигнал на аппарат подвижности, вследствие чего осуществляется целенаправленное движение клетки. Но при более детальном сравнении выявляются существенные отличия, которые наводят на вопросы как функционального, так и эволюционного плана.

Исследование известных на сегодняшний момент геномов архей (более 50-ти) показало, что у архей отсутствуют гены всех белковых компонентов аппарата подвижности бактерий. В свою очередь для архей были определены специфические белки жгутика (флагеллины), не имеющие гомологии с бактериальными. Сопутствующие гены археальных белков из *fla* кластера, прилегающего к генам флагеллинов, пока полностью не охарактеризованы, хотя имеются данные об отношении их к структурной части мотора [3]. Структура археального аппарата подвижности на сегодняшний день неизвестна.

Несмотря на резкие отличия в аппарате подвижности архей по сравнению с бактериальным, многие геномы архей (более 20) содержат полный набор генов бактериальной системы хемотаксиса. В данный набор входят основные элементы двукомпонентной системы: гистидин-киназа CheA, и регулятор отклика CheY, а также белки-сенсоры и дополнительные регуляторные белки: CheB, CheC, CheD, CheR, CheW [2-3,10]. Экспериментально показано, что у галофильного археона *Halobacterium salinarum* двукомпонентная система таксиса работает так же, как у бактерий [4,6-9]. В зависимости от сигнала рецептора, киназа CheA автофосфорилируется по гистидиновому остатку. Далее фосфогруппа передается на аспартатный остаток белка CheY. У бактерий активация повышает сродство CheY к одному из компонентов мотора, белку FliM, и в результате взаимодействия этих белков изменяется характер вращения жгутика. В целом баланс между активированной и неактивированной конформациями белка CheY регулирует скорость и направление вращения мотора [10].

CheY – последний компонент в цепи передачи сигнала на аппарат подвижности. Этот небольшой белок (14кДа) высоко консервативен

среди бактерий и архей. Было показано, что активированный CheY главным образом связывается с N-концевым участком FliM [5,11]. Для связывания необходима консервативная последовательность из 16 аминокислотных остатков [1]. Была получена кристаллографическая структура комплекса CheY с N-концевым участком FliM, на основании которой были определены механизмы активации CheY и остатки CheY, ответственные за взаимодействие с FliM. На сегодняшний день у архей не найдены белки, выполняющие функции бактериального белка FliM.

Результаты и их обсуждение. Как известно, у бактерий гены системы хемотаксиса и подвижности обычно располагаются вблизи друг от друга. У архей наблюдается сходная картина. Следуя этой логике, неизвестные гены, являющиеся, например, аналогами бактериального FliM, у архей также должны находится вблизи che/fla локусов. Археальные гены с неизвестной функцией, находящиеся вблизи che/fla локусов были детально проверены нами на предмет их возможного участия в подвижности. Для каждого исследуемого гена был проведен поиск гомологов с помощью программы pBLAST (http://blast.ncbi.ntm.nih.gov/Blast.cgi). Отбор проводился по следующим критериям: искомые гены должны быть консервативными и присутствовать только у подвижных архей, имеющих хемотаксис. В конечном итоге оказалось, что полностью параметрам поиска соответствовал только один ген. Найденный ген, названный нами «*cheM*», не имеет близких гомологов у других организмов, однако среди архей гомология между различными *cheM* довольно высока. Примечательно, что у термофильных и метаногенных архей ген *cheM* присутствует в количестве одной копии, тогда как у галофилов кроме *cheM1,* ортолога генов *cheM* негалофильных архей, присутствует, еще по меньшей мере, один ген-паралог *cheM2*. У *Halobacterium salinarum*, *Natronomonas pharaonis* и *Halorubrum lacusprofundi* имеется по одной копии гена *cheM2*, в то время как у *cheM2 Haloarcula marismortui* присутствуют три таких паралога: *cheM2, cheM1a* и *cheM1b*. Как видно из рисунка 1, на филогенетическом древе паралоги занимают отдельную ветвь и имеют большую гомологию друг с другом, чем с *cheM1*.

Из 23 архейных организмов, имеющих *cheM,* у 14 (все метаногены и *Archaeoglobus fulgidus*) *cheY* и *cheM* непосредственно примыкают друг к другу. В остальных случаях ген *cheM* располагается вблизи *che/fla* генов. Исключение составляет геном *Haloarcula marismortui*, где два из четырех генов *cheM* (*rrnAC3221* и *rrnAC3231*) находятся на значительном расстоянии от *che/fla* генов.

Для экспериментального подтверждения роли данных генов в подвижности археальной клетки были созданы 3 мутантных штамма галофильного археона *H. salinarum* с делецией каждого из генов *cheM*: *OE2402F* (*cheM1*) и *OE2404R* (*cheM2*), и с делецией обоих генов.

Мутантные штаммы, в особенности с делецией *cheM1*(ΔM1) и с делецией обеих генов (ΔM1ΔM2), имеют заметное отличие от штамма дикого типа по размеру пятен, образующихся вокруг точки посева (рис.2).

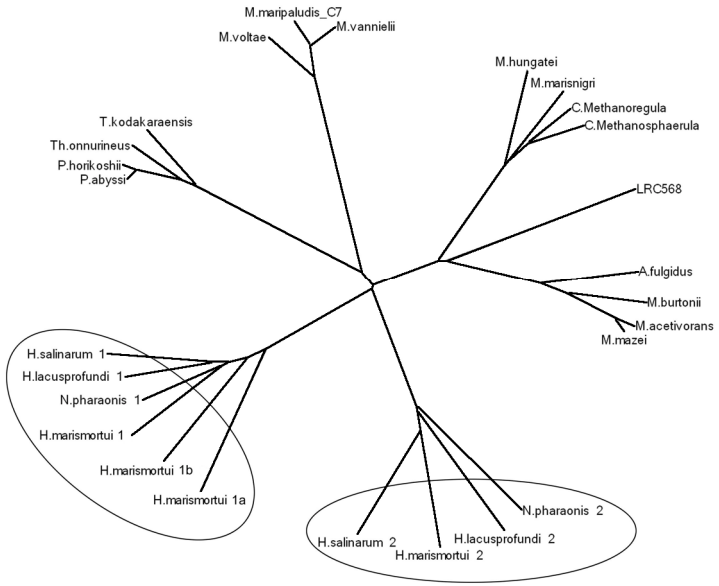


Рис.1. Филогенетическое древо белков CheM.

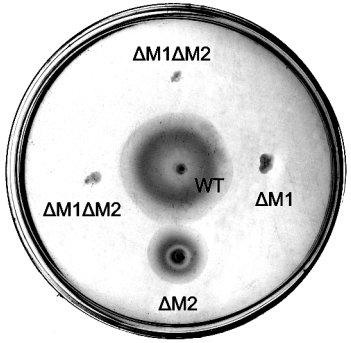


Рис.2. Влияние делеции генов *cheM* на рост точечных посевов *H. salinarum*. 0,25% агаризованная среда. WT – клетки дикого типа.

В то же время, при анализе с помощью фазово-контрастной микроскопии не обнаружено никаких различий в скорости движения мутантных клеток и клеток дикого типа. Скорость роста в жидкой среде для всех исследованных штаммов также одинакова. Иммуноблотинг не

выявил отличий в количестве внутриклеточного белка CheY, что говорит об отсутствии влияния на его экспрессию со стороны CheM. Из полученных данных можно однозначно сделать вывод о влиянии CheM на процесс передачи сигнала. В отсутствие CheM система хемотаксиса практически полностью выключается, вследствие чего клетка не может ориентироваться в градиенте питательных веществ (рис.2).

Логично предположить, что активированный CheY связывается с CheM при передаче сигнала на мотор. Для проверки этой гипотезы мы провели следующие эксперименты. Клеточный экстракт *H. salinarum* пропускали через хроматографическую колонку с иммобилизованным CheY-Hs_{6his}. Для активации аспартат-киназы CheY использовали буфер, содержащий фторид бериллия. Фторид бериллия связывается с активным центром CheY, мимикрируя фосфогруппу [12]. Белки, связывающиеся с CheY-Hs_{6his}, анализировались с помощью масс-спектрометрии. Эффект специфичного связывания с активированным CheY наблюдался только для одного из белков с молекулярной массой около 30кДа. Данный белок был идентифицирован как OE2404R (CheM2) (рис.3).

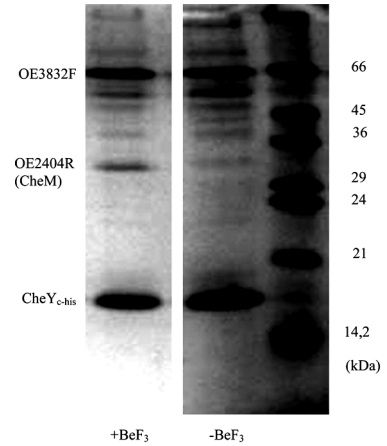


Рис.3. Электрофорез совыделяющихся с CheY-Hs6his белков из клеточного экстракта *H. salinarum* R1. 14% ПААГ.

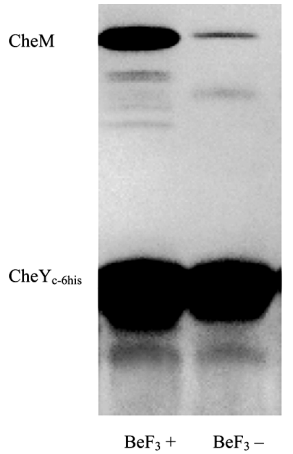


Рис.4. Электрофорез рекомбинантных белков CheM и CheY-Ph6his из *P. horikoshii* после совыделения. 14% ПААГ.

Белок CheM1 при использовании данного подхода обнаружен не был. Проводились попытки выделения комплекса CheM2 и CheY-Hs_{6his}, но при гель-фильтрационной хроматографии данные белки элюировали отдельно друг от друга, в соответствии с их молекулярными весами. Возможно, на металл-аффинном сорбенте комплекс стабилизируется. Подобный результат был получен и с использованием рекомбинантых белков CheY и CheM из гипертермофильного археона *Pyrococcus*

horikoshii (экспрессирующие плазмиды были любезно предоставлены доктором Yutaka Kawarabayasi, IBRF, AIST, Tsukuba-shi, Japan) (рис.4). В экспериментах по связыванию использовался подход, сходный с использовавшимся при работе с белками *H. salinarum.*

Полученные данные подтверждают возможность функционирования CheM в качестве аналога бактериального белка FliM. Мы предположили, что для связывания CheY белок CheM должен иметь характерный мотив, который имеется только у архей, имеющих хемотаксис. Интересен тот факт, что у археона *Methanocaldococcus jannaschii,* который подвижен, но не имеет хемотаксиса, имеется белок MJ1615, обладающий высокой гомологией с CheM, но лишенный протяженного С-концевого участка. Возможно, этот концевой участок важен именно для хемотаксиса. Так как белок CheY высоко консервативен, мы предположили что CheM должен иметь участок для связывания с CheY, похожий на аналогичный участок бактериального FliM. Известно, что для связывания CheY важен N-концевой участок FliM с консенсусной последовательностью **LSQXEIDALL**. Как оказалось, С-концевой участок CheM содержит подобный участок (рис.5).

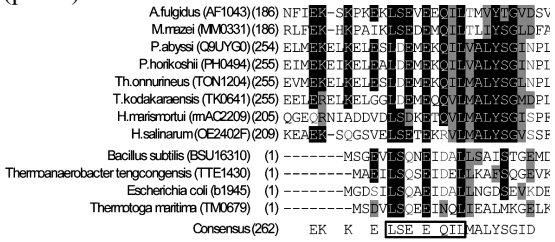


Рис.5. Выравнивание С-концевых участков CheM и N-концевых участков FliM.

То, что данный участок находится внутри белковой цепи не противоречит возможности связывания с CheY, поскольку у некоторых подвижных бактерий (*Magnetospirillum magneticum, Nitrobacter hamburgensis*, *Rhodopseudomonas palustris*) соответствующий участок FliM располагается на расстоянии 60-80 аминокислотных остатков от N-конца. В то же время, по-видимому, нельзя говорить о полной аналогии между FliM и CheM. Известно, что делеция гена *fliM* у бактерий приводит к полной потере подвижности ввиду того что белок FliM является необходимой структурной частью мотора. У архей такого не наблюдается. Наиболее вероятно, что CheM представляет собой дополнительный адаптор между бактериальной системой хемотаксиса и археальным аппаратом подвижности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bren A, Eisenbach M.* //J. Mol. Biol. (1998) 278: 507-14;
2. *Faguy D.M., Jarrell K.F.* //Microbiology (1999) 145: 279-81;
3. *Ng S.Y.M., Chaban B., Jarrell K.F.* //J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (2006) 11: 167-91;
4. *Ng W.V. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97:1 2176-81;
5. *Mathews M.A.A., Tang H.L., Blair D.F.* //J. Bacteriol. (1998) 180: 5580-90;
6. *Pfeiffer F.et al.* //Genomics (2008) 91: 335-46;
7. *Rudolph J., Oesterhelt D.* //EMBO J. (1995) 14: 667-73;
8. *Rudolph J.et al.* // EMBO J. (1995) 14: 4249-4257;
9. *Rudolph J., Oesterhelt D.* //J. Mol. Biol. (1996) 258: 548-554;
10. *Szurmant H., Ordal G.W.* //Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2004) 68: 301-319;
11. *Toker A.S., Kihara M., Macnab R.M.* //J. Bacteriol. (1996) 178: 7069-79;
12. *Yan D. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 14789-94.

УЧАСТИЕ NO И цГМФ В РЕАЛИЗАЦИИ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА В ПРОРОСТКАХ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Бакакина Ю.С., Дубовская Л.В., Волотовский И.Д.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск

На рост и развитие растений постоянное влияние оказывает множество сигнальных факторов различной природы. Поэтому основной биологической функцией клеток растений является интегрирование информации о постоянно изменяющихся сигналах окружающей среды. Индуцированное повышение устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам осуществляется в клетках растений при участии сигнальных систем, воспринимающих, преобразующих и усиливающих химические и физические стресс-сигналы.

Оксид азота (NO) является биологически активной сигнальной молекулой в клетках растений. Известно, что NO играет важную роль при действии абиотических стрессовых сигналов. Так, в литературе имеются данные об участии NO в реакциях растений на засуху, окислительный, солевой, механический, температурные стрессы, высокие концентрации тяжелых металлов. в ходе гиперосмотического, солевого и высокотемпературного стрессов было обнаружено усиление синтеза NO в клетках табака, однако избыточное световое и механическое воздействия не оказывали видимого влияния на содержание NO [1].

Имеются данные о том, что NO опосредует свое действие, модулируя синтез циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). Обнаружено, что обработка низкими концентрациями NO приводила к 10-кратному увеличению концентрации цГМФ в еловой хвое и картофеле [2,3]. Имеются также данные о влиянии NO на синтез цГМФ при ИУК-индуцированной сигнализации [4] и биотическом стрессе [5]. Следовательно, взаимодействие между NO- и цГМФ-зависимыми сигнальными системами имеет большое значение при стрессовых воздействиях.

В настоящее время установлено, что цГМФ выступает в качестве вторичного медиатора в цепи реакций стимул-ответ. В литературе имеются данные о том, что обработка проростков арабидопсиса мембранно-проникающим аналогом цГМФ повышала устойчивость растений к солевому стрессу [6]. Было также обнаружено, что в ответ на действие солевого и осмотического стресса в клетках арабидопсиса увеличивалось содержание цГМФ, и рост предотвращался при добавлении ингибитора гуанилатциклазы (ГЦ) [7]. Группой Neil с соавт. было показано, что АБК-индуцированное закрывание устьиц подавлялось ингибитором синтеза цГМФ, что указывает на участие цГМФ в этом процессе [8].

Однако, несмотря на наличие косвенных данных об участии NO и цГМФ в сигнальных каскадах, полученных, в основном, с использованием ингибиторов ферментов синтеза указанных сигнальных молекул, имеется очень ограниченное количество данных, основанных на прямом измерении эндогенного содержания NO и цГМФ. В литературе отсутствуют данные о влиянии низкотемпературного стресса на метаболизм этих сигнальных молекул в клетках растений.

Поэтому целью данной работы было исследование участия NO и цГМФ в трансдукции такого абиотического стрессового сигнала как низкотемпературный стресс, в растительной клетке.

В качестве объекта исследования использовали 10-дневные проростки растений *Arabidopsis thaliana*. Измерение количества цГМФ проводили методом иммуноферментного анализа с помощью набора реактивов «cGMP Enzyme Immunoassay kit» (фирмы «Sigma», США). Образование NO оценивали по концентрации нитритов (NO_2^-), которые являются первичными и стабильными продуктами превращения NO. Измерение концентрации NO_2^- проводили с использованием набора реагентов Грисса (фирмы «Promega», США).

Показано, что низкотемпературный стресс вызывал быстрое значительное переходное увеличение уровня эндогенного содержания NO в проростках арабидопсиса (рис.1А). Максимальная концентрация NO наблюдалась уже через 10сек инкубации, после чего следовало некоторое снижение содержания NO. Через 15мин инкубации

концентрация NO снижалась до уровня контроля. При действии низких температур (5 и 10°С) максимальное значение концентрации NO составило 4,03 и 3,89нмоль/г ткани, при 0°С – 4,61нмоль/г ткани (двукратное увеличение по сравнению с контролем) (рис.1Б).

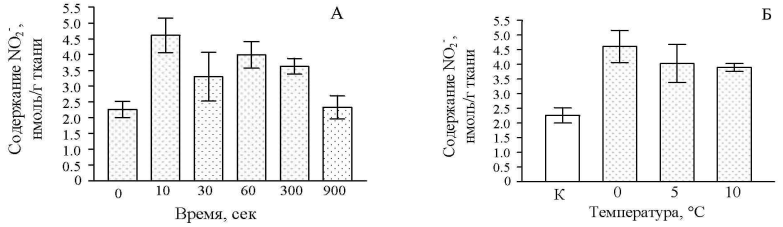


Рис.1. Влияние низких температур (0, 5 и 10°С) на эндогенное образование NO в проростках *A. thaliana*. А–зависимость влияния низкотемпературного воздействия (0°С) на эндогенное образование NO от времени инкубации. Б–влияние низких температур на эндогенное образование NO. Инкубация проростков проводилась в течение 10сек. К–содержание нитритов в отсутствии эффектора.

Для установления механизмов синтеза NO при низкотемпературном стрессовом воздействии было исследовано влияние таких ингибиторов синтеза no как 1-(2-трифторометилфенил)имидазол (trim) и азид натрия (nan_3). Было обнаружено, что предварительная инкубация проростков арабидопсиса с ингибитором нитратредуктазы nan_3 полностью подавляла вызванный холодовым стрессом рост концентрации NO, в то время как ингибитор NO-синтазы trim не вызывал существенного ингибирования NO-ответа. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что синтез оксида азота при низкотемпературном стрессе катализируется преимущественно ферментом – нитратредуктазой.

Известно, что в клетках млекопитающих NO активирует образование цГМФ через взаимодействие с растворимой формой гуанилатциклазы, приводящее к активации фермента. Данная активация кратковременна, и продолжается до тех пор, пока присутствует NO. Поэтому на следующем этапе работы нами была оценена степень и характер влияния низкотемпературного стресса на эндогенное содержание цГМФ в растительной клетке. Было обнаружено, что понижение температуры сопровождалось увеличением концентрации цГМФ в проростках (рис.2А). Эффект наблюдался через 15сек после холодового воздействия и достигал максимума к 30сек инкубации. Через 10мин инкубации содержание цГМФ снижалось до уровня контроля. Инкубация проростков арабидопсиса в течение 30сек приводила к увеличению содержания цГМФ, которое составляло 1,60пмоль/г ткани

при 5°С, при действии 0°С и 10°С максимальное значение составляло 1,45 и 1,30пмоль/г ткани, соответственно (рис.2Б).

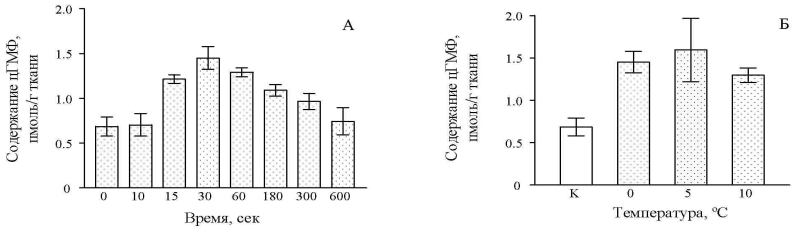


Рис.2. Влияние низких температур (0, 5 и 10°С) на эндогенное содержание цГМФ в проростках *A. thaliana*. А–зависимость влияния низкотемпературного воздействия (0°С) на эндогенное содержание цГМФ от времени инкубации. Б–влияние низких температур на эндогенное содержание цГМФ. Инкубация проростков проводилась в течение 30сек. К–эндогенное содержание цГМФ в отсутствии эффектора.

Результаты вышеописанных экспериментов позволяют сделать вывод о том, что трансдукция стрессового холодового сигнала в растительной клетке реализуется при участии циклического гуанозинмонофосфата. Известно, что в поддержании эндогенного уровня содержания цГМФ в клетке принимают участие ферменты его анаболизма и катаболизма – гуанилатциклаза (ГЦ) и фосфодиэстераза (ФДЭ), соответственно. Поскольку под действием низких температур происходило увеличение, а не снижение содержания цГМФ, можно предположить, что действие стрессового фактора реализуется через активацию фермента синтеза – ГЦ, а не цГМФ-гидролизующей ФДЭ. Для подтверждения этого предположения было измерено содержание цГМФ при низкотемпературном стрессе в клетках проростков арабидопсиса в присутствии ингибитора ГЦ – 6-анилинохинолин-5,8-хинон (LY 83583). Было обнаружено, что LY 83583 полностью подавлял увеличение концентрации цГМФ при холодовом стрессе, что свидетельствует об образовании цГМФ при данном стрессовом воздействии за счет активации фермента синтеза цГМФ – гуанилатциклазы.

Чтобы убедиться в том, что при холодовом стрессе в клетках растений синтез цГМФ индуцируется оксидом азота, было изучено влияние ингибиторов синтеза NO на эндогенное содержание цГМФ при действии низких температур. Показано, что предварительная инкубация проростков арабидопсиса с ингибитором нитратредуктазы nan_3 полностью подавляла рост концентрации цГМФ, в то время как ингибитор NO-синтазы trim не вызывал существенного ингибирования цГМФ-ответа при данном стрессовом воздействии. Следовательно,

образование цГМФ при холодовом стрессе индуцируется оксидом азота, синтез которого катализируется ферментом нитратредуктазой. Следует отметить, что цГМФ-ответ на действие низких температур наступал несколько позже, чем NO-реакция, т.е. в сигнальной цепи цГМФ находится после NO.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии NO и цГМФ в сигнальных процессах, индуцированных низкотемпературным стрессом. показано, что в ответ на действие низких температур в клетке происходит увеличение содержания NO, образование которого катализируется ферментом нитратредуктазой, что приводит к активации гуанилатциклазы и синтезу цГМФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gould K.S. et al.* //Plant Cell Env. (2003) 26: 1851-62;
2. *Pfeiffer S. et al.* //Phytochem. (1994) 36: 259-62;
3. *Pfeiffer S. et al.* //J. Endothel. Cell Res. (1995) 3: 66;
4. *Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lamattina L.* //Plant Physiol. (2003) 132: 1241-8;
5. *Durner J., Wendehemme D., Klessig D.F.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95: 10328-33;
6. *Maathuis Frans J.M., Sanders D.* //Plant Physiol. (2001) 127: 1617-25;
7. *Donaldson L. et al.* //FEBS Lett. (2004) 569: 317-320;
8. *Neill S.J. et al.* //Plant Physiol. (2002) 128: 13-6.

ГИПЕРПОЛЯРИЗАЦИЯ ПЛАЗМАЛЕММЫ ПРОРАСТАЮЩЕГО МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ (*PETUNIA HYBRIDA*) ПОД ДЕЙСТВИЕМ АУКСИНА: УЧАСТИЕ H^+-АТФазы В ТРАНСДУКЦИИ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА

Воронков А.С., Андреев И.М., Ковалева Л.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Введение. В последние годы достигнут значительный прогресс в выяснении молекулярных механизмов, лежащих в основе процессов репродукции у растений. В этих процессах ключевую роль играет прогамная фаза, которая включает в себя каскад событий, запускающих прорастание пыльцы на поверхности рыльца и последующий рост пыльцевой трубки в тканях пестика и завязи [1-3]. Недавно полученные результаты демонстрируют важную роль транспорта основных физиологически важных ионов, таких как H^+, K^+ и Ca^{2+}, через

плазмалемму клеток пыльцевого зерна в регуляции прорастания мужского гаметофита [4-5].

Известно, что пыльцевые зерна содержат большинство классических фитогормонов и, как недавно установлено, прорастание пыльцевых зерен сопровождается изменением уровней в них эндогенных фитогормонов и чувствительно к действию экзогенных фитогормонов [6-8]. Хотя эти данные могут указывать на участие таких соединений в прорастании мужского гаметофита, возможные механизмы их действия остаются неясными. В частности, практически ничего не известно в настоящее время о возможной роли ион-транспортирующих систем в плазмалемме пыльцевых зерен в действии фитогормонов на процессы их прорастания и роста пыльцевых трубок.

Недавно нами было показано, что цитоплазматический pH (pH_c) прорастающих пыльцевых зерен петунии (*Petunia hybrida* L.) заметно возрастает в ответ на добавление к ним ауксина (ИУК) или абсцизовой кислоты (АБК), и этот эффект полностью подавляется в присутствии ортованадата, известного ингибитора H^+-транслоцирующей АТФазы на плазмалемме растительных клеток [9]. На основании этих наблюдений нами было высказано предположение о том, что фитогормон-индуцированный сдвиг pH_c обусловлен активацией данного протонного насоса. В настоящей работе мы протестировали справедливость этой гипотезы, следя за гормон-индуцированными изменениями мембранного потенциала на плазмалемме прорастающих пыльцевых зерен петунии с помощью катионных потенциал-чувствительных красителей, Dis-C_3-(5) и сафранина О, часто применяемых для регистрации поляризации и ионной проницаемости клеточных мембран [10-11]. Флуоресцентные и спектрофотометрические измерения были выполнены при комнатной температуре на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi-850 (Япония) и двухволновом/двухлучевом спектрофотометре Hitachi-557 (Япония), соответственно, в стандартных 1см-кюветах при непрерывном перемешивании образцов в ходе измерений. Среда инкубации пыльцевых зерен, использованная для этих измерений, содержала 0,3М сахарозу, 25мМ MES/Трис (pH 6,9) и 1мкМ Dis-C_3-(5) или 10мкМ сафранина О.

Результаты и их обсуждение. Для того, чтобы дать ответ на вопрос о том, способны ли исследуемые нами фитогормоны модулировать активность ион-транспортирующих систем на плазмалемме прорастающих пыльцевых зерен петунии, и выяснить их происхождение, в настоящей работе исследовано действие экзогенной ИУК на величину их мембранного потенциала ($\Delta\Psi$), отражающего глобальную результирующую активность этих систем. Данные, представленные на рис.1А, показывают, что добавление 2,5мкМ ИУК к суспензии пыльцевых зерен в бескалиевой буферной среде немедленно инициировало их мембранную гиперполяризацию, отражаемую в

тушении флуоресценции Dis-C_3-(5). Быстрое обращение гормон-индуцированного сигнала Dis-C_3-(5) имело место при добавлении к пыльцевым зернам 60мМ KCl, свидетельствуя о том, что K^+-индуцированная диссипация мембранного потенциала скорее всего происходит именно на плазмалемме, а не на каких-либо внутриклеточных мембранах клеток пыльцевого зерна. В тех же самых экспериментальных условиях ИУК-индуцированная гиперполяризация пыльцевых зерен наблюдалась и при использовании сафранина О в качестве зонда мембранного потенциала (рис1Б). Рис.1 также показывает, что запускаемые фитогормонами ответные реакции потенциал-чувствительных красителей полностью снимались в присутствии ортованадата (300мкМ), относительно специфического ингибитора АТФ-зависимого протонного насоса на плазмалемме растительных клеток.

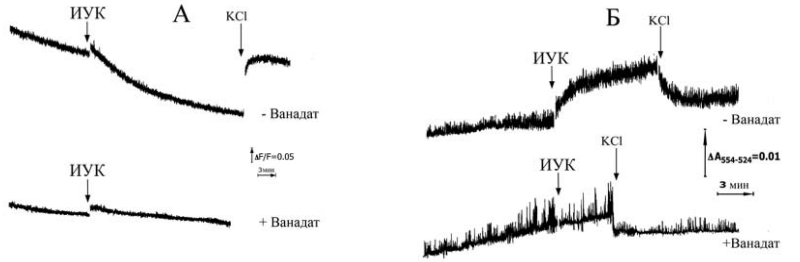


Рис.1. Гиперполяризация плазмалеммы под действием ИУК и ингибирование этого эффекта в присутствии ортованадата.

Эти наблюдения говорят об электрогенной активности протонной АТФазы на плазмалемме клеток пыльцевого зерна. Значительный вклад этой H^+-АТФазы в гормон-индуцированную гиперполяризацию плазмалеммы подтверждается также тем, что эффект фитогормонов стимулируется протонофором FCCP или нигерицином, то есть агентами, способными конвертировать ΔpH в $\Delta\Psi$ в ходе действия протонного насоса (данные не приведены), причем имитация действия нигерицина протонофором FCCP объясняется относительно высокой калийной проницаемостью данной клеточной мембраны, как это следует из наблюдаемой K^+-индуцируемой диссипации гиперполяризации плазмалеммы пыльцевых клеток под действием фитогормонов.

Еще одно свидетельство в пользу нашего предположения о включении H^+-АТФазы плазмалеммы в наблюдаемый эффект фитогормонов состоит в том, что он выраженным образом имитируется активным синтетическим аналогом ауксина, 2,4-Д (0,25мкМ), а также фузикокцином (2мкМ) (рис.2) – известными стимуляторами активности

данного протонного насоса на плазмалемме растительных клеток. Важно отметить при этом и тот факт, что вызываемый этими соединениями сдвиг мембранного потенциала остается неизменным после добавления к суспензии пыльцевых зерен ИУК (рис.2).

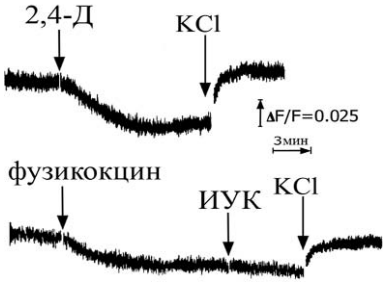


Рис.2. Гиперполяризация плазмалеммы под действием 2,4-Д и фузикокцина и снятие этого эффекта в присутствии KCl.

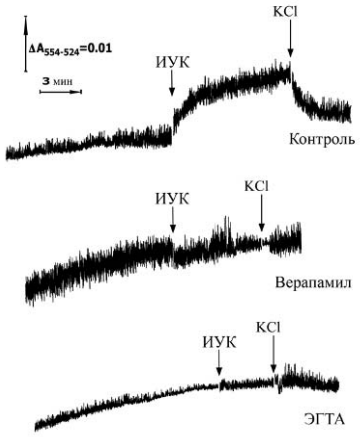


Рис.3. Эффекты верапамила и ЭГТА на ИУК-индуцируемую гиперполяризацию пыльцевых зерен петунии.

Другое важное наблюдение, очевидно имеющее отношение к механизму трансдукции гормонального сигнала в исследуемой системе, это полное подавление гормон-индуцируемой гиперполяризации плазмалеммы пыльцевых зерен в присутствии Ca^{2+}-хелатора ЭГТА (0,5мМ) или верапамила (100мкМ), известного блокатора Ca^{2+}-каналов клеточных мембран (рис.3).

Представленные в этой работе результаты позволяют заключить, что протон-транслоцирующая АТФаза на плазмалемме клеток пыльцевого зерна включается в трансдукцию сигналов, запускаемых ИУК. Однако, эта H^+-АТФаза, скорее всего, не является непосредственной мишенью действия гормона, поскольку наблюдаемый эффект его, вероятно, опосредован рядом событий, включающих, как следует из рис.3, и увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле пыльцевых клеток за счет его поступления в этот компартмент из внеклеточной среды. Вместе с тем, каскад всех событий, участвующих в трансдукции сигналов, запускаемых ИУК, в настоящее время остается неясным, и их идентификация требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Taylor L.P., Hepler P.K.* //Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. (1997) 25: 461-91;
2. *Franklin-Tong V.E.* //Plant Cell (1999) 11: 727-38;
3. *Lord E.M., Russell S.D.* //Annu. Rev. Cell Dev. Biol. (2002) 18: 81-105;
4. *Feijo J.A., Malho R., Obermeyer G.* //Protoplasma (1995) 187: 155-67;
5. *Holdaway-Clarke T.L., Hepler P.K.* //New Phytol. (2003) 159: 539-63;
6. *Kovaleva L.V., Zakharova E.V.* //Sex. Plant Reprod. (2003) 16: 191-6;
7. *Ковалева Л.В., Захарова Е.В.* //Физиол. Раст. (2004) 51: 446-51;
8. *Ковалева Л.В. и др.* //Физиол. Раст. (2005) 52: 584-90;
9. *Андреев И.М. и др.* // Физиол. Раст. (2007) 54: 707-14;
10. *Hernandez-Gonzalez E.O. et al.* //J. Biol. Chem. (2007) 282: 24397-406;
11. *Akerman K.E.O., Wikstrom M.K.F.* //FEBS Lett. (1976) 68: 191-7.

РОЛИ ФИТОХРОМА А И ФИТОХРОМА В В СВЕТОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA L.*

Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н., Анвар Ахмад Дж., Селиванова Н.В., Гончаренко И.Н.

Воронежский государственный университет

Введение. Энергетические баланс растения складывается из фотосинтетического аппарата и функционирования цикла Кребса, при этом в светлое время суток основная доля АТФ образуется за счет работы фотосинтетической ЭТЦ. В тоже время наблюдается резкое снижение интенсивности функционирования цикла Кребса в данных условиях, о чем и свидетельствует уменьшение активности ферментов этого пути [1]. Неполное выключение ЦТК на свету, может свидетельствовать об участии данного цикла в синтезе интермедиатов для биосинтетических процессов [2,3]. В связи с этим, интересным представляется изучение механизмов регуляции ключевых ферментов цикла Кребса различными рецепторными системами растительной клетки, в частности, маркерного энзима – сукцинатдегидрогеназы (КФ. 1.3.99.1).

Применение в научных исследованиях генмодифицированных организмов дает большую перспективу для создания целостной картины происходящих процессов в клетке на основе изучения отдельных ее компонентов. Анализ растений, нокаутных по гену отдельного вида фоторецептора, позволяет выявить его функциональную роль в регуляции метаболических процессов клетки, что является важным для изучения вклада отдельного компонента генетической системы в

адаптации организма к изменяющимся условиям внешней среды [4]. Для решения этой задачи использовали в качестве объектов исследования генмодифицированные организмы, в генетическом аппарате которых отсутствует ген, кодирующий один из типов фитохромов. В связи с этим целью данной работы явилось изучение роли фитохрома А и фитохрома В в световой регуляции экспрессии сукцинатдегидрогеназы в листьях арабидопсиса.

Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали 24-дневные растения *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа и мутантов по гену фитохрома А и В, выращенные гидропонным способом при температуре 25^{o}C при 12-часовом световом дне. Проростки облучали светом различного спектрального состава с помощью светодиодов с максимумами испускания в области 660 и 730нм.

Для выделения суммарной клеточной РНК использовался метод гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформной экстракции [5] с использованием в качестве осадителя LiCI. Визуализацию осуществляли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем 0,1% бромистого этидия.

Подбор праймеров осуществляли на основе нуклеотидных последовательностей субъединицы А сукцинатдегидрогеназы с использованием программного обеспечения Primer3 [6].

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе Bio-Rad DNA Engine Thermal Cycler Chromo 4 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green I. Нормализатором являлся ген фактора элонгации *ef-1ά* [7]. В качестве праймеров использовали следующие нуклеотидные последовательности к гену *sdh1-2*:
прямой – 5'-CAAACGGGTCACTTCCAACT-3';
обратный – 5'-CCAAAACTGTCCCACGTCTT-3'.

Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$-метода [8] с использованием программного обеспечения Opticon Monitor^{TM} Software (Biorad, США).

Результаты. Методом ПЦР в реальном времени с использование интеркалирующего красителя Sybr Green I показано, что количество транскрипта в растениях инкубированных в темноте и после последовательного облучения КС и ДКС больше, чем в образцах, из растений, экспонируемых на свету и под действием КС.

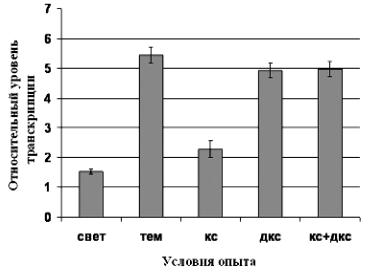


Рис.1. Уровень транскрипции гена *sdh1-2* в листьях *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа в условиях различного светового режима. Свет –растения, освещенные белым светом; Тем –растения, выдержанные в темноте; КС –растения, освещенные светом с длиной волны 660нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660нм и 730нм.

Полученные данные по влиянию светового режима на экспрессию гена субъединицы А сукцинатдегидрогеназы свидетельствуют об участии фитохромной системы в регуляции данного процесса. Установлено, что СДГ из растений арабидопсиса мутантных по гену фитохрома А является нечувствительной к действию красного света, что, вероятно, связано с отсутствием в них фитохрома А, влияющего на экспрессию гена *sdh1-2* (рис.2.). В данном типе растений не было обнаружено существенных изменений в интенсивности транскрипции исследуемого гена после их облучения КС и ДКС и экспозицией в темноте.

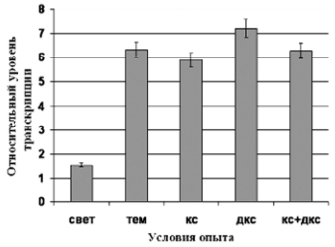


Рис.2. Уровень транскрипции гена *sdh1-2* в листьях *Arabidopsis thaliana* L. дефицитного по гену фитохрома А в условиях различного светового режима. Условные обозначения: см. рисунок 1.

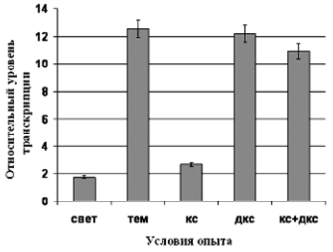


Рис.3. Уровень транскрипции гена *sdh1-2* в листьях *Arabidopsis thaliana* L. дефицитного по гену фитохрома В в условиях различного светового режима. Условные обозначения: см. рисунок 1.

Данные по влиянию светового режима на активность СДГ в растениях арабиопсиса мутантных по гену фитохрома В показывают, что на свету уровень транскрипции гена *sdh1-2* был в 8,2 раза ниже, значения этого показателя в темноте (рис.3). После облучения растений КС исследуемый фермент ингибировался в 5,3 раза. После экспозиции растений в условиях ДКС и последовательного действие КС и ДКС

уровень относительной транскрипции исследуемого гена находился в близких значениях к данному показателю в варианте опыта «темнота».

Обсуждение. Полученные данные по влиянию светового режима на функциональное состояние сукцинатдегидрогеназы свидетельствуют об участии фитохромной системы в данном процессе. Изучен механизм световой регуляции экспрессии гена субъединицы А СДГ в листьях арабидопсиса посредством фитохромной системы. Установлено, что СДГ из растений арабидопсиса мутантных по гену фитохрома А является нечувствительной к действию красного света, что, вероятно, связано с отсутствием в них фитохрома А, влияющего уровень экспрессии гена *sdh1-2*. Однако, данные по влиянию красного света (КС) на активность СДГ в растениях арабиопсиса мутантных по гену *phyb-1*, кодирующего фитохром В растений дикого типа, свидетельствуют, что исследуемый ген подвергается значительному изменению в скорости экспрессии в условиях различного светового режима.

Данные по влиянию КС и ДКС на уровень транскрипции гена *sdh1-2* СДГ в мутантных растениях арабидопсиса свидетельствуют, что именно фитохром В не принимает участия в изменении активности сукцинатдегидрогеназы. Активная форма фитохрома А регулирует работу СДГ посредством изменение функционального состояния генетического аппарата клетки. В темноте и после последовательного действия ДКС света фитохром переходит в неактивную форму и снимает угнетающее действие с гена. Регуляция экспрессии СДГ активной формой фитохрома А осуществляется через воздействие на геном растения, блокируя экспрессию гена, кодирующего субъединицу А сукцинатдегидрогеназы. Данное предположение основано на результатах оценки экспрессии гена *sdh1-2 Arabidopsis thaliana* L., мутантного по генам фитохрома А и В в условиях различного светового режима. Регуляция уровня транскрипции гена фитохром А может осуществляться через различные мессенжеры, такие как G-белки, ионы Ca^{2+} и др. [9, 10]. Это предположение основано на известном случае воздействия красного света на ротеноннечувствительные НАДН-дегидрогеназы, приводящее к увеличению концентрации их мРНК [11].

Результаты исследований по влиянию красного и дальнего красного света на активность СДГ в мутантных растениях арабидопсиса свидетельствуют, что фитохром В не принимает участия в данном процессе.

Т.о., на примере маркерного фермента митохондрий показано снижение функциональной активности цикла Кребса на свету. Механизм ингибирования ЦТК в листьях арабидопсиса опосредован через рецепцию красного света с длиной волны 660нм фитохромом А, блокирующего экспрессию гена *sdh1-2*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мамушина Н.С.* //Физиол. Раст. (1997) 44(3): 449-61;
2. *Ракитин А.В.* //Действ. красн. св. в смешан. светопот. на продук. проц.растений. Томск (2001): 21;
3. *Землянухин А.А.* //Метаб. орган. кислот раст. Воронеж (1995): 150-2;
4. *Tsiantis M, Hay A.* //Nature Rev. Gen. (2003) 4(3):169-80;
5. *Алексеев В.И., Каминский В.А.* //Прикл. Молек. Биол. М. (2005): 196;
6. *Rozen S.* //Meth. Mol. Biol. (2000) 132: 365-86;
7. *Nicot N. et al.* //J. Exp. Botany (2005) 56: 2907-14;
8. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* //Methods (2001) 25: 402-8;
9. *Синещеков В.А.* //Биол. Мембр. (1998) 15: 549-71;
10. *Tretyn A.* //Pol. J. Pharmacol. (1999) 51: 145-51;
11. *Matthew A.E. et al.* //Plant Physiol. (2004) 136: 2710-21.

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА ВОДОНАГНЕТАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ КОРНЕЙ МОЛОДЫХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

Жуковская Н.В., Попова М.С., Дустмаматов А.Г.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Ранее было показано, что эндогенная регуляция движущей силы водонагнетающей деятельности корня может осуществляться посредством фитогормонов и нейротрансмиттеров [1]. С целью выяснения типа восприятия первичного нейротрансмиттерного сигнала было испытано действие блокаторов различных классов адренорецепторов на интенсивность экссудации отделенных корней этиолированных 5-7-дневных проростков кукурузы. Известно, что альфа-адренорецепторы у животных участвуют в регуляции кровяного давления, бета-адренорецепторы участвуют в регуляции пропускной способности периферических сосудов, усиливают сердечные сокращения. Адреноблокаторы прямо или косвенно воздействуют на гидростатическую составляющую водного тока в организме животного, а также на сопротивляемость тканей кровяному току [2].

Испытание широкого спектра блокаторов тех или иных рецепторов может позволить сделать предположение об участии последних в регуляции водонагнетающей деятельности корня.

Табл.1. Влияние блокаторов адренорецепторов на экссудацию корней кукурузы *Zea mays* L.

Адренорецепторы	Вещество	Концентрация, М	Влияние на экссудацию, экспозиция 2 ч (% от контроля)
неселективные альфа-адрено-рецепторы	индорамин	1×10^{-4}…1×10^{-6}	Отсутствие статистически достоверного эффекта
	кетансерин	5×10^{-4}…1×10^{-6}	Отсутствие статистически достоверного эффекта
	ницерголин	1×10^{-4} 5×10^{-4} 1×10^{-3} 5×10^{-3}	143 514 392 350
	дигидроэрго-кристин	5×10^{-4} 1×10^{-3}	61 15
	дигидроэрго тамин	1×10^{-5} 5×10^{-5} 1×10^{-4} 5×10^{-4}	41 47 53 47
селективные альфа-1-адрено-рецепторы	празозин	1×10^{-3}…1×10^{-6}	Отсутствие статистически достоверного эффекта
неселективные бета-адрено-рецепторы	тимолол	1×10^{-6} 1×10^{-5}	33 33
	надолол	1×10^{-3}...1×10^{-9}	Отсутствие статистически достоверного эффекта
селективные бета-1-адрено-рецепторы	атенолол	1×10^{-3} 1×10^{-2}	33 11
	ацебутолол	1×10^{-3}… 1×10^{-9}	Отсутствие статистически достоверного эффекта
	метопролол	1×10^{-2}…1×10^{-8}	Отсутствие статистически достоверного эффекта
альфа-1-+бета-адрено-рецепторы	лабеталол	1×10^{-3} 1×10^{-2}	33 11

Были испытаны следующие адреноблокаторы: альфа-1-адреноблокаторы – ницерголин, празозин, доксазозин, кетансерин; альфа-2-адреноблокатор – йохимбин; неселективный альфа-адреноблокатор – индорамин; бета-1-адреноблокаторы - атенолол, ацебутолол, метопролол, бетаксалол; неселективные бета-адреноблокаторы – пропранолол, надолол, тимолол; альфа и бета-1-адреноблокатор - лабеталол. Действие всех веществ на интенсивность экссудации испытывалось в широком диапазоне концентраций от 1×10^{-7} до 1×10^{-2}М (табл.1). Опыты проводились при

30°С на протяжении 3-7ч. Оказалось, что испытанные селективные бета-1-адреноблокаторы (атенолол 1×10^{-3}–1×10^{-6}М; метопролол 1×10^{-3}–1×10^{-6}М) оказывают ингибирующее влияние на экссудацию. Наблюдалась тенденция к уменьшению интенсивности экссудации до 30%. При этом осмотическое давление применявшихся растворов практически не изменялось по сравнению с контролем и, следовательно, не могло быть причиной ингибирования экссудации. Наблюдавшийся эффект мог быть, по-видимому, следствием их специфического воздействия на изучаемый процесс. Из всех испытанных агентов только альфа-1-адреноблокатор ницерголин и неселективный бета-адреноблокатор пропранолол оказали стимулирующее воздействие на экссудацию.

Влияние различных концентраций ницерголина на интенсивность экссудации представлено на рис.1. Стимулирующий эффект наиболее быстро развивался в концентрации 5×10^{-3}М. (кривая 5). Однако, максимальный стимулирующий эффект наблюдался в концентрации 5×10^{-4}М (кривая 3). Продолжительность стимулирующего действия в концентрации 5×10^{-4}М составляла 3-4 часа.

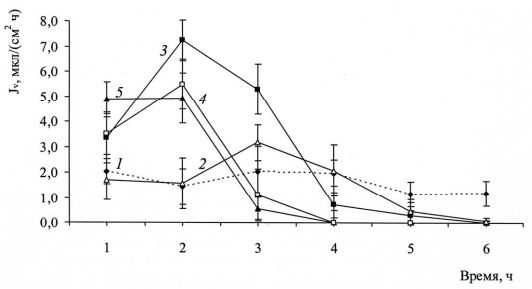


Рис.1. Влияние ницерголина в разных концентрациях на интенсивность экссудации отделённой корневой системы *Zea mays* L. при 30°С.
1– контроль, вода;
ницерголин: 2 – 1×10^{-4}М; 3 – 5×10^{-4}М; 4 – 1×10^{-3}М; 5 – 5×10^{-3}М.

Температурный коэффициент стимулирующего действия ницерголина оказался очень высоким (около 20), что может свидетельствовать о деструктивных процессах, происходящих в тканях корня, в том числе и опосредованных рецепторным взаимодействием. При связывании лиганда изменяется третичная структура белкового рецептора, этот процесс может быть чрезвычайно чувствителен к температуре. Осмотическое давление экссудата, собранного с базального конца корня в момент стимуляции экссудации ницерголином не отличалось от контрольного. Эти данные могут свидетельствовать либо о возрастании локального осмотического давления, либо об увеличении гидравлической проводимости тканей корня, если исключить участие в этом процессе так называемой неосмотической составляющей корневого давления. Пропранолол в концентрациях 1×10^{-5} до 1×10^{-4}М увеличивал

интенсивность экссудации приблизительно в 2-4 раза. Наблюдались различия в воздействии различных стереоизомеров пропранолола ((±)-пропранолол и (S)-(-)-пропранолол) на экссудацию. Некоторые различия в действии стереоизомеров сводятся, в основном, к различию в характере, а не в интенсивности наблюдаемой стимуляции. У изомера (±)-пропранолол (1×10^{-4}M) стимуляция начиналась на 3-м часу, достигая максимума к концу 3-го часа. Эффект стимуляции в растворе с концентрацией 1×10^{-4}M у изомера (S)-(-)-пропранолол также развивался на 3-м часу после начала воздействия препарата, достигая максимума к концу 3-го часа. Различие в действии этой концентрации обнаружены не были. Однако в растворе с концентрацией 5×10^{-5}M у (±)-пропранолола максимум стимуляции наблюдался на четвертый час, а у (S)-(-)-пропранолола на третий час и продолжался на протяжении 3-х часов. При этом стимуляция у изомера пропранолола (S)-(-)-пропранолол вдвое превышала стимуляцию (±)-пропранолола. 5×10^{-4}–1×10^{-3}M подавляют экссудацию. К 3-4 часу экссудация практически полностью прекращается. Известно, что пропранолол, кроме действия на бета-адреноцепторы, к которым у него сродство наиболее сильное, также оказывает влияние и на серотониновые рецепторы (5-HT1/5-HT2 - (±)-пропранолол и 5-HT1 - (S)-(-)-пропранолол), к которым сродство меньше, но оно также имеет место. Что является решающим в наблюдавшейся разнице в интенсивности стимуляции двух стереоизомеров – собственно различие в изомерии или их действие на различные серотониновые рецепторы, выяснить на данном этапе исследований нам не удалось. У других применявшихся препаратов обнаружить какое-либо действие на экссудацию ни в одной из концентраций не удалось.

С момента открытия корневого давления не было найдено ни одного вещества, которое бы стимулировало экссудацию более чем в два раза. Лишь недавно было обнаружено мощное стимулирующее действие высоких концентраций $HgCl_2$ на интенсивность экссудации молодых корней проростков кукурузы [3,4]. Увеличение интенсивности восходящего водного тока является, по-видимому, результатом деструктивных процессов в тканях корня.

Стимулирующие эффекты, обнаруженные под воздействием альфа-1- и бета-адреноблокаторов, могут свидетельствовать о том, что восприятие первичного нейротрансмиттерного сигнала в корнях молодых проростков кукурузы осуществляется рецепторными белками, т.е. мы можем предположить существование альфа-1- и бета-подобных адренорецепторов. Полученные нами данные о возможном участии G-белков в трансдукции нейротрансмиттерного сигнала [5] также делают вероятным их взаимосвязь с предполагаемыми альфа-1- и бета-

подобными адренорецепторами. Таким образом, теперь мы можем обрисовать приблизительную цепочку системы регуляции водонагнетающей деятельности корня, осуществляемую нейротрансмиттерами адреналином и норадреналином. По всей видимости, при эндогенной регуляции корневого давления первичный сигнал воспринимается альфа-1- и бета-подобными адренорецепторами, передается G-белкам, а те, в свою очередь, передают сигнал протеинкиназам и протеинфосфатазам [6]. Пути трансдукции сигнала от протеинкиназ и протеинфосфатаз к системам, формирующим движущую силу водонагнетающей деятельности корня, в настоящий момент остаются неизученными. Полученные данные, однако, не исключают возможность участия других интермедиатов при передаче нейротрансмиттерного сигнала и возможной межрецепторной передачи сигнала, объединяющей несколько различных типов рецепторов в единый регуляторный комплекс.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Жолкевич В.Н., Анискин Д.Н., Дустмаматов А.Г.* //ДАН (2003) 392(1): 138-41;
2. *Гилман* //Клинич. фармак. по Гудману и Гилману М. (2006) 1 501с.;
3. *Дустмаматов А.Г., Жолкевич В.Н.* //ДАН (2008) 421(4): 567-70;
4. *Дустмаматов А.Г., Жолкевич В.Н.* //Физиол. Раст. (2008) 55(6): 901-7;
5. *Жолкевич В.Н., Жуковская Н.В., Попова М.С.* //Физиол. Раст. (2007) 54(6): 885-91;
6. *Жолкевич В.Н., Жуковская Н.В., Попова М.С.* //Физиол. Раст. (2007) 54(4): 550-4.

ДИНАМИКА ГДК-ИНДУЦИРОВАННОГО ТИРОЗИНОВОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ГОРОХА ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Каримова Ф.Г., Якушева О.В.

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

Введение. Оксилипины представляют собой группу физиологически активных продуктов липоксигеназного метаболизма растений. Молекулярные механизмы действия оксилипинов привлекают особое внимание благодаря их высокой рострегулирующей и антипатогенной активности. Роль оксилипинов в регуляции метаболизма растений хорошо изучена на примере жасмоновой кислоты и метилжасмоната [1]. Одним из основных продуктов окисления линолевой и линоленовой кислот в липоксигеназном сигнальном каскаде бобовых является 12-гидрокси-9(Z)-додеценовая кислота (ГДК) [2]. Было показано, что ГДК является стимулятором роста, вызывающим увеличение биомассы каллуса сои до 400% [3]. У большинства растений понижение температуры среды вызывает торможение клеточного роста, что приводит к значительной потере урожая сельскохозяйственных культур. Изучение молекулярных механизмов приспособления разных видов растений к гипотермии при действии регуляторов роста необходимо для повышения холодоустойчивости растений, однако до сих пор они остаются мало изученными.

Ранее в нашей лаборатории показано участие Ca^{2+}- и цАМФ-зависимого фосфорилирования белков в сигналинге ГДК [4]. Известно, что тирозиновое фосфорилирование/дефосфорилирование белков критично для клеточной пролиферации и дифференцировки [5]. Предметом настоящего исследования было изучение динамики ГДК-индуцированного тирозинового фосфорилирования белков растений при низкотемпературном стрессе.

Материалы и методы. Растения гороха *(Pisum sativum* L.*)* выращивали в течение 7-9 дней на 0,25 нормы среды Хогланда-Арнона I в условиях 12-часового фотопериода при интенсивности освещения 10клк и температуре 25°С. В связи с тем, что условия опыта включали механический стресс (отделение корней от проростков), перед экспериментом проводили 4-часовую предадаптацию корней в среде роста (согласно данным [6] за это время органы, отделенные от целого растения, приходили в состояние «относительного покоя»). Корни инкубировали в течение различного времени в среде роста при оптимальной температуре и/или гипотермии +4°С без добавок (контроль) и с добавлением ГДК (0,1мкМ). Методы выделения, разделения белков 1D- и 2D-электрофорезом и определения их фосфорилирования описаны в работе [7]. Тирозиновое фосфорилирование белков выявляли с помощью антител к фосфотирозину PY20 (Amersham), высокая (мкМ) специфичность которых была нами показана [8].

Результаты и обсуждение. Условия наших экспериментов включают поранение растений при отделении корней от целого растения. Поранение является мощнейшим стрессовым фактором [9], вызывающим резкое повышение содержания активных форм кислорода [10], наиболее стабильная из которых – H_2O_2 вызывает повышение уровня тирозинового фосфорилирования (УТФ) белков [8], вызванное окислением существенных SH-групп цистеинов белков с константой ионизации pKa менее 7 [11]. УТФ белков зависит от соотношения активности ферментов фосфорилирования протеинтирозинкиназ (ПТК) и дефосфорилирования – протеинтирозинфосфатаз (ПТФ). Каталитический остаток цистеина ПТФ обладает необычно низкой pKa (между 4,5 и 5,5); его окисление ингибирует активность фермента, и вследствие этого повышается УТФ белков-субстратов ПТФ. Кроме того, активность некоторых ПТФ может быть ингибирована образованием дисульфидного мостика между двумя цистеинами ПТФ, что обращается низкомолекулярными тиолами [12].

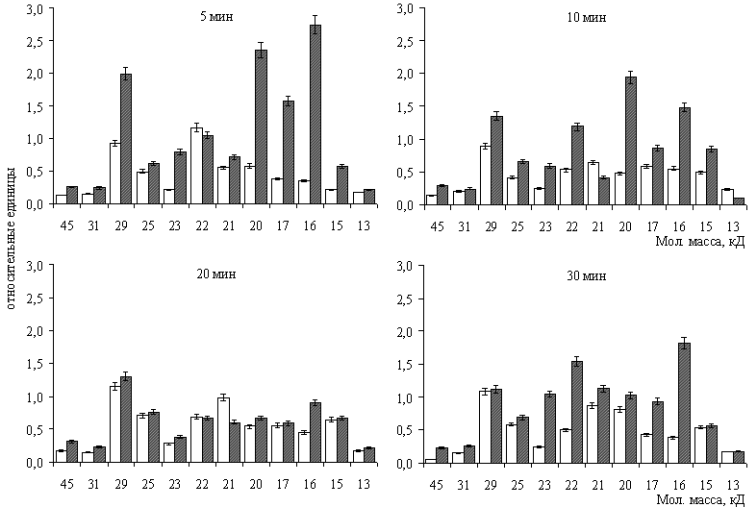


Рис.1. Динамика удельного тирозинового фосфорилирования белков корней гороха (9дн.) при гипотермии (+4°С**):**
□– контроль, корни инкубировали в среде роста при +25°С;
▨– гипотермия, корни инкубировали в среде роста при +4°С.

Данные рис.1 свидетельствуют о достаточно высоком УТФ большинства идентифицированных полос полипептидов (ПП) корней гороха в контроле за все наблюдаемое время и о высокой динамичности УТФ выявленных ПП. В условиях гипотермии УТФ белков меняется резко в сравнении с контролем, и за разное время наблюдения он может

меняться в противоположном направлении. В течение 5мин действие гипотермии (+4°С) на корни гороха вызывало драматическое повышение в 0,2-8 раз УТФ большинства ПП в сравнении с контролем (рис.1). Колебания величины УТФ различных полос ПП за взятые промежутки времени лишь косвенно свидетельствуют об истинном, очень быстром изменении УТФ отдельных составляющих полосу ПП с одинаковой молекулярной массой и различными изоэлектрическими точками pI. Данные 2D-электрофореза (рис.2) демонстрируют более приближенную к действительности картину УТФ отдельных ПП через 5мин после отрезания корней в контроле, однако далеко неполную, в связи с ограничением метода 2D-электрофореза и иммуноблотинга, не позволяющим выявить минорные белки, такие как протеинкиназы, существующие в клетках в единичных копиях [13].

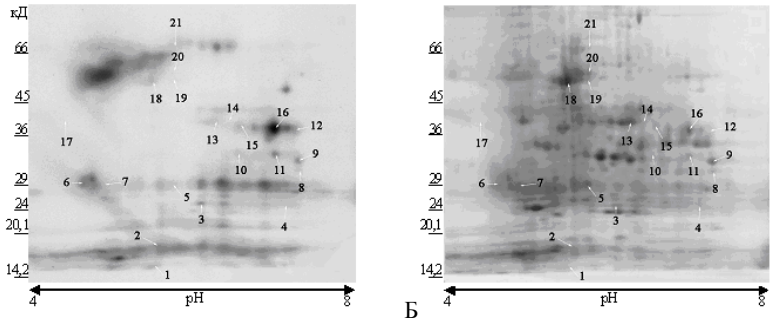


Рис.2 2D-электрофореграмма разделения белков корней гороха: А –тирозиновое фосфорилирование белков; Б –белки, окрашенные Кумасси R-250.

Липиды плазматических и других клеточных мембран являются одними из первых мишеней действия изменяющихся условий внешней среды. Поранение вызывает быстрые изменения мембранных липидов: уровень полярных липидов уменьшается и повышается уровень лизофосфолипидов и фосфатидной кислоты, также как и свободных жирных кислот (линолевой и линоленовой). Фосфолипазы конститутивно присутствуют в тканях растений, а при поранении высвобождаются из органелл, вызывая деградацию мембран. Повышение концентрации цитозольного кальция, вызванное поранением, приводит к транслокации фосфолипазы Д в мембраны и активируют фосфолипазы [14]. Очевидно, в описанных событиях принимает участие изменение УТФ различных ПП (рис.2), последующая идентификация которых методом MALDI-TOF MS позволит выявить эти белки.

Действие ГДК на фосфорилирование ПП при оптимальной температуре и гипотермии было противоположно направленным за детектируемые времена (рис.3,4).

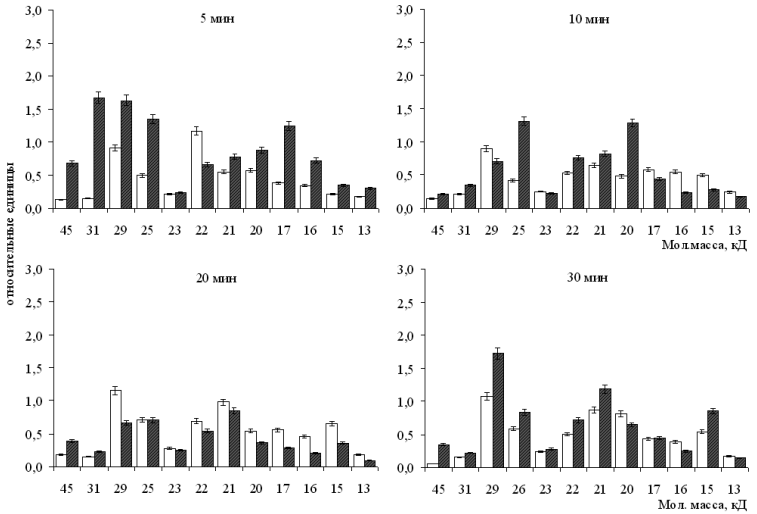


Рис.3. Динамика влияния ГДК на удельное тирозиновое фосфорилирование белков корней гороха (9дн.) при оптимальной температуре (+25°С), отрезанные корни инкубировали в среде роста: □ – контроль, ▨ – 0,1мкМ ГДК.

Если при оптимальной температуре ГДК через 5-10мин после отделения корней повышала фосфорилирование всех ПП, то при гипотермии ГДК, наоборот, уменьшала повышенный действием гипотермии уровень фосфорилирования белков. Подобный характер действия на физиолого-биохимические параметры имеют обычно фитогормоны и другие регуляторы роста. Известно, что гипотермия вызывает у холодоустойчивых растений задержку клеточного цикла в G1 или G2-фазе клеточного цикла [15]. Показано, что переход из G2-фазы клеточного цикла растений в фазу митоза контролируется тирозиновым фосфорилированием/дефосфорилированием специфических регуляторных белков, где именно дефосфорилирование белка по тирозину разрешает переход из G2 в М-фазу [5]. Ингибирование ПТФ задерживает клеточные циклы в точке перехода в митоз, очевидно, именно этот механизм предохраняет от повреждения молодые растущие органы растений при гипотермии. Известно, что холодоустойчивость растений сопряжена с их способностью задерживать клеточные циклы в фазах G1 или G2 [15].

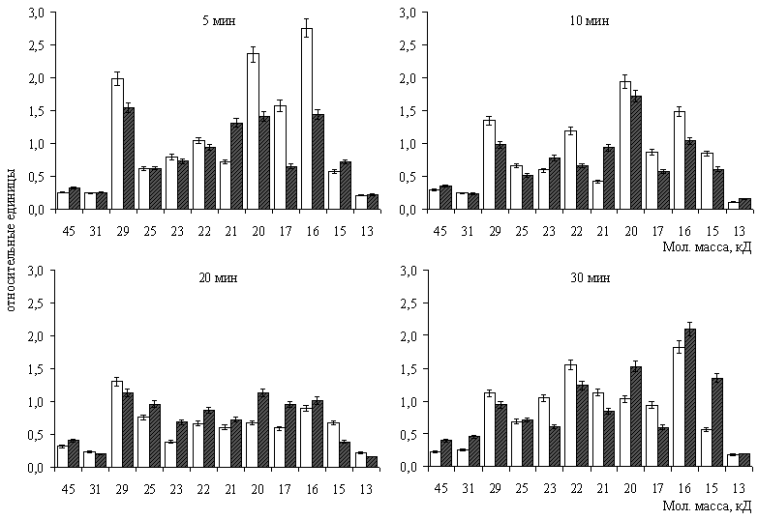


Рис.4. Динамика влияния гипотермии (+4°С) на ГДК-индуцированное тирозиновое фосфорилирование белков корней гороха (9дн.), отрезанные корни инкубировали в среде роста: □ – контроль, ▨ – 0,1мкМ ГДК.

Результаты наших экспериментов указывают, что оксилипин ГДК, образующийся в липоксигеназном метаболизме в ответ на стрессы, является рострегулирующим соединением, действие которого при гипотермии обусловлено регуляцией активности белков через их тирозиновое фосфорилирование/дефосфорилирование, критичное для клеточного деления и дифференцировки.

Действие пониженных температур приводит к снижению или к полной потере урожая из-за замедления созревания или прямого повреждения растений. Регуляторы роста, повышающие холодоустойчивость растений, к которым может относиться ГДК, актуально применять в практике сельского хозяйства.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yan Y. et al.* //Plant Cell. (2007) 19: 2470-83;
2. *Гречкин А.Н. и др.* //ДАН СССР (1987) 297 (5): 1257-60;
3. *Tarchevsky I.A. et al* //Curr. Res. in Photosynthesis (1990) 4: 429-32;
4. *Каримова Ф.Г. и др.* //Физиол. Раст. (1999) 46 (1): 148-52.;
5. *Zhang K., Letham D.S., John P.C.L.* //Planta (1996). 200: 2-12;
6. *Пахомова В.М., Гордон Л.Х.* //Физиол. Раст. (1984) 31 (6): 1162-9.
7. *Федина Е.О., Каримова Ф.Г., Тарчевский И.А.* //Биохимия (2006) 71 (4): 525-32;

8. *Каримова Ф.Г., Петрова Н.В.* //Физиол. Раст. (2007) 54(3): 365-72;
9. *Reymond P. et al.* //Plant Cell (2000) 12: 707-19;
10. *Pastori G.M., Foyer C.H.* //Plant Physiol. (2002) 129(2): 460-8;
11. *Denu J.M., Tanner K.G.* //Biochem. (1998) 37: 5633-42;
12. *Caselli A. et al.* //J. Biol. Chem. (1998) 273: 32554-60;
13. *Gygi, S.P. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97: 9390-5;
14. *Wang C. et al.* //Plant Cell (2000) 12: 2237-46;
15. *Гриф В.Г., Мачс Э.М.* //Цитология (1994) 36(11): 1069-85.

ДЕЙСТВИЕ ЭЛИСИТОРА ХИТОЗАНА И H_2O_2 НА СОСТОЯНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ УСТЬИЧНЫХ КЛЕТОК ГОРОХА

Киселевский Д.Б., Кузнецова Ю.Е., Самуилов В.Д.

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

Введение. Хитозан, поли(β-1,4)-N-ацетилглюкозамин, – продукт неполного дезацетилирования хитина, компонента клеточной стенки грибов. Взаимодействуя с клетками растений, хитозан проявляет свойства элиситора: узнается специфическим рецептором и индуцирует гиперчувствительный ответ – каскад реакций, включающий, образование активных форм кислорода (АФК) и гибель клеток растения или приводящий к повышению устойчивости растения к патогенам [1]. Фитопатогенные грибы вызывают различные заболевания у растений. Хитозан в низких концентрациях индуцирует закрытие устьиц у растений и тем самым, по-видимому, затрудняет проникновение гифов грибов в ткани растения. Сходным эффектом обладает фитогормон абсцизовая кислота. Закрытие устьиц сопровождается увеличением содержания активных форм кислорода и азота в устьичных клетках [2].

АФК, продукты последовательного одно-, двух- и трехэлектронного восстановления молекулярного кислорода (соответственно супероксидный анион-радикал, H_2O_2, гидроксильный радикал), стимулируют программируемую клеточную смерть (ПКС) у растений. H_2O_2 значительно усиливает апоптоз устьичных клеток гороха, вызванный цианидом и регистрируемый по разрушению клеточных ядер [3,4]. При этом H_2O_2 сам по себе не вызывает разрушения ядер устьичных клеток даже в концентрации 10-50мМ, но в концентрации 0,1мМ индуцирует разрушение ядер эпидермальных клеток. Как и H_2O_2 хитозан (0,1мг/мл) вызывает разрушение ядер эпидермальных, но не устьичных клеток [5].

В настоящей работе исследовано действие элиситора хитозана и H_2O_2 на состояние плазматической мембраны устьичных клеток.

Материалы и методы. Опыты проводили на эпидермисе, изолированном с нижней поверхности листьев 7-15-суточных проростков гороха *Pisum sativum* L., сорта Альфа. Растения выращивали в условиях периодического освещения люминесцентными лампами интенсивностью ~100мкЕ·м$^{-2}$с$^{-1}$ (свет – 18ч, темнота – 6ч) при 23-28º. Эпидермис отделяли пинцетом, помещали в дистиллированную воду, добавляли реагенты (состав представлен на рисунках) и инкубировали в полистирольных планшетах при комнатой температуре.

Для регистрации состояния плазматической мембраны клеток использовали флуоресцирующий краситель пропидий иодид (PI), связывающийся с ДНК и не проникающий через неповрежденную мембрану. Эпидермис окрашивали 2мкМ PI в течение 20мин. Наблюдения проводили на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axiovert 200M (Германия). Флуоресценцию PI возбуждали светом с λ 525-565нм и регистрировали при 575-640нм.

Гибель клеток регистрировали по разрушению клеточных ядер. Для регистрации ядер эпидермис после инкубации обрабатывали 5мин фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5:5:1:1), промывали 15мин этанолом для удаления фиксатора, 5мин инкубировали в воде и 30мин окрашивали гематоксилином Каравди. Окрашенные пленки эпидермиса промывали водой и исследовали с помощью световой микроскопии.

Определяли долю клеток с поврежденной плазматической мембраной (с окрашенной ДНК), с разрушенными ядрами и лишенных ядер в 300-500 обследованных клетках (в 2-3 пленках эпидермиса). Опыты проводили в 2-3 повторностях. Приводятся типичные данные, полученные в одной из повторностей.

Результаты и их обсуждение. В изолированных пленках эпидермиса листа гороха, окрашенных PI, связывающимся с ДНК, выявлялись две группы устьичных клеток: неокрашенные и с флуоресцирующим ядром (рис.1). Флуоресценция ядер клеток свидетельствует о нарушении плазматической мембраны (ПМ), которая в норме не проницаема для PI. В отсутствие воздействий доля устьичных клеток в пленках эпидермиса, окрашенных PI, не превышала 10% или 20% после 3-часовой или 1-суточной инкубации, соответственно (рис.2).

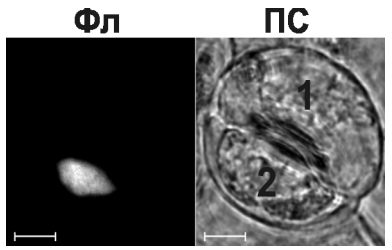


Рис.1. Устьичные клетки с интактной (1) и поврежденной ПМ (2) в эпидермисе из листьев гороха. Состояние ПМ оценивали по флуоресценции PI. Эпидермис инкубировали в дистиллированной воде 2ч.
Фл –флуоресценция PI,
ПС –изображение в проходящем свете. Масштабная линейка – 5мкм.

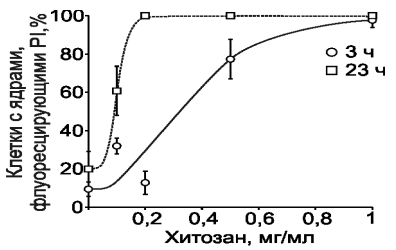


Рис.2. Действие хитозана на проницаемость ПМ в устьичных клетках эпидермиса из листьев гороха, регистрируемую по флуоресценции PI в клеточных ядрах. Эпидермис помещали в растворы хитозана и инкубировали при перемешивании на магнитной мешалке на свету (время инкубации отмечено на диаграмме).

Хитозан вызывал нарушение барьера проницаемости ПМ для PI. Доля клеток с поврежденной ПМ достигала 100% в течение 3ч или 1 суток при обработке хитозаном в концентрациях соответственно 1 и 0,2мг/мл (рис.2). Разрушение клеточных ядер – результат ПКС. Нами показано, что CN^-, ингибитор каталазы и пероксидаз, утилизирующих H_2O_2, рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы в хлоропластах и цитохром *c*-оксидазы в митохондриях вызывает разрушение ядер устьичных клеток [6,7]. Индуцированное CN^- разрушение ядер стимулируется H_2O_2 и подавляется соединениями, ингибирующими образование АФК [3,4]. Ультраструктурные изменения клеток, межнуклеосомная фрагментация ДНК и действие ингибиторов энергообеспечения клеток свидетельствуют о том, что CN^- вызывает апоптоз [8,9]. В отличие от CN^- хитозан не индуцировал разрушения ядер устьичных клеток даже после 3-суточной обработки (данные не представлены).

Хитозан индуцирует гиперчувствительный ответ клеток растений, сопровождающийся генерацией АФК и гибелью клеток [10]. Это создает барьер для проникновения патогена. Мы испытали действие H_2O_2 на состояние ПМ устьичных клеток. Как и хитозан, H_2O_2 в концентрации 1-10мМ вызывал проникновение PI в клетки, т.е. повреждал ПМ, доля клеток с нарушением ПМ достигала почти 100% в течение 2ч инкубации с H_2O_2 (рис.3).

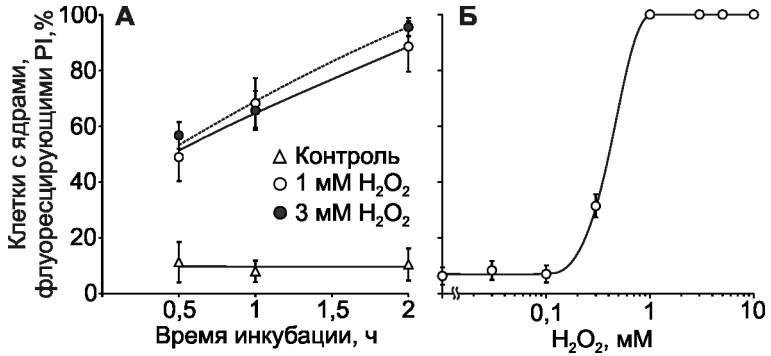


Рис.3. Действие H_2O_2 на проницаемость ПМ устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха, регистрируемую по флуоресценции PI в клеточных ядрах. Эпидермис помещали в растворы хитозана и инкубировали 0,5-2ч (**А**) или 23-24ч (**Б**) при перемешивании на магнитной мешалке на свету.

Испытан эффект соединений, стимулирующих накопление H_2O_2 в клетках. NH_2OH использовали в качестве ингибитора каталазы [11]. NH_2OH нарушал барьер проницаемости ПМ для PI, но не разрушал ядер устьичных клеток (рис.4). Имеются данные о том, что H_2O_2 транспортируется в клетку через аквапорины [12] – трансмембранные каналы, избирательно пропускающие воду и некоторые другие низкомолекулярные соединения [13]. $AgNO_3$, ингибитор аквапориновых каналов [14], индуцировал проницаемость ПМ для PI, но не разрушение ядер устьичных клеток (рис.4). Таким же эффектом обладала комбинация $AgNO_3$ с NH_2OH (рис.4). По-видимому, накопление H_2O_2 как продукта окислительно-восстановительных реакций в клетках в результате подавления 1) активности каталазы и 2) диффузии H_2O_2 через аквапориновые каналы приводит к деструктивным изменениям ПМ. Полученные данные показывают, что удаление H_2O_2 через аквапориновые каналы играет существенную роль в защите клеток от АФК.

PI используется исследователями в качестве маркера погибших клеток у животных и растений [15]. В качестве воздействий, вызывающих гибель клеток табака, которая сопровождается межнуклеосомной фрагментацией ДНК спустя 1-7 суток инкубации после обработки, используют замораживание клеток в жидком азоте, механическую гомогенизацию или обработку детергентом, нарушающим целостность ПМ [16]. Детергент тритон Х-100 вызывал нарушение барьера проницаемости ПМ устьичных клеток для PI (рис.5), подобно хитозану, H_2O_2, NH_2OH и $AgNO_3$. Разрушения ядер клеток не наблюдалось даже после 3-суточной обработки детергентом (данные не представлены).

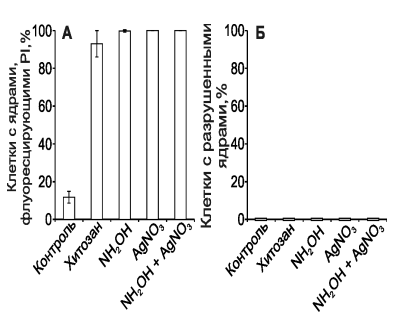


Рис.4. Действие хитозана, NH_2OH и $AgNO_3$ на (**А**) проницаемость ПМ устьичных клеток, регистрируемую по флуоресценции PI в клеточных ядрах, и (**Б**) программируемую гибель устьичных клеток, регистрируемую по разрушению клеточных ядер в эпидермисе из листьев гороха. Эпидермис помещали в раствор хитозана (1мг/мл), добавляли 10мМ NH_2OH и 10мкМ $AgNO_3$ и инкубировали при перемешивании на магнитной мешалке 3ч (**А**) или 25ч (**Б**) на свету.

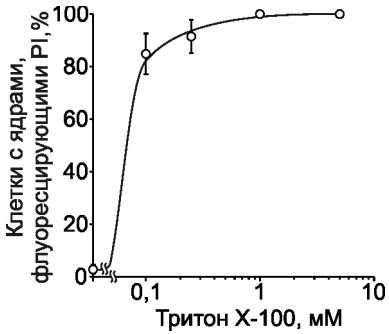


Рис.5. Действие тритона Х-100 на состояние ПМ в устьичных клетках эпидермиса из листьев гороха, регистрируемое по флуоресценции PI в клетках. Пленки инкубировали в растворах тритона Х-100 или дистиллированной воде 2ч на свету.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что элиситор хитозан нарушает барьерные свойства ПМ устьичных клеток. Поскольку 1) элиситоры индуцируют гиперчувствительный ответ в клетках растений, сопровождающийся генерацией АФК, и 2) действие H_2O_2 и соединений, способствующих его накоплению в клетке, сходно с действием хитозана, можно полагать, что эффект хитозана на ПМ устьичных клеток опосредован образованием АФК. Эпидермальные клетки гороха, основные клетки покровной ткани листа, погибают в результате обработки хитозаном с признаками ПКС – конденсацией и маргинацией ядерного хроматина, разрушением ядер и межнуклеосомной фрагментацией ДНК [5]. В настоящей работе не выявлено признаков программируемой смерти устьичных клеток при обработке хитозаном и H_2O_2. Действие испытанных соединений на состояние ПМ может быть интерпретировано как 1) вызванные АФК некротические изменения, либо 2) H_2O_2-индуцированное изменение свойств проницаемости ПМ [17] устьичных клеток. Не исключено, что устьичные клетки сами по себе не взаимодействуют с хитозаном и его эффект опосредован

эпидермальными клетками, в которых активируются системы образования АФК в ответ на хитозан.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lin W. et al.* //J. Plant Physiol. (2005) 162: 937-44;
2. *Srivastava N. et al.* //Planta (2009) 229: 757-65;
3. *Самуилов В.Д. и др.* //Биохимия (2006) 71: 481-92;
4. *Самуилов В.Д. и др.* //Биохимия (2008) 73: 1344-54;
5. *Васильев Л.А. и др.* //Биохимия (в печати).
6. *Самуилов В.Д. и др.* //Биохимия (2002) 67: 757-65;
7. *Samuilov V.D. et al.* //Biosci. Rep. (2003) 23: 103-17;
8. *Бакеева Л.Е., Дзюбинская Е.В., Самуилов В.Д.* //Биохимия (2005) 70: 1177-85;
9. *Дзюбинская Е.В. и др.* //Биохимия (2006) 71: 493-504;
10. *Iriti M. et al.* //Plant Physiol. Biochem. (2006) 44: 893-900;
11. *Kono Y.* //Bichem. Biophys. Res. Commun. (1984) 124: 75-9;
12. *Bienert G.P. et al.* //J. Biol. Chem. (2007) 282: 1183-92;
13. *Johansson I. et. al.* //Biochim. Biophys. Acta (2000) 1465: 324-42;
14. *Niemietz C.M., Tyerman S.D.* //FEBS Lett. (2002) 531: 443-7;
15. *Koyama H., Toda T., Hara T.* //J. Exp. Bot. (2001) 52: 361-8;
16. *Kuthanova A., Opatrny Z., Fischer L.* //J. Exp. Bot. (2008) 59: 2233-40;
17. *Folmer V. et al.* //Biochim. Biophys. Acta (2008) 1778: 1141-7.

ПАССИВНЫЙ ТРАНСПОРТ МАЛАТА, СУКЦИНАТА И ГЛУТАМАТА В ВЕЗИКУЛАХ ПЕРИБАКТЕРОИДНОЙ МЕМБРАНЫ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВ

Крылова В.В., Андреев И.М.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва

Введение. Фиксация молекулярного азота в высших растениях происходит в симбиосомах, находящихся в клетках корневых клубеньков бобовых и представляющих собой бактероиды, окруженные перибактероидной мембраной (ПБМ) и перибактероидным пространством [1, 2]. Эффективная фиксация азота требует поступления в бактероид не только дикарбоксилатов (малат и сукцинат) - основных углеродсодержащих метаболитов, функционирующих в энергообеспечении данного процесса, но и транспорта через бактероидную мембрану некоторых аминокислот. К их числу относится глутамат, поступающий внутрь бактероида, а также выходящие из него аспартат и аланин, образуемые в бактероидах в результате аминирования

аминотрансферазами продуктов окисления дикарбоксилатов [3,4]. Реализация всех этих транспортных процессов возможна только при условии, что глутамат, образуемый в цитозоле клетки-хозяина, также транспортируется и через ПБМ. Однако это не согласуется с рядом данных, имеющихся в литературе и полученных в экспериментах, проведенных на выделенных симбиосомах с использованием C^{14}-меченых субстратов [5-8]. Этот негативный результат может быть обусловлен повреждением ПБМ симбиосом в ходе их выделения или инактивацией в этой мембране в условиях *in vitro* соответствующего транспортера аминокислот [3,8]. Вместе с тем, ранее в экспериментах с выделенными симбиосомами люпина желтого нами была выявлена способность глутамата транспортироваться через ПБМ [9]. Подобные результаты были получены и на симбиосомах бобов из клубеньков, находящихся на ранней стадии развития и формирования азотфиксирующей системы бактероидов [10,11]. Однако в силу сложности исследуемой системы предложенная авторами интерпретация сделанных наблюдений вряд ли является единственно возможной. Вместе с тем представляется вероятным, что в случае экспериментов с симбиосомами *in vitro* отсутствие некоторых факторов нативного окружения ПБМ, в том числе соответствующей энергизации мембраны, способно оказывать сильное и, возможно, различное влияние на активность транспортеров рассматриваемых метаболитов и тем самым приводить к наблюдаемому преимущественному поглощению дикарбоксилатов симбиосомами.

Поскольку вопрос о транспорте глутамата через ПБМ до сих пор остается открытым, в настоящей работе мы попытались внести вклад в решение этой проблемы. Чтобы исключить вероятность того, что феномены, выявленные в работе, являются результатом активности бактероидов, способных присутствовать в виде примеси в препаратах симбиосом, эксперименты были проведены на более простой системе – везикулах ПБМ. За пассивным транспортом глутамата, малата и сукцината в везикулы ПБМ следили по снижению pH внутривезикулярной водной фазы, регистрируемому с помощью акридинового оранжевого (АО), известного ΔpH-индикатора, проникающего через биологические мембраны [12]. Проведенные нами эксперименты имели в своей основе предположение о том, что поступление указанных метаболитов, как анионов при физиологических значениях pH, внутрь везикул должно приводить к поляризации везикулярной мембраны («минус» внутри) и, в результате этого, к кислотному сдвигу pH внутри везикул, также зависимому и от протонной проводимости мембраны.

Результаты и обсуждения. Везикулярные препараты ПБМ были получены из симбиосом корневых клубеньков бобов (*Vicia faba* L.) методом, описанным нами ранее [9]. Спектрофотометрические измерения

абсорбционных изменений АО (A_{492}–A_{540}=ΔA) были выполнены при комнатной температуре на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) в стандартных 1см-кюветах без непрерывного размешивания образцов в ходе измерений.

Среда суспендирования везикул ПБМ, использованная для регистрации сдвига pH внутри них, содержала: 0,4М сорбит, 20мМ HEPES/BTP (pH 7,0), 12мкМ АО и примерно 100мкг/мл мембранного белка. Глутамат, малат и сукцинат добавлялись к суспензии везикул ПБМ до конечной концентрации 10мМ в виде растворов соответствующих кислот в дистиллированной воде, оттитрованных до pH 7,0 с помощью бис-трис-пропана (BTP).

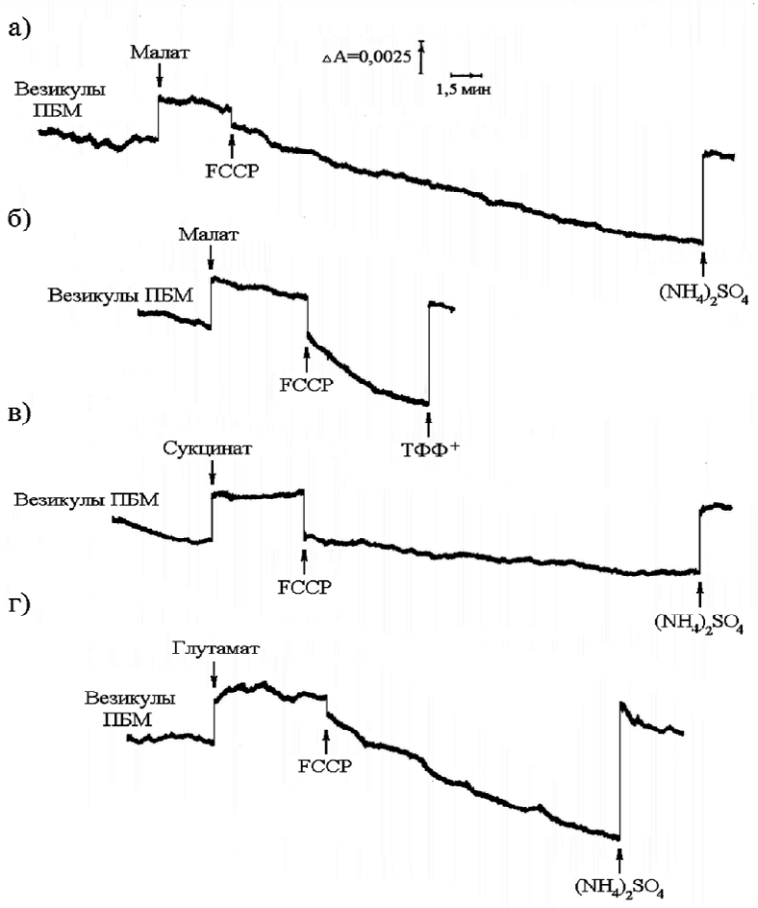


Рис.1. Кислотный сдвиг pH внутри везикул ПБМ под действием малата (а,б), сукцината (в) и глутамата (г), запускаемый FCCP и снимаемый в присутствии сульфата аммония или тетрафенилфосфония.

Как показано на рис.1а, добавление малата к везикулам ПБМ, суспендированным в буферной среде, содержащей ΔpH-индикатор, приводило только к очень быстрому и небольшому увеличению абсорбционного сигнала АО, и в дальнейшем его величина оставалась практически неизменной на протяжении 10-15 минут. Наблюдаемый здесь эффект дает основание полагать, что отсутствие кислотного сдвига pH внутри везикул, несмотря на ожидаемую малат-индуцируемую генерацию на ПБМ мембранного потенциала соответствующей полярности («минус» внутри везикул), обусловлено низкой протонной проводимостью везикулярной мембраны. Действительно, справедливость этого предположения подтверждается тем, что закисление среды внутри везикул в присутствии малата немедленно инициировалось после добавления к везикулярной суспензии 2мкМ протонофора FCCP , о чем дополнительно свидетельствует быстрое обращение этого процесса 1мМ сульфата аммония (рис.1а), или 1мМ проникающего катиона тетрафенилфосфония ($ТФФ^+$) (рис.1б).

Качественно подобные эффекты наблюдались нами не только в присутствии сукцината (рис.1в), но и глутамата (рис.1г), которые были добавлены к везикулам ПБМ в той же концентрации, что и малат.

Результаты настоящей работы показывают, что глутамат как анион способен проникать внутрь везикул через ПБМ, создавать на ней движущую силу для транспорта в том же направлении протонов в виде мембранного потенциала соответствующей полярности («минус» внутри везикул) и, как результат, приводить в присутствии FCCP к снижению pH внутривезикулярной водной фазы. Хотя эти результаты согласуются с некоторыми цитированными выше данными, полученными нами ранее, природа транспортных систем, обеспечивающих перенос через ПБМ соответствующих метаболитов, остается неясной. Судя по имеющимся в литературе сообщениям, на сегодняшний день эта проблема остается нерешенной даже в отношении транспорта через ПБМ дикарбоксилатов таких как малат и сукцинат. В свою очередь это означает, что неясными остаются и факторы, контролирующие активность рассматриваемых транспортных систем. Не исключено, что именно это обстоятельство сильно осложняет решение проблемы импорта аминокислот симбиосомами, связанного с их транслокацией через ПБМ, если иметь в виду возможность инактивации соответствующих транспортеров в тех или иных условиях *in vitro*. Заслуживает внимания и другой аспект той же проблемы, касающийся потенциальной зависимости активности данных транспортеров от стадии развития симбиотической азотфиксирующей системы, о чем могут свидетельствовать недавно полученные нами результаты [10,11]. Полагая, что поступление аминокислот, таких как глутамат, в симбиосомы отражает специфику взаимоотношений между макро- и микросимбионтом, представляется вероятным, что этот метаболит выполняет в данной системе еще и

другую, а именно сигнальную роль. На это указывают данные о способности глутамата выступать в роли лиганда, активирующего ионные каналы, и, тем самым, запускающего каскад событий, приводящих к экспрессии некоторых генов в растениях [13].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №08-04-01118.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Streeter J.G.* //Adv. Bot. Res. (1991) 18: 129-87;
2. *Udvardi M.K., Day D.A.* //Annu. Rev. Plant Physiol. (1997) 48: 493-523;
3. *Lodwig E.M. et al.* //Nature (2003) 422: 722-6;
4. *White J. et al.* //Plant Physiol. (2007) 144: 604-14;
5. *Udvardi M.K., Salom C.L., Day D.A.* //Mol. Plant Microbe Interact. (1988) 1: 250-4;
6. *Rosendahl L., Dilworth M.J., Glenn A.R.* //J. Plant Physiol. (1992) 139: 635-8;
7. *Day D.A., Copeland L.* //Plant Physiol. Biochem. (1991) 29: 185-201;
8. *Lodwig E., Pool P.* //CRC Crit. Rev. Plant Sci. (2003) 22: 37-78;
9. *Андреев И.М. и др.* //Физиол. Раст. (1996) 43: 874-82;
10. *Крылова В.В., Дуброво П.Н., Измайлов С.Ф.* //Физиол. Раст. (2007) 54: 209-6;
11. *Крылова В.В., Дуброво П.Н., Измайлов С.Ф.* //Прикл. Биохим. Микробиол. (2007) 43: 325-30;
12. *Palmgren M.G.* //Anal. Biochem. (1991) 192: 316-21;
13. *Forde B.G., Lea P.J.* //J. Exp. Bot. (2007) 58: 2339-58.

РЕЦЕПТОРЫ ЦИТОКИНИНОВ ИЗ КУКУРУЗЫ РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИМ СВОЙСТВАМ И, ВИДИМО, СУБКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

Ломин С.Н.[1], Йонекура-Сакакибара К.[2], Сакакибара Х.[2], Романов Г.А.[1]

[1]Институт физиологи растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва
[2]RIKEN Plant Science Center, Yokohama, Japan

Введение. Гены рецепторов цитокининов кукурузы были обнаружены в 2004г. [1], вскоре после открытия аналогичных рецепторов у арабидопсиса (2001г.). По своему строению рецепторы цитокининов кукурузы представляли собой сенсорные гистидинкиназы и были гомологичны рецепторам арабидопсиса: кукурузный рецептор ZmHK1 соответствовал рецептору CRE1/AHK4, рецептор ZmHK2 – рецептору AHK3, а рецептор ZmHK3 – рецептору AHK2 [1]. Впоследствии были найдены близкие изоформы рецепторов, в результате рецептор ZmHK3 стал рассматриваться как смесь близких изоформ ZmHK3a и ZmHK3b. Дополнительно были изолированы другие изоформы: ZmHK1a2 (сходен с ZmHK1), ZmHK1b1 и ZmHK1b2 (сходны с ZmHK2). Целью настоящей работы было количественное исследование лиганд-связывающих свойств различных цитокининовых рецепторов кукурузы, а также их субклеточной локализации.

Результаты. Лиганд-связывающие свойства цитокининовых рецепторов кукурузы изучали с помощью радиолигандного метода с применением интактных трансгенных бактерий, экспрессирующих тот или иной тип рецептора [2-4]. В целом рецепторы имели высокое сродство к цитокининам (Kd на наномолярном уровне), но разные предпочтения к различным формам цитокининов (рис.1, табл.1). Так, рецептор ZmHK2 демонстрировал высокое сродство к *транс*-зеатину, тидиазурону и *мета*-тополину. ZmHK1 и ZmHK3a очень хорошо связывали изопентениладенин, ZmHK1 – также и бензиладенин. ZmHK1 взаимодействовал слабее с *транс*-зеатином и, что необычно, связывал *транс*- и *цис*-формы зеатина со сходной аффиностью. Ранее было показано, что цитокининовые рецепторы способны взаимодействовать с бактериальными компонентами передачи сигнала, т.е. при связывании цитокинина активировались гены, управляемые чувствительным к двухкомпонентному сигналингу *cps* промотором [1]. Функциональный тест по активации репортерного конструкта *cps::LacZ* показал корреляцию с данными по связыванию. Изоформы рецепторов были близки в опытах по лиганд-зависимой активации *cps::LacZ* к их структурным гомологам.

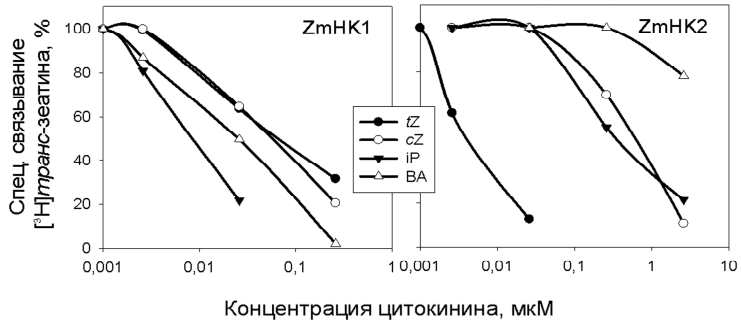


Рис.1. Различия в конкуренции цитокининов *транс*-зеатина (*t*Z), *цис*-зеатина (*c*Z), изопентениладенина (iP) и 6-бензиладенина (BA) с [^{3}H]*транс*-зеатином за высокоаффинные сайты связывании в клонах *E. coli*, экспрессирующих рецепторы кукурузы ZmHK1 или ZmHK2.

Моно- и дивалентные катионы в физиологических концентрациях практически не влияли на связывание. Связывание цитокинина рецептором ZmHK1, но не ZmHK2, оказалось pH-чувствительным.

Табл.1. Кажущиеся константы сродства (K_d) для связывания ряда природных цитокининов рецепторами ZmHK1, ZmHK2 и ZmHK3a.

Цитокинин	Кажущаяся Kd (нМ)		
	ZmHK1	ZmHK2	ZmHK3a
транс-зеатин (*t*Z)	**83**	**1.2**	**7**
цис-зеатин (*c*Z)	50	70	180
изопентенладенин (iP)	**5**	**120**	**8**
транс-зеатин рибозид (*t*ZR)	3000	70	280
изопентениладенин рибозид (iPR)	-	-	400
Дигидрозеатин (DZ)	200	700	60
6-бензиладенин (BA)	12	500	60
транс-зеатин *O*-глюкозид (*t*ZOG)	нет связ.	нет связ.	нет связ.

Для исследования субклеточной локализации рецепторов выделяли мембранные фракции из корней и листьев кукурузы, проводили их очистку и разделяли на фракцию плазмалеммы и фракцию внутренних мембран (эндоплазматический ретикулум). Далее оценивали способность выделенных мембран специфически связывать меченый *транс*-зеатин. Результаты типичного опыта представлены на рис.2. Удельное связывание [^{3}H]*транс*-зеатина плазматической мембраной гораздо выше по сравнению с внутренними мембранами в случае листьев, но достаточно близки (нет достоверных различий) в случае корней.

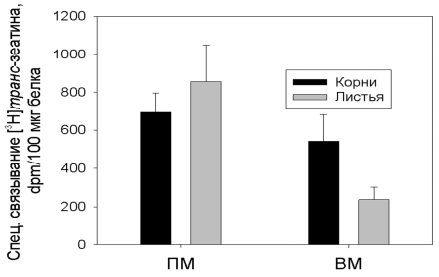


Рис.2. Уровень удельного специфического связывания [^{3}H]*транс*-зеатина с мембранами из корней и листьев кукурузы.
ПМ –плазмалемма,
ВМ –внутренние мембраны.

Для оценки лигандной специфичности связывания проводили опыты по вытеснению меченого [^{3}H]*транс*-зеатина, используя в качестве конкурентов *транс*-зеатин и 6-бензиладенин (BA). Указанные соединения были выбраны в связи с тем, что относительно сродство к

ним у рецепторов ZmHK1 и ZmHK2, по данным наших опытов (табл.1), резко различается. У рецептора ZmHK1 сродство к BA существенно выше, чем к *t*Z, тогда как для рецептора ZmHK2 соотношение противоположное. Кроме того, было известно, что экспрессия ZmHK2 в листьях существенно выше, чем ZmHK1. При этом в корнях эти рецепторы экспрессируются на сходном уровне [1].

Результаты наших конкурентных опытов показаны на рис.3. Очевидно, что относительное связывание BA с мембранными фракциями листьев слабее, чем с фракциями корней, как в случае внутренних мембран, так и особенно в случае плазмалеммы.

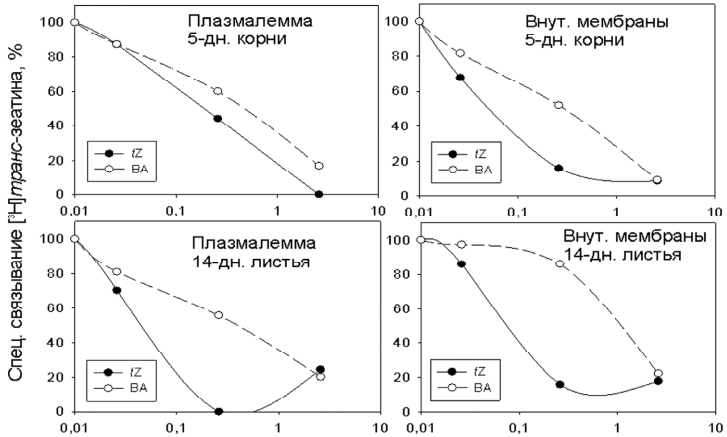


Рис.3. Конкуренция цитокининов *t*Z и BA с [^{3}H]*транс*-зеатином за связывание со специфическими сайтами мембранных фракций из корней и листьев кукурузы.

Обсуждение. Проведенный нами количественный анализ отчетливо демонстрирует различия в лигандной специфичности основных цитокининовых рецепторов кукурузы: ZmHK1, ZmHK2 и ZmHK3. В этом отношении рецепторный аппарат кукурузы сходен с аппаратом рецепции цитокининов у арабидопсиса [5]. Однако параллелизм систем восприятия цитокининового сигнала заметен и на более детальном уровне, хотя кукуруза (однодольное растение) и арабидопсис (двудольное растение) таксономически очень далеки. Аналогом «листового» рецептора арабидопсиса AHK3 является у кукурузы рецептор ZmHK2. В обоих случаях «листовые» рецепторы имеют сильное сродство к *транс*-зеатину, но относительно слабое – к изопентениладенину. Напротив, оба «корневых» рецептора арабидопсиса (CRE1/AHK4) и кукурузы (ZmHK1) имеют сильное сродство к изопентениладенину, причем у рецепторов кукурузы это сродство выше, чем сродство к *транс*-зеатину.

Также неоднородной оказалась и субклеточная локализация рецепторов. Данные по связыванию цитокининов с фракциями мембран (рис.2,3) указывали на различную локализацию рецепторов ZmHK1- и ZmHK2 (ZmHK1b-)-типов. «Листовые» рецепторы имели тенденцию концентрироваться на плазмалемме, тогда как «корневые» - распределялись между плазмалеммой и внутренними мембранами клетки. Предварительный вестерн-блоттинг с использованием антител против ZmHK1/ZmHK1a подтвердил присутствие значительной части рецепторов внутри клетки.

Ранее для арабидопсиса была предложена модель сигнальной коммуникации между корнем и побегом с участием цитокининов, в рамках которой находили объяснение специфические различия лигандной специфичности между «корневым» и «листовым» рецепторами [5,6]. Модель строилась на основе известных данных о том, что корни производят *транс*-зеатин, который по ксилеме поступает в листья, тогда как в самих листьях образуется изопентениладенин, который переносится во все органы по флоэме. Приведённые характеристики цитокининовых рецепторов кукурузы согласуются с предложенной моделью и указывают на особую роль рецепторов цитокининов в сигнальном взаимодействии между корнем и побегом растения.

Работа поддержана РФФИ №07-04-00331, №08-04-90429-Укр, Программой Президиума РАН по МКБ, а также НШ-3444.2008.4

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yonekura-Sakakibara K. et al.* //Plant Physiol. (2004) 134: 1654-61;
2. *Romanov G.A. et al.* //Analyt. Biochem. (2005) 347: 129-34;
3. *Romanov G.A., Lomin S.N.* //Pl. Horm: Meth. Prot. (2009) 495: 111-20;
4. *Романов Г.А., Ломин С.Н.* //см. в этом сборнике (2009) 2: 733-8;
5. *Romanov G.A., Lomin S.N., Schmülling T.* //J. Exp. Bot. (2006) 57: 4051-8;
6. *Романов Г.А.* // Физиол. Раст. (2009) 56(2): 295-319.

ИНДУКЦИЯ ЭНДОГЕННОГО РАЗОБЩЕНИЯ В ХЛОРОПЛАСТАХ: СИНЕРГИЗМ ДЕЙСТВИЯ АММОНИЙНЫХ КАТИОНОВ И СЖК

Опанасенко В.К., Васюхина Л.А.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино

Введение. Действие субстратов и продуктов клеточного метаболизма на энергетику хлоропластов обычно исследуется индивидуально, в то время как в цитоплазме живой клетки эти вещества циркулируют одновременно. К таким метаболитам, в частности, относятся аммоний и свободные жирные кислоты. Содержание этих веществ в нативной клетке колеблется в зависимости от многих факторов. Аммоний поглощается из внешней среды и образуется из нитратов, он расходуется для синтеза аминокислот и азотистых оснований. Жирные кислоты продуцируются и катаболизируются при синтезе и гидролизе липидов в клетке, их количество и состав зависят от условий выращивания и возраста растений.

На хлоропластах высших растений довольно подробно исследовано влияние аммония и свободных жирных кислот на перенос электронов и синтез АТР, однако совместное действие этих метаболитов впервые было исследовано лишь недавно [1]. Нами было показано, что на хлоропластах гороха наблюдается синергизм в действии пальмитиновой кислоты и аммония. В присутствии низких концентраций пальмитата и аммония происходит неаддитивное увеличение трансмембранной утечки ионов водорода (аммония) - ингибируется синтез АТР, стимулируется базальный перенос электронов, снижается ΔH - светоиндуцированное поглощение ионов водорода.

В настоящей работе показано, что стимулятором аммонийного разобщения, более эффективным, чем пальмитат (16:0), является стеариновая кислота (18:0). Миристиновая кислота, имеющая более короткую углеводородную цепь (14:0), оказалась гораздо менее эффективной, чем пальмитат и стеарат. Синергизм в разобщении с СЖК показан нами и для других проникающих аминов – триметиламина и имидазола, но он не был найден при совместном действии СЖК и амфифильных аминов – тетракаина, дибукаина и 9-аминоакридина.

Предполагается, что благодаря синергизму действия аммония и СЖК может осуществляться эндогенная регуляция сопряжения процессов трансформации энергии в тилакоидах хлоропластов. На основании данных о синергизме действия имидазола и СЖК можно предположить и возможность гормональной регуляции энергетического сопряжения в нативной растительной клетке эндогенными аминами.

Материалы и методы. Хлоропласты класса С после выделения промывали в растворе, содержавшем 0,5мг/мл БСА, 0,2М сахарозу, 10мМ Tricine-KOH (pH 7,8), 10мМ NaCl и 5мМ $MgCl_2$, при температуре 4^{o}C, ресуспендировали и хранили в той же среде при концентрации хлорофилла 2-3мг/мл. Концентрацию хлорофилла определяли по методу Арнона.

В экспериментах использовали реакционные среды без альбумина, термостатированные при 20^{o}C, содержавшие вышеуказанные концентрации солей и сахарозы, хлоропласты (40мкг Хл/мл), акцепторы электронов (0,1мМ метилвиологен или 0,4мМ феррицианид) и различные концентрации буферов. При измерении электронного транспорта использовали 2мМ HEPES+2мМ Tricine (pH 7.8); величину ΔH

определяли в присутствии 0,1мМ HEPES+0,1мМ Tricine (pH 7.8); для измерения синтеза ATP использовали 0,25мМ ADP, 2мМ Pi+2мМ Tricine (pH 7.8). СЖК, растворенные в этаноле, добавляли в реакционную среду сразу после хлоропластов, аммоний и другие амины – через 30с. Хлоропласты освещали красным светом (λ>600нм, 200W/м^2) в течение 1-1,5мин.

Скорость транспорта электронов с метилвиологеном в качестве акцептора измеряли электродом Кларка по поглощению кислорода, с феррицианидом – по выделению кислорода или pH-электродом по закислению реакционной среды.

Светоиндуцированное поглощение ионов водорода (ΔH) и синтез ATP при переносе электронов от воды к метилвиологену регистрировали по защелачиванию реакционной среды. Количество поглощенных ионов водорода определяли титрованием среды известными дозами HCl. Скорость синтеза ATP рассчитывали по известной методике [2]. Разброс данных для всех измерений на хлоропластах одного выделения не превышал 5%.

В работе использовали ADP, ATP, БСА (без жирных кислот) и метилвиологен фирмы Sigma Chemical Co.

Результаты и обсуждения. На рис.1 сопоставлено действие пальмитата (PA) , стеарата (SA) и миристата (MA) на синтез ATP в контрольных опытах (A) и в присутствии аммония (B). На рисунке видно, что аммоний значительно усиливает ингибирование фосфорилирования низкими концентрациями жирных кислот.

На митохондриях пальмитат в отсутствии аммония вызывает, по разным данным, десопряжение или разобщение [3], которое опосредовано ATP/ADP антипортером и специальными разобщающими белками, способными переносить через мембрану анионы жирных кислот [4].

Считается, что на хлоропластах ингибирование фотофосфорилирования в присутствии СЖК тоже связывают с десопряжением, которое может быть обусловлено нарушением латеральных путей переноса ионов водорода от протонных помп к ATP-синтазам по примембранному слою люмена [5]. Однако и на тилакоидных мембранах недавно был найден ATP/ADP антипортер [6].

Если возможен перенос анионов СЖК с помощью антипортера или разобщающих белков, то в условиях базального переноса электронов СЖК должны стимулировать скорость электронного транспорта. Однако измерения базального транспорта в условиях наших экспериментов показали, что в отсутствии аммония СЖК не вызывают заметной симуляции переноса электронов (рис.2), т.е. не индуцируют трансмембранной утечки ионов водорода из люмена.

В присутствии низких концентраций аммония без СЖК происходит слабое разобщение, которое резко усиливается при добавлении в реакционную среду СЖК.

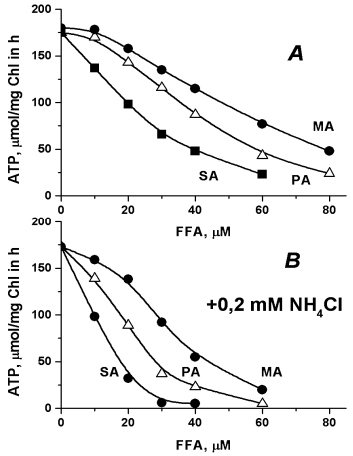


Рис.1 Ингибирование синтеза ATP жирными кислотами в отсутствии (A) и в присутствии аммония (B) при переносе электронов от воды к метилвиологену.

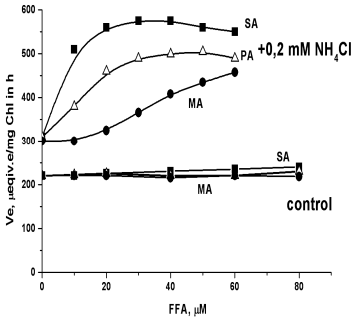


Рис.2. Влияние СЖК на скорость базального переноса электронов в отсутствии и в присутствии аммония.

Следовательно, лишь совместное действие аммония и СЖК обеспечивают утечку H^+ (или аммония) через тилакоидную мембрану.

Мы обнаружили, что наблюдается синергизм в действии СЖК и других проникающих аминов, в частности, имидазола. Имидазол имеет pK=6.8-6.9, поэтому концентрация его катионов в реакционной среде с pH 7.8 составляет около 10% от общей концентрации амина. При том же значении pH аммоний составляет более 90% от общей концентрации амина, поэтому практически весь NH_4Cl, добавленный в реакционную среду, сохраняет катионную форму. Имидазол как разобщитель гораздо слабее аммония, что свидетельствует о том, что именно катионы аминов индуцируют разобщение.

На рис.3 показано действие имидазола на синтез ATP (*A*) и скорость базального переноса электронов от воды к феррицианиду *(B*) в зависимости от присутствия пальмитиновой кислоты. Как видно на рисунке, для индукции небольшой стимуляции электронного транспорта требуются в 10 раз большие концентрации имидазола, чем аммония, но в этих «слабо разобщающих» концентрациях оба амина обычно симулируют синтез ATP в отсутствии СЖК, но всегда ингибируют фосфорилирование в присутствии жирных кислот.

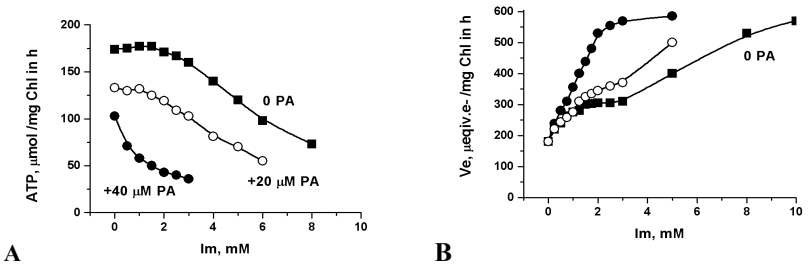


Рис.3. Действие имидазола и РА на синтез АТР (А) и перенос электронов (В).

На графиках зависимости функций от концентрации имидазола хорошо заметны 2 ступени разобщения, индуцируемого амином. Первая ступень расположена в области низких (<2мМ) концентраций, вторая – в области высоких. На рис.3В эти ступени показаны на примере стимуляции имидазолом базального переноса электронов. Как видно на рисунке, увеличение концентрации пальмитиновой кислоты сдвигает вторую ступень в область первой, так что сильная стимуляция электронного транспорта и практически полное ингибирование синтеза АТР наблюдаются при низких концентрациях амина.

Совмещение обеих ступеней разобщения в области низких концентраций амина, сопровождающееся резким снижением ΔpH - сильным ускорением переноса электронов и спадом ΔH, наблюдается и после обработки мембран DCCD при соотношении DCCD/хлорофилл=2 причем как для аммония, так и для имидазола. В отсутствии аминов такая обработка снижает H-проводимость мембран. Это дает основания полагать, что первая ступень разобщения (в области низких концентраций аминов) соответствует активации аминами белковой системы, способной транспортировать протоны по градиенту их концентрации. Возможно, ионные пары, СЖК+катионы аминов, связываются с белками и тем самым увеличивают эффективность функционирования этой системы. Вторая ступень – это классическое аммонийное разобщение высокими концентрациями амина, связанное с растяжением мембран под действием осмотического градиента - при концентрации катионов амина в реакционной среде выше 1мМ осмотическое давление в люменах превышает 200мОсм, т.к. концентрации аммонийных катионов и компенсирующих их заряд ионов хлора будут выше 100мМ. Эта ступень стимулируется более низкими концентрациями СЖК, чем первая.

Стимуляция разобщения может быть связана с увеличением проводимости липидного бислоя за счет образования мембранных пор, появление которых при растяжении мембран было зарегистрировано с помощью патч-кламп метода [7]. Поры проницаемы для небольших катионов – аммония, имидазола, триметиламина, но не для

9-аминоакридина и локальных анестетиков, дибукаина и тетракаина, которые в концентрациях 20-40мкМ ингибируют синтез АТР, но не стимулируют базальный перенос электронов ни в отсутствии, ни в присутствии СЖК.

Мы предполагаем, что наличие синергизма в действии имидазола и СЖК указывает на возможность регуляции процессов сопряжения с помощью эндогенных аминов типа гистамина, который по размеру мало отличается от имидазола. Эндогенные амины пока не найдены в хлоропластах, возможно потому, что их трудно обнаружить в препаратах, т.к. их нейтральные формы проникают сквозь клеточные мембраны и легко теряются при выделении органелл.

Следует отметить, что синергизм в действии аммония и СЖК наблюдается в области концентраций аммония 0.1-0.4мМ, характерных для живой растительной клетки. Эти концентрации стимулируют синтез АТР при заботе полной ЭТЦ, но индуцируют утечку протонов из люмена, особенно в присутствии СЖК, предотвращая набухание и деформацию тилакоидов при избыточном закислении люменов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Опанасенко В.К., Васюхина Л.А.* //Биохимия (2009) 74(6);
2. *Nishimura M., Ito T., Chance B.* //BBA (1962) 59: 177-82;
3. *Rottenberg H.* //BBA (1990) 1018: 1-17;
4. *Skulachev V.P.* //BBA (1998) 1363: 100-124;
5. *Pick U., Weiss M., Rottenberg H.* //Biochemistry (1987) 26: 8295-302;
6. *Thuswaldner S. et al.* //J. Biol. Chem. (2007) 282: 8848-59;
7. *Hinnah. S.C., Wagner. R.* //Eur. J. Biochem. (1998) 253: 606-13.

ВОЗМОЖНО ЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛАТ-ЗАВИСИМОЙ И ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ РАСТЕНИЙ

Прудников Г.А.[1], Красавина М.С.[1], Паничкин Л.А.[2], Бурмистрова Н.А.[1]

[1]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва
[2]Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева

Введение. Салициловая кислота (СК) – ключевой эндогенный сигнал, вовлеченный в регуляцию многих внутриклеточных процессов – транспорта веществ, роста, органогенеза, цветения, термогенеза, дыхания, ответных реакций на внешние стимулы. Ранние этапы трансдукции разных сигналов имеют общие черты. Они включают

активность плазматических мембран, в том числе изменение ионных потоков, трансмембранной разности потенциалов, активности мембранных и апопластных ферментов, образование активных форм кислорода. Индуцированная в результате этих изменений сложная цепь вторичных мессенжеров влияет на активность многих генов, что вызывает специфические физиологические ответы [1].

Одним из первых ответов клетки на присутствие салициловой кислоты также являются изменения функционирования мембран. Показано, что при этом активируется вход в клетки H^+ и Ca^{2+} и выход K^+, что должно приводить к изменениям электрического потенциала на мембране [2]. Этот процесс изучен крайне слабо, лишь на корнях некоторых растений обнаружена деполяризация плазмалеммы в присутствии СК [3]. Между тем, снижение мембранного потенциала под влиянием СК может приводить к генерации импульсной электрической активности на мембране – медленной волны изменения электрических потенциалов (SWP) и потенциала действия. Такая возможность не изучалась.

К электрическим явлениям на клеточных мембранах в последнее время привлекается все большее внимание исследователей, поскольку постепенно складывается представление о существовании независимой электрической сигнальной системы растения [4]. Появляются данные об участии этой системы не только в ответных реакциях на внешние сигналы, но и в регуляции метаболических процессов в клетках. Однако роль биоэлектрической реакции растений изучена крайне слабо и совсем нет данных о ее возможной связи с другими системами клетки. Первым подходом к выявлению такой связи может быть изучение зависимости биоэлектрических реакций от компонентов других сигнальных систем. В нашей работе мы изучали влияние СК на генерацию местной электрической реакции в листе огурца (*Cucumis sativus* L.). В качестве внешнего стимула использовали локальное охлаждение нижней поверхности листовой пластинки (диаметр охлаждающего зонда 5мМ) с помощью охлаждающего столика ТОС-1. Такое воздействие не повреждало ткани и было полностью обратимым. Регистрирующий хлорсеребряный электрод ЭВЛ-1М1 (Белоруссия) подводили к верхней поверхности охлаждаемого участка, референтный электрод помещали в окружающий корень растения раствор. Разность потенциалов регистрировали с помощью установки pH-METR 5170 (Венгрия) и записывали на 2-х-координатном милливольтметре Н307/1 (Россия).

Результаты. Снижение температуры участка листа, происходившее со скоростью 8^{o}/мин, приводило не только к уменьшению электрического потенциала листа по отношению к окружающему корень раствору, но и вызывало импульсную активность (рис.1, стрелки показывают момент начала и окончания охлаждения). Прекращение охлаждения постепенно возвращало разность потенциалов

к исходной величине. Несмотря на сходство параметров регистрируемой биоэлектрической реакции (БЭР) с потенциалом действия растений, регистрируемые при охлаждении импульсы не распространялись и регистрировались лишь в охлаждаемом участке.

Поскольку местная электрическая реакция, подобная регистрируемой в наших экспериментах, редко обнаруживалась в других работах и не была охарактеризована, прежде всего мы пытались с помощью ингибиторного анализа выявить участвующие в ней процессы. Для этого перед подведением измерительного электрода исследуемый участок листа в течение часа предобрабатывали ингибиторами. Обнаруженное в экспериментах изменение параметров электрической реакции под влиянием ингибиторов Ca^{2+}-каналов гадолиния и верапамила предполагает ее зависимость от механочувствительных и потенциалзависимых Ca^{2+}-каналов (рис.1). Действие ингибиторов неоднозначно – при меньших концентрациях электрическая активность повышалась, а при более высоких – тормозилась (показано на примере гадолиния). Характерно, что гадолиний заметно замедлял начальную фазу электрического ответа (деполяризацию), что свидетельствует об участии механочувствительных каналов в ее формировании.

Ингибиторы анионных (SITS) и калиевых (тетраэтиламмоний) каналов также влияли на биоэлектрическую активность (рис.1). Причем, тетраэтиламмоний тормозил фазу реполяризации, определяемую главным образом выходом калия из клеток. Таким образом, генерация местной электрической реакции сопряжена с трансмембранными потоками кальция, анионов и калия.

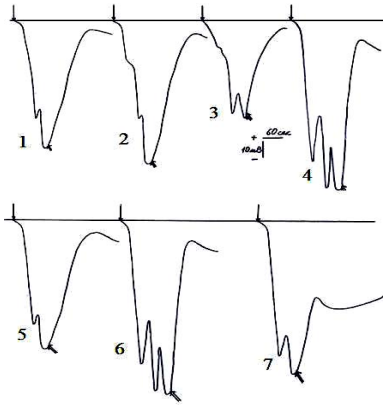


Рис.1. Влияние ингибиторов ионных каналов на форму БЭР.
1 -контроль, 2 –Gd^{3+} 1мМ, 3 –Gd^{3+} 10мМ, 4 –верапамил 1мМ, 5 –контроль, 6 –SITS 10мМ,
7 –тетраэтиламмоний 10мМ.

Использование специфичного ингибитора протонного насоса на плазмалемме – ортованадата – позволило заключить об участии H^+-АТ и, по крайней мере для импульсов

Рис.2. Влияние ортованадата на биоэлектрическую реакцию.
1 – контроль, 2 – ортованадат, 1мМ

«перегиб» на этой стадии полностью исключался в присутствии ортованадата, что предполагает его связь с активностью протонного насоса.

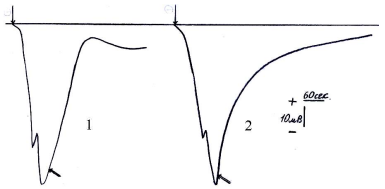


Рис.2. Влияние ортованадата на биоэлектрическую реакцию. 1–контроль, 2–ортованадат 1мМ.

Форма биоэлектрической реакции изменялась в присутствии СК (рис.3). Более низкие концентрации повышали электрическую активность, что выражалось в увеличении амплитуды реакции и увеличении скорости деполяризации (возможно, в результате происходящей на этой стадии активации выхода анионов). Под влиянием высоких концентраций СК генерация электрических импульсов тормозилась. Поскольку неактивный аналог СК – 4-оксибензойная кислота – и другая слабая кислота – ацетат – не влияли на форму импульсов, можно полагать, что действие СК специфично (рис.3).

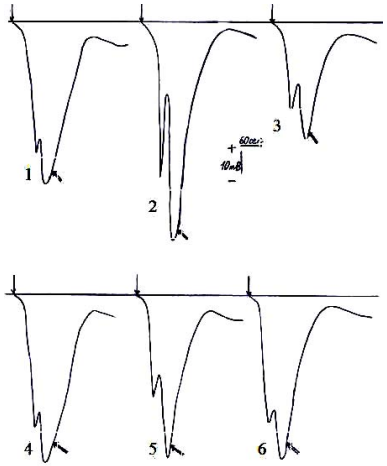


Рис.3. Влияние СК на БЭР
1 –контроль, 2 –СК 0,1мМ,
3 –СК 10мМ, 4 –контроль,
5 –4-оксибензойная кислота 0,1мМ,
6 –ацетат натрия 0,1мМ.

Обсуждение. Природа местных нераспространяющихся изменений биопотенциалов под влиянием внешних стимулов не расшифрована. В работе Krol с соавт. [5] приведена похожая на полученную в наших опытах импульсная электрическая активность, также не распространявшаяся от места раздражения. Однако в отличие от наших данных эта активность не зависела от блокаторов анионных и калиевых каналов. Только блокаторы трансмембранных потоков кальция

подавляли электрическую активность. В то же время представленные в нашей работе данные предполагают участие в генерации электрической реакции потоков как кальция, так и анионов, калия и протона. По-видимому, локальные изменения биопотенциалов ткани имеют разную природу и необходимо исследовать ее в каждом конкретном случае.

Имеются данные о том, что на транспорт этих ионов влияет СК [2] и что изменение ионных потоков на мембране предваряет генерацию электрических импульсов [6]. Поэтому первый пункт взаимодействия СК с системой генерации электрических импульсов локализован, по-видимому, на плазматической мембране. Повышение содержания в цитоплазме кальция и протона может запускать целый каскад процессов, локализованных на плазмалемме и внутри клеток – образование АФК, активацию НАДН- и НАДФН-оксидаз, пентозофосфатного пути, МАРК и т.д. [7-9]. В конечном счете формируется устойчивость клеток.

Хорошо известна роль СК в устойчивости к биотическим и абиотическим неблагоприятным факторам среды [10,11]. В предварительных опытах мы показали, что характер электрической реакции зависит от степени устойчивости растений и что изменения параметров БЭР в присутствии СК характерны для более устойчивых растений [12].

В настоящее время лишь отдельные факты позволяют предполагать возможность взаимодействия салицилат-зависимой и электрической сигнальных систем. Наша работа представляет лишь первый шаг в ее изучении. Однако влияние компонентов этих систем на одни и те же ионные потоки предполагает возможность такого взаимодействия уже на плазматической мембране. Кроме того, СК влияет на метаболические процессы, протекающие в плазмалемме, в частности, на синтез каллозы [13], что может затруднять восприятие и проведение электрических сигналов. Наконец, и СК, и биопотенциалы влияют на экспрессию ядерных генов, правда, пока идентифицированы только гены ингибиторов протеиназ [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hayat S. et al.* //Salicylic Acid: Plant Hormone. Springer (2007);
2. *Krasavina M.S.* //Salicylic Acid: Plant Hormone. Springer (2007): 25-68;
3. *Glass A.D.M.* //Plant Physiol. (1974) 54: 855-8;
4. *Baluska F. et al.* //Communication Plants. Springer (2006);
5. *Krol E., Dziubinska H., Trebacz K.* //Physiol. Plant. (2004) 120: 265-70;
6. *Zimmermann M.R., Felle H.H.* //Planta. (2009) 229: 539-47;
7. *Dahan J. et al.* //Biochem. J. (2009) 418: 191-200;
8. *Zhang X., Mou Z.* //Plant J. (2009) 57: 302-12;
9. *Lebrun-Garcia A. et al.* //Biochimie. (1999) 81: 663-8;

10. *Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л.* //Прикл. Биохим. Микробиол. (2007) 43: 405-11;
11. *Yuan S., Lin H.H.* //Z. Naturforsch. (2008) 63: 313-20;
12. *Красавина М.С., Прудников Г.А., Паничкин Л.А.* //Сборник трудов конф. «Агротехнологии XX1 века». М. (2007): 58-61;
13. *Серова В.В., Ралдугина Г.Н., Красавина М.С.* //ДАН (2006) 406: 705-8;
14. *Herde O. et al.* //Plant Physiol. (1999) 119: 213-8.

АЦЕТИЛХОЛИН И БИОГЕННЫЕ АМИНЫ В НЕСИНАПТИЧЕСКИХ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Рощина В.В.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Агентами раздражимости являются ацетилхолин и биогенные амины, медиаторы, передатчики информации между клетками многоклеточного организма. Основные исследования этих соединений, названных нейротрансмиттерами, проводились на организмах, обладающих нервной системой. Однако оказалось, что эти вещества выполняют не только медиаторную, но и другие функции. Например, установлена их роль как модуляторов внутриклеточного метаболизма, а в ряде случаев и гормонов, регуляторов роста и морфогенеза в ненервных тканях и в донервный период развития организмов [1,2], а также у растений [3,4] и микроорганизмов [5-7]. В связи с этим был даже применен термин «биомедиаторы» [3], подчеркивающий общебиологическое значение данных веществ. Особый случай сигнализации связан с микроорганизмами, которые, поселяясь внутри одноклеточного или многоклеточного организма, также выделяют нейротрансмиттеры [5,7]. Более того, нейромедиаторы клетки-хозяина взаимодействуют с локальной симбиотической или паразитической микробиотой. Настоящее сообщение представляет собой попытку обозначить новые тенденции в исследовании хемосигнальной роли этих соединений в несинаптических системах. Основное внимание в статье уделено растениям, поскольку в последнее время именно на этих объектах получены новые сведения.

Чувствительные к нейротрансмиттерам реакции организмов. Сравнение ответов на нейротрансмиттеры у клеток организмов из разных царств (рис.1) показывает общие реакции на рост и развитие. У микроорганизмов основные реакции связаны со стимуляцией (редко с ингибированием) нейротрансмиттерами роста бактериальных культур, агрегации клеток и образованием колоний [5-7]. И у растений основная ответная реакции – изменение ростовых процессов. Аналогичная картина

и для реакций животных, напрямую, не связанных с нейротрансмиссией, таких как эмбриональное развитие [1,2]. Таким образом, мы видим сходство в несинаптических системах именно ростовых реакций любых организмов на нейротрансмиттеры. Следует отметить, что на клеточном уровне в качестве быстрых чувствительных реакций рассматривают изменения флуоресценции, ионной проницаемости и подвижности. Некоторые из них рассмотрены ниже.



Рис.1. Чувствительные к нейротрансмиттерам реакции организмов.

Секреция нейротрансмиттеров и реакции на секрет. Важным направлением изучения нейротрансмиттеров в несинаптических системах в данный момент времени является исследование механизмов их секреции во внутриклеточную или наружную среду, а также секреции ферментов их синтеза и метаболизма. Секреция – первый этап в хемосигнализации, особенно важный в межклеточных взаимодействиях. Внешние факторы, например, ионы кальция, стимулируют выделение ацетилхолина из секреторных пузырьков клеток, особенно при стрессе. В последние годы исследования секреции проведены на генеративных органах, обогащенных ацетилхолином и биогенными аминами [1-5]. Особое внимание уделено исследованию фермента холинэстеразы, маркеру присутствия ацетилхолина в клетке [1-4]. С помощью специальных красителей удалось показать присутствие холинэстеразы в самых разнообразных клетках растений (пищеварительные железистые волоски насекомоядного растения дрозеры, выделения поверхности генеративных органов пестика и пыльцы при оплодотворении, в клетках корней и корневой слизи и др.) и выделение этого фермента наружу [3,4]. Роль холинэстеразы весьма важна для всех типов организмов. Ее отсутствие или угнетение активности в пыльце коррелирует с самонесовместимостью у растений [4].

Секреция биогенных аминов наблюдается у корней наземных растений и всей поверхностью водных растений. Показано, например, что выделение дофамина водорослью *Ulvaria obscura* составляет до 4%

веса и служит механизмом не только хемокоммуникации, но и защиты от поедания морскими обитателями [8]. К секреции биогенных аминов в водную среду одних организмов, другие организмы весьма чувствительны. Быстрым ответом на их воздействие является флуоресценция разных частей растений [9]. Например, таллом водоросли хары и листья водного высшего растения ряски *Lemna* реагируют в зависимости от добавленного медиатора изменением интенсивности флуоресценции хлорофилла при 640-680нм (рис.2). У хары эта эмиссия стимулируется только дофамином и серотонином в концентрациях 10^{-6}–10^{-5}М, тогда как у листьев ряски – дофамином и гистамином в концентрациях 10^{-5}М и 10^{-6}–10^{-5}М (при этом эмиссия ее корневой меристемы ингибировалась на 70% 10^{-3}М дофамином, и в меньшей мере – 10^{-3}М серотонином).

Рецепция. Для исследования рецепции клеток несинаптических систем в последние годы применяют флуоресцирующие агонисты и антагонисты нейротрансмиттеров, а также искусственные флуоресцентные маркеры [9]. С их помощью показана локализация рецепторов на поверхности клеток пыльцы различных растений, микроспор хвоща полевого, клеток устьиц конских бобов, бластомеров зародышей мыши и зародышей морских ежей.

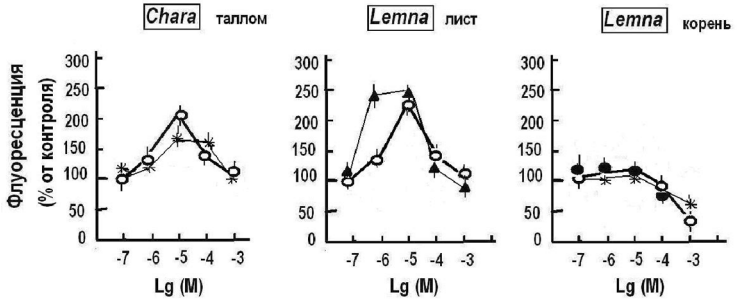


Рис.2. Концентрационные кривые действия биогенных аминов на интенсивность флуоресценции при 640-680нм таллома водоросли хары *Chara carolina*, листа и корня водного высшего растения ряски *Lemna minor*. о-о -дофамин, ●-● -норадреналин, *-* -серотонин, ♠-♠ -гистамин. Отсутствующие на графике данные для некоторых биогенных аминов и адреналина означают отсутствие достоверного эффекта по сравнению с контролем.

На рис.3 А и Б приведены примеры зеленого свечения d-тубокурарина, и Bodipy FL- ABT [10], флуоресцирующих антагонистов ацетилхолина на поверхности растительных клеток, где располагается рецептор. Другой подход к изучению рецепторных механизмов состоит в использовании чувствительной реакции на нейротрансмиттер или его антагонист, например – оплодотворение у гиппеаструма и поглощение воды спорами хвоща, как показано на рис.3 В и Г. В первом случае после

2-минутной обработки рыльца пестика антагонистом ацетилхолина тубокурарином или антагонистом норадреналина иохимбином перед опылением происходит нарушение образования нормальных плодов. Во втором – блокада натриевых или калиевых ионных каналов антагонистами холинорецепторов бунгаротоксином (10^{-7}М) или тетраэтиламмонием (10^{-4}М), а также блокада кальциевых каналов верапамилом (10^{-5}М) приводит к значительному снижению поглощения воды (соответственно на 90, 66 и 80% от контроля), от которого зависит прорастание спор хвоща.

Внутриклеточная сигнализация. Исследования внутриклеточной сигнализации (после получения хемосигнала от того или иного нейротрансмиттера) с участием систем внутриклеточных посредников и нейротрансмиттеров в последние годы концентрировались на анализе концентрации кальция как вторичного посредника под действием ацетилхолина [10] и связи ионных каналов с сократительными белками как проводниками внутриклеточного сигнала [11-13]. Так ацетилхолин значительно увеличивает содержание внутриклеточного кальция устьиц при обработке клеток листьев бобов ацетилхолином [14]. Получены данные об участии цитоскелета в развитии клеток и показано влияние антиконтрактильных агентов на развитие растительных микроспор [11-13].

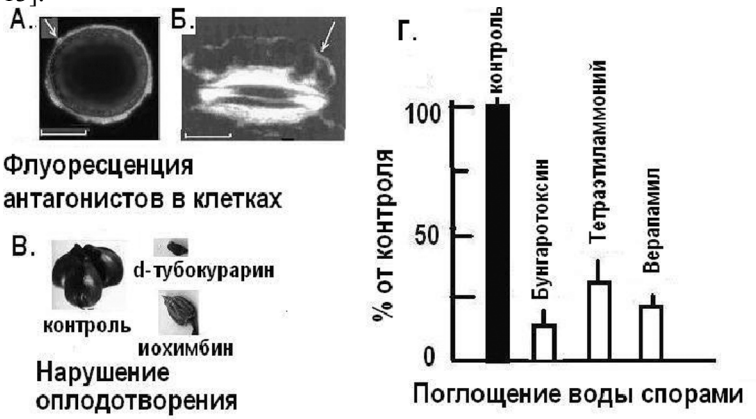


Рис.3. Действие антагонистов нейротрансмиттеров на растительные клетки. А и Б -Флуоресценция (под лазерным сканирующим конфокальным микроскопом при возбуждении лазером с длиной волны 488нм, бар=5мкм) 10^{-5}М d-тубокурарина и Bodipy FL-ABT при связывании соответственно с клетками вегетативных микроспор хвоща полевого *Equisetum arvense* и устьиц конских бобов *Vicia faba*. В –Блокада оплодотворения и последующего образования семян у гиппеаструма *Hippeastrum hybridum* после обработки пестика перед опылением антагонистами ацетилхолина и норадреналина, Г -поглощение воды сухими спорами (2мг в 5мл) хвоща *Equisetum arvense* в присутствии антагонистов ацетилхолина – блокаторов ионных каналов.

Так цитохалазин В, блокирующий полимеризацию актина в актомиозиновых филаментах и агенты, препятствующие полимеризации тубулина в микротрубочках, такие как колхицин и винбластин, в разной степени, но тоже ингибировали прорастание микроспор. Актин восстанавливал проводимость блокированных K^+- и Na^+-каналов. Был сделан вывод о связи работы этих ионных каналов с сократительным белком [13]. Актин пыльцы, вероятно, связан с кальциевыми каналами, а тубулин вегетативных микроспор – с Na^+/K^+-каналами. Какие-то домены контрактильных белков могут быть включены в кластеры ионных каналов. Нейротрансмиттер сигнализирует, связываясь с рецептором, что ведет к изменению конформации субъединиц ионного канала, который быстро передает информацию через протеиновый цитоскелет (через образование механических или электрических волн) к ядру. Клетка отвечает делением ядра, а затем ростом пыльцевой трубки (для пыльцы) или делением клетки, одна из новых клеток образует ризоид в вегетативных микроспорах. Таким образом, наряду с существованием двух известных путей передачи информации (с участием вторичных месседжеров или путем открывания потенциал-зависимых ионных каналов с образованием потенциала действия) возможно существует и третий путь с участием цитоскелета.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бузников Г.А.* //Нейротрансмит. Эмбриог. М. (1987);
2. *Бузников Г.А.* //Онтогенез (2007) 38(2): 262-70;
3. *Рощина В.В.* //Биомедиат. Раст. Ацетилхол. Биоген. Амины (1991) Пущино;
4. *Roshchina V.V.* //Neurotransmit. Plant Life. Enfield, Plymouth (2001);
5. *Олескин А.В. и др.* //Микробиология (1998) 67(3): 305-12;
6. *Lyte M.* //J. Endocrinol. (1992) 137(2): 343-5;
7. *Анучин А.М. и др.* //Микробиология (2008) 77(6): 758-65;
8. *Van Alstyne K.L. et al.* //Oecologia (2006) 148(3): 304-11;
9. *Roshchina V.V.* //Fluor. World Plant Secret. Cells. Plymouth (2008);
10. *Meng F. et al.* //Chinese Sci. Bulletin (2001) 46(7): 586-9;
11. *Рощина В.В.* //Известия РАН Биол. (2005) 32(3): 281-6;
12. *Рощина В.В.* //Известия РАН Биол. (2006) 33(4): 414-20;
13. *Roshchina V.V., Vikhlyantsev I.M.* //Allelopathy J. (2009) 23(1): 25-36;
14. *Meng F. et al.* //Chinese Sci. Bulletin (2004) 49(5): 471-5.

МИКРОСКОПИЯ ОБЪЕКТОВ – МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ХЕМОСИГНАЛИЗАЦИИ

Рощина В.В., Яшин В.А., Яшина А.В., Гольтяев М.В., Манохина И.А.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

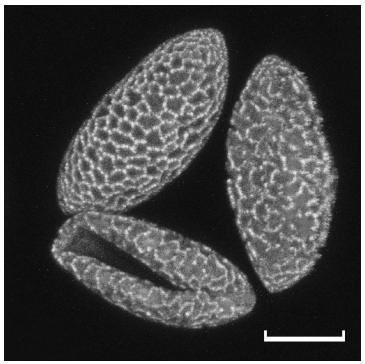
Выбор объектов – модельных систем для анализа хемосигнализации представляет важную методологическую проблему. Среди преимуществ использования секретирующих растительных клеток в качестве моделей для клеточной биологии – их способность ярко флуоресцировать при возбуждении ультрафиолетовым или фиолетовым светом [1,2]. Характер и интенсивность автофлуоресценции клеток заметно изменяются в процессе развития или под воздействием оксидантов, некоторых трансмиттеров, а также различных белков. Эта способность может быть основой для разработки соответствующих тестов и с применением обычной люминесцентной и сканирующей конфокальной микроскопии [3,4]. Целью данной работы было рассмотреть возможности применения различных видов микроскопии в исследованиях секретирующих растительных клеток как моделей для изучения хемосигнальных процессов.

Методы исследования. Объектами исследований были пыльца нескольких видов растений (лилии *Lilium sp.*, ослинника *Oenothera biennis* L., ромашки *Matricaria chamolilla*), апикальная корневая меристема редиса обыкновенного *Raphanus sativus* и меристемы харовой водоросли *Chara carolina* и ряски обыкновенной *Lemna minor*. В работе использовали стереомикроскоп Leica MZ 16A, люминесцентный микроскоп Carl Zeiss A-10 Axio Imager, лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 510 META NLO (Carl Zeiss) и спектральный лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 с соответствующим программным обеспечением для получения и обработки изображений. При работе на конфокальных микроскопах использовали аргоновый лазер (длина волны 488нм) и лазер с длиной волны 405нм. Для измерения интенсивностей флуоресценции объектов в зеленой (максимум 530нм) и красной областях спектра (640-700нм) использовали двухволновой микроспектрофлуориметр MSF-2 [5].

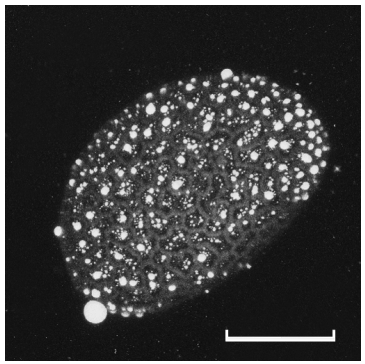
Результаты исследований

Пыльца. Пыльца, контактирующая с рыльцем пестика или чужеродной пыльцой, выделяет секрет, который является аналогом обонятельной слизи и служит для узнавания и сигнализации. Она обладает собственной флуоресценцией, что позволяет без искусственных воздействий наблюдать взаимодействие клеток по изменению световой эмиссии. Изменения флуоресценции являются ответом на воздействие хемосигнальных веществ секрета пыльцы, например ацетилхолина или катехоламинов [3]. Применение сканирующей лазерной конфокальной

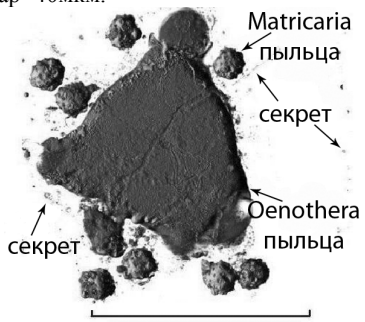
микроскопии и микроспектрофлуориметрии на клетках пыльцевых зерен (рис.1) показывает заметные изменения внешнего вида флуоресцирующей пыльцы и интенсивности ее свечения после смачивания сухой пыльцы и при ее контактах с пестиком или пыльцой другого вида. Так, выделяемый при смачивании водой секрет пыльцы лилии *Lilium sp.* светится зеленым светом на фоне пыльцевого зерна, флуоресцирующего красным светом. При контакте пыльцы ослинника *Oenothera biennis* и ромашки *Matricaria chamomilla* отмечен светящийся красным светом секрет пыльцы ослинника и светящийся зеленым светом секрет пыльцы ромашки. При этом по сравнению с контролем резко возрастает красная флуоресценция пыльцы ромашки.



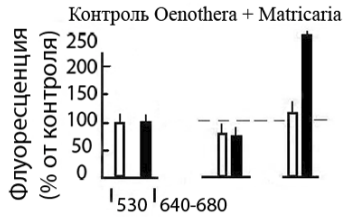
А. Сухая пыльца лилии.
Бар=40мкм.



Б. Пыльца лилии после смачивания.
Бар=40мкм.

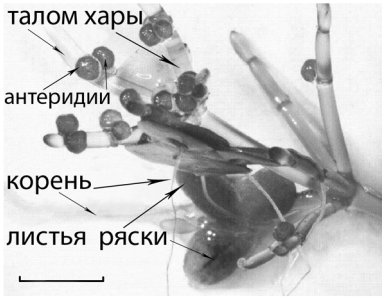


В. Фронтальный вид взаимодействующих пыльцевых зерен ослинника (крупная пыльца) и ромашки (мелкая пыльца).
Бар=100мкм.

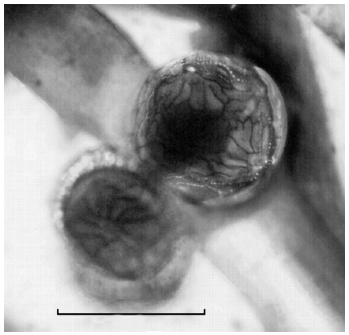


Г. Интенсивность (при 530нм и 640-680нм) флуоресценции пыльцы ослинника и ромашки после смешивания. Возбуждение светом 360-380нм.

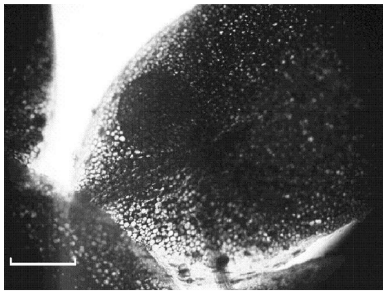
Рис.1. Вид флуоресцирующей пыльцы под конфокальным микроскопом (А, Б, В) и влияние выделений пыльцы на эмиссию контактирующей пыльцы, измеренной на микроспектрофлуориметре (Г).



Вид под стереомикроскопом побегов хары с антеридиями (вверху) и ряски (внизу).
Бар=15мм.



Вид под люминесцентным микроскопом двух антеридиев хары, флуоресцирующих красным цветом.
Бар=4мм.



Вид под люминесцентным микроскопом листовой меристемы ряски, флуоресцирующей зеленоватым светом (светлый участок) на фоне красной флуоресценции хлорофилла листа. Видны отделяющиеся листья нового растения. Бар=200мкм.



Фото апикальной корневой меристемы ряски, флуоресцирующей голубым светом, полученное с помощью конфокального микроскопа.
Бар=250мкм.

Рис.2. Стерео и люминесцентная микроскопия ряски *Lemna minor* и хары *Chara carolina*

Меристематические клетки. Меристемы растений также являются удобными модельными системами при изучении хемосигнализации. Примером могут служить клетки междоузлий хары, листовые (стволовые клетки) и корневые меристемы ряски (рис.2), а также апикальная корневая меристема проростков редиса (рис.3). Междоузлия хары и ее мужские органы размножения антеридии флуоресцируют красным светом за счет присутствия хлорофилла, также

как листья ряски. Корни же ряски флуоресцируют сине-зеленым светом. Растения ряски и хары растут в тесном содружестве, что показывает стереомикроскопия (рис.2А) и контактируют друг с другом, выделяя различные вещества в наружную среду. При этом может наблюдаться изменение их флуоресценции. В качестве сигнализаторов могут служить, например нейротрансмиттерные соединения – биогенные амины (серотонин, гистамин, дофамин), найденные в растениях и микроорганизмах и выделяемые ими в наружную среду. Благодаря таким секретируемым веществам может осуществляться коммуникация различных организмов между собой. Серотонин и гистамин способны вызывать стимуляцию флуоресценции меристем таллома в междоузлиях хары и листьев ряски в красной области (табл.1).

Табл.1. Действие биогенных аминов (10^{-5}М) на интенсивность флуоресценции (% от контроля) при 640-680нм на меристемы таллома хары *Chara carolina* и листа ряски *Lemna minor* по данным микроспектрофлуориметрии.

Вид	Серотонин	Гистамин
Chara carolina	192±20	95±4
Lemna minor	90±10	236±25

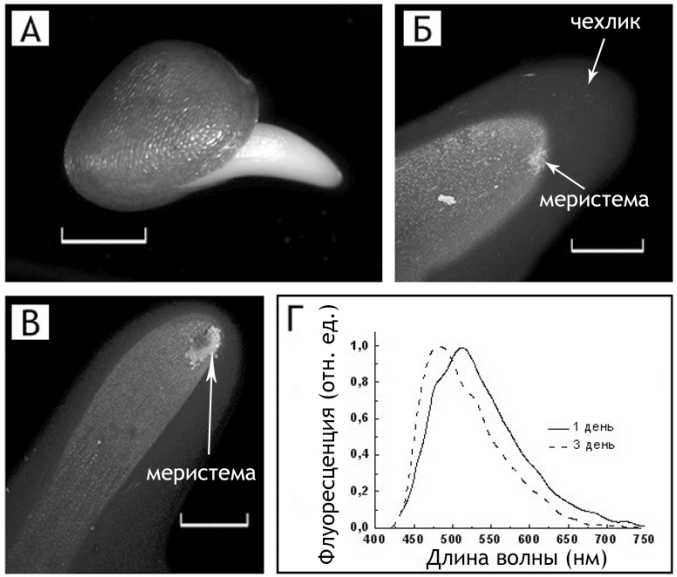


Рис.3. Фото проростка редиса *Raphanus sativus*, полученное с помощью стереомикроскопа (А -1 сутки прорастания, Бар=2мм) и конфокального микроскопа (Б и В, апикальная корневая меристема флуоресцирует в зеленой области спектра спустя 1 сутки или 3 суток прорастания семени, Б -Бар=200мкм, В -Бар=400мкм), а также спектры флуоресценции (Г) той же корневой меристемы, показанной на Б и В.

Табл.2. Флуоресценция с максимумом 530нм (относительных единиц) спустя через 1 час после обработки двухдневных проростков редиса 10^{-3}М дофамином.

Часть проростка	Первичная корневая меристема	Корневой волосок
Контроль	0,11±0,01	0,02±0,03
+ Дофамин	0,.29±0,02	0,23±0,03

Другой объект для изучения хемосигнализации – апикальная корневая меристема проростков редиса, хорошо видимая под стерео – (А) и конфокальным (Б,В) микроскопами (рис.3). Верхушка меристемы светится в зеленой области спектра с разной степенью интенсивности (рис.3 Б и В), и в спектре ее флуоресценции после 1 суток прорастания семени виден максимум 515нм, который смещается в коротковолновую область после 3 суток роста (рис.3Г). Это может быть вызвано изменением состава светящихся компонентов – вначале преобладали флавоноиды, а затем восстановленные пиридиннуклеотиды, такие как НАД(Ф)Н. Клетки проростков редиса чувствительны к нейротрансмиттерам. Нейротрансмиттер дофамин, генератор активных форм кислорода, выделяемый растениями, значительно увеличивает зеленую флуоресценцию корневой меристемы проростков редиса. (табл.2). Реакция протекает в две ступени:

1.быстрая: Дофамин+O_2⇒Дофамин-хинон+($O_2^{\bullet-}$)

2. медленная: Дофамин- хинон+O_2 (+полифенолоксидаза) ⇒⇒ Меланин

В течение 1 часа дофамин быстро окисляется до семихинона, а затем образуется красный пигмент дофаминхром (максимум поглощения 480нм), быстро переходящий в промежуточное соединение с максимумом флуоресценции 530нм (усиление зеленой эмиссии в табл.2). Дальнейшая реакция ведет к появлению черного пигмента меланина (продукт полимеризации дофамин-хинонов).

Микроскопия изученных объектов позволила получить новую информацию о взаимодействии клеток с нейротрансмиттерами, участвующими в хемосигнальных процессах.

Часть работы с апикальной корневой меристемой поддержана РФФИ №07-04-00510.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Roshchina V.V. et al.* //Cell Diagnos. Imag., Biophys. Biochem. Proc. Allelopathy (2007): 93-102;
2. *Roshchina V.V.* //Fluor.World Plant Secret. Cells (2008);
3. *Roshchina V.V., Yashina A.V., Yashin V.A.* //Allelopathy J. (2008) 21(2): 219-26;
4. *Roshchina V.V. et al.* //Allelopathy J. (2009) 23 (1): 3-24;
5. *Карнаухов В.Н. и др.* //Цитология (1987) 29(1):113-9.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ PIP-АКВАПОРИНОВ В СТЕРИН-СОДЕРЖАЩИХ ДОМЕНАХ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Шевырева Т.А., Трофимова М.С., Жесткова И.М.

УРАН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Введение. Жидкостно-мозаичная модель структуры биологических мембран определяет их как высоко динамичные образования. Это подразумевает, что белковый и липидный состав, толщина, текучесть и проводимость мембран неодинаковы в разных ее областях и способны изменяться. Формирование структурно различающихся доменов позволяет координировать и синхронизовать мембранные процессы в пространстве и времени, обеспечивая более эффективные ответы клетки на изменяющиеся условия среды. Известно, что концентрирование некоторых липидов и белков в определенных участках мембраны детерминирует такие этапы везикулярного транспорта как формирование везикул на донорной и их слияние с акцепторной мембраной [1]. Может ли локализация транспортируемых мембранных белков быть факторов, определяющим интенсивность их трафика, неизвестно.

Вместе с тем, везикулярный транспорт может рассматриваться наряду с транскрипцией, трансляцией, пострансляционными модификациями как важный путь регуляции содержания белков-транспортеров в мембранах-мишенях. Так показана решающая роль везикулярного транспорта аквапорина AQP2 млекопитающих для регуляции водной проницаемости апикальных мембран клеток почечных канальцев [2]. Экспериментальных данных, позволяющих рассматривать везикулярный транспорт как способ регуляции содержания аквапоринов в растительных мембранах, пока весьма не достаточно, хотя известно, что активность трафика в растениях очень высока и установлено его участие во многих физиологически значимых процессах клетки.

Ранее нами было показано, что при осмотически индуцируемом экзо- и эндоцитозе в протопластах суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы транспортируемые везикулы слабо обогащены аквапоринами PIP-типа [3]. В чем заключалась причина такого поведения аквапорин-содержащих участков плазмалеммы было неясно. Мы предположили, что PIP-аквапорины содержатся в малоподвижных мембранных доменах плазмалеммы. Поэтому цель настоящей работы заключалась в исследовании возможности локализации аквапоринов PIP-типа в этих мембранных структурах и определении степени их вовлеченности в мембранный трафик, спровоцированный кратковременным осмотическим воздействием.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили клетки суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы

(*Beta vulgaris* L.) из коллекции «Культуры клеток высших растений» Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева (г.Москва), изолированные из них протопласты, а также плазматические мембраны побегов 5-дневных этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L.). Об *интенсивности везикулярного транспорта* в протопластах судили по изменению локализации мембранного материала, окрашенного флуоресцентным маркером эндоцитоза FM 1-43, используя флуоресцентный микроскоп [4]. Параллельно наблюдали за трафиком стерин-обогащенных участков плазмалеммы, используя маркер подобных доменов – филипин. *Плазматические мембраны* получали путем разделения микросомальной фракции в двухфазной полимерной системе (*Larsson et al.*, 1994), *фракции клеточных мембран различной плотности* – разделением микросомальных мембран в ступенчатом сахарозном градиенте путем флотации (*Sazuka et al.*, 1998). *Детергент-устойчивые фракции плазмалеммы* выделяли центрифугированием (100000g, 2ч) после солюбилизации мембран 1%-ными растворами Тритона X-100 или додецилмальтозида 30мин на льду. *Содержание белка* в мембранных препаратах определяли методом Bradford (1976) или с помощью бицинхониновой кислоты (*Smith et al.*, 1985), в качестве стандарта используя БСА. *Денатурирующий электрофорез* мембранных белков проводили в 12.5%-ном ПАА-геле по методу Laemmli (1970). *Вестерн-блот анализ* вели по Towbin et al. (1979) и для определения содержания аквапоринов использовали первичные антитела к PIP-аквапоринам [5].

Результаты и обсуждения. После разделения микросомальных мембран из клеток суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы в ступенчатом сахарозном градиенте были получены 7 фракций, различающихся по содержанию в них сахарозы и белка (табл.1).

Табл.1. Характеристика мембранных фракций разной плотности, полученных флотацией в сахарозном градиенте из микросомальных мембран из суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы.

№ фракции	Содержание сахарозы, %	Содержание белка, мкг/мл	Активность V-АТФазы	Активность P-АТФазы
3	12	80	25	4,2
4	16	200	70	5
5	21	200	20	22,7
6	23	120	10	12,5
7	27	160	5	8,3

Активность АТФаз выражена в нмоль АТФ/мкг белка/мин

Содержание сахарозы во фракциях определяло их плотность, что обеспечивало распределение везикул по размерам и плотности мембран. Денатурирующий электрофорез белков мембранных фракций различной плотности и их вестерн-блот анализ с последующей компьютерной обработкой иммуноблотов показал, что содержание PIP-аквапоринов в различных мембранных фракциях варьировало (рис.1). Так, в

мембранной фракции №3 содержание аквапоринов было выше, чем во фракции №5. При этом фракция №5 характеризовалась максимальной активностью Р-АТФазы, т.е. была обогащена плазматической мембраной и содержала больше белка по сравнению с 3-ей фракцией (табл.1). Это позволяет нам предположить, что аквапорины локализуются в мембранных везикулах сравнительно небольшого размера, а это обеспечивает возможность последним флотировать в менее плотный слой сахарозного градиента. Поскольку при гомогенизации растительной ткани место разрыва мембран и последующее формирование везикул определяется спецификой белкового и липидного состава этих мембран, то высока вероятность, что PIP-аквапорины локализуются в мембранных участках особого состава. Содержание сахарозы во фракции №3 составляло 12%, что, согласно литературным данным [6], соответствует плотности сахарозы, необходимой для выделения так называемых липидных «рафтов».

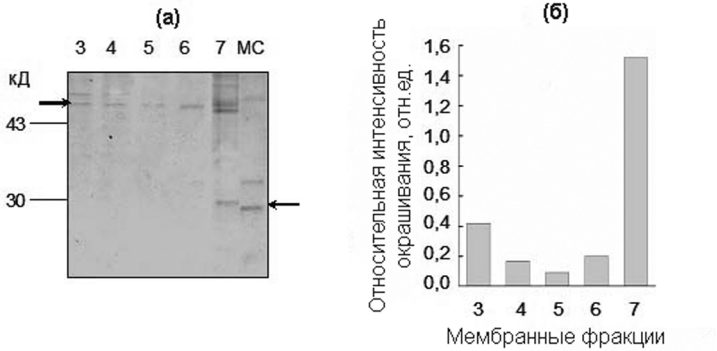


Рис.1. Иммунодетекция аквапоринов PIP-типа (а) и их содержание (б) в мембранных фракциях (3-7) различной плотности и микросомальных мембранах (МС) из клеток суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы. Стрелками указано местоположение полос, соответствующих мономерным (~30кДа) и димерным (~50кДа) формам PIP-аквапоринов.

Липидные «рафты» − это мембранные домены, характеризующиеся особым липидным и белковым составом, а именно: повышенным содержанием стеринов и сфинголипидов, а также белков, задействованных в передаче различного рода сигналов и реализации транспортной функции плазмалеммы. Следствием высокого содержания в этих доменах стеринов является их устойчивость к действию неионного детергента Тритона Х-100 и высокая по сравнению с другими участками мембраны степень упорядоченности липидных молекул. Последнее свойство липидных «рафтов» обеспечивает ограничение конформационной подвижности находящихся в них белков, что может отражаться не только на их функциональной активности, но и на активности их везикулярного транспорта. Основываясь на

вышеизложенных характеристиках этих мембранных доменов, исследована возможность локализации аквапоринов PIP-типа в «рафтах». Для этого было использовано два методических подхода. Первый состоял в анализе распределения PIP-аквапоринов в мембранных фракциях плазмалеммы из этиолированных 7-дневных проростков кукурузы после ее солюбилизации двумя неионными детергентами Тритоном Х-100 и додецилмальтозидом. Второй - в наблюдении за локализацией маркера стеринов – филипина в протопластах суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы.

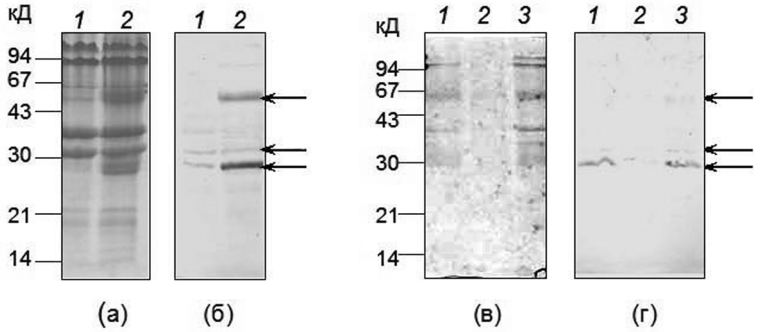


Рис.2. Электрофоретическое разделение (а и в) белков мембранных фракций плазмалеммы этиолированных проростков кукурузы, различающихся по своей устойчивости к действию 1%-ного додецилмальтозида (1) и Тритона Х-100 (2), и иммунодетекция (б и г) в них аквапоринов PIP-типа. Солюбилизированные мембранные препараты переосаждали центрифугированием (100000g). Полученные осадки и супернатант переводили в буфер Laemmli. При проведении электрофореза на дорожки, соответсвующие осадкам (а и б) вносили весь объем полученного раствора (15мкл), а при разделении супернатантов (в и г) - по 6,5мкг белка. В качестве контроля использовали плазмалемму. Стрелками обозначены полосы, соответсвующие аквапоринам.

Используемые детергенты различаются по своему действию на липидные «рафты»: Тритон Х-100 сохраняет их структуру, а додецилмальтозид – разрушает. В наших экспериментах денатурирующий электрофорез солюбилизированных и устойчивых к действию детергентов фракциях плазмалеммы выявил различия в белковом спектре мембран. Кроме того, вестерн-блот анализ показал, Тритон-солюбилизированная фракция менее обогащена PIP-аквапоринами, чем солюбилизированная додецилмальтозидом (рис.2).

Наблюдения за мембранным трафиком в протопластах методом флуоресцентной микроскопии показали, что мембранный материал, меченый по фосфолипидам FM 1-43, подвергался интернализации в гиперосмотических условиях, в то время как в гипоосмотических условиях наблюдалась увеличение площади окрашиваемой этим

красителем поверхности плазмалеммы. В противоположность этому, окрашивание мембран филипином – маркером стеринов показало неравномерность распределения красителя по поверхности протопласта. Кроме того, при гиперосмотическом стрессе происходило сближение маркированных им мембранных структур, а при гипоосмотическом, – наоборот, их разрежение. Это означает, что транспортируемые мембранные участки были обеднены стеринами. Таким образом, характер реакции стерин-обогащенных мембранных доменов на изменение осмотического потенциала среды совпадал с реакцией PIP-аквапорин содержащих участков плазмалеммы. Это свидетельствует об отсутствии активации везикулярного транспорта стеринов и PIP-аквапоринов при кратковременном осмотическом стрессе.

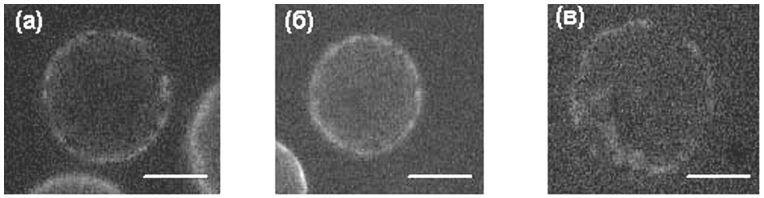


Рис.3. Локализация мембранного материала, обогащенного стеринами, в протопластах в изотонических условиях (0,4М сорбит) (а) и при гипер- (0,6М сорбит) (б) и гипоосмотическом (0,25М сорбит) (в) стрессе. Окрашенные филипином (5мкг/мл) протопласты непосредственно перед микроскопированием на предметном стекле подвергали осмотическому воздействию. Масштабная линейка 12мкм.

Полученные нами результаты позволяют объяснить низкую подвижность PIP-аквапоринов при осмотическом стрессе их локализацией в стерин-обогащенных доменах плазмалеммы и рассматривать включение этих белков в те, или иные мембранные домены, как возможный механизм регуляции их везикулярного транспорта, в том числе индуцированного стрессовым воздействием.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Roth M.G.* //Physiol. Rev. (2004) 84: 699-730;
2. *Noda Y., Sasaki S.* //Biol. Cell (2005) 97: 885-92;
3. *Шевырева Т.А. и др.* //Физиол. Раст. (2007) 54: 356-64;
4. *Bolte S. et al.* //J. Microsc. (2004) 214: 159-73;
5. *Ампилогова Я.Н. и др.* //Физиол. Раст. (2006) 53: 703-10;
6. *Borner G.H.H. et al.* //Plant Physiol. (2005) 137: 104-16.

***

НОВЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ КЛЕТОЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

МЕТОДИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ЛИГАНДОВ NMDA-, AMPA/KA- И GABA-РЕЦЕПТОРОВ С ПОМОЩЬЮ КАЛЬЦИЙ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Бережнов А.В., Кононов А.В., Федотова Е.И., Толмачева А.В., Зинченко В.П.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Введение. Основным возбуждающим нейротрансмиттером в ЦНС является глутамат. Среди рецепторов глутамата различают ионотропные NMDA-, AMPA- и KA-рецепторы, проницаемые для катионов – Ca^{2+}, Na^{+} и K^{+}. γ-аминомасляная кислота (GABA) считается главным тормозным нейротрасмиттером. Рецепторы $GABA_A$ представляют собой хлорные каналы и, при активации, вызывают гиперполяризацию плазматической мембраны. Нарушения в функционировании указанных рецепторов определяют развитие многих патологий [1,2], поэтому рецепторы глутамата и GABA являются мишенями действия широкого спектра фармакологических препаратов [3]. В связи с этим представляет интерес разработка методов тестирования (поиска) соединений, взаимодействующих рецепторами-каналами глутамата и GABA.

Известно, что активация NMDA-рецепторов приводит к увеличению концентрации ионов кальция в цитозоле ($[Ca^{2+}]_i$) в нейронах [см. обз. 4] – это явление широко используется для регистрации активности этих каналов. AMPA- и KA-рецепторы, деполяризуя клеточную мембрану, способствуют активации входа кальция как через канал NMDA-рецептора, так и через другие потенциал-зависимые кальциевые каналы, что дает возможность следить за активностью и этих каналов по изменению $[Ca^{2+}]_i$.

В зрелых нейронах активация $GABA_A$-рецепторов приводит к входу ионов Cl^{-} в клетки, что приводит к гиперполяризации плазмалеммы. Однако, на ранних этапах развития ЦНС, когда концентрация ионов хлора внутри клетки больше, чем во внеклеточной среде [5], GABA выполняет функцию возбуждающего нейротрансмиттера, обеспечивая деполяризацию клеток. В молодых нейронах можно наблюдать активацию входа кальция через кальциевые каналы L-типа при добавлении GABA [6].

В настоящей работе предложена единая методика выявления лигандов NMDA-, AMPA/KA- и $GABA_A$-рецепторов в культуре клеток

гиппокампа крысы, основанная на регистрации флуоресценции кальций-чувствительных зондов.

Методы. При разработке методики в качестве тест-системы использовали культуру клеток гиппокампа крысы, выделенных из мозга 1-2-дневных крысят. Культуру выращивали на 25мм круглых покровных стеклах, покрытых 0,001% Poly-L-lysine, в среде Neurobasal A с добавлением 2% Supplement B27, 0,5мМ глутамина и 15мкг/мл гентамицина. Эксперименты по регистрации уровня цитозольного кальция в клетках, нагруженных флуоресцентным кальциевым зондом Fura-2, проводили с помощью флуоресцентной станции на базе микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), оснащенного камерой AxioCam HSm и набором светофильтров «Filter set 21HE» для регистрации флуоресценции Fura-2. Полученные серии изображений обрабатывались в программе ImageJ с использованием плагинов «Time Series Analyzer» и «RatioPlus». Для построений графиков и статистической обработки использовали «Origin 7.0».

При обработке серий изображений оценивали амплитуду кальциевых ответов одиночных клеток, выраженную в относительных единицах (отношение сигналов флуоресценции Fura-2 при возбуждении 340 и 380нм). Исходный уровень сигнала в нейронах обычно составлял 0,20±0,02 (Mean±SD, n=195).

В эксперименте использовали культуру в возрасте 3-5 дней. В такой культуре GABA активирует вход Ca^{2+} в нейронах [6]. Кроме того, в этот период в культуре не проявляется спонтанная активность нейронов, возникающая после формирования синапсов [7]. Нейроны в культуре выявляли по наличию характерного кальциевого сигнала на кратковременное (10сек) добавление 50мМ KCl за 10мин до начала эксперимента.

Результаты.

Кальциевые ответы нейронов, вызванные NMDA. При разработке методики обнаружения агонистов NMDA использовалась безмагниевая среда, поскольку канал NMDA-рецептора потенциал-зависимо блокируется Mg^{2+} [8]. Добавление 50мкМ NMDA вызывает кальциевый ответ с амплитудой в 0,42±0,09 в 90% нейронов (n=243). При воздействии NMDA в течение 30-60сек и последующей отмывкой от агониста, клетки восстанавливают уровень $[Ca^{2+}]_i$ до базального (рис.1А). Кроме того, клетки способны к повторному (и последующим) ответу на добавление NMDA (рис.1А).

Для подавления кальциевого ответа на добавку NMDA используется селективный антагонист NMDA-рецептора – МК-801, который в концентрации 15мкМ предотвращает кальциевый сигнал, как при добавлении до NMDA (рис.1А), так и на фоне действующего агониста (рис.1Б). Способность нейронов к обратимому кальциевому

ответу на повторяющиеся кратковременные добавки агониста NMDA-рецептора и способность МК-801 полностью подавлять этот ответ позволяют исследовать образец на содержание агонистов NMDA рецептора в одном эксперименте по следующей схеме: 1) выявить в культуре нейроны; 2) выявить среди них клетки, способные отвечать на добавку NMDA; 3) оценить Ca^{2+}-ответ этих клеток на добавку неизвестного образца и 4) оценить Ca^{2+}-ответ на добавку образца в присутствии МК-801. При этом если образец вызывает в нейронах кальциевый сигнал, который подавляется МК-801, можно утверждать, что в исследуемом образце присутствует агонист NMDA-рецептора.

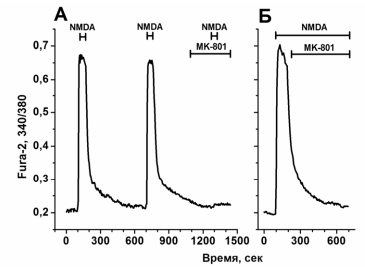


Рис.1. А – Изменение $[Ca^{2+}]_i$ нейронов в ответ на последовательные 30сек добавки 50мкМ NMDA с интервалом 10мин. Присутствие 15мкМ МК-801 предотвращает кальциевый ответ на NMDA, Б – 15мкМ МК-801, при добавлении на фоне 50мкМ NMDA, возвращает $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню.

Ca^{2+}-сигналы в нейронах, вызванные активацией AMPA/KA-рецепторов. Активация AMPA- и KA-рецепторов их агонистами (α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовой (AMPA) или каиновой (KA) кислотами) вызывает кальциевые сигналы в нейронах. Как и в случае с NMDA-рецепторами, можно получить повторные кальциевые ответы в клетках при нескольких кратковременных добавках AMPA или KA (рис.2). Эти ответы обратимо подавляются в присутствии 3мкМ антагониста AMPA/KA-рецепторов – NBQX (рис.3).

Таким образом, для выявления агонистов AMPA/KA-рецепторов в неизвестном образце справедливо применять схему эксперимента, разработанную для NMDA-рецептора.

Стимуляция AMPA/KA-рецепторов вызывает быструю деполяризацию, приводящую к активации потенциал-чувствительных Ca^{2+}-каналов L-типа, а также к усилению Ca^{2+}-сигналов в ответ на NMDA. Это свойство можно использовать для исследования лигандов AMPA/KA-рецепторов, даже если они содержатся в образце в небольшой концентрации. На рисунке 4 показано, что небольшая концентрация каината (1мкМ) не приводит к росту $[Ca^{2+}]_i$, однако резко увеличивает амплитуду кальциевого ответа, вызванного добавлением 50мкМ NMDA в среде, содержащей 1мМ Mg^{2+}. По-видимому, в этом случае степень деполяризации не достаточна для активации канала L-типа, но достаточна для удаления Mg^{2+} с NMDA-рецептора.

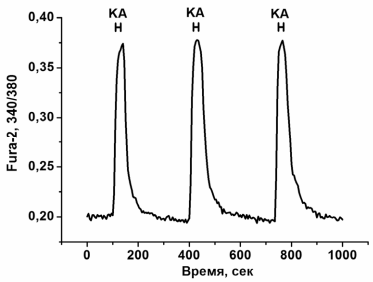


Рис.2. Три кратковременных добавки 10мкМ каината вызывают в нейронах кальциевые ответы одинаковой амплитуды.

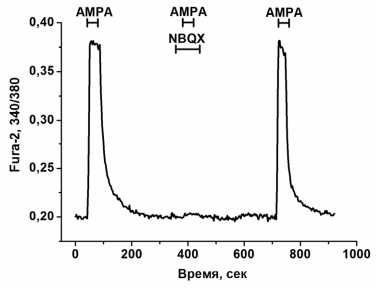


Рис.3. Кальциевые ответы нейронов, вызванные 10мкМ AMPA, подавляются в присутствии 3мкМ NBQX.

В присутствии ингибиторов потенциал-чувствительных кальциевых каналов (нифедипин) и NMDA-рецепторов (МК-801) могут быть выявлены подтипы AMPA- и KA-рецепторов, проницаемые для кальция, что продемонстрировано на рисунке 5.

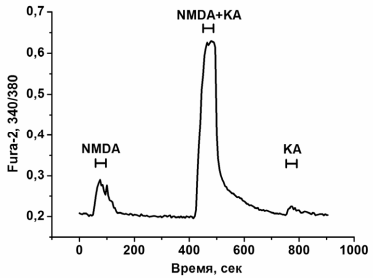


Рис.4. 1мкМ каината не вызывает повышение $[Ca^{2+}]_i$ в нейроне, однако резко увеличивает амплитуду кальциевого ответа на 50мкМ NMDA.

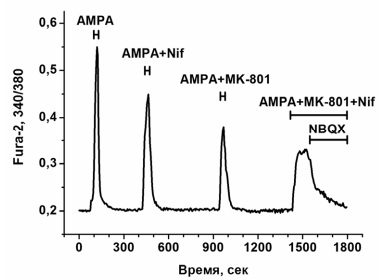


Рис.5. Кальциевый ответ нейрона, вызванный 10мкМ AMPA частично ингибируется 2мкМ нифедипина (Nif) и 10мкМ МК801, и полностью подавляется 3,5мкМ NBQX.

Ca^{2+}-сигналы в нейронах, вызванные GABA. GABA может индуцировать кальциевый сигнал в нейронах гиппокампа [6]. Этот ответ специфичен для молодых (<5 дней) культур и связан с активацией потенциал-зависимых кальциевых каналов при деполяризации клеток в ответ на GABA.

В экспериментах на молодых (3-5дней) культурах клеток гиппокампа наблюдаются кальциевые ответы нейронов на добавление 50-200мкМ GABA (рис.6). Эти ответы имеют характер транзитных кальциевых сигналов с небольшой амплитудой 0,08±0,03. Для одиночного нейрона характерна одинаковая амплитуда кальциевых сигналов, вызванных несколькими кратковременными добавками GABA с интервалом 5-10мин. Эти сигналы подавляются антагонистами $GABA_A$-рецептора – пикротоксином (10-50мкМ) (рис.7) и бикукуллином (20-100мкМ), а также антагонистом потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов L-типа нифедипином (не показано).

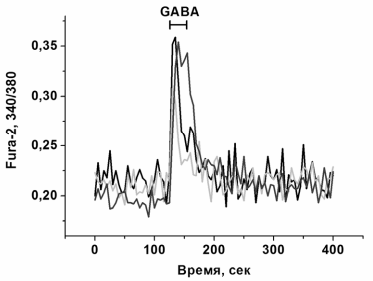


Рис.6. Кальциевые ответы трех нейронов в на добавку 200мкМ GABA Возраст культуры – 3 дня.

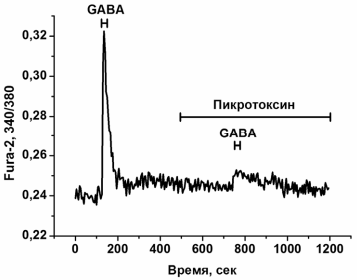


Рис.7. Кальциевый ответ нейрона, вызванный 200мкМ GABA, подавляется в присутствии 50мкМ антагониста $GABA_A$-рецептора – пикротоксина. Возраст культуры – 3 дня.

Полученные результаты подтвердили возможность использования изменений $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах культуры клеток гиппокампа крысы для выявления лигандов NMDA-, AMPA/KA- и $GABA_A$-рецепторов. На основании проведенных исследований, разработана схема эксперимента по выявлению лигандов указанных рецепторов в неизвестном образце, основанная на регистрации активности потенциал-зависимых кальциевых каналов в культуре клеток гиппокампа крысы с помощью кальциевых флуоресцентных зондов. Разработанный метод позволяет определить все агонисты исследуемых рецепторов, которые входят в состав образца.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bowie D.* //CNS Neurol. Disord. Drug Targets (2008) 7(2): 129-43;
2. *Michels G., Moss S.J.* //Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. (2007) 42(1): 3-14;
3. *Foster A.C., Kemp J.A.* //Curr. Opin. Pharmacol. (2006) 6(1): 7-17;
4. *Khodorov B.* //Prog. Biophys. Mol. Biol. (2004) 86(2):b279-351;
5. *Li K., Xu E.* //Neurosci. Bull. (2008) 24(3): 195-200;
6. *Fukuda A. et al.* //J. Neurophysiol. (1998) 79(1): 439-46;
7. *Opitz T, De Lima AD, Voigt T.* //J. Neurophysiol. (2002) 88(5): 2196-206;
8. *Nowak L.* //Nature (1984) 307(5950): 462-5.

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ (КВАНТОВЫХ ТОЧЕК) В ИССЛЕДОВАНИИ ЭНДОЦИТОЗА ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

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

[1] Институт цитологии РАН, СПб

Введение. Один из наиболее распространённых подходов в исследовании поведения макромолекул в живых клетках в настоящее время включает в себя применение флуорофоров разной природы, присоединенных к специфическим антителам или лигандам. Таким образом, например, можно проследить динамику эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР), выявляемую методом непрямой иммунофлуоресценции в фиксированных клетках различных клеточных линий [1].

Применяемые флуорофоры, как правило, обладают рядом недостатков, связанных с низким квантовым выходом, быстрым выгоранием, специфической для каждого флуорофора длиной волны возбуждения и широким спектром испускания, а в случае GFP и его аналогов – и с необходимостью введения в клетки генетических конструктов.

В 1993 году были получены альтернативные флуорофоры, так называемые квантовые точки (quantum dots, QDs) - полупроводниковые нанокристаллы на основе элементов II-VI и III-V групп, характеризующиеся высоким квантовым выходом, фотостабильностью и узким симметричным спектром испускания. Максимум спектра испускания может варьировать, в зависимости от размера наночастицы, при этом спектр возбуждения одинаков для всех квантовых точек и лежит в УФ области, что также облегчает их использование. Наиболее широкое применение нашли нанокристаллы из CdSe. Их размер варьирует от 2 до 9нм, что обеспечивает флуоресценцию во всей видимой области спектра. В этом случае QD представляет собой комплексное образование, состоящее из CdSe кора, покрытого слоем сульфида цинка для увеличения стабильности и увеличения квантового выхода [2]. Из-за особенностей методики получения нанокристалла, на его поверхности остаётся органический растворитель триоктилфосфин оксид, ТОФО. Такую нерастворимую в воде наночастицу необходимо функционализировать, чтобы придать ей свойства необходимые для дальнейшего использования в биологических системах. С этой целью QD покрывают различными амфифильными полимерными молекулами, в результате нанокристалл становится гидрофильным. В полимерной оболочке могут быть активные группы, позволяющие конъюгировать

квантовую точку с интересующей исследователя молекулой [3]. Таким образом, QDs, присоединенные к лигандам и антителам, можно применять для исследования процессов в живых клетках. При изготовлении коммерческих препаратов используется ещё один подход: к полиэтиленгликолю (ПЭГ), покрывающему QDs пришивают стрептавидин, что делает возможным применение одних и тех же QDs с широким спектром биотилинированных молекул (лиганды, антитела и др.) Такие QDs были использованы в нашей работе.

Несмотря на то, что первое применение квантовых точек в биологии датируется 1998 годом [4], такие флуорофоры до сих пор не нашли широкого распространения в исследованиях живых объектов. В первую очередь это связано с высокой цитотоксичностью кора, состоящего из солей тяжёлых металлов [5]. Оболочки кора должны предотвращать непосредственный контакт нанокристалла с клетками [6], однако, недостаточно чётко изучено, являются ли оболочки достаточно стабильными, чтобы удерживать кор внутри на протяжении продолжительного времени. Кроме того, после функционализации нанокристаллов их размер возрастает на порядок, и они становятся значительно больше, чем нативные лиганды, с ними связанные. Возникает вопрос о том, как такие громоздкие конструкции влияют на поведение связанных с ними молекул в клетке. Для ответа на него необходимо сопоставить результаты экспериментов, полученных новым способом с использованием QDs и стандартным способом с помощью антител в фиксированных клетках методом двойной непрямой иммунофлуоресценции.

Методика. Объектом исследования были клетки линии HeLa (Европейская коллекция клеточных культур), которые культивировали в среде DMEM с глутамином (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки, при 37^{o}C в 5%CO_2. Рецептор ЭФР выявляли двумя способами. (1) Мечение рецептора квантовыми точками проводили в два этапа. Производили связывание лиганда ЭФР-биотин (55нг/мл, Invitrogen) при +4^{o}C 60мин с рецептором, затем клетки инкубировали с квантовыми точками с длиной волны испускания 655нм, стабилизированные ПЭГ-стрептавидином (QD-PEG-sv, Invitrogen) при +4^{o}C 30мин. В результате образовывались ЭФР-рецепторные комплексы, далее обозначаемые EGFb-svQD. Затем отмывали несвязавшийся лиганд и стимулировали эндоцитоз переводом клеток в среду температурой +37^{o}C на указанное время [7]. Клетки либо наблюдали прижизненно, либо фиксировали в 4% формалине 15мин и отмывали от фиксатора фосфатно-солевым раствором (PBS). (2) Непрямая иммунофлуоресценция: для выявления рецептора ЭФР использовали поликлональные антитела кролика (дар д-ра Творогова, США). В качестве вторых антител использовали конъюгаты GAR-Alexa Fluor 488

(Molecular Probes). Иммунофлуоресцентное окрашивание проводилось по стандартной схеме, при этом пермеабилизация мембраны осуществлялась с использованием либо 0,1% Triton X-100, либо 0,05% сапонина, либо 0,05% Brij56. Для отмывки клеток от связавшихся неспецифично антител использовали PBS, содержащий 0,5% Tween-20, либо PBS без Tween-20.

Результаты и обсуждение. Иммунофлуоресцентное окрашивание включает в себя две стадии: фиксация клеток и пермеабилизация мембраны. При выявлении комплекса EGFb-svQD на разных стадиях эндоцитоза в живых (рис.1а) и фиксированных (рис.1б) клетках линии HeLa было обнаружено, что фиксация клеток 4% формалином не вызывает изменения в распределении QD в клетке. При этом фиксатор влияет на интенсивность флуоресценции, вызывая незначительное гашение свечения.

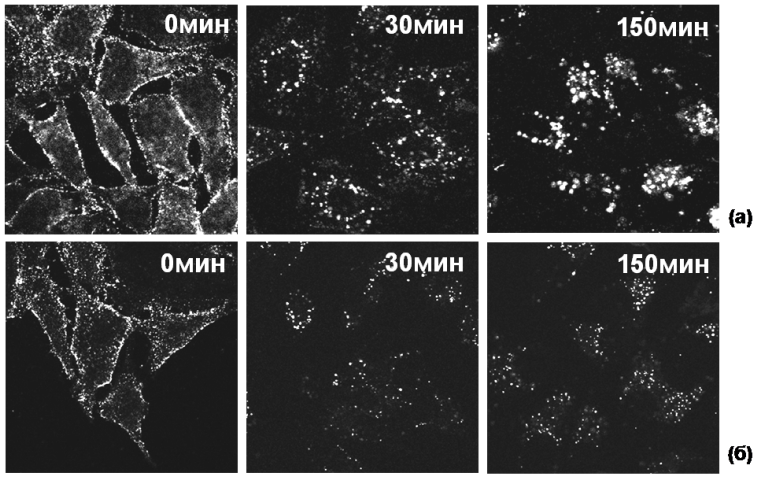


Рис.1. Выявление квантовых точек, конъюгированных с ЭФР, на разных стадиях эндоцитоза, стимулированного ЭФР-биотин (55нг/мл) в живых (а) и фиксированных (б) клетках HeLa.

Для того чтобы сделать белки внутри клетки доступными для антител, необходимо пермеабилизовать мембрану. Чаще всего в стандартной методике непрямой иммунофлуоресценции производят обработку неионным детергентом Triton X-100 (0,1%) в течение 15 минут. Во второй серии экспериментов на разных стадиях эндоцитоза, стимулированного EGFb-svQD, клетки фиксировали 15% формалином и обрабатывали Triton X-100 (0,1%) в течение 15мин. Окраска таких клеток антителами к рецептору ЭФР позволяла выявить рецептор в эндосомах (рис.2а), однако при этом флуоресценция QDs не наблюдалась (рис.2б). Если эти клетки не подвергались пермеабилизации, то QDs выявлялись в

эндосомальных структурах (рис.2г), а антитела связывались с рецептором ЭФР только на поверхности (рис.2в). Таким образом, пермеабилизация мембраны клеток Triton X-100 приводит к потере QDs.

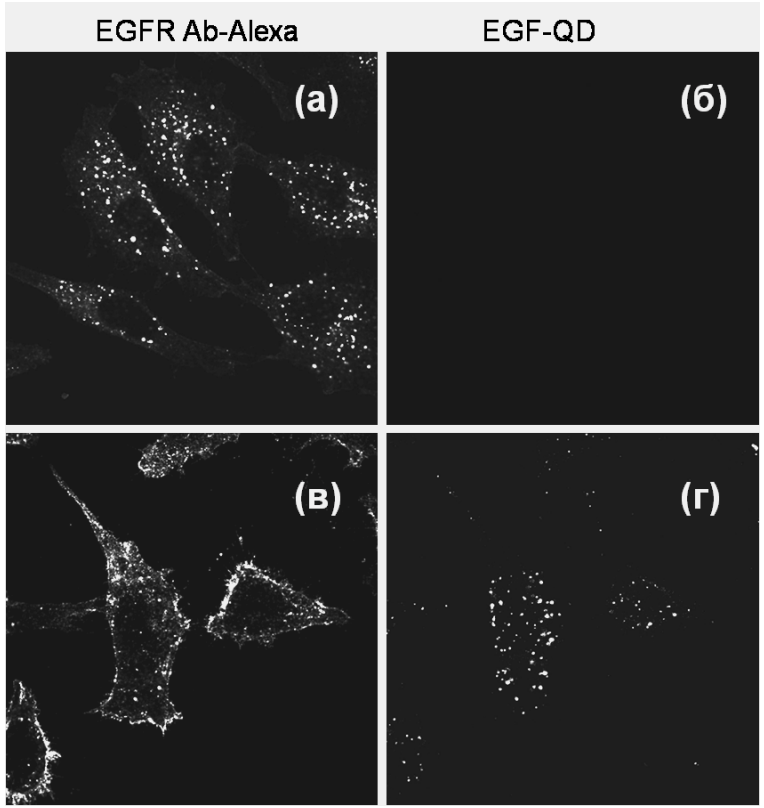


Рис.2. Совместное выявление рецептора ЭФР (EGFR) с помощью антител и с помощью квантовых точек, конъюгированных с ЭФР в ходе непрямой иммунофлуоресценции при обработке детергентом Triton X-100 (а, б) и без обработки детергентом (в, г) в клетках HeLa на стадии 30мин после стимуляции эндоцитоза.

Известно, что детергенты различаются по способности экстрагировать липиды. Поэтому в третьей серии экспериментов, подбирая оптимальные условия для сохранения QDs в клетке, мы проверили влияние других детергентов, а именно: сапонина и Brij56 в различной концентрации и с разным временем воздействия по сравнению с Triton X-100. Оказалось, что 10-ти минутное воздействие сапонина 0,05% вызывало вымывание QDs. При уменьшении времени

пермеабилизации или концентрации как Triton X-100, так и сапонина, антитела практически не проникали внутрь клетки. QDs также не выявлялись при использовании для отмывки несвязавшихся антител буфера, содержащего детергент Tween 20.

С другой стороны, использование мягкого неионного детергента Brij56 (0.05%) и проведение отмывок в буфере, не содержащем детергент, позволяло предотвратить выход нанокристаллов из клетки. В этом случае детекция рецептора с помощью QDs (рис.3а) и антител против рецептора ЭФР (рис.3б) совпадала. Этот факт свидетельствует в пользу адекватности такого способа фиксации и пермеабилизации клеток.

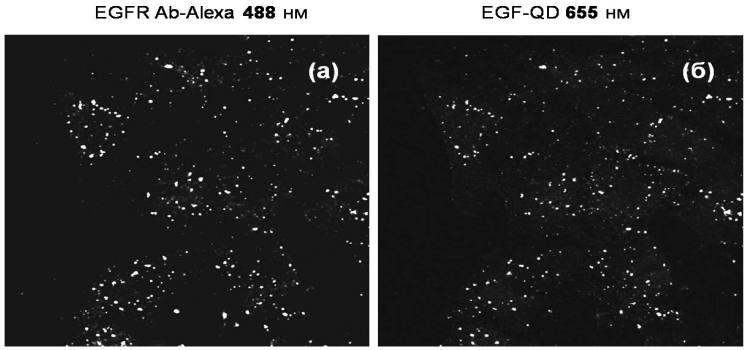


Рис.3. Совместное выявление рецептора ЭФР (EGFR) с помощью антител (а) и квантовых точек, конъюгированных с ЭФР (б) в ходе непрямой иммунофлуоресценции при обработке Brij56 в клетках HeLa на стадии 30мин после стимуляции эндоцитоза.

Можно предположить, что наблюдаемый эффект вымывания квантовых точек из клеток связан не столько со свойствами самих QDs, сколько со способом их получения, в результате которого на поверхности QDs остается слой гидрофобного органического растворителя (в данном случае – ТОФО оболочка). При обработке клеток детергентами в жестких условиях эта оболочка дестабилизируется, в результате чего QDs вымываются. Однако, возможны и другие механизмы, связанные с процессингом рецептора в эндосомах. Тем не менее, можно заключить, что способ пермеабилизации влияет на сохранение QDs в клетке и наиболее адекватные результаты на клетках линии HeLa получаются при использовании мягких детергентов, например Brij56. Следует подчеркнуть, что этот аспект действия детергентов необходимо учитывать при использовании квантовых точек и в других клеточных линиях.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kharchenko M.V. et al.* //Cell Biol. Int. (2007) 31: 349-59;
2. *Grabolle M. et al.* //Ann. N.Y. Acad. Sci. (2008) 1130: 235-41;
3. *Liu W. et al.* //J. Am. Chem. Soc. (2008) 130(4): 1274-84;
4. *Bruchez M. Jr. et al.* //Science. (1998) 281(5385): 2013-6;
5. *Chan W.H., Shiao N.H.* //Acta. Pharmacol. Sin. (2008) 29(2): 259-66;
6. *Singh S., Nalwa H.S.* //J. Nanosci. Nanotechnol. (2007) 7(9): 3048-70;
7. *Харченко М.В., Корнилова Е.С., Меликова М.С.* //Цитология (2007) 49(3): 236-41.

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БУФЕРА ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ РЕОРГАНИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА ЭФР-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТКАХ *HELA-F.*

Латкин Д.С.[1,2], Злобина М.В.[2], Корнилова Е.С.[2], Харченко М.В.[2]

[1]Санкт-Петербургский государственный университет
[2]Институт цитологии РАН, СПб

Стимуляция эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводит к последовательной реорганизации системы микротрубочек (МТ) в культивируемых интерфазных клетках [1]. После инкубации клеток при 4ºС происходит разборка МТ. Через 15мин после стимуляции эндоцитоза восстанавливается радиальная сеть МТ. Затем параллельно с увеличением размера эндосом и перемещением их к центру клетки (30 и 60 мин) число длинных радиальных МТ уменьшается, а интенсивность окрашивания тубулина вокруг ЦОМТ усиливается. В целом система приобретает «губкоподобный» вид (спутанная сеть МТ). Отдельные МТ укорачиваются, фрагментируются и даже частично деполимеризуются. В дальнейшем радиальная система МТ восстанавливается [1-3]. Для оценки доли полимеризованного тубулина на каждой стадии реорганизации системы МТ мы попытались использовать буфер для экстракции растворимых цитоплазматических белков, далее называемый цитоскелетным буфером (ЦБ). Такие буфера разного состава довольно широко применяются в исследованиях цитоскелета [4,5]. Первоначально мы использовали ЦБ следующего состава: 20мМ HEPES (pH 7,4), 3мМ MgCl2, 50мМ NaCl, 0.1% Triton-X100, 1мМ Na3V04, 1мМ NaF, 10%

глицерин и коктейль протеазных ингибиторов (Invitrogen). Мы ожидали, что такая обработка удалит из клетки деполимеризованный тубулин, тогда как интактные МТ останутся. Однако оказалось, что в ходе эндоцитоза чувствительность МТ к экстракции изменяется, что приводит к нарушению морфологии МТ цитоскелета при обработке ЦБ по сравнению с необработанными клетками. МТ в контрольных клетках и восстановленные на ранней стадии эндоцитоза радиальные МТ практически полностью удалялись из клеток, оставались лишь единичные искривленные МТ разной длины. Когда же в необработанных буфером клетках МТ приобретали наиболее спутанный, фрагментированный вид («губкоподобная» организация тубулинового цитоскелета), обработка клеток ЦБ практически не изменяла морфологию МТ. Эти данные свидетельствуют о том, что радиальные ранние МТ и более поздние «фрагментированные» значительно различаются по своим свойствам. Однако для решения исходной задачи было необходимо подобрать такой состав ЦБ, при обработке которым, морфология МТ совпадала с таковой в контрольных клетках.

Эндоцитоз стимулировали по схеме предварительного связывания лиганда: клетки инкубировали в рабочей среде Игла, содержащей 0,1% БСА и 20мМ HEPES (pH 7,4) при 4ºС в течение 60мин в присутствии ЭФР (50нг/мл). После 5-кратной отмывки PBS от несвязавшегося лиганда эндоцитоз стимулировали переводом клеток в среду, не содержащую лиганд, нагретую до 37ºС, на указанное время. Обработку клеток ЦБ проводили следующим образом: после завершения стимуляции эндоцитоза клетки дважды промывали PBS и инкубировали 1мин при комнатной температуре в цитоскелетном буфере. Затем клетки фиксировали 4%-ным раствором формалина (Sigma) в PBS. Мы сравнили действие ЦБ, приготовленного на основе глицерина, с действием буферов с добавлением 12% ПЭГ 2000 (Loba chemie) либо 300мМ сахарозы (Helicon). Данные вещества химически инертны и позволяют достичь одинаковой осмомолярности раствора. Основа цитоскелетного буфера содержала 10мМ PIPES (pH 6.8), 3мМ MgCl2, 50мМ NaCl, 0.1% Triton-X100, 1мМ Na_3V0_4, 1мМ NaF и коктейль протеазных ингибиторов (Invitrogen). Тубулин выявляли методом непрямой иммунофлуоресценции. После фиксации клетки промывали 5 раз по 3мин раствором PBS и обрабатывали 15мин при комнатной температуре раствором PBS, содержащим 0,5% Triton-X100 (Sigma). Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией в растворе БСА (1%), приготовленном на PBS, 30мин при комнатной температуре. С первыми антителами клетки инкубировали 30мин при комнатной температуре. После этого промывали 3 раза по 5мин раствором PBS, содержащим 0,1% Tween 20 (BioRad). Инкубацию со вторыми антителами (GAM-Alexa488) проводили 30мин при комнатной температуре. Потом промывали, как описано выше. Распределение флуоресцентно-меченных белков в клетках изучали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Leica, Германия). Зеленую флуоресценцию возбуждали аргоновым лазером (488нм) и сканировали с помощью программы Leica Confocal Software. На черно-белых рисунках приведено инвертированное изображение.

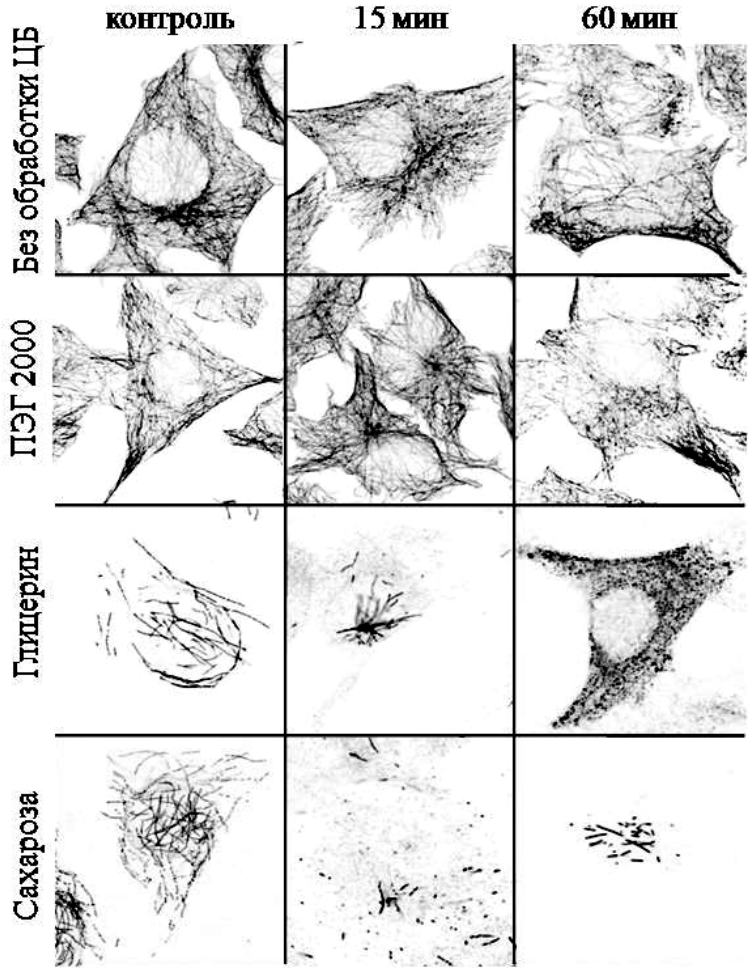


Рис. Выявление тубулина методом иммунофлуоресценции в клетках HeLa-F до и после обработки клеток ЦБ. Время указано с момента запуска эндоцитоза.

Нами были получены следующие результаты: обработка контрольных клеток ЦБ с добавлением глицерина и сахарозы ведёт к разрушению радиальной сети МТ, общее количество МТ уменьшается,

они искривляются и частично фрагментируются (рис.). Обработка клеток данными ЦБ на ранней стадии эндоцитоза (15мин) приводит к почти полному вымыванию МТ с сохранением фрагментов в районе ЦОМТ (а при обработке ЦБ с сахарозой – и небольших хаотично расположенных фрагментов). На стадии образования «губкоподобного» тубулинового цитоскелета экстракция цитоплазматических белков ЦБ с глицерином вызывает полное разрушение МТ, но не ведёт вымыванию тубулина. Применение на данной стадии ЦБ с сахарозой приводит к значительной фрагментации и вымыванию МТ. Использование же ЦБ с ПЭГ 2000 сводит к минимуму повреждения МТ в контрольных клетках и на всех исследованных стадиях эндоцитоза. Морфология полученного в ходе экстракции тубулинового цитоскелета не отличаются от таковой в необработанных ЦБ клетках. Это позволяет нам заключить, что обработка ЦБ с добавлением ПЭГ 2000 не влияет на интактные МТ, но вымывает димеры тубулина, в общем, не изменяя морфологию тубулинового цитоскелета.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kharchenko M.V. et al*. //Cell Biol. Int. (2007) 31: 349-59;
2. *Харченко М.В. и др.* //Цитология (2007) 49(9): 803;
3. *Kornilova E.S., Zlobina M.S., Kharchenko M.V.* //Abstracts of 33rd FEBS Congress (2008): 253;
4. *Svitkina T.M., Borisy G.G.* //Meth. Enzymology (1998) 298: 570-92;
5. *Bell P.B. et al.* //J. Histochem. Cytochem. (1987) 35(12): 1381-8.

МЕТОД ЭЛЛМАНА В ПЛАНШЕТНОМ ВАРИАНТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЛИНИИ SH-SY5Y КАК НОСИТЕЛЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Прокофьева Д.С., Бабаков В.Н., Войтенко Н.Г., Гончаров Н.В.

НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека
ФМБА России, СПб

Введение. Фосфорорганические соединения (ФОС) широко используются в сельском хозяйстве и промышленности в качестве пестицидов, пластификаторов, компонентов синтеза лекарственных веществ, полимерных материалов. Кроме того, некоторые высокотоксичные ФОС, такие как табун, зарин, зоман и VX, являются компонентами химического оружия. Несмотря на широкую распространенность, нейротоксичность и цитотоксичность ФОС изучены недостаточно [1]. Необходимо проведение исследований по оценке перечисленных параметров ФОС как в чистом виде, так и в смесях, поскольку механизм их совместного действия не всегда предсказуем. Например, в середине 90-х годов прошлого века для смесей отдельных ФОС, относящихся к пестицидам, было показано отсутствие аддитивного эффекта [2]. Некоторые пестициды могут усиливать или, наоборот, ослаблять действие других веществ.

Масштабы и сферы применения ФОС требуют соблюдение самых строгих мер контроля и безопасности рабочего персонала, населения и объектов окружающей среды. Для этого существуют методы химического и биохимического целевого анализа и оценки их содержания в различных средах. Химические методы, как правило, трудоемки, длительны и требуют дорогой высокопрецизионной аппаратуры. Кроме того, химические методы, будучи высокоспецифичными, не отличаются высокой чувствительностью по сравнению с биохимическими методами.

Ингибирование ферментативной активности холинэстераз посредством ФОС лежит в основе нескольких биохимических методов оценки их содержания в объектах окружающей среды. Во всех существующих биохимических методах используется готовый коммерческий препарат ацетилхолинэстеразы (АХЭ) для определения остаточной активности фермента после контакта с тестируемой пробой, предположительно содержащей ФОС. Наиболее часто используемый в настоящее время метод Эллмана основан на расщеплении субстрата ацетилтиохолина на уксусную кислоту и тиохолин, который при взаимодействии с 5,5’-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ) образует окрашенный комплекс [3].

Клеточные культуры могут использоваться для изучения действия ФОС только в том случае, если они содержат в своей плазматической мембране маркерные ферменты – эстеразы, в частности АХЭ. В 1991 году M. Ehrich и L. Correll разработали модификацию метода Эллмана с применением клеток нейробластомы, в плазматической мембране которой имеется АХЭ [4]. Очевидные достоинства данного подхода состоят в том, что используемый фермент находится в нативном состоянии в оптимальном молекулярном окружении. Недостатком методики является тот факт, что в ходе анализа клетки из адгезионного состояния переводят в суспензию, что, безусловно, не мешает определению активности АХЭ, но делает невозможным использование методики для исследования механизмов действия ее ингибиторов, в частности ФОС, а также параллельного определения их цитотоксичности.

В 1993 году было показано, что из всех нейробластом наиболее подходящей для тестирования цитотоксичности и антихолинэстеразной активности ФОС является нейробластома человека линии SH-SY5Y,

поскольку активность АХЭ этих клеток выше по сравнению с другими линиями [5]. В 2003 году была предпринята первая попытка разработки такого варианта анализа с использованием нейробластомы SH-SY5Y, при котором клетки оставались бы в адгезионном состоянии [6]. Несмотря на то, что новая методика отличалась уменьшением времени анализа, сокращала количество используемых клеток и делала возможным проведение скрининговых исследований, попытка использовать методику для анализа смесей ФОС оказалась неудачной, что признается самими авторами, которые в заключение статьи пишут о необходимости проведения дополнительных экспериментов для верификации полученных результатов. Других попыток разработать улучшенный вариант данной методики с устранением всех ее недостатков до настоящего времени предпринято не было.

Целью настоящей работы была адаптация метода Эллмана к планшетному формату с использованием в качестве «носителя» АХЭ нейробластомы линии SH-SY5Y для получения производительной, чувствительной и экономичной методики, обладающей хорошей воспроизводимостью и апробировать ее на двух высокотоксичных ФОС (зомане и веществе типа VX – далее VX), а также их смесях. Необходимо отметить, что исследования антихолинэстеразной активности зомана и VX на клетках нейробластомы ранее не проводились.

Материалы и методы. Клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y культивировали во влажной атмосфере при 37^{o}C и 5% CO_2 с использованием среды DMEM/F12 с добавлением 15% бычьей фетальной сыворотки, 2мМ L-глутамина и 50мкг/мл гентамицина.

Для определения оптимального количества клеток, необходимых для проведения анализа, клетки нейробластомы снимали с подложки, ресуспендировали в ростовой среде и рассеивали в лунки 96-луночного планшета в количестве 50, 75, 100, 125 тысяч на лунку. Спустя 24 часа среду из лунок удаляли, клетки промывали раствором Хэнкса и в каждую лунку добавляли реагенты для визуализации ферментативной активности АХЭ: 50мкл ацетилтиохолина (1,3мг/мл) и 150мкл ДТНБ (0,057мг/мл), приготовленных на растворе Хэнкса в день проведения эксперимента. Абсорбцию проб при λ=405нм измеряли с помощью прибора Multi-Detection Microplate Reader через 15мин, 30мин, 1 час, 1.5 часа, 2 часа и 3 часа после добавления реагентов с вычетом значений абсорбции содержимого лунок без клеток, в которые вносили растворы ацетилтиохолина и ДТНБ.

Зоман и VX растворяли в ДМСО в концентрации 10мг/мл. Последующие разведения готовили в день опыта на растворе Хэнкса. Рабочие концентрации ФОС были в пределах от $0{,}5\times10^{-8}$ до 15×10^{-8}мг/мл. При проведении экспериментов по оценке совместного эффекта ингибирования двух ФОС были приготовлены смеси обоих веществ на растворе Хэнкса с конечными концентрациями веществ $0{,}5\times10^{-8}$, 1×10^{-8} и 2×10^{-8}мг/мл.

Для проведения опытов по определению процента ингибирования АХЭ различными концентрациями ФОС в лунки планшета вносили по 100мкл клеточной суспензии в концентрации 0,75млн/мл. Спустя 24 часа после рассева клеток, среду из лунок удаляли, клетки промывали раствором Хэнкса и добавляли по 100мкл рабочих растворов ФОС на лунку. Каждая концентрация была представлена четырьмя лунками. Контрольной пробой был раствор Хэнкса. Клетки инкубировали в течение часа во влажной атмосфере при 37^{o}C и 5% CO_2. По истечении этого времени измеряли абсорбцию опытных проб относительно бланка, представляющего собой растворы ацетилтиохолина и ДТНБ, внесенные в лунки, не содержащие клеток. Было проведено два независимых эксперимента для VX и три независимых эксперимента для зомана.

Результаты и обсуждение. Результаты экспериментов по определению оптимального числа клеток, необходимых для анализа, и времени инкубирования для визуализации активности АХЭ представлены на рис.1, отмечены средние значения абсорбции со стандартными отклонениями. На рисунке указаны квадраты коэффициентов корреляции для каждой тестируемой концентрации клеток, из значения которых следует, что оптимальными являются количества 50 и 75 тысяч на лунку, поскольку квадраты коэффициентов корреляции для этих концентраций максимальны. При увеличении концентрации клеток до 100 тысяч на лунку и выше наблюдается увеличение стандартных отклонений. Поскольку для точности и чувствительности анализа необходимо, чтобы в лунках с контрольными пробами (раствор Хэнкса) значение абсорбции было максимальным, а величина стандартного отклонения минимальным, нами для дальнейшей работы была выбрана концентрация в 75 тысяч клеток нейробластомы на лунку планшета и время визуализации реакции – 2 часа.

Известно, что воздействие ФОС на клетки нейробластомы приводит к дозо-зависимому ингибированию АХЭ. Нами были изучены антихолинэстеразные эффекты зомана и VX на линию нейробластомы SH-SY5Y. На рис.2 представлены зависимости процента ингибирования АХЭ от концентраций исследуемых веществ. При сравнении обеих зависимостей можно заключить, что для АХЭ клеток линии SH-SY5Y большей ингибирующей активностью обладает зоман, хотя в случае коммерческого препарата фермента оба вещества обладают практически одинаковым ингибирующим действием [7]. Это можно объяснить тем, что, в отличие от коммерческого препарата АХЭ культура клеток является сложноорганизованным живым объектом. Например, для клеток линии SH-SY5Y показано наличие активности еще как минимум двух эстераз в их цитоплазматических мембранах -

карбоксилэстеразы и нейротоксиэстеразы, которые также известны своей способностью связывать ФОС [8]. Также известно о неэстеразных эффектах ФОС, которые на сегодняшний день мало изучены. С этой точки зрения разрабатываемый вариант метода Эллмана с использованием в качестве носителя АХЭ нейробластомы линии SH-SY5Y представляется нам наиболее подходящим для исследования возможных механизмов действия ФОС. Предел чувствительности методики был определен для каждого исследуемого вещества и составил для VX $(1\pm0,4)\times10^{-8}$мг/мл (p=0,05), а для зомана – $(1\pm0,2)\times10^{-8}$мг/мл (p=0,05).

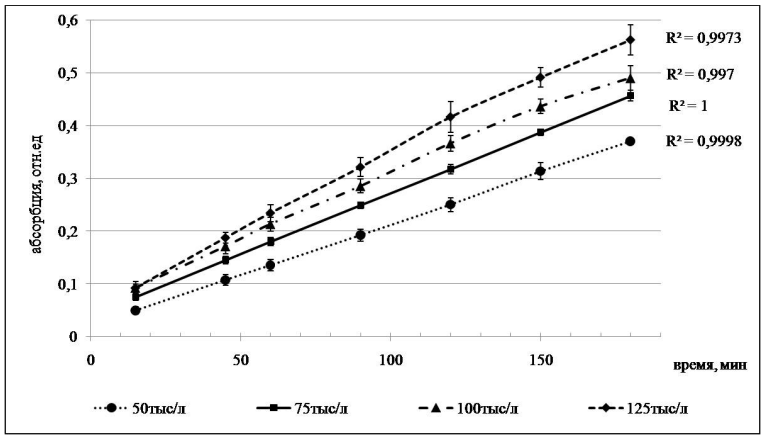


Рис.1. Определение оптимального количества клеток на лунку и времени реакции для определения активности АХЭ, n=3 для каждой точки.

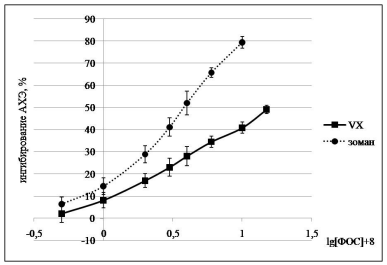


Рис.2. Влияние VX и зомана на активность АХЭ нейробластомы SH-SY5Y.

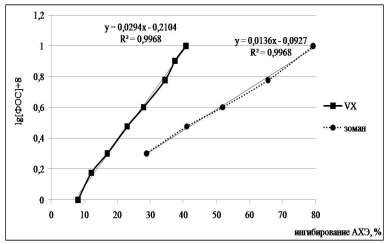


Рис.3. Калибровки VX и зомана.

Табл.1. Ингибирующее действие смесей зомана и VX на активность АХЭ нейробластомы линии SH-SY5Y, n=6 для каждой точки

Зоман (концентрация в смеси), $\times10^{-8}$мг/мл	VX (концентрация в смеси), $\times10^{-8}$мг/мл	измеренное ингибирование (ср.±станд.откл.),%	расчетное ингибирование (p=0,05),%
0,5	0,5	12,7±2,8	11,3±2,5
1	1	24,0±2,3	23,0±2,4
2	2	41,2±1,7	40,0±3,4
2	1	36,1±4,8	34,5±2,5
1	2	34,1±3,5	28,5±2,4

Результаты экспериментов по оценке совместного эффекта действия обоих ФОС представлены в табл.1. В предпоследнем столбце указаны измеренные значения процента ингибирования АХЭ для всех пяти тестируемых смесей, а в последнем столбце - проценты ингибирования для каждой смеси, рассчитанные с помощью предварительно полученных калибровок обоих веществ, представленных на рис.3. Из данных, приведенных в таблице, следует, что тестируемые вещества обладают аддитивным характером действия по отношению к активности АХЭ. Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанная модификация метода Эллмана с использованием в качестве носителя АХЭ нейробластомы линии SH-SY5Y может с успехом использоваться при анализе не только отдельных ФОС, но также их смесей для установления характера их совместного действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tiffany-Castiglioni E. et al.* //Neurotoxicology (2006) 27(5): 835-9;
2. *Marinovich M., Ghilardi F., Galli C.L.* //Toxicol. (1996) 108(3): 201-6;
3. *Ellman G.L. et al.* //Biochem. Pharmacol. (1961) 7: 88-95;
4. *Correll L., Ehrich M.* //Fundam. Appl. Toxicol. (1991); 16(1):110-6;
5. *Veronesi B., Ehrich M.* //Toxicol. Appl. Pharmacol. (1993) 120(2): 240-6;
6. *Roszell L.E., Kramer B.C., Leach G.J.* //Alternative Toxicol. Meth. (2003) Ch.31: 341-6;
7. *Hammond P.S., Forster J.S.* // Anal. Biochem. (1989) 180(2): 380-3;
8. *Ehrich M., Veronesi B.* //Clin. Exp. Pharm. Physiol. (1995) 22(5): 385-6.

ХАРАКТЕРИСТИКА БРОУНОВСКОГО ДВИЖЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИФОСФАТОВ В ВАКУОЛЯХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Пучков Е.О.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино

Введение. В клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при определенных условиях культивирования наблюдается появление оптически плотных частиц, получивших название «танцующих телец» («dancing bodies»). Такое название им дали за оживленное движение в интактных (нефиксированных) клетках. Эти же структуры обладают свойством метахроматического окрашивания основными красителями, что послужило основанием отнести их к так называемым валютиновым включениям [1,2]. Установлено, что «танцующие тельца» представляют собой комплексы полифосфатов (КПФ) [3], которые локализованы в вакуолях [4]. Удобным для наблюдений свойством КПФ является их взаимодействие с флуоресцентным красителем нуклеиновых кислот 4,6-диамидино-2-фенилиндол (ДАФИ) [5]. В результате окраски клеток дрожжей ДАФИ по голубой флуоресценции (456нм) выявляются структуры, содержащие нуклеиновые кислоты, а по желтой флуоресценции (526нм) – КПФ.

Поведение «танцующих телец» как физических частиц не изучалось. Предполагается, что «танцы» КПФ – броуновское движение, хотя, строго говоря, это доказано не было. Известно [6], что броуновское движение частиц подчиняется уравнению Эйнштейна-Смолуховского, которое для случая двумерного перемещения имеет вид:

$$\langle s^2 \rangle = 4\kappa T t / 3\pi\eta D, \qquad (1)$$

где $\langle s^2 \rangle$ – средний квадрат смещения частиц; к – постоянная Больцмана; Т – абсолютная температура; t – время; η – вязкость; D – диаметр частицы.

Таким образом, если доказать, что КПФ перемещаются вследствие хаотичного броуновского движения, то измерение параметров этого движения, может дать представление о физических свойствах окружающей их среды.

Цель настоящей работы – количественно охарактеризовать движение КПФ в клетках дрожжей *S. cerevisiae* и оценить на основании полученных данных вязкость среды в вакуолях.

Материалы и методы исследования. Работу проводили на клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ Y-2549, выращенных в жидкой среде, содержащей глюкозу – 2% и азотсодержащий комплекс для дрожжей (Yeast Nitrogen Base) (Becton Dickinson, США) – 0,67%.

Клетки окрашивали 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (ДАФИ), («Serva», Германия) после 18-24 часов роста путем добавления красителя непосредственно в среду культивирования до концентрации 15мкМ. В работе использовали также микросферы латекса с диаметрами 2,1мкм и 3,1мкм, меченые флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) («Sigma», США), исходные препараты которых разбавляли дистиллированной водой. Для микроскопии образы клеток и микросфер по 5мкл наносили на предметное стекло, покрывали покровным стеклом и окантовывали лаком для ногтей. Флуоресцентную микроскопию проводили на микроскопе МЛ-2Б (ЛОМО, Россия), оснащенном фотокамерой DSC-V3 (Sony, Япония), как описано ранее [7]. Регистрацию изображений осуществляли в двух режимах: 1) стандартный режим фотографирования с автоматическим подбором чувствительности и 2) скоростной режим при фиксированной чувствительности сериями с интервалом между кадрами 0,43с. и с промежутком между сериями 2-3с. Изображения получали с разрешением $3{,}7\times10^{-2}$мкм/пиксель. Наблюдения и регистрацию изображений проводили при температуре 25±0,5°С. Данные обрабатывали и анализировали с помощью компьютерных программ Adobe Photoshop v. 8.0 (Adobe Systems Inc., США), ImageJ v. 1.32 (National Institute of Health, США, http://rsb.info.nih.gov/ij/), MS Excel 2003 и OriginPro 7.5 (OriginLab, США).

Результаты и обсуждение. В исследованных препаратах 60 – 80% клеток *S. cerevisiae* содержали КПФ. Как правило, в клетке наблюдался один КПФ, редко – два, три и более – практически не встречались. На рис.1 показан пример типичного КПФ.

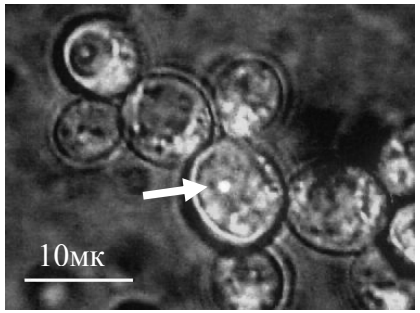
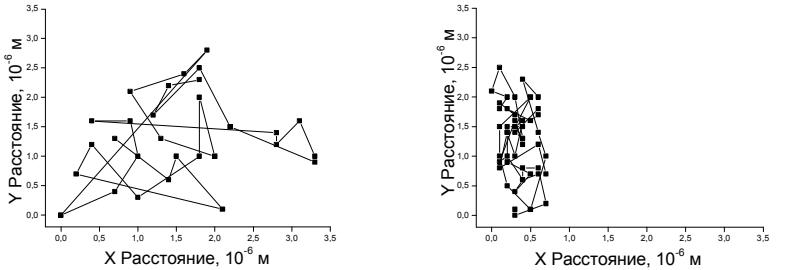


Рис.1. КПФ (указан стрелкой) в клетках *S. cerevisiae* . Совмещение изображений в проходящем свете и флуоресценции.

Ретроспективный анализ перемещений КПФ по изображениям, полученным при скоростном режиме съемки, позволил установить следующее. Движение КПФ происходит в трехмерном пространстве, в результате чего они иногда выходят из плоскости фокусировки объектива, и видимая интенсивность их флуоресценции падает или даже они полностью пропадают из поля зрения. Зарегистрированные видимые

перемещения носят хаотичный (броуновский) характер (рис.2). При этом было отмечено, что область перемещений КПФ, по-видимому, может зависеть не только от размеров, но и формы вакуоли (рис.2, сравнить А и Б). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности анализа поведения КПФ как броуновских частиц.



А Б

Рис.2. Траектории перемещений КПФ в двух клетках *S. cerevisiae* (А и Б).

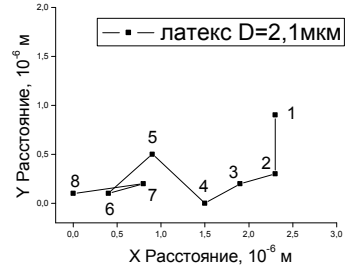


Рис.3. Траектория перемещений микросферы латекса в одной серии скоростной съемки.

Табл.1. (Приложение к рис.3)

Номер положения микросферы	Интенсивность флуоресценции (отн. ед)
1	0,9
2	1,0
3	0,92
4	1,0
5	0,9
6	0,98
7	0,75
8	0,97

Для определения вязкости в вакуолях по параметрам движения КПФ, необходимо было разработать методики определения среднего квадрата смещения в плоскости и размеров КПФ по данным флуоресцентной микроскопии. Эти методики были разработаны на

модельной системе – на микросферах латекса, меченных ФИТЦ, с известными размерами в среде с известной вязкостью (дистиллированная вода). Перемещения микросфер регистрировали скоростной фотосъемкой так же, как и КПФ. Флуоресцирующие микросферы на полученных изображениях характеризовали с помощью программы ImageJ по двум показателям: 1) положение в двумерных координатах и 2) интенсивность флуоресценции. Первый показатель определяли как положение усредненного центра области флуоресценции каждой выбранной частицы (опция Analyze-Measure-Center of Mass). Второй – как среднее значение интенсивности флуоресценции частицы в единицах градации серого цвета (опция Analyze-Measure-Mean Value). На рис.3 и в табл.1 показан пример результатов такого анализа. Для определения смещений частиц, приближенного к движению в одной плоскости в рамках данной серии, был выбран эмпирический критерий – снижение интенсивности флуоресценции не более чем на 15% по отношению к максимальному. Так, по данным серии снимков, представленных на рис.3 расчет квадрата смещения производился только между точками 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 , удовлетворяющих этому критерию. Перемещение между точками 6 – 7 – 8 не учитывалось, т.к. в точке 7 регистрируемая интенсивность флуоресценции была на 25% меньше максимальной (табл.1), т.е. микросфера «уходила» из плоскости дальше выбранного критерия.

С учетом представленных выше условий были определены значения средних квадратов смещений микросфер в плоскости за время 0,43с. и по формуле (1) была рассчитана вязкость воды (табл.2). Полученные значения вязкости с точностью не хуже 30% совпадают с известным значением этого показателя – 0,89сР, измеренного другими методами [8]. Этот результат свидетельствует о том, что разработанный подход позволяет оценивать вязкость среды, в которой происходит броуновское движение флуоресцирующих частиц.

Табл.2. Вязкость воды, рассчитанная по параметрам броуновского движения микросфер.

Диаметр микросферы (10^{-6}м)	Номер микросферы	Вязкость η±sd (сР)
2,1	1	0,96±0,14
	2	1,05±0,21
	3	0,83±0,18
3,1	1	1,02±0,31
	2	0,76±0,30
	3	0,89±0,27

На микросферах также была разработана методика оценки размеров флуоресцирующих частиц по их изображениям с помощью

программы ImageJ. По этой методике регистрировался профиль интенсивности флуоресценции (опция Analyze-Plot Profile) вдоль оси, проходящей через усредненный центр области флуоресценции (опция Analyze-Measure-Center of Mass). На микросферах с диаметрами 2,1 и 3,1мкм было установлено, что внешним границам микросферы и соответственно ее диаметру соответствует область 85% максимальной интенсивности флуоресценции.

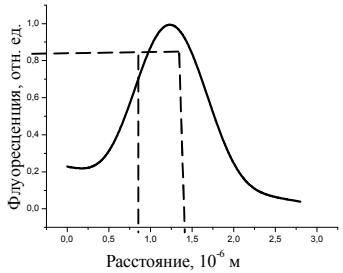


Рис.4. Определение размера КПФ по профилю интенсивности флуоресценции.

С использованием методик, разработанных на микросферах для четырех клеток были измерены внешние размеры КПФ (на рис.4 показан пример такого измерения) и определены средние квадраты смещений за время 0,43с. По этим параметрам рассчитаны значения вязкости в вакуолях для каждой из клеток (табл.3). Как видно из представленных данных, в вакуолях клеток №№1, 2 и 4 измеренные значения вязкости были примерно в 2-3 раза больше, чем у воды. Это приблизительно соответствует вязкости 30-40% растворов глицерина [8]. Существенно большее значение вязкости получено для клетки №3. Однако не исключено, что этот результат является артефактом, обусловленным тем, что движения данного комплекса значительно ограничивались размерами и/или формой вакуоли (рис.3Б).

Табл.3. Размеры КПФ, средние квадраты смещений за время 0,43с и расчетные значения вязкости в вакуолях 4 клеток дрожжей *S. cerevisiae.*

Номер клетки	Размер КПФ (10^{-6}м)	Число учтенных перемещений	Средний квадрат смещения $<s^2>\pm$sd (10^{-13}м^2)	Вязкость $\eta\pm$sd (сР)
1	0,82	23	4,52±1,26	2,16±0,60
2	0,52	25	6,11±1,53	2,52±0,63
3	0,60	39	1,18±0,18	11,3±1,7
4	0,51	42	4,81±1,44	3,32±0,9

Мы не обнаружили в литературе сведений о вязкости не только внутри вакуолей, но и в цитоплазме *S. cerevisiae.* Большинство методов определения внутриклеточной вязкости, которые использовались на других видах клеток, основано на применении флуоресцентных [9,10] или спиновых [11] зондов. Введение в клетки, а тем более избирательно в вакуоли *S. cerevisiae* соответствующих зондов пока продемонстрировано не было. Описана попытка оценить внутривакуолярную вязкость в мицелии гриба *Neurospora crassa* с помощью ядерного магнитного резонанса ядер N^{15} аргинина [12]. Однако, по мнению самих авторов этой работы, полученные результаты не имели однозначной интерпретации. Таким образом, возможность оценки внутривакуолярной вязкости по характеристикам перемещений КПФ является уникальной. Вместе с тем следует отметить, что полученные значения вязкости внутри вакуолей *S. cerevisiae* все-таки пока следует считать ориентировочными, поскольку не известна, в частности, форма КПФ. Одно из возможных направлений развития исследований по этой проблеме – это измерение параметров движения изолированных из клеток или синтезированных *in vitro* КПФ в средах с известной вязкостью.

Автор выражает благодарность М.Г. Винокурову за предоставленные образцы флуоресцирующих микросфер.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Henrici A.T.* //Molds, Yeasts, Actinomycetes. New York. (1947) 2nd 271p.;
2. *Nagel L.* //The Botanical Review. (1948) 14(3): 174-84;
3. *Wiame J.M.* //Biochim. Biophys. Acta (1947) 1: 234-55.
4. *Urech K. et al.* //Arch. Microbiol. (1978) 116(3): 275-8;
5. *Allan R.A., Miller J.J.* //Can. J. Microbiol. (1980) 26(8): 912-20;
6. *Захарченко В.Н.* //Коллоидная химия. М. (1974) 33-8;
7. *Пучков Е.О.* //Микробиология (2006) 75(2): 193-200;
8. *Sheely M.L.* //Ind. Eng. Chem. (1932) 24(9): 1060-4;
9. *Luby-Phelps K. et al.* //Biophys. J. (1993) 65: 236-42;
10. *Bicknese S. et al.* //Biophys. J. (1993) 65:1272-82;
11. *Morse P.D. 2nd* //Meth. Enzymol. A.P. NY, London (1986)127: 239-49;
12. *Kanamori K. et al.* //Biochemistry (1982) 21(20): 4916-20.

ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ РЕЦЕПТОР, ДЛЯ АНАЛИЗА ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Романов Г.А., Ломин С.Н.

Институт физиологии растений РАН, Москва

Введение. Взаимодействие гормона с соответствующим рецептором является первой и критической стадией гормонального

сигналинга в клетке. Характеристики этого взаимодействия важны для последующих внутриклеточных процессов, инициируемых гормоном. Кроме того, высокое сродство к гормону предполагаемого белкового сенсора часто служит решающим аргументом в пользу его рецепторной функции. На практике гормон-рецепторное взаимодействие изучается с использованием выделенного рецепторного белка или изолированной фракции клетки, содержащей рецептор. Как правило, процедура получения рецептора или рецептор-содержащей фракции требует времени, дорогостоящих оборудования и реактивов. Последующий анализ лиганд-рецепторного взаимодействия также нуждается в специальном оборудовании для дискриминации между специфическим и неспецифическим связыванием гормона. Эти трудности нередко усиливаются в случае мембранных рецепторов, которые в ходе очистки часто теряют стабильность и способность связывать гормон (лиганд).

В нашем исследовании свойств эукариотических рецепторов мы применили трансгенные бактерии (*E. coli*), экспрессирующие изучаемый рецепторный белок. В качестве эукариотических рецепторов служили сенсорные гистидинкиназы арабидопсиса CRE1/AHK4 и AHK3. Эти гистидинкиназы представляют собой мультидоменные трансмембранные белки, рецепторы классических фитогормонов цитокининов [1,2]. Ранее было показано, что экспрессируемые в E. coli рецепторы цитокининов способны передавать сигнал на чувствительный промотор [3,4], т.е. присутствуют в бактерии в функционально-активном состоянии. Это создало хорошие предпосылки для использования таких бактерий в опытах по связыванию, т.е. для прямого изучения взаимодействия гормона с рецептором. Важно отметить, что процедура связывания выполняется в условиях низкой температуры и короткого времени инкубации, что делает маловероятным влияние каких-либо метаболических процессов на взаимодействие лигандов с рецептором. Результаты наших исследований [5-7] показывают, что данный быстрый и недорогой метод позволяет определить наиболее существенные характеристики лиганд-рецепторного взаимодействия: константу сродства, лигандную специфичность, зависимость от условий среды.

Результаты. Одна из главных методических задач при изучении лиганд-рецепторного взаимодействия - это количественная дискриминация между связанным и несвязанным лигандом (гормоном). В свою очередь, в случае связанного лиганда надо различать специфическое и неспецифическое связывание [8]. Общепринятым подходом является получение такой смеси рецептора и лиганда (гормона), где взаимодействующие компоненты находятся в разных фазах: обычно рецептор в составе нерастворимых частиц, тогда как гормон полностью растворен в жидкой среде. После инкубации растворимая и нерастворимая фазы могут быть легко разделены,

например, центрифугированием или фильтрацией. При этом связанный и несвязанный лиганд количественно разделяются. Если рецептор экспрессируется в бактерии, он пребывает в нерастворимой фазе, тогда как несвязанный гормон сохраняется в основном в растворимой фазе, за исключением малой доли, механически захваченной бактериальными клетками. Эта малая доля представляет собой неспецифическое связывание. Рецепторы, экспрессирующиеся в бактериях типа *E. coli*, легко доступны для низкомолекулярных гормонов (менее 600-900 кД), а сама бактериальная суспензия достаточно гомогенна и может быть аликвотирована аналогично истинным растворам. Все эти свойства рецептор-экспрессирующих бактерий делают их удобным инструментом для проведения относительно простых по исполнению опытов по связыванию с лигандом.

Для анализа связывания нами был использован высокомеченный тритием цитокинин 3H-транс-зеатин (3H-Z), являющийся меченым двойником активного природного фитогормона [2,8]. Предварительные опыты показали, что связывание 3H-Z трансгенными бактериями происходит быстро даже в ледяной бане, т.е. при температуре около 0^{o}C. Это позволило проводить опыты по связыванию с бактериями при низкой температуре в течение всего 20-30 мин, что было достаточно для достижения равновесия в системе [5-7]. После инкубации, бактерии со связавшимся гормоном осаждали быстрым центрифугированием, супернатант сразу полностью удаляли, а гормон экстрагировали в малом объеме этанола и просчитывали на сцинтилляционном счетчике. Для оценки неспецифического связывания меченый цитокинин смешивали с большим избытком немеченого двойника.

Пример результатов анализа связывания с бактериями, экспрессирующими рецептор CRE1/AHK4, показан на рис.1.

Рассчитанное по уровню радиоактивности тотальное связывание гормона (T) является суммой неспецифического (NS) и специфического (SB) связывания. Из рисунка следует, что неспецифическое связывание представляет собой небольшую долю от тотального связывания; последнее, таким образом, в основном соответствует специфическому высокоаффинному связыванию - SB.

Важно отметить, что подобные характеристики связывания, показанные на рис.1, возможны только при использовании бактерий, экспрессирующих достаточно высокое число (несколько десятков тысяч) рецепторов на клетку. У контрольных бактерий, не экспрессирующих рецепторы цитокининов, тотальное связывание снижается до уровня неспецифического, т.е. специфическое высокоаффинное связывание гормона полностью отсутствует [5].

Связывание гормона с рецептором характеризуется высоким уровнем избирательности. При анализе взаимодействия рецептора

CRE1/AHK4 в составе бактерий с различными лигандами, включающими другие классы фитогормонов (ауксины, гиббереллин, абсцизовую кислоту), структурный аналог цитокинина циклоАМР, а также активный биорегулятор спермин и другие, оказалось, что только цитокинин способен конкурировать с меченым 3H-Z за связывание с рецептором (рис.2).

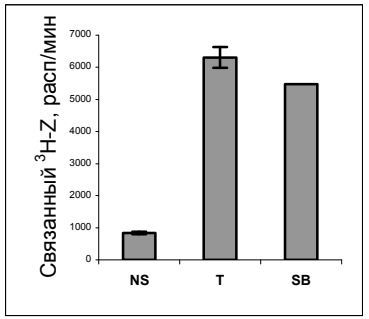


Рис.1. Анализ связывания меченого цитокинина ^{3}H-*транс*-зеатина (^{3}H-Z) с интактными бактериями, экспресс-сирующими рецептор цитокининов CRE1/AHK4.
NS – неспецифическое, T – тотальное, SB – специфическое связывание.

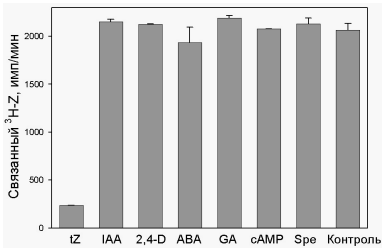


Рис.2. Конкуренция различных фитогормонов и других сигнальных соединений с 3H-транс-зеатином (3H-Z) за высокоаффиное связывание с рецептором CRE1/AHK4. tZ – транс-зеатин; IAA, 2,4-D – ауксины; ABA – абсцизовая кислота; GA – гибберелловая кислота; cAMP – циклоАМР; Spe – спермин; контроль – отсутствие конкурента.

Опыты с трансгенными бактериями позволили оценить также сродство гормона к рецепторам, с применением техники Скетчард-анализа [6,8]. Результаты представлены на рис.3.

Рисунок демонстрирует, что оба рецептора цитокининов имеют высокое сродство к транс-зеатину, причем величины этого сродства типичны именно для гормон-рецепторных взаимодействий [8] и хорошо соотносятся с концентрациями эндогенных цитокининов в растениях [6].

Еще одной важной характеристикой рецепторов является лигандная специфичность. В нашей работе исследование лигандной специфичности проведено с использованием различных клонов трансгенных бактерий и большого набора лигандов, как цитокининов, так и их структурных аналогов. Использовали метод конкурентного вытеснения 3H-Z. В качестве примера на рис.4 показаны результаты анализа конкуренции за связывание с рецептором CRE1/AHK4.

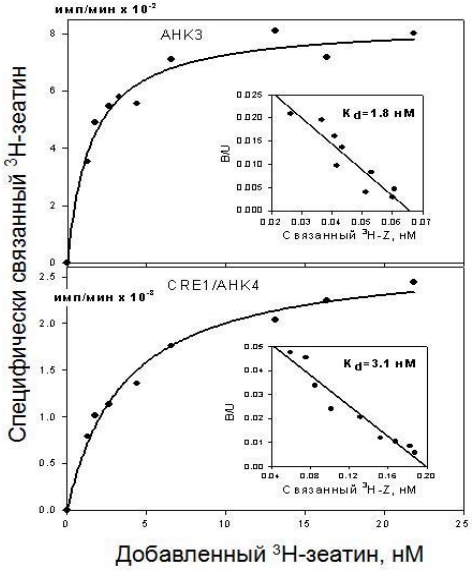


Рис.3. Дозовая зависимость связывания ^{3}H-*транс*-зеатина с рецепторами цитокининов AHK3 и CRE1/AHK4. Кривые связывания линеаризованы в координатах Скетчарда (см. вставки), K_d –рассчитанные кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов гормон-рецептор. B/U –соотношение связанного и свободного гормона.

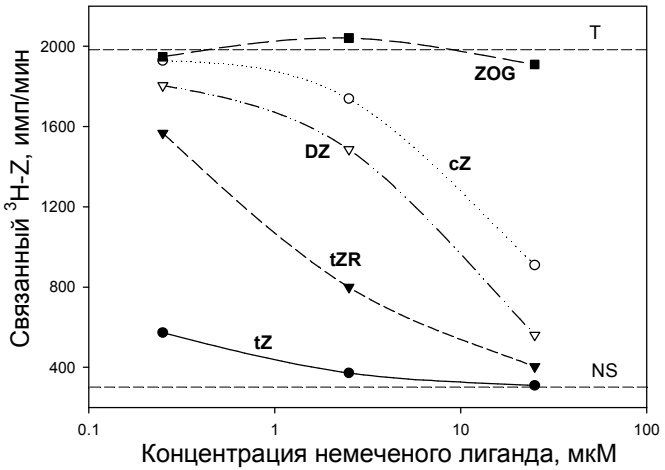


Рис.4. Конкуренция немеченых цитокининов – производных зеатина – с ^{3}H-*транс*-зеатином за высокоаффинное связывание с рецептором CRE1/AHK4. tZ – *транс*-зеатин; tZR – *транс*-зеатин рибозид; DZ – дигидрозеатин; cZ – *цис*-зеатин; ZOG – *транс*-зеатин-*O*-глюкозид.

Обсуждение. Представленные результаты демонстрируют большие возможности метода для анализа гормон-рецепторного взаимодействия. Результаты, полученные при использовании трансгенных бактерий, находятся в хорошем соответствии с результатами, полученными традиционными методами [5]. При этом работа с бактериями существенно проще работы с выделенными рецепторами или очищенными фракциями клетки. Важно и то, что бактериальная система дает возможность изучать конкретный индивидуальный рецептор, экспрессируемый в данном клоне бактерий, а не набор рецепторов, обычно присутствующий в эукариотической клетке. Предлагаемый способ также практически исключает метаболические изменения гормона или рецептора в процессе анализа. Однако у метода есть и определенные ограничения, которые, впрочем, можно обойти. Одно из ограничений связано с тем, что в бактерии часто не реализуются вторичные модификации рецепторного белка (гликозилирование, фосфорилирование и т.п.), которые иногда могут быть важны для реализации его сигнальных функций. Другое ограничение связано со строением внешней оболочки E. coli, поры которой свободно пропускают к плазматической мембране только соединения небольшого молекулярного веса, не более 600-900 кДа. Однако молекулярный вес абсолютного большинства известных небелковых гормонов животных и растений не превышает указанных пределов.

Работа поддержана РФФИ №07-04-00331, №08-04-90429-Укр, Программой Президиума РАН по МКБ, а также НШ-3444.2008.4

ЛИТЕРАТУРА

1. *Романов Г.А.* //Физиология растений (2002) 49(4): 615-25;
2. *Романов Г.А.* //Физиология растений (2009) 56(2): 295-319;
3. *Suzuki T. et al.* //Plant Cell Physiol. (2001) 42: 107-13;
4. *Spichal L. et al.* //Plant Cell Physiol. (2004) 45: 1299-305;
5. *Romanov G.A. et al.* //Analyt. Biochem. (2005) 347: 129-34;
6. *Romanov G.A., Lomin S.N., Schmlling T.* //J. Exp. Botany (2006) 57: 4051-8;
7. *Romanov G.A., Lomin S.N.* //Plant Hormones (2009) 495: 111-20;
8. *Ломин С.Н., Романов Г.А.* //Физиология растений (2008) 55(2): 283-99.

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫЕ КАЛИЕВЫЕ ТОКИ В КУЛЬТУРЕ ГИПОФИЗАРНЫХ КЛЕТОК GH3 КРЫСЫ

Ситдикова Г.Ф.[1], Weiger T.M.[2], Hermann A.[2]

[1] Казанский государственный университет
[2]University of Salzburg, Dept. of Cell Biology, Salzburg, Austria

Сероводород (H_2S) относится к классу газообразных посредников наряду с оксидом азота (NO) и монооксидом углерода (CO), выполняя целый ряд физиологических функций [1,2]. H_2S продуцируется эндогенно во многих типах клеток из L-цистеина с помощью ферментов цистатионин β-синтазы и цистатионин γ-лиазы [3]. H_2S модулирует нейрональную активность [2,4], вызывает расслабление гладкой мышцы [1], регулирует секрецию адренокортикотропного гормона из гипоталамуса [5] и освобождение медиатора из двигательного нервного окончания [6]. Среди ионных каналов возможными мишенями действия H_2S в разных тканях могут быть кальциевые и калиевые каналы [7,8,9]. Кальций активируемые калиевые каналы большой проводимости (BK) участвуют в регуляции целого ряда клеточных функций, таких как секреция гормонов и медиаторов, регуляция сосудистого тонуса и многие другие [10]. Работа BK-каналов может модулироваться целым рядом внутри- и внеклеточных факторов, включая их окислительно-восстановительный статус [10,11]. Показано, например, что NO и CO модулируют активность BK-каналов и, таким образом, проявляют свои эффекты в различных типах клеток и тканей [12,13]. Данные в литературе об эффектах H_2S на кальций-активируемые калиевые каналы отсутствуют. GH3 клетки широко используются для исследования активности BK каналов в естественных условиях. Целью нашей работы было оценить эффекты H_2S на BK каналы в GH3 клетках с использованием метода регистрации одиночных ионных каналов.

Объект и методы исследования. Эксперименты проводились на культуре гипофизарных клеток крысы GH3, полученных из коллекции микроорганизмов и клеточных культур ФРГ. Клетки культивировались при температуре 37°C и влажности 90% с растворе MEM (Minimal Essential Medium), дополненным 7% FCS (fetal calf serum) и 3% HS (horse serum). Для экспериментов клетки растили в чашках Петри на покровных стеклах, покрытых poly-D-lysine. Регистрацию электрических ответов проводили на 3-4 дни после высаживания. Электрофизиологические эксперименты проводились, как было описано ранее [14]. Пэтч-пипетки изготавливались из боросиликатного стекла (Havard Apparatus) и имели сопротивление 3-6 Mom. Регистрация в режиме whole cell или outside out

проводилась с использованием усилителя Axopatch-200B с использованием программы Clamp10 (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Стандартный внеклеточный раствор содержал в мМ: 145 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 10 HEPES, pH 7.2, осмомолярность 305 мОсм. Внутрипипеточный раствор содержал в мМ: 145 KCl, 1 $MgCl_2$, 5 EGTA, 3.63 $CaCl_2$ (0.5мкМ свободного Ca^{2+}), 10 HEPES, pH 7.2. Гидросульфид натрия (NaHS) использовали в качестве донора H_2S [15]. Используемые реактивы получены из фирмы Sigma (Vienna, Austria). Вероятность открытия канала оценивали по формуле $P_{open}=[t_o/t_{tot}]n$, где P_{open}=вероятность открытия одного канала, t_o=сумма значений открытого состояния, t_{tot}=общее время регистрации, n=количество регистрируемых каналов в отдельном эксперименте. Достоверность полученных результатов определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. H_2S обладает липофильными свойствами и хорошо проницает через плазматические мембраны [1], поэтому мы аппликировали донор H_2S - NaHS во внеклеточный раствор. NaHS использовался в качестве донора H_2S так как в водных растворах 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^- [4].

Следовательно, при использовании NaHS в концентрации 300мкМ, эффективная концентрация газа H_2S составляла примерно 100мкМ, что находится в пределах значений H_2S, обнаруженных в различных тканях млекопитающих (от 10 до 160мкМ) [16–18]. Аппликация донора H_2S NaHS в концентрации 300мкМ во внеклеточный раствор приводила к значительному и обратимому усилению выходящих калиевых токов в режиме регистрации whole-cell (рис.1a). Ионные токи вызывались в ответ на серии деполяризующих импульсов от -60мВ до +150мВ с шагом в 20мВ. Внеклеточная аппликация тетраэтиламмония (ТЭА) (1мМ), который блокирует BK каналы в субмиллимолярных концентрациях [19,20], снижала выходящие токи и предотвращала действие NaHS (n=5). Вычитание токов в контроле и действии NaHS выявило, что сероводород усиливает компонент выходящих токов, обусловленный Ca^{2+}-активируемыми K^+ токами большой проводимости (рис.1b). На рис.1c представлена вольтамперная характеристика для выходящего тока в контроле и при действии газа.

В конфигурации outside-out регистрировали активность одиночных BK каналов. Аппликация NaHS в перфузионный раствор приводила к доза-зависимому увеличению активности каналов, эффективная концентрация (EC) NaHS составила 90.14мкМ. Вероятность открытия (Po) BK-каналов при потенциале +60mV (концентрация свободного Ca^{2+} в пипетке 0.5мкМ) в контроле составила 0.043±0.007 (n=11).

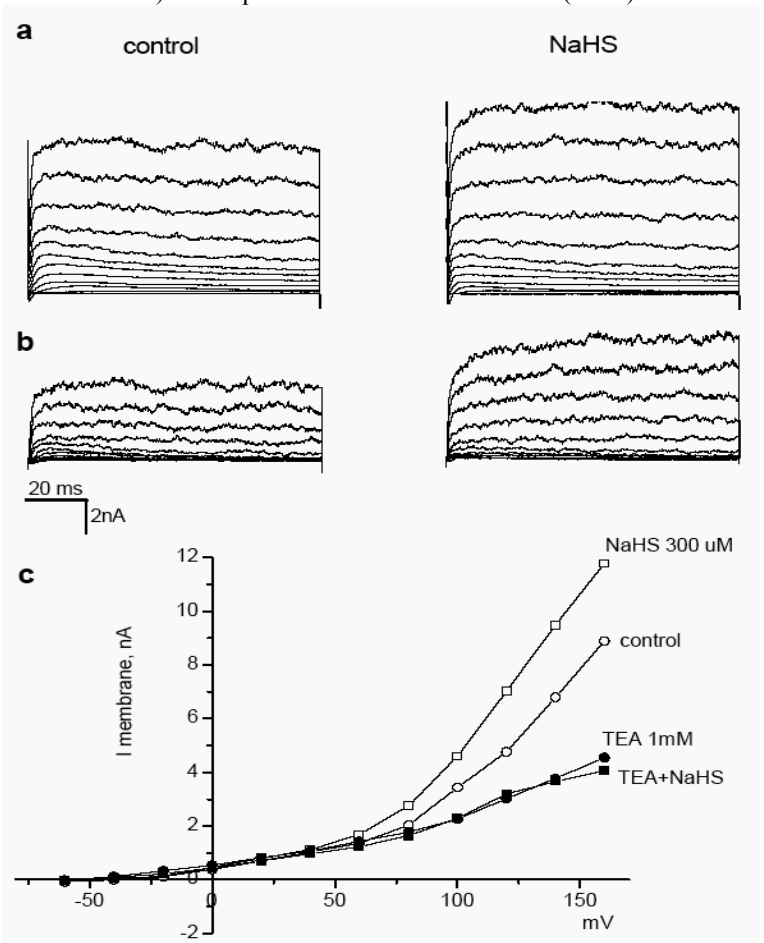


Рис.1. Сероводород (H_2S) активирует Ca^{2+}-активируемые калиевые токи в GH3 клетках a). Общие мембранные токи при регистрации whole cell в ответ на серию деполяризующих импульсов, начиная с -60мВ до +150мВ с шагом 20мВ до (control) и после аппликации донора H_2S (300мкМ NaHS). b) Вычитание выходящих токов на фоне действия тетраэтиламмония (TEA) (1мМ), подавляющего Ca^{2+}-активируемые калиевые токи, из общих выходящих токов выявило усиление Ca^{2+}-активируемых калиевых токов при действии NaHS. c) Вольтамперная характеристика выходящих токов до (control) и после аппликации NaHS (300мкМ) показала усиление токов в присутствие H_2S. Эффект NaHS предотвращался аппликацией TEA (1мМ).

Аппликация NaHS (300мкМ) вызывала достоверное увеличение вероятности открытия одиночного канала до 0.084±0.011 (213±14%) (n=11, p<0.001) и увеличение среднего времени открытого состояния от 1.83±0.12мс (n=11) до 2.53±0.37мс (n=11, p<0.001) уже в течение первой минуты аппликации. Амплитуда токов одиночных каналов не изменилась (16.06±0.26пА в контроле и 16.78±0.23пА - после аппликации NaHS, n=11, p>0.05). Активность каналов возвращалась к исходному уровню после отмывки контрольным раствором. NaHS (300мкМ) не вызывал достоверных изменений воротной кинетики каналов.

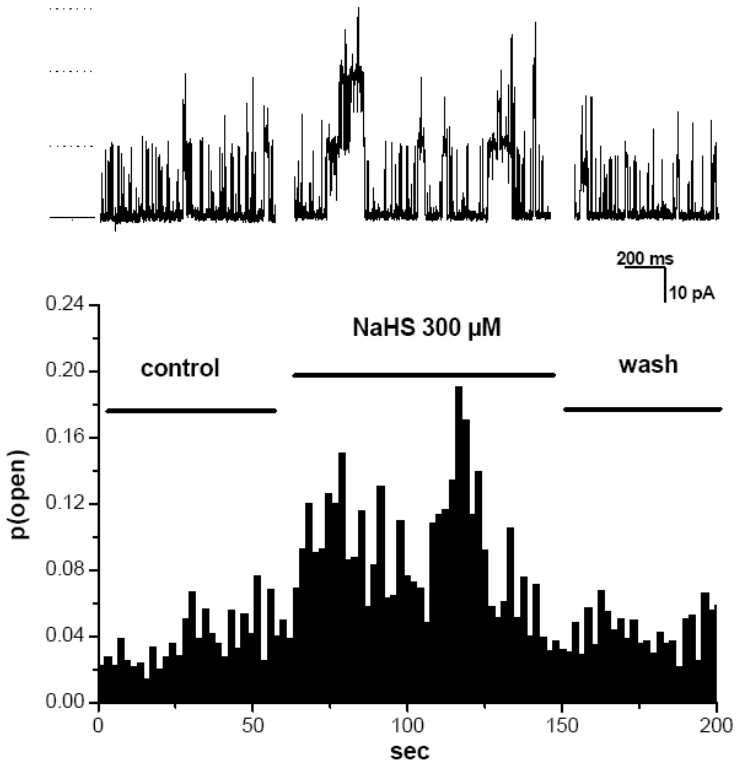


Рис.2. H_2S увеличивает вероятность открытия одиночных BK-каналов - P(open). График показывает Po в контроле, в течение аппликации NaHS (300мкМ) и возвращение к уровню активности в контроле после отмывки. Вверху представлены оригинальные записи активности каналов в контроле, при действии NaHS после отмывки.

Таким образом, нами впервые было показано, что NaHS, донор H_2S, обратимо стимулирует Ca^{2+}-активируемые K^+ токи (BK) в культуре гипофизарных клеток крысы GH_3 и повышает вероятность открытого состояния (Po) BK-каналов доза-зависимым образом без изменения амплитуды и воротных свойств канала. Полученные данные свидетельствуют о том, что H_2S, действуя на клеточные белковые мишени, может являться внутри- и межклеточным посредником.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wang R.* //FASEB J. (2002) 16: 1792-98;
2. *Li L., Moore P.K.* //Trends Pharmacol. Sci (2008) 29: 84- 90;
3. *Lowicka E., Beltowski J.* //Pharmacol. Repots (2007) 59: 4-24;
4. *Abe K., Kimura H.* //J. Neurosci (1996) 16: 1066–1071;
5. *Russo C.D. et al.* //J. Neuroendocrinol. (2000) 12:225–33;
6. *Gerasimova E.V., Sitdikova G.F., Zefirov A.L.* //Neurochem. J. (2008) 2(1-2): 120–126;
7. *Garcia-Bereguiain M.A. et al.* //Antioxidants & Redox Signaling (2008) 10(1):31-41;
8. *Kawabata A.* et al. //*Pain* (2007) 132**:** 74-81;
9. *Zhao W. et al.* //EMBO J. (2001) 20**:**6008–6016;
10. *Weiger T.M., Hermann A., Levitan I.B.* //J. Comp. Physiol. (2002) 188(2):79-87;
11. *DiChiara T.J., Reinhart P.H.* //J. Neurosci. (1997) 17: 4942-55;
12. *Wang R., Wu L.* //J. Biol. Chem. (1997) 272**:** 8222-6;
13. *Bolotina V.M., Najibi S., Palacino J.J.* //Nature (1994) 368: 850-3;
14. *Jakab M. et al.* //Acta Physiol. (2006) 187: 51-9;
15. *Reiffiensten R.J., Hulbert W.S, Roth S.H.* //Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. (1992) 32: 109-34;
16. *Goodwin L.R., Francom D., Dieken F.P.* //J. Anal. Toxicol. (1989) 13: 105-109;
17. *Warenycia M.W. et al.* //Biochem. Pharmacol. (1989) 38**:** 973-81;
18. *Savage J.C., Gould D.H.* //J. Chromatogr. (1990) 526, 540-5;
19. *Hermann A., Gorman A.L.* //J. Gen. Physiol. (1981) 78: 87-110;
20. *Lang, D.G., Ritchie A.K.* //J.Physiol. (1990). 425: 117-32.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФОСФОЛИПАЗЫ А2 ГРУППЫ IIА КАК МАРКЁРА МИКСОМЫ СЕРДЦА ЧЕЛОВЕКА С ВЫСОКИМ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ

Хаспеков Г.Л.[1], Скамров А.В.[1], Шереметьева Г.Ф.[2], Нечаенко М.А.[2], Винницкий Л.И.[2], Власик Т.Н.[1], Горюнова Л.Е.[1], Руткевич Н.М.[1], Пекло М.М.[1], Феоктистова Е.С.[1], Бибилашвили Р.Ш.[1]

[1]Институт экспериментальной кардиологии РКНПК Росмедтехнологий РФ, Москва
[2]Российский научный центр хирургии им. Б.В. Петровского РАМН

Введение. Опухоли сердца являются предметом изучения такой относительно недавно сформировавшейся области медицинской науки, как кардиоонкология. Эта область медицины прошла в своём развитии путь от первоначального отрицания самой возможности неопластического процесса в сердце через описание отдельных секционных наблюдений до прижизненного распознавания и успешного хирургического лечения опухолевых образований сердца. Из-за особенностей локализации внутрисердечное образование любой природы, как доброкачественной, так и злокачественной, требует безотлагательной резекции в ходе кардиохирургической операции.

Частота встречаемости первичных опухолей сердца составляет не более 0,1% (по некоторым оценкам около 0,02%), то есть заболевание относится к группе очень редких. Среди всего разнообразия первичных опухолей сердца наиболее распространённой является миксома сердца, составляющая до 90% от общего числа зарегистрированных в клинической практике случаев [3,5,18,19]. Точное определение диагноза по материалу удалённой в ходе операции опухоли имеет принципиальное значение, так как в случае типирования такой опухоли как «миксома» (с доброкачественным течением) послеоперационный прогноз для пациента является оптимистическим. Обратная ситуация наблюдается при резекции других, более редких, типов опухолей сердца, многие из которых отличаются злокачественной природой и высокой склонностью к возникновению повторного неопластического процесса.

В представленном исследовании впервые показана гиперэкспрессия фосфолипазы А2 группы IIА (PLA2G2A) на уровне мРНК и белка в миксомах сердца человека. В процессе выполнения работы постадийно пройден путь от анализа профиля экспрессии генов в опухоли до иммуногистохимического (ИГХ) тканевого маркёра.

Результаты и обсуждение. Исследуемыми образцами явились первичные опухоли сердца, удалённые в ходе хирургических операций, проведённых в Российском научном центре хирургии им. акад. Б.В. Петровского РАМН. В каждом случае диагноз подтверждался в ходе послеоперационного гистологического исследования. Возраст пациентов находился в диапазоне от 7 до 76 лет, женщин – 10, мужчин – 3. В общем списке опухолей сердца всего было проанализировано 8 образцов миксомы, 2 образца мезенхимомы, по одному образцу липомы, неврилеммомы и папиллярной фиброэластомы. Внешне нормальный аутопсийный материал сердца, аорты, толстого и тонкого кишечника был получен в ходе постмортальных патологоанатомических исследований.

На этапе анализа профилей экспрессии генов с применением микроэррейной технологии радиоактивно меченная кДНК, синтезированная на суммарной РНК из индивидуальных миксом сердца, гибридизовалась с матрицами Atlas™ (Clontech, США). С учётом частичного перекрывания наборов генных зондов на разных Atlas™ Array матрицах, всего проанализирован уровень экспрессии 2051 индивидуального гена человека.

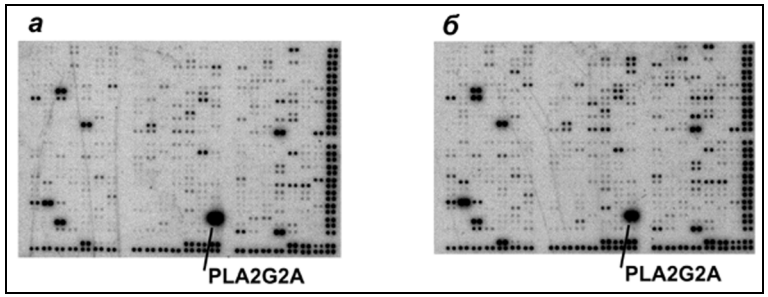


Рис.1. Транскрипционный профиль миксомы сердца. Результаты гибридизации радиоактивно меченной кДНК, синтезированной на РНК из образцов миксомы №2(а) и №3(б), с транскрипционной матрицей Cardiovascular Atlas™ Array.

На рисунке 1 приведена картина гибридизации образцов миксомы №2 и №3 с генной матрицей Cardiovascular Atlas™ Array. Большой объём данных, получаемых в одном опыте, не позволяет провести полный анализ картины экспрессии (транскрипционного профиля) с использованием только визуального сравнения картин гибридизации, а требует анализа численных значений интенсивностей гибридизационных сигналов. Тем не менее, некоторые особенности картины экспрессии можно заметить и при визуальном анализе. Как видно из рисунка 1, сигналы гибридизации с отдельными зондами значительно отличаются между собой, что свидетельствует о значительной разнице в уровнях экспрессии соответствующих генов в опухоли. Примечательно, что общий вид картины гибридизации не изменяется от миксомы к миксоме (рис.1) и отличается от картины гибридизации для других

проанализированных тканей [22]. Таким образом, можно сделать вывод о том, что миксомы сердца имеют характерный транскрипционный профиль.

При внимательном анализе этих профилей обращает на себя внимание группа генов, экспрессия которых всегда увеличена в миксоме по сравнению с другими тканями. Такие гены могут служить транскрипционными маркёрами миксом сердца, т.к. высокий уровень их экспрессии отличает миксомы сердца от других нормальных и опухолевых тканей. Результатом статистического анализа профилей с использованием описанного подхода было выделение группы генов-кандидатов в экспрессионные маркёры миксомы сердца [22]. Ген фосфолипазы А2 группы IIA (PLA2G2A) выделяется среди всех отобранных генов–кандидатов даже при визуальном анализе картин гибридизации высоким уровнем сигнала. Интенсивность сигнала гибридизации опухолевой РНК с PLA2G2A-пробой является одной из самых высоких среди всех сигналов на матрице, (рис.1а,б), а при гибридизации РНК из нормальных тканей сигнал с PLA2G2A–пробой либо не виден, либо слабо отличается от фона [22].

Следующим этапом тестирования *PLA2G2A* как потенциального транскрипционного маркёра миксомы сердца человека стала проверка при помощи ОТ–ПЦР (полимеразной цепной реакции, совмещённой с обратной транскрипцией) и Нозерн–гибридизации.

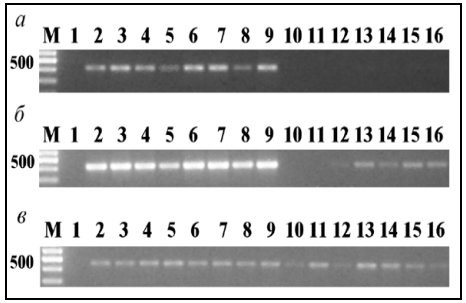


Рис.2. Сравнение уровня экспрессии PLA2G2A в миксоме, нормальных тканях и опухолях сердца, отличных от миксомы, методом ОТ-ПЦР. Выявление ампликона мРНК *PLA2G2A* после 20 циклов(а*)* и 24 циклов *(*б*)* ПЦР (размер ампликона – 416п.н); в - 26 циклов амплификации с праймерами для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (размер ампликона – 452п.н.). 1 - контрольный образец без добавления РНК; 2 - миксома обр. №1; 3 - миксома обр. №2; 4 - миксома обр. №3; 5 - миксома обр. №4; 6 - миксома обр. №9; 7 - миксома обр. №11; 8 - миксома обр. №12; 9 - миксома обр. №13; 10 - мезенхимома обр. №10; 11 - мезенхимома обр. №15; 12 - липома обр. №16; 13 - сердце; 14 - аорта; 15 - толстый кишечник; 16 - тонкий кишечник; М-100–нуклеотидный ДНК-маркёр молекулярной массы (Fermentas, Литва), размерность – пары нуклеотидов.

На рисунке 2 представлен результат ОТ-ПЦР анализа экспрессии PLA2G2A в группе опухолей сердца, включавшей 8 разных образцов миксомы сердца, 2 независимых образца мезенхимомы сердца и один образец липомы сердца, а также нормальные ткани, где по данным литературы и предыдущим результатам этот ген работает в здоровом организме: сердце, аорта, тонкий кишечник и толстый кишечник.

Информационная РНК (мРНК) гена PLA2G2A выглядит как перспективный молекулярный маркёр миксомы сердца при определении принадлежности удалённой опухоли к этому типу опухолей. Следует отметить, что увеличение числа одновременно выявляемых маркёров при исследовании операционного материала повышает точность диагностики. В способе диагностики миксом сердца, запатентованном с участием группы авторов из нашей лаборатории, предложена процедура выявления в ткани опухоли сердца шести транскрипционных (молекулярных) онкомаркёров с методикой нормализации получаемых сигналов (патент на изобретение RU2261446 [1]).

Подтверждение специфичной и воспроизводимой экспрессии PLA2G2A на высоком уровне в образцах миксомы сердца по сравнению с нормальными тканями и другими опухолями сердца получено методом иммуноблоттинга [7]. Картина иммуноблоттинга согласуется с картиной профиля экспрессии мРНК гена PLA2G2A в нормальных и опухолевых тканях. При этом идентифицируется много белка PLA2G2A, как и мРНК *PLA2G2A* на этапах Нозерн–гибридизации и ОТ-ПЦР анализа, во всех образцах миксом и отсутствует белок или его очень мало в нормальных тканях и других проанализированных опухолях сердца (два независимых образца мезенхимомы и липома) [7]. Обращает на себя внимание не менее чем 50-кратное различие в пользу миксомы в уровне содержания белка PLA2G2A [6].

Для выявления белкового антигена PLA2G2A в тканях опухолей сердца был применён метод иммуногистохимического анализа белка на тканевых срезах. На рисунке 3 показан в качестве примера результат такого анализа. Миксома в этом случае имела характерное гистологическое строение.

Однако не во всех случаях миксомы имеют характерное строение. Для этой опухоли хорошо известно разнообразие вариантов гистологического строения. В таких случаях установление верного диагноза сильно осложняется. Интенсивное специфическое окрашивание воспроизводимо развивается во всех образцах миксом, независимо от гистологических особенностей конкретного образца опухоли [7]. Обычно при обсуждении чувствительности выявления белкового маркёра на срезах опухолевой ткани применяют системы условной оценки в баллах (или в количестве знаков «плюс») доли окрашиваемых клеток от их общего числа в сочетании со степенью интенсивности окрашивания [4].

В данном случае, в силу тотального и очень интенсивного, устойчивого характера специфического иммуногистохимического окрашивания срезов миксом, нет оснований для применения подобной системы. Иммуногистохимического окрашивания не развивалось при выполнении такой же методической процедуры на срезах других проанализированных опухолей сердца, а именно двух мезенхимом, неврилеммомы, папиллярной фиброэластомы [6].

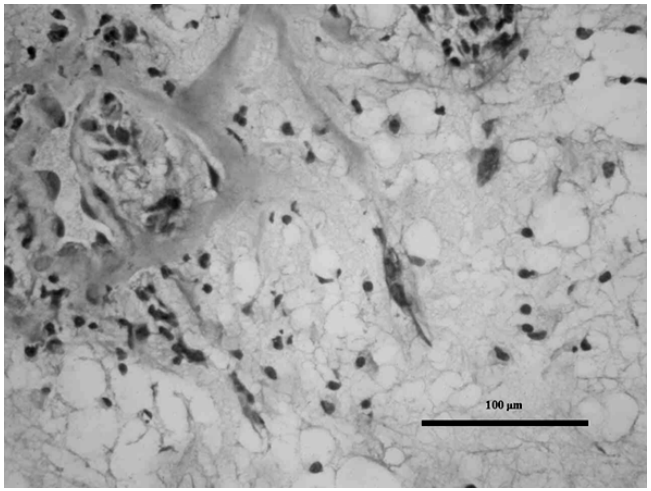


Рис.3. Иммуногистохимическое выявление высокой экспрессии PLA2G2A на криосрезах образца №11 миксомы, ×400.

Благодаря особенностям аминокислотного состава, фосфолипаза А2 группы IIA при физиологических условиях заряжена положительно, что предопределяет её высокое сродство к кислым гликозаминогликанам и коллагенновым волокнам [20,21]. Этими компонентами очень богата ткань миксомы [5,25], что и приводит к положительной иммуногистохимической реакции внеклеточного матрикса, продемонстрированной нами. Однако самое интенсивное окрашивание развивается внутри клеток миксомы, где происходит синтез фермента и его накопление до этапа секреции в окружающий внеклеточный матрикс. Наиболее интенсивно окрашенные клетки в ткани миксомы находятся в клеточных тяжах и внутри лакунарных структур.

Как фермент PLA2G2A гидролизует фосфодиэфирную связь во втором положении (sn–2) фосфолипидов с высвобождением остатка жирной кислоты и сложноэфирного ядра на основе молекулы глицерина, в качестве которого могут образовываться физиологически активные молекулы лизофосфатидилхолина и лизофосфатидата (относятся к

группе липидных медиаторов) [9,15,26]. При высвобождении остатка арахидоновой кислоты происходит запуск синтеза биологически активных веществ – простагландинов, простациклинов, тромбоксанов, липоксинов и лейкотриенов, для которых арахидоновая кислота является общим предшественником в процессах биосинтеза [8,10]. Таким образом, PLA2G2A принимает участие в широком спектре нормальных и патологических процессов в организме, включая реакции воспалительного ответа.

Фосфолипаза PLA2G2A, находящаяся в просвете кишечной трубки, по–видимому, выполняет регуляторные и эффекторные функции по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, которые как попадают в желудочно-кишечный тракт с пищей, так и присутствуют там в виде облигатной флоры [17,27]. Высокое содержание PLA2G2A обнаруживается при тяжёлых воспалительных заболеваниях кишечника: болезни Крона и неспецифическом язвенном колите. Это даёт возможность ряду авторов обсуждать возможную взаимосвязь воспалительных заболеваний кишечника с нарушениями процессов синтеза и функционирования PLA2G2A в кишечнике [13,16]. Также необходимо отметить, что обсуждается ключевая роль PLA2G2A в развитии аденокарциномы простаты [11,24], где и в нормальном состоянии экспрессия этого фермента высока [14,23]. А повышенная экспрессия PLA2G2A во многих тканях трансгенных по этому гену мышей и крыс приводит в числе прочих симптомов к сильному кератозу дермального слоя кожи без признаков септического поражения [12]. Учитывая изложенные факты, а также, принимая во внимание физиологически активную функцию и исключительно высокое содержание, можно предположить весьма существенную роль PLA2G2A в возникновении и развитии миксомы.

Заключение. Таким образом, на основе выявления высокой экспрессии ранее неизвестного маркёрного гена был разработан и предложен способ послеоперационной дифференциальной патологогистологической диагностики миксом сердца с использованием антител к охарактеризованному, сильно выраженному и специфичному иммуногистохимическому маркёру – фосфолипазе А2 группы IIA, что стало основой заявки на изобретение, изложенной в патенте RU2271008 [2], получившем одобрение. Назначение предлагаемого способа – отличить миксому сердца от других первичных опухолей сердца. Прогностическая значимость – способ послеоперационной идентификации наиболее часто встречающейся первичной опухоли сердца с доброкачественным течением и низким процентом рецидивирования (исключение – около 10% случаев наследственной формы заболевания, миксомного синдрома), а также способ проверки тканей эмболов неясного генеза на возможную принадлежность к ранее

не диагностированной миксоме сердца (в первую очередь, возможна дифференциальная диагностика с тромбоэмболами). Предлагаемый способ не должен заменить давно используемые, проверенные способы диагностики по срезу ткани опухоли с использованием общегистологических красителей (в частности гематоксилин и эозин, альциановый синий), а должен способствовать установлению правильного диагноза в случае затруднений и стать дополнительным методом исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бибилашвили Р.Ш., и др.* //Бюлл. ФГУ ФИПС «Изобретения. Полезные модели» (2005) 27;
2. *Бибилашвили Р.Ш., и др.* //Бюлл. ФГУ ФИПС «Изобретения. Полезные модели» (2006) 6;
3. *Нечаенко М.А., и др.* //Хирургия (1994) (6):8-13;
4. *Петров С.В., Райхлин Н.Т.* //Рук. по иммуногистохим. диагностике опухолей человека, Казань (2004) 456с.;
5. *Петровский Б.В., Константинов Б.А., Нечаенко М.А.* //Первичные опухоли сердца, М. (1997) 152с.;
6. *Хаспеков Г.Л.* //Автореф. дис. к.б.н, М. (2008) 24с.;
7. *Хаспеков Г.Л., и др*. //Арх. пат. (2008) 70(2): 31-6;
8. *Dennis E.A., et all* //FASEB J. (1991) 5: 2068-77;
9. *Fourcade O., et al*. //Cell (1995) 80: 919–27;
10. *Goetzl E.J., An S., Smith W.A.* //FASEB J. (1995) 9: 1051-8;
11. *Graff J.R.,. et al*. IClin. Cancer Res. (2001) 7: 3857-61;
12. *Grass D.S., et al*. //J. Clin. Invest. (1996) 97: 2233-41;
13. *Haapamaki M.M., et al.* //Gut (1997) 40: 95-101;
14. *Kallajoki M., et al.* //Prostate (1998) 35: 263-72;
15. *Kume N., et al.* //J. Clin. Invest. (1992) 90: 1138-44;
16. *Minami T., et al.* //Gut (1994) 35: 1593-98;
17. *Nyman K.M., et al.* //J. Histochem. Cytochem. (2000) 48: 1469-77;
18. *Perchinsky M.J., Lichtenstein S.V., Tyers F.O.* //Cancer (1997) 79: 1809-15;
19. *Roberts W.C.* //Am. J. Cardiol. (1997) 80: 671-81;
20. *Romano M., et al* //Artherioscler. Thromb. Vasc. Biol. (1998) 18: 519-25;
21. *Sartipy P., et al.* //J. Biol. Chem. (1996) 271: 26307-14;
22. *Skamrov A.V., et al.* //J. Mol. Cell. Cardiol. (2004) 37: 717-33;
23. *Su A.I., et al.* //Cancer Res. (2001) 61: 7388-93;
24. *Sved P., et al.* //Cancer Res. (2004) 64: 6934-40;
25. *Tanimura A., et al*. //Hum. Pathol. (1988) 19: 316-22;
26. *Yamakawa T., et al*. //Biomed. Res. (2008) 29: 1-8;
27. *Yoshikawa T., et al*. //J. Histochem. Cytochem. (2001) 49: 777-82.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ ДИМЕРИЗАЦИИ В ПРОЦЕССАХ АКТИВАЦИИ ЭФРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ EPHA1И EPHA2 МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Шаронов Г.В.[1,2], Астапова М.В.[1], Колосов П.М.[1], Арсеньев А.С.[1], Феофанов А.В.[1]

[1]Институт биоорганической химии РАН, Москва
[2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение. Эфриновые рецепторы (Eph), принадлежащие к семейству рецепторных тирозинкиназ (РТК), играют центральную роль в дифференцировке и формировании пограничных тканей, участвуют в ангиогенезе, миграции клеток и, согласно последним данным, вовлечены в канцерогенез [1-4]. Связывание Eph с лигандом (эфрином) приводит к фосфорилированию тирозиновых остатков Eph, что инициирует внутриклеточный сигнальный каскад [5]. Как и для большинства РТК, для некоторых Eph было показано, что при связывании с лигандом они образуют димеры или кластеры более высокого порядка [6-8]. Для рецепторов EphA1 и EphA2 пока нет данных о димеризации и/или кластеризации; кроме того, роль этих процессов в активации всех Eph остается малоизученной. Причинами недостатка данных о роли олигомеризации рецептора являются ограничения традиционных методов анализа. Так большинство данных о димеризации Eph получено при исследовании кристаллизованных комплексов рецептор/лиганд с помощью рентгеновской кристаллографии [7,8]. В тоже время, для выявления активации и сигнального каскада в подавляющем числе работ используется биохимический анализ клеточных лизатов. Очевидно, что для построения взаимосвязи между олигомеризацией и активацией необходим подход, который позволяет регистрировать оба этих события в максимально близких условиях, в идеальном случае – в отдельно взятой клетке. Для реализации данного подхода могут быть использованы современные методы оптической микроскопии, такие как регистрация эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции (fluorescence resonance energy transfer, FRET) и измерение восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP). FRET позволяет идентифицировать взаимодействие между двумя флуоресцентно-меченными молекулами. С помощью FRAP можно выявить мобильную и неподвижную фракции молекул [9]. В данной работе мы разработали подход, позволяющий использовать описанные выше методы для изучения роли олигомеризации в активации эфриновых рецепторов EphA1 и EphA2 в отдельных клетках.

Результаты

Экспрессия флуоресцентно-меченных EphA1 и EphA2. Нами были созданы плазмиды для экспрессии в эукариотических клетках EphA1 и EphA2, слитых с флуоресцирующими белками. В качестве флуоресцирующих белков были выбраны циановый (CFP) и желтый (YFP) флуоресцирующие белки, поскольку известно, что они являются донор-акцепторной парой, для которой реализуется эффект FRET (FRET-пара). Введение генов белков слияния в клетки осуществляли методом липосомальной трансфекции. При этом количество клеток, интенсивно экспрессирующих введенный ген, достигало максимума через 48ч после трансфекции и составляло 2-10%. Поскольку для FRET необходимо присутствие как CFP-, так и YFP-меченного рецептора в одной клетке, осуществлена совместная трансфекция клеток двумя плазмидами, но при этом количество клеток, содержащих оба слитых белка, не превышало 1%. Кроме того, данная схема трансфекции не позволяла добиться воспроизводимого результата и одинакового уровня синтеза CFP- и YFP-меченного рецептора, необходимого для надежной регистрации FRET. Чтобы преодолеть эти ограничения, проведена работа по получению линий клеток, стабильно синтезирующих слитые рецепторы. Установлено, что для решения данной задачи метод селекции клеток антибиотиком не применим. Вероятно, это связано с тем, что усиленный синтез EphA2, и в особенности EphA1, замедляет рост клеток и снижает их адгезию к субстрату. В результате селекции антибиотиком в культуре начинают доминировать клетки, в которых устойчивость к антибиотику сочетается с низким уровнем синтеза целевых рецепторов. Решение поставленной задачи найдено с использованием метода флуоресцентно–активированной клеточной сортировки. Для этого из общей популяции трансфецированных клеток HEK293 один раз в неделю выделяли клетки, синтезирующие слитый белок, которые культивировали далее. Через 4 недели такой селекции получали культуру, в которой около 90% клеток стабильно и интенсивно синтезировали целевой флуоресцентно-меченный рецептор. Были получены линии клеток HEK293, стабильно синтезирующие EphA1-CFP, EphA2-YFP и EphA2-CFP. На основе клона клетки, синтезирующей EphA2-CFP, была также создана стабильная линия клеток, синтезирующих совместно EphA2-CFP и EphA2-YFP.

Регистрация FRET. В данной работе для регистрации FRET мы использовали два подхода, основанных на лазерной сканирующей конфокальной микроскопии: метод индуцированной эмиссии (ИЭ) и метод фотообесцвечивания акцептора. Метод ИЭ позволяет измерять эффективность FRET в динамике, в то время как методом фотообесцвечивания акцептора повторная регистрация FRET в одной и той же области клетки невозможна. В методе ИЭ регистрируется эмиссия акцептора FRET-пары (YFP) при возбуждении донора FRET-пары (CFP),

наличие которой и указывает на наличие эффекта FRET. Однако на практике редко удается возбуждать донор и регистрировать акцептор со 100% избирательностью: практически всегда присутствует неспецифическое возбуждение самого акцептора и "затекание" флуоресценции донора в канал регистрации акцептора. Неспецифическую флуоресценцию необходимо вычитать из канала регистрации FRET, но используемые для этого программы имеют ряд ограничений, основное из которых – отсутствие возможности анализировать FRET во временных сериях изображений. Поэтому нами разработан и используется специальный программный модуль, который подключается к программе анализа изображений ImageJ, и позволяет преодолевать ряд существовавших методических ограничений (программный модуль может быть загружен с http://cytometry.ru/interactive–fret.html).

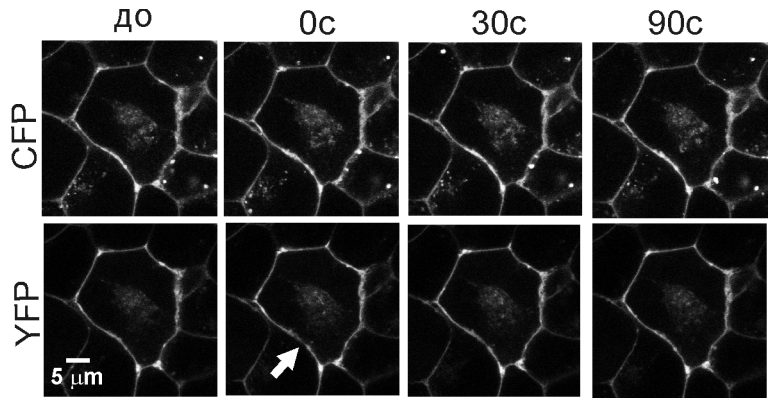


Рис.1. Конфокальные флуоресцентные изображения клеток HEK293 со стабильной экспрессией EphA2-CFP (верхний ряд) и EphA2-YFP (нижний ряд). Представлены изображения до фотообесцвечивания YFP (до), сразу после (0с) и спустя 30с и 90с после фотообесцвечивания. Стрелкой отмечено место, в котором проводилось фотообесцвечивание. Неполное фотообесцвечивание в указанной области, по-видимому, обусловлено тем, что скорость обесцвечивания (обесцвечивание занимает около 30с) сопоставима со скоростью диффузии в данную область молекул рецептора из близлежащих областей.

Свойства химер эфриновых рецепторов в клетках. Исследования, проведенные с использованием клеток, синтезирующих одновременно EphA2-CFP и EphA2-YFP, не выявили FRET между этими белками на мембране клеток без стимуляции лигандом. При этом EphA2-CFP был локализован как на плазматической мембране, так и в цитоплазме в гранулярных структурах, в то время как EphA2-YFP был локализован преимущественно на плазматической мембране (рис.1).

Измерения по методу FRAP позволили установить, что рецептор, локализованный на плазматической мембране (в том числе и в области межклеточных контактов), чрезвычайно подвижен и диффундирует на расстояния в несколько микрон за десятки секунд (рис.1). Аналогичная высокая подвижность была выявлена и для EphA1-CFP. Это говорит в пользу того, что экспрессированный химерный рецептор не связан с цитоскелетом клетки и с возможными лигандами на мембране соседних клеток.

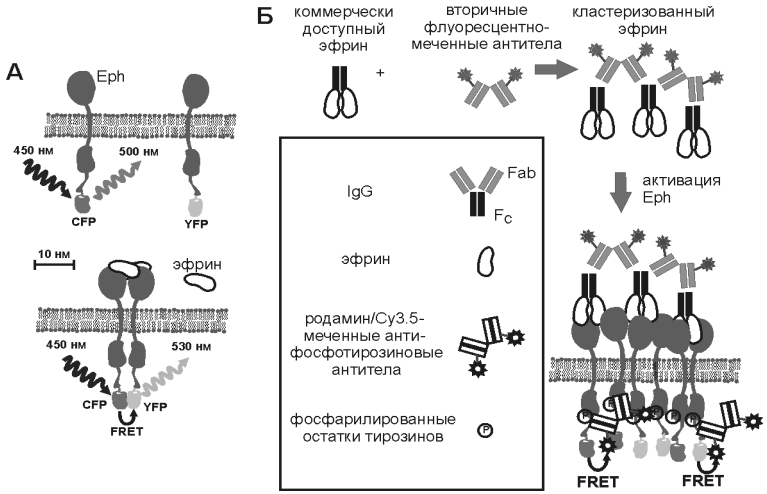


Рис.2. А. Схематическое изображение эффекта FRET между CFP- и YFP-меченным эфриновым рецептором при димеризации в комплексе с эфрином. Показаны характерные длины волн поглощения и испускания флуоресценции молекулой CFP и комплексом CFP/YFP при наличии FRET. Характерное расстояние, на котором наблюдается эффект FRET- 5нм, что примерно вдвое больше диаметра "бочонка" CFP. Б. Схема активации Eph. Для активации Eph необходимо предварительно кластеризовать эфрин. Для этого к коммерчески доступному димеру эфрина, конъюгированному с Fc-фрагментом иммуноглобулина, можно добавить антитела (или $(Fab)_2$-фрагмент), специфические к этому Fc-фрагменту. Результатом активации является фосфорилирование остатков тирозина Eph. При окрашивании всех фосфорилированных остатков тирозина в клетке с помощью антител, конъюгированных с родамином (или Cy3.5), наличие переноса энергии с CFP или YFP эфринового рецептора на родамин позволяет выявить области с активированным рецептором.

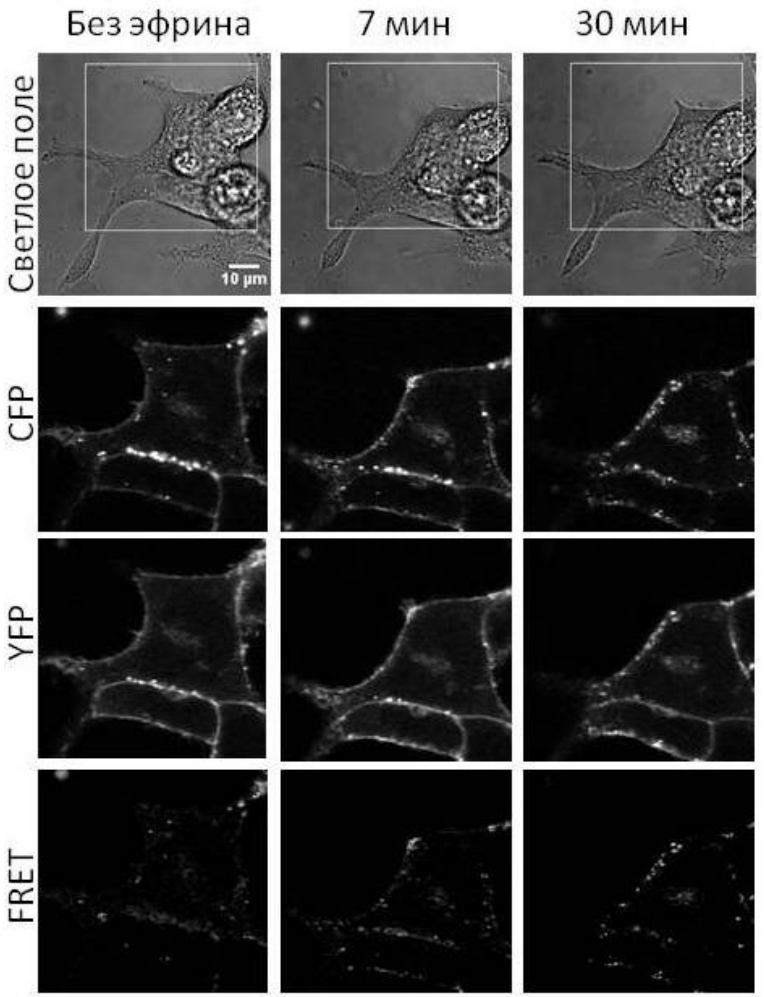


Рис.3. Изображения клеток HEK293 со стабильной экспрессией EphA2-CFP и EphA2–YFP до (без эфрина) и спустя 7 и 30мин после добавления предкластеризованного эфрина-A3. Представлены изображения светлого поля, конфокальные флуоресцентные изображения CFP, YFP и рассчитанной интенсивности FRET. Стрелками отмечено появление FRET на плазматической мембране через 7мин после добавления эфрина-A3 и образование везикул с олигомеризованным EphA2 спустя 30 после добавления эфрина-A3.

Активация EphA2 с помощью кластера эфриа-А3. Из литературных данных известно, что для активации большинства Eph эфринами необходимо предварительно сформировать кластер из эфринов [10], хотя в некоторых случаях фосфорилирование Eph можно наблюдать и при активации димеризованным эфрином [11]. Наши эксперименты не позволили выявить олигомеризацию EphA2 при воздействие димера рекомбинантного человеческого эфрина-А3 в комплексе с Fc-фрагментом иммуноглобулина (эфрин-А3-Fc). В связи с этим мы использовали для активации EphA2 кластеры эфрина-А3-Fc более высокого порядка. Для этого эфрин-А3-Fc инкубировали с антителами против Fc–фрагмента иммуноглобулина человека в течение 12 часов при 4^0C (рис.2.Б). Активация таким предкластеризованным эфрином привела к появлению сигнала FRET между CFP и YFP на плазматической мембране клеток уже через 7мин после добавления эфрина и формированию примембранных везикул, содержащих олигомеризованный EphA2 после 30мин активации (рис.3).

Обсуждение. В данной работе предложен подход, который позволяет изучать в отдельной клетке молекулярные взаимодействия эфриновых рецепторов между собой. Основной данного подхода служит методика измерения FRET с помощью методов оптической микроскопии. Было установлено, что данные методы предъявляют особые требования к уровню экспрессии флуоресцентно-меченных рецепторов в клетке. Для обеспечения заданного уровня экспрессии была показана эффективность использования метода флуоресцентно-активированной клеточной сортировки. Для активации EphA2 были использованы кластеры эфрина-А3, сформированные «кроссшивкой» антителами. Использование для этого флуоресцентно-меченных антител позволит выявить роль непосредственного контакта с лигандом и олигомеризацией Eph (рис.2).

Для оценки активации флуоресцентно-меченных Eph также можно использовать подходы оптической микроскопии. Для этого применяют флуоресцентно-меченные антифосфотирозиновые антитела, а интенсивность FRET между данными антителами и флуоресцентной меткой рецептора служит мерой активации рецептора [6]. Таким образом, предложенный подход может быть использован для выявления связи между всеми ключевыми стадиями активации эфриновых рецепторов (связывания лиганда, олигомеризация и фосфорилирование Eph) в отдельной клетке с временным и пространственным разрешением.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №08-04-01372-а и грантом Президента РФ (МК-3160.2008.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yarden Y., Sliwkowski M.X.* //Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2001) 2: 127-37;
2. *Campbell T.N., Robbins S.M.* //Curr. Issues Mol. Biol. (2008) 10: 61-6;
3. *Dong Y. et al.* //Mod. Pathol. (2009) 22(1): 151-60;
4. *Himanen J.P., Nikolov D.B.* //Int. J. Biochem. Cell Biol. (2003) 35: 130-4;
5. *Vearing C.J., Lackmann M.* //Growth Factors (2005) 23: 67-76;
6. *Wimmer-Kleikamp S.H. et al.* //J. Cell Biol. (2004) 164(5): 661-6;
7. *Himanen J.P. et al.* //Nature (2001) 414(6866): 933-8;
8. *Nikolov D. et al.* //Protein Sci. (2007) 16(5): 996-1000;
9. *Du W. et al.* //Anal. Bioanal. Chem. (2006) 386(3): 444-57;
10. *Davis S. et al.* //Science (1994) 266(5186): 816-9;
11. *Irie F. et al.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2008) 105(34): 12307-12.

***

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абрамочкин Д.В. 163
Авдонин П.В. 81, 197
Авдонин П.П. 197, 238
Агафонова Т.А. 278
Азарашвили Т.С. 575, 594
Аксенов Н.Д. 77
Аксенова Г.Е. 5
Акулов А.Н. 191
Алатырев А.Г. 644
Алексеева О.М. 317
Алёшин С.Е. 350
Аллахвердян Г.С. 55
Анвар Ахмад Дж. 657
Андреев И.М. 653, 676
Антонов В.Г. 68, 291, 296
Антонов С.А. 310
Ариповский А.В. 570
Арсеньев А.С. 751
Асланиди К.Б. 411
Астапова М.В. 751
Астахова Л.А. 242
Афанасьев В.Н. 5
Ашин В.В. 385

Б

Бабаков В.Н. 197, 321, 335, 722
Бабурина Ю.Л. 575, 594
Багинская Н.В. 326
Бакакина Ю.С. 649
Бакеева Л.Е. 528, 541
Балезина О.П. 167, 177, 212
Барышников А.Ю. 55
Батурина Г.С. 221, 496
Бахтеева В.Т. 379
Безгина Е.Н. 401
Бейлина С.И. 304
Белкина М.В. 457
Белобородова Н.В. 628, 634
Белов В.В. 90
Белослудцев К.Н. 10, 523, 565
Белослудцева Н.В. 565
Бережнов А.В. 15, 36, 143, 273, 709
Бибилашвили Р.Ш. 55, 744
Биктасова А.К. 457
Бобков Д.Е. 417
Бобров М.Ю. 138
Бобылёв А.Г. 135
Богачева П.О. 167
Бойцова Л.Ю. 619
Бондарева В.М. 114
Борисова М.П. 20, 330
Бородина Н.А. 362
Бронников Г.Е. 278, 570
Буданова Е.Н. 247
Бурлакова Е.Б. 317
Бурмистрова Н.А. 689
Бурова Е.Б. 24
Бурова О.С. 55
Бутов С.Н. 68
Бухараева Э.А. 172
Быкова О.В. 130
Быстрова М.Ф. 247

В

Васильева А.А. 431
Васин А.Л. 172
Васюхина Л.А. 684
Ведунова М.В. 138
Вивуланец Е.В. 73, 468
Винницкий Л.И. 744
Винокуров М.Г. 423, 507
Вихлянцев И.М. 401
Вишнякова Х.С. 217
Власик Т.Н. 744
Войтенко Н.Г. 197, 321, 335, 722
Волков Е.М. 148
Вологин С.Г. 182
Волотовский И.Д. 649
Воробьев В.С. 339
Воронина Е.С. 55
Воронков А.С. 653
Воронцова О.Н. 153
Вульфиус Е.А. 234, 345
Высоких М.Ю. 528

Г

Гайдуков А.Е. 177
Галева А.В. 644
Ганшин В.М. 251
Гарбуз Д.Г. 507
Гарнюк В.В. 353
Герасимова Е.В. 182, 188
Гимаутдинова О.И. 377
Гиниатуллин А.Р. 191, 208
Гладырь Е.А. 63
Гладышева О.С. 257
Глашкина Л.М. 197, 335
Глушкова О.В. 474
Годухин О.В. 120
Голиченков В.А. 492
Головкина М.С. 217
Голощапов А.Н. 317
Голубева В.А. 55
Голышев С.А. 619
Гольдштейн Д.В. 492
Гольтяев М.В. 699
Гончар И.В. 24
Гончаренко И.Н. 657
Гончаров Н.В. 197, 321, 335, 353, 468, 722
Горбачева Е.В. 345
Горудко И.В. 532
Горюнова Л.Е. 744
Горячева А.Е. 619
Грабеклис С.А. 350
Грачев Д.Е. 575, 594
Гриценко Е.Н. 523, 638
Грудинкин П.С. 425
Грушин К.С. 143
Гужова И.В. 507
Гуковская А.С. 479
Гулидова Г.П. 581

Д

Давыдова Г.А. 391
Демидов Л.В. 55
Денисенко В.Ю. 269
Деркач К.В. 114, 396
Дмитриевский И.М. 30
Добрылко И.А. 73, 353, 468
Долгачева Л.П. 229, 278, 287
Дорош В.Н. 24
Дроздов А.А. 114
Дубовская Л.В. 649
Дунина-Барковская А.Я. 217
Дустмаматов А.Г. 661
Душкин М.И. 326
Дынник В.В. 15, 36, 143

Е

Евгеньев М.Б. 483, 507
Евсеенко Л.С. 590
Евтодиенко Ю.В. 479
Ежова Е.В. 167
Епринцев А.Т. 657
Еремеев С.А. 586
Ермаков Г.Л. 501
Ермакова И.И. 357
Ермолаева Е.Е. 321
Ефремова А.С. 313
Ефремова Т.Н. 42

Ж

Жесткова И.М. 704
Жигачева И.В. 590
Жирнов В.В. 554
Жмак М.Н. 234
Жукова О.Б. 457
Жуковская Н.В. 661

З

Замай О.С. 46, 362
Замай Т.Н. 46, 362
Захаров Ю.Н. 138
Захарченко А.В. 431, 599
Захарченко М.В. 431, 599
Зацепина О.Г. 507
Землянских Н.Г. 368
Зенин В.В. 425
Зефиров А.Л. 191
Зима А.П. 457
Зинкевич Э.П. 251
Зинченко В.П. 15, 143, 197, 229, 273, 287, 301, 310, 313, 709
Злобина М.В. 100, 714, 719
Зобова С.Н. 157
Зоров Д.Б. 105, 485

И

Игловикова О.И. 296
Игнатьев Д.А. 5, 130
Иляскин А.В. 221, 496

Й

Йонекура-Сакакибара К. 680

К

Кадкин А.А. 46
Казанцев В.Б. 138
Казаченко А.В. 485
Каймачников Н.П. 50, 512
Камзолкина О.В. 528
Камышный А.М. 437
Каримова Ф.Г. 666
Карнаухова Н.А. 391
Каткова Л.Е. 221, 496
Кашникова Т.В. 257
Ким Ю.А. 317, 385
Киреев И.И. 217
Кирпатовский В.И. 485
Киселев С.Л. 55
Киселевский Д.Б. 671
Кленов Р.О. 224
Кнорре Д.А. 442, 499, 520
Ковалева Л.В. 653
Ковалевский Д.А. 55
Ковалицкая Ю.А. 391
Кожина О.В. 624
Козюлина П.Ю. 425
Кокоз Ю.М. 143
Колбаев С.Н. 339
Колесников С.С. 262
Колесова Г.М. 614
Коломийцева И.К. 5, 130
Колосов П.М. 751
Колосова Н.Г. 541
Конаков М.В. 278
Кондратьева Т.Т. 55
Кондрашова М.Н. 431, 599
Кононов А.В. 709
Корнилова Е.С. 100, 714, 719
Коробов В.П. 330
Коротченко С.А. 138
Корягина Е.А. 138
Костава В.Т. 586
Кофанова О.А. 368
Кравченко И.В. 58
Крамарова Л. 444
Красавина М.С. 689
Красный А.М. 229, 283, 287
Крестинина О.В. 575, 594
Кривошлык В.В. 73, 468
Кривченко А.И. 353, 468
Кропачёва И.В. 417
Круглов А.Г. 515, 594
Крутецкая З.И. 68, 291, 296
Крутецкая Н.И. 291, 296
Крылова В.В. 676
Кудрявцев А.А. 515
Кузеванов А.В. 217
Кузнецов П.А. 377
Кузнецов С.В. 73, 197
Кузнецова Ю.Е. 671
Кузьмина Т.И. 269
Кулагина Т.П. 570
Курилова Л.С. 291, 296

Л

Лабас Ю.А. 251
Лаврова Е.А. 379
Лавровская В.П. 401, 515
Лаптева В.И. 212
Латкин Д.С. 719
Лебедев О.Е. 68, 291, 296
Лебедева И.Ю. 63
Левин С.Г. 120
Литвинова Е.Г. 431, 599
Лобанов А.В. 125
Лобышева Н.В. 153, 449, 610
Логвиненко Н.С. 455
Логвинович О.С. 5
Ломин С.Н. 680, 733
Лошкарева М.Л. 110
Лукьянова Л.Д. 523, 565, 603
Лунин С.М. 474

М

Маевский Е.И. 431
Маломуж А.И. 205
Мальцева В.Н. 234
Мальцева Е.Л. 90
Манохина И.А. 699
Марахова И.И. 77
Маркевич Л.Н. 130
Маркевич Н.И. 512
Маркитантова Ю.В. 238
Маркова О.В. 442, 520
Марова А.А. 301
Марошкина А.Н. 457
Марсагишвили Л.Г. 135
Мартынова Е.А. 461
Марчик Е.И. 624
Матвеева Н.Б. 304
Махмутов Б.Б. 385
Межевикина Л.М. 20
Мельницкая А.В. 68
Метелев М.В. 217
Миндукшев И.В. 73, 197, 353, 468
Миронова Г.Д. 523, 565, 638
Митрошина Е.В. 138
Митюшова Е.В. 77
Михайлова И.Н. 55
Моисеева В.С. 610
Морачевская Е.А. 42
Морозов В.И. 357
Морозова Л.Ф. 55
Мотовилов К.А. 610, 614
Мошков Д.А. 401, 594, 638
Мурашев А.Н. 143, 483
Мурзаева С.В. 523
Мурина М.А. 537
Муслихов Э.Р. 81
Мухина И.В. 138
Мухортова А.В. 532
Мякишева С.Н. 411, 483

Н

Нарциссов Я.Р. 153, 449
Наумов А.А. 373, 546
Негуляев Ю.А. 42
Недорубов А.А. 523, 638
Некрасова И.В. 85
Ненов М.Н. 15, 36, 143
Нечаенко М.А. 744
Никифоров Е.Л. 229, 287
Никифорова А.Б. 515
Николаева С.Д. 379
Никольский Е.Е. 148, 205
Никольский Н.Н. 24, 425
Новоселова Е.Г. 474
Новоселова Т.В. 474
Нуруллин Л.Ф. 148, 163

О

Овсепян А.А. 599
Одинокова И.В. 479
Ожован С.М. 528
Озернюк Н.Д. 283
Оленин А.Ю. 634
Опанасенко В.К. 684
Остров В.Ф. 483

П

Павлик Л.Л. 401, 638
Пальмина Н.П. 90
Панин Л.Е. 377
Паничкин Л.А. 689
Парнова Р.Г. 379
Парнышкова Е.Ю. 373
Пархитько А.А. 95
Пахомова И.А. 143
Певзнер И.Б. 485
Пекло М.М. 744
Перепелкина Н.И. 130
Перепечаева М.Л. 326
Песочинская С.С. 468
Песочинская С.Д. 73
Петенко Н.Н. 55
Петрищев Н.Н. 73, 353
Петров А.М. 191, 208
Петров Ю.П. 357
Петрова Р.Р. 20
Пименов О.Ю. 143
Пинаев Г.П. 417
Пинелис В.Г. 157
Плотников Е.Ю. 105, 485
Погорелов А.Г. 492
Погорелова М.А. 492
Подлубная З.А. 135
Подольская Е.П. 321
Поляков Л.М. 377
Попов В.Н. 657
Попов В.О. 58
Попова М.С. 661
Потапова Т.В. 619
Поцелуева М.М. 373, 501, 546
Прокофьева Д.С. 197, 321, 335, 722
Прохоренко Т.С. 457
Прудников Г.А. 689
Пучков Е.О. 728
Пятибратов М.Г. 644

Р

Радзивил Т.Т. 457
Радилов А.С. 321
Райзер Г. 350, 575
Рогачевская О.А. 262
Рогачевский В. 264
Рожкова Е.В. 507
Романов Г.А. 680, 733
Романов Р.А. 262
Рощина В.В. 694, 699
Рощупкин Д.И. 537
Руткевич Н.М. 744
Рыбакова С.Р. 624
Рыков В.А. 317, 385
Рязанцева Н.В. 457

С

Сазонова Е.В. 457
Сакакибара Х. 680
Сакута Г.А. 357
Самарцев В.Н. 624
Самигуллин Д.В. 172
Самуилов В.Д. 671
Санталова И.М. 594
Сапрунова В.Б. 541
Сафронова В.Г. 234
Северин Ф.Ф. 442, 494, 499, 520
Селиванова Н.В. 657
Селин А.А. 153, 449
Семушина С.Г. 143
Сенилова Я.Е. 157
Сергеев А.И. 287, 310, 313
Сергеева М.Г. 350
Сергиевич Л.А. 391
Симонова М.А. 431
Сингина Г.Н. 63
Синяева Ю.А. 494
Ситдикова Г.Ф. 182, 188, 739
Скамров А.В. 744
Скарга Ю.Ю. 385
Скачков И.В. 217
Скитева О.И. 212
Слащева Г.А. 483
Смирнова Е.А. 499, 520
Соколов С.С. 442, 494
Соколова Е.П. 114
Соленов Е.И. 221, 455, 496
Соловьева М.Е. 515
Сорокин М.И. 499
Софин А.Д. 401
Старков В.Г. 345
Струкова Е.В. 581
Сурин А.М. 157
Сурков К.В. 81
Суханова И.Ф. 81
Сухих Г.Т. 105
Сухов И.Б 110
Сухомлин Т.К. 373, 501

Т

Теплов В.А. 304
Теплова В.В. 515, 628, 634
Тимошенко А.В. 532
Толмачева А.В. 709
Тоньшин А.А. 153, 449
Трофимова М.С. 704
Трудовишников А.С. 10
Туровский Е.А. 278
Тухбатова Г.Р. 157
Тяпкина О.В. 148

У

Узденский А.Б. 125
Успенская З.И. 396
Уткин Ю.Н. 345
Утяшев И.А. 55

Ф

Фатеенков В.Н. 321
Федорин В.В. 177
Федорин Д.Н. 657
Федоров О.В. 644
Федотова Е.И. 15, 36, 143, 273, 709
Федотчева Н.И. 431, 599, 628, 634
Феоктистова Е.С. 744
Феофанов А.В. 751
Фиалковская Л.А. 5
Филина Ю.В. 345
Фирсов М.Л. 242
Фок Е.М. 379
Фрумкина Л.Е. 138
Фуралёв В.А. 58

Х

Хаертдинов Н.Н. 188
Хайтлина С.Ю. 42
Харченко М.В. 100, 714, 719
Хаспеков Г.Л. 744
Хаспеков Л.Г. 138
Херманн К. 479
Ходоров Б.И. 157
Холоденко Б.Н. 50
Хощенко О.М. 326
Хренов М.О. 474
Хряпенкова Т.Г. 105
Хундерякова Н.В. 431
Хушматов Ш.С. 388

Ц

Цетлин В.И. 234, 345

Ч

Черемушкин Е.А. 55
Черенкевич С.Н. 532
Чернов А.С. 391
Чечина О.Е. 457
Чистякова О.В. 110, 114
Чубинский-Надеждин В.И. 42

Ш

Шаймуратов Р.И. 191
Шамшев А.В. 296
Шаронов Г.В. 751
Шаронова И.Н. 339
Шаталин Ю.В. 373, 501, 546
Шевырева Т.А. 704
Шереметьева Г.Ф. 744
Шигаева М.И. 523, 638
Шипилов В.Н. 110
Ширшев С.В. 85
Шпагина М.Д. 135
Шпаков А.О. 114, 396
Шпакова Е.А. 396
Штайер О.В. 528
Шубина В.С. 401

Ю

Юдин А.Л. 396
Юринская М.М. 423, 507
Юрков В.И. 610
Юров С.С. 30

Я

Ягужинский Л.С. 153, 449, 586, 610, 614
Языкова М.Ю. 550
Яковенко И.Н. 554
Яковлев А.В. 188
Яковлева О.В. 188
Якушева О.В. 666
Янкаускас С.С. 485
Яценко Ю.Е. 262
Яшин В.А. 699
Яшина А.В. 699

C

Cannon B. 444

D

Duden R. 264

H

Hartmann E. 264
Henske E.P. 95
Hermann A. 739
Hoek J.B. 560

M

Majoul I. 264
Markevich N.I. 560

N

Nedergaard J. 444

S

Shirao T. 264

W

Weiger T.M. 739

Gate2RuBIN

Российская
бизнес-инновационная сеть

Бизнес и инновации – общий язык России и Европы

Проект «Gate2RuBIN» - это новый широкомасштабный долгосрочный (до 2013г.) проект участия российских организаций бизнес-инновационной инфраструктуры в новой и самой крупной Европейской сети поддержки предпринимательства (http://www.enterprise-europe-network.ec.europa.eu/index_en.htm) . Этот проект - шлюз для организаций российской инновационной инфраструктуры в новую Европейскую сеть. Он призван объединить российские и европейскую сети поддержки МСП и опыт работы в этой сфере.

Проект «Gate to Russian Business Innovation Networks» (Gate2RuBIN, www.Gate2RuBIN.ru) инициирован в 2007 г. консорциумом трех сетевых организаций:

- Союзом Инновационно-Технологических Центров России (Союз ИТЦ),
- Некоммерческим партнерством «Российская сеть трансфера технологий» (Сеть RTTN) и
- Российским агентством поддержки малого и среднего бизнеса (Российское агентство ПМСБ).

Эти организации объединяют более 90 российских организаций инновационной инфраструктуры (бизнес-инновационные центры, центры трансфера технологий, технопарки, агентства поддержки бизнеса) из 30 наиболее инновационно-активных регионов России и обладают многолетним опытом работы и координации сетевого взаимодействия инновационных организаций на национальном и международном уровнях.

В 2008г. в рамках «Gate2RuBIN» начато формирование на конкурсной основе сети региональных центров-партнеров проекта – Российской бизнес-инновационной сети (Russian Business Innovation Network – RuBIN) - интегрированной национальной инфраструктуры поддержки бизнеса и инноваций. Сеть включает в себя профессиональные бизнес и инновационные центры в регионах России, которые ориентированы на

эффективное международное сотрудничество и непосредственно оказывают услуги и поддержку своим клиентам (компаниям, научным организациям), используя инструментарий и методическую поддержку, которую обеспечивает проект «Gate2RuBIN».
Государственную поддержу проекту и работе центров-партнеров оказывают Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фонд содействия развитию МФП НТС) и Министерство экономического развития РФ (МЭР РФ).

Для участия в проекте создан специализированный **Консорциум** (соглашение от 24 декабря 2008г.) с интегрированным пакетом услуг по модулям АВС по направлению Живые системы (биотехнология и медицина), в который вошли: Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН (Национальный Контактный Центр «Биотехнология, сельское хозяйство и пища», НКТ-БИО), Государственное учебно-научное учреждение Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (Национальный Контактный Центр «Здравоохранение», НКТ - Здравоохранение) и Некоммерческое Партнерство «Аналитический центр международных научно-технологических и образовательных программ» (МНиОП).

Консорциум имеет возможность привлекать экспертов из Общества биотехнологов России, Корпорации Биотехнологии, биотехнологического венчурного фонда и других бизнес-структур.

Консорциум проводит многоплановую работу по информационному обеспечению российских действующих и потенциальных участников 7-й Рамочной Программы Евросоюза (7 РП), содействуя максимальному вовлечению научных и образовательных организаций, предприятий малого и среднего бизнеса, государственных и коммерческих структур в международные проекты со странами Евросоюза. Регулярно выпускаются аналитические обзоры по перспективным направлениям биотехнологии и вопросам интеллектуальной собственности.

Данный проект будет сфокусирован на МСП (малые и средние предприятия), что позволит использовать наработанный опыт в данном направлении, проводить более точную экспертную оценку предлагаемых профилей МСП с учетом современных тенденций науки, конкурентоспособности и востребованности разработок биотехнологической промышленностью и медициной.

В рамках проекта Gate2RuBIN на консорциум возложены **следующие задачи:**

1. Информационная поддержка клиентов (МСП, научно-исследовательские организации и университеты), в области биотехнологии и здравоохранения о действующих программах и открытых конкурсах в поддержку развития инноваций
2. Консультации и поддержка клиентов в области инноваций, трансферта и коммерциализации технологий в области биотехнологии и здравоохранения, интеллектуальной собственности в 7РП.
3. Распространение описаний технологических потребностей и предложений (в т.ч. европейских) и нахождение релевантных европейских/российских партнеров по инфраструктурным консорциумам.
4. Специализированные однодневные семинары, тематические секции в рамках проводимых в регионах конференциях по биотехнологии и здравоохранению
5. Информационные рассылки, публикации в СМИ.
6. Участие в конференциях, круглых столах, рабочих встречах, выставках, ярмарках
7. Выявление заинтересованных клиентов, сбор информации занесение в общую базу данных в участи в 7РП.
8. Адресное информирование и консультирование по правилам участия в FP7 по запросам от европейских партнеров.
9. Консультирование по вопросам экспертной оценки проектов 7 РП.
10. Поддержка российских организаций в области живых систем по включению в инфраструктуру проектов 7 РП через европейский проект BIOCIRCLE, направленный на расширение и развитие международного научно-технологического сотрудничества по тематикам 7 РП.

Контактное лицо:

Шарова Ирина Валерьевна

к.б.н., зам. руководителя Национального Контактного Центра «Биотехнологии»

Тел.: +7(495)954-44-74, моб. +7(915)298-71-99;

e-mail: sharova@inbi.ras.ru

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 2

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. 22,5. 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.