

ISSN 0233-4755

Том 41, Номер 2

Март-Апрель 2024



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Журналу

40

лет

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 41, номер 2, 2024

Влияние лигандов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов на адгезивные свойства гранулоцитов костного мозга мыши при воспалении <i>Э. А. Жирова, Д. А. Серов, Е. В. Федорова, В. Г. Сафронова</i>	99
Поправки к электрической емкости деформированной липидной мембраны <i>О. В. Кондрашов, С. А. Акимов</i>	115
Расчет энергетического барьера образования монослойного сталка в процессе слияния липидных капель <i>Р. Ю. Молотковский</i>	123
Механизм действия ингибитора CaCCinh-A01 на активность кальций-зависимых хлорных каналов ANO6 <i>Д. О. Колесников, Е. Р. Григорьева, М. А. Номеровская, Д. С. Решетин, А. В. Шалыгин, Е. В. Казначеев</i>	133
Новый подход к анализу состояния системы комплемента у больных COVID-19. Пилотные исследования <i>П. П. Авдонин, Л. А. Комлева, М. С. Блинова, Е. С. Иванова, О. Н. Котенко, Н. Ф. Фролова, Е. С. Столяревич, Е. Ю. Рыбакова, П. В. Авдонин</i>	139
Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения He-Ne-лазера на состав и содержание фосфолипидов и стероидов в тканях каллусов пшеницы <i>Triticum aestivum</i> L. <i>Л. В. Дударева, Е. Г. Рудиковская, Н. В. Семенова, А. В. Рудиковский, В. Н. Шмаков</i>	149
Различные формы супероксиддисмутазы из корней проростков гороха различаются по чувствительности к САМР и ионам кальция <i>Л. А. Ломоватская, О. В. Захарова, А. М. Гончарова, А. С. Романенко, Т. А. Кишинская</i>	160

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Организация резервного пула синаптических везикул в нервных окончаниях с удаленными компонентами белковой жидкой фазы <i>Н. В. Нифантова, А. Г. Шишков, О. М. Коренькова, Е. С. Сопова, Л. Бродин, О. В. Шупляков</i>	168
--	-----

CONTENTS

Vol. 41, No. 2, 2024

The Effect of Nicotine Acetylcholine Receptor Ligands on the Adhesive Properties of Murine Bone Marrow Granulocytes in Inflammation <i>E. A. Jirova, D. A. Serov, E. V. Fedorova, V. G. Safronova</i>	99
Corrections to the Electrical Capacitance of Deformed Lipid Membrane <i>O. V. Kondrashov, S. A. Akimov</i>	115
Energy Barrier of a Monolayer Stalk Formation during Lipid Droplet Fusion <i>R. J. Molotkovsky</i>	123
The Mechanism of Calcium-Activated Chloride ANO6 Channel Inhibition by CaCCinh-A01 <i>D. O. Kolesnikov, E. R. Grigorieva, M. A. Nomerovskaya, D. S. Reshetin, A. V. Shalygin, E. V. Kaznacheyeva</i>	133
A New Approach to Analyze the State of the Complement System in Patients with COVID-19. Pilot Study <i>P. P. Avdonin, L. A. Komleva, M. S. Blinova, E. S. Ivanova, O. N. Kotenko, N. F. Frolova, E. S. Stolyarevich, E. Y. Rybakova, P. V. Avdonin</i>	139
Influence of Low-Intense Laser Radiation He-Ne Laser on the Composition and Content of Phospholipids and Sterols in the Tissue of Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) Callus Tissues <i>L. V. Dudareva, E. G. Rudikovskaya, N. V. Semenova, A. V. Rudikovskii, V. N. Shmakov</i>	149
Different Forms of Superoxide Dismutase from Pea Seedling Roots Differ in Sensitivity to cAMP and Calcium <i>L. A. Lomovatskaya, O. V. Zaharova, A. M. Goncharova, A. S. Romanenko, T. A. Kishinskaya</i>	160

SHORT COMMUNICATIONS

Organization of the Reserve Pool of Synaptic Vesicles in Nerve Terminals Lacking Protein Liquid Phase Components <i>N. V. Nifantova, A. G. Shishkov, O. M. Korenkova, E. S. Sopova, L. Brodin, O. Shupliakov</i>	168
---	-----

УДК 577.354.3:577.27

ВЛИЯНИЕ ЛИГАНДОВ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ГРАНУЛОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

© 2024 г. Э. А. Жирова^a, Д. А. Серов^{a, b}, Е. В. Федорова^c, В. Г. Сафронова^{a, *}

^a Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино Московской обл., 142290 Россия

^b Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, 119991 Россия

^c Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино Московской обл., 142290 Россия

*e-mail: safronova@icb.psn.ru

Поступила в редакцию 21.09.2023

После доработки 27.10.2023

Принята к печати 31.10.2023

Первой стадией выхода зрелых нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга в кровь и последующей миграции в очаг воспаления является прикрепление к эндотелию сосудов. Эндо- и экзогенные факторы модифицируют способность клеток к адгезии через рецепторы разного типа, включая никотиновые рецепторы ацетилхолина (нАХР). Однако участие нАХР в регуляции адгезии гранулоцитов костного мозга (КМ-гранулоцитов) и роль сигнальных компонентов в действии никотина исследованы мало. Целью данной работы явилось изучение роли нАХР разных типов в регуляции адгезии КМ-гранулоцитов мыши при остром воспалении. Работа проведена на КМ-гранулоцитах мышей линии BALB/c с применением статической адгезионной пробы, конфокальной микроскопии, ингибиторного анализа, ПЦР с обратной транскрипцией. Роль типов нАХР оценена с помощью селективных антагонистов: 10 нМ α -СТХ ($\alpha 7$), 10 нМ G1C и 5 нМ МП ($\alpha 3\beta 2$), 200 нМ МП ($\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 7$), RgIA и Vc1.1 ($\alpha 9\alpha 10$). Показано, что количество прикрепившихся КМ-гранулоцитов, оцениваемое по оптической плотности, не различалось у животных с острым воспалением и без него. Никотин (0.01–100 мкМ, 30 мин) значительно усиливал адгезию клеток животных контрольной и “воспалительной” групп. Токсины α -СТХ, RgIA и Vc1.1 усиливали адгезивность клеток мышей обеих групп, как и 200 нМ МП – в контрольной группе. В пробах с флуоресцентным мечением показана экспрессия субъединиц $\alpha 7$ и $\alpha 10$ нАХР на мембране нативных КМ-гранулоцитов. С помощью ингибиторов обнаружено, что действие никотина на адгезию КМ-гранулоцитов опосредовано гетеротримерными G-белками, PKC, PI3K и ROCK как в норме, так и при наличии воспаления. В регуляции адгезии КМ-гранулоцитов мыши участвуют преимущественно $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ типы нАХР, вклад $\alpha 3(\alpha 6^*)\beta 2$ незначителен, возможно вследствие низкой экспрессии $\alpha 3/\alpha 6^*$ -субъединиц. Роль $\alpha 7$ нАХР, присутствующих на мембране КМ-гранулоцитов конвенционально, в регуляции адгезивности клеток никотином усиливается при развитии воспаления в организме.

Ключевые слова: костный мозг, гранулоцит, никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, адгезия, воспаление

Список сокращений: нАХР – никотиновый рецептор ацетилхолина; КМ-гранулоциты – гранулоциты костного мозга; α -СТХ – α -кобротоксин (α -cobratoxin); PKC – протеинкиназа C (protein kinase C), PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа (phosphatidylinositol 3-kinase); ROCK – Rho-ассоциированная протеинкиназа (Rho-associated protein kinase); ICAM – молекула межклеточной адгезии (intercellular adhesion molecule); VLA – очень поздний антиген (very late antigen), LFA-1 – связанный с функцией лимфоцитов антиген 1 (lymphocyte function-associated antigen-1); Mac-1 – антиген макрофага 1 (macrophage-1 antigen); AX – ацетилхолин; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase); VCAM-1 – васкулярная молекула клеточной адгезии 1 (vascular cell adhesion molecule 1); JNK – c-Jun N-концевые киназы (c-Jun N-terminal kinases); PTX – коклюшный токсин (pertussis toxin); OD – оптическая плотность (optical density); AF488 – AlexaFluor488.

DOI: 10.31857/S0233475524020017, EDN: xxhoiw

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительная реакция организма сопровождается быстрой активацией полиморфноядерных нейтрофильных гранулоцитов (нейтрофилов). Они развиваются из полипотентной стволовой кроветворной клетки в костном мозге, где проходят этапы миелоидной дифференцировки. Зрелые нейтрофилы выходят в кровеносное русло, обладая сформированным цитотоксическим потенциалом в виде протеолитических ферментов, цитотоксических белков и аппарата для генерации супероксид-анион радикала [1–3]. При повреждении ткани или проникновении патогена нейтрофилы активируются в течение нескольких минут, мигрируют из кровеносного сосуда и скапливаются в очаге воспаления, где они реализуют защитные функции [4–7]. Прикрепление к эндотелию сосудов и внеклеточному матриксу является первой стадией выхода зрелых нейтрофилов из костного мозга в кровь и последующей миграции в очаг инфицирования или повреждения [2, 4]. Механизм этого процесса хорошо изучен, установлены основные адгезионные молекулы и рецепторы [8–13]. Кратко “адгезионный каскад” можно представить следующим образом: 1) мягкое прикрепление к эндотелию и медленное качение (rolling), что обеспечивается экспрессией L-селектина и активацией интегринов; 2) при получении сигнала тревоги (например, в виде медиаторов воспаления) нейтрофил прикрепляется прочно перед последующим “просачиванием” через эндотелий и базальную мембрану (трансэндотелиальная и периваскулярная миграция) [9, 13–15]. Прочное прикрепление обеспечивается взаимодействием молекул межклеточной адгезии (ICAM) на эндотелии с $\beta 1$ - и $\beta 2$ -интегринами на мембране нейтрофила: VLA (very late antigen), LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1, CD11a/CD18) и Mac-1 (macrophage-1 antigen, CD11b/CD18). Кроме того, молекулы адгезии участвуют в регуляции фагоцитоза и других функций нейтрофилов [13, 16]. Нарушение адгезионных свойств нейтрофилов критично для многих заболеваний с воспалительным компонентом [5, 9, 13, 14, 16, 17]. Предлагается подход к терапии воспалительных заболеваний на основе модуляции адгезии [18].

Адгезивные свойства нейтрофилов модифицируются эндо- и экзогенными факторами через рецепторы разного типа, в том числе через никотиновые рецепторы ацетилхолина (нАХР) [15, 19–21]. Среди экзогенных лигандов нАХР наиболее распространенным является никотин. Первоначально интерес к его действию на клетки иммунной системы был связан с курением сигарет,

тогда как в последнее время большое внимание привлекает участие нАХР в воспалительных процессах и болевых реакциях [22–24]. Показано, что никотин, как и эндогенный лиганд нАХР ацетилхолин (АХ), способствовали адгезии моноцитоподобных клеток U937 на эндотелиальных клетках [25]. В присутствии липополисахарида никотин подавлял экспрессию ICAM-1 в моноцитах крови человека с участием $\alpha 7$ нАХР, NF- κ B и p38 MAPK [26], тогда как в эндотелиальных клетках десен, в которых обнаружены субъединицы $\alpha 5$ и $\alpha 7$, никотин увеличивал экспрессию генов и белков ICAM-1, что было опосредовано p38 MAPK, но не протеинкиназой C (PKC) [27]. У активных курильщиков, имеющих высокую концентрацию никотина в крови, выявлено изменение экспрессионного профиля адгезивных молекул, приводящее к осложненному течению заболеваний с воспалительным компонентом [28]. Никотин в концентрации, сопоставимой с уровнем в крови курильщиков, потенцировал экспрессию гена и белка васкулярной молекулы клеточной адгезии-1 (vascular cell adhesion molecule, VCAM-1) в клетках макрофагальной линии RAW264.7 через $\alpha 7$ нАХР и сигнальный путь JNK (с-Jun N-концевые киназы) [29]. Также он усиливал перекачивание и адгезию лейкоцитов в микроциркуляторном русле головного мозга мышей [30]. Наиболее детально изучена регуляция ацетилхолином адгезии кератиноцитов, осуществляемая через $\alpha 3$, $\alpha 7$ и $\alpha 9$ нАХР при участии фосфолипазы C, Src-тирозиновых протеинкиназ, PKC и малых G-белков семейств Ras и Rho [31–33]. Эндогенный АХ может влиять на адгезию и миграцию иммунных клеток по механизму ауто- и паракринной регуляции [34]. Однако участие нАХР в регуляции адгезии гранулоцитов костного мозга и их сигнальные пути исследованы мало.

Ранее мы показали, что в нейтрофилах из очага острого воспаления у мыши активация нАХР приводила к транзientному повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле и влияла на генерацию активных форм кислорода и адгезию [35]. С помощью селективных антагонистов была обнаружена регуляторная роль $\alpha 7$, $\alpha 3(\alpha 6^*)\beta 2$ нАХР и показана экспрессия мРНК субъединиц $\alpha 2$ –7, $\alpha 9$, $\beta 2$ –4. При сопоставлении нейтрофилов из очага воспаления с гранулоцитами костного мозга (КМ-гранулоцитами) обнаружены различия в экспрессии генов субъединиц и в действии лигандов нАХР на функции клеток [21]. Отметим, что никотин не влиял на адгезию клеток из очага воспаления и усиливал адгезию КМ-гранулоцитов, АХ усиливал адгезию в обоих случаях. Было показано участие $\alpha 9$ -содержащих нАХР в регуляции адгезии

КМ-гранулоцитов, но роль других рецепторов не рассматривалась. Кроме того, остается неизученным участие сигнальных компонентов в действии никотина на адгезию КМ-гранулоцитов.

Целью данной работы являлось исследование роли нАХР разных типов в регуляции адгезии гранулоцитов костного мозга мышей с острым воспалением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использованы: перколл, зимозан из *Saccharomyces cerevisiae*, красители (акридиновый оранжевый и трипановый синий), тирфостин 51, вортманнин, стауроспорин, коклюшный токсин (РТХ), Y27632, NucRed (Thermo Fisher Scientific, США). Для изоляции и инкубации клеток использованы: фосфатно-бикарбонатный буфер (PBS, Thermo Fisher Scientific, США); среда RPMI-1640 (ПанЭко, Россия); среда Хенкса, содержащая (мМ): 138 NaCl, 6 KCl, 1 MgSO₄, 1 Na₂HPO₄, 5 NaHCO₃, 5.5 глюкоза, 10 Hepes, pH 7.3 (Sigma-Aldrich). Лиганды нАХР: никотин (Sigma, США), α -кобратоксин (α -СТХ) и AF488- α -СТХ, α -конотоксины G1C, MII, Rg1A и Vc1.1. AF488- α -СТХ, α -СТХ и α -конотоксины были любезно предоставлены И.Е. Кашеверовым и Ю.Н. Уткиным (ИБХ РАН, Москва).

Животные. Работа проведена на мышах-самцах линии BALB/c (21–23 г), приобретенных в питомнике филиала “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства” России. Все эксперименты с лабораторными животными выполнены в соответствии с нормативно-правовым актом Министерства здравоохранения РФ № 199-н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”, международно-правовыми нормами, указанными в Европейской конвенции ETS № 123 “О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” и руководством по работе с лабораторными животными ИБК РАН № 57.30.12.2011. Были взяты две группы: 1) животные с острым воспалением, вызванным инъекцией суспензии зимозана в растворе Хенкса без Ca²⁺ (5 мг/мл, 150 мкл в/б); 2) контрольные животные (раствор Хенкса, 150 мкл в/б). Животные содержались в конвенциональных условиях и получали питье и корм *accessus libero*.

Изоляция гранулоцитов из брюшной полости. Через 15 ч после инъекций суспензии зимозана или солевого раствора мышей обездвиживали с помощью цервикальной дислокации, брюшную полость промывали раствором Хенкса без Ca²⁺, суспензию

центрифугировали, осадок ресуспендировали в среде Хенкса без Ca²⁺ до плотности 10⁷ клеток/мл.

Изоляция гранулоцитов из костного мозга. КМ-гранулоциты получали по стандартной методике [36, 37]. Большеберцовую, бедренную и плечевую кости промывали средой RPMI-1640, полученную суспензию наслаивали на градиент перколла (78%, 62.5%, 55% в PBS, V/V) и центрифугировали (1500g, 35 мин, 7°C). Собирали клетки на границе фаз 62.5–78%, промывали средой RPMI-1640, затем PBS. После второй промывки и центрифугирования (500g, 10 мин) осадок ресуспендировали в среде Хенкса без Ca²⁺ до плотности 10⁷ клеток/мл.

Количество выделенных зрелых нейтрофилов в обоих случаях оценивали по форме ядра при окрашивании акридиновым оранжевым. Живые клетки составляли около 98% по окрашиванию трипановым синим. Изолированные клетки хранили до эксперимента в течение 1 ч при 4°C.

Адгезионную пробу проводили по протоколу, описанному ранее [21], в плоскодонном 96-луночном планшете с ТС-обработкой поверхности (Eppendorf, США). В каждую лунку помещали по 270 мкл раствора Хенкса, содержащего 1 мМ Ca²⁺, затем в зависимости от задачи в соответствующие лунки добавляли: исследуемые лиганды нАХР или раствор Хенкса (контроль), токсины или ингибиторы сигнальных компонентов; после этого добавляли по 3 × 10⁵ клеток. Были использованы: 0.01–100 мкМ никотин, 10 нМ α -СТХ, 10 нМ G1C, 5 или 200 нМ MII, 10 нМ стауроспорин, 50 нМ тирфостин 51, 10 нМ вортманнин, 140 нМ Y27632. Клетки инкубировали в течение 30 мин при 37°C или в течение 2 ч с коклюшным токсином (РТХ, 300 нг/мл). Затем супернатант удаляли, клетки фиксировали с помощью 96% C₂H₅OH (3 ч, 22°C). После удаления этанола планшет просушивали (14–15 ч, 37°C), и прикрепившиеся клетки окрашивали раствором азур-эозина по Романовскому (40 мин, 22°C). Планшет трехкратно промывали PBS, и клетки лизировали изопропанолом. Количество прикрепившихся клеток оценивали по оптической плотности (OD) растворов, полученных после лизиса, при длинах волн 492 нм (OD₄₉₂) и 405 нм (OD₄₀₅, референсная длина волны) с помощью фотометра Infinite F50 (Tecan, Австрия). Определяли $\Delta OD = OD_{492} - OD_{405}$. Эффекты (относительная оптическая плотность, %) никотина, токсинов или ингибиторов рассчитывали по отношению ΔOD клеток, обработанных никотином или каким-либо из агентов, либо антагонистом нАХР и никотином совместно, к величине ΔOD интактных клеток, принятой за 100%. При совместном использовании

никотина и одного из ингибиторов эффект никотина рассчитывали по отношению величины ΔOD от клеток, обработанных обоими веществами, к величине ΔOD от клеток, обработанных тем же ингибитором, принятой за 100%.

Примененный нами метод статической оценки адгезии КМ-гранулоцитов имеет ограничения, так как он не воспроизводит физиологические условия, при которых клетки находятся в условиях сдвигового потока. Но считается, что статические адгезионные пробы позволяют с высокой производительностью исследовать прочную адгезию, опосредованную $\beta 2$ -интегрином [17].

Связывание меченого α -кобратоксина. 100 мкл суспензии КМ-гранулоцитов наносили на круглые покровные стекла (диаметром 25 мм) и инкубировали во влажной камере для прикрепления (15 мин, 37°C). Стекло с клетками помещали в камеру RC-40LP (Warner Instruments, США), затем добавляли 400 мкл раствора Хенкса без Ca^{2+} и трижды промывали. Окрашивание клеток α -кобратоксином (α -СТХ), конъюгированным с AlexaFluor488 (AF488- α -СТХ), проводили по протоколу [38] с модификациями. Клетки инкубировали с немеченым α -СТХ (500 нМ) во влажной камере в темноте (1 ч, 23°C), добавляли 50 нМ AF488- α -СТХ и 5 мкМ NucRed (витальный ядерный краситель), инкубировали в течение 30 мин. Контрольная проба содержала немеченый α -СТХ.

Флуоресцентное окрашивание $\alpha 10$ НАХР. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток с помощью меченых антител к субъединице $\alpha 10$ НАХР проводили по протоколу [39]. Клетки фиксировали 4% формальдегидом в PBS (15 мин), трижды промывали PBS, инкубировали с 1% БСА в PBS для блокирования дальнейшего неспецифического связывания антител (30 мин). Затем инкубировали в течение 1 ч с первичным поликлональным антителом (анти- $\alpha 10$ НАХР) кролика против $\alpha 10$ НАХР (Abscam, Великобритания) в разведении 1:100, трижды промывали PBS. Заменяли PBS на 1% БСА в PBS и инкубировали клетки 1 ч со вторичным поликлональным антителом козы, меченым AF488 (AF488-анти-IgG), против IgG кролика (A11034, Thermo Fisher Scientific) в разведении 1:100. Часть клеток инкубировали без добавки первичного антитела к $\alpha 10$ НАХР, но в присутствии вторичного антитела, меченого AF488. Для визуализации ядер добавляли 5 мкМ NucRed за 15 мин до окончания инкубации. Затем клетки трижды промывали PBS. Все процедуры проводили при 22°C.

Для визуализации обеих субъединиц НАХР интенсивность флуоресценции регистрировали с использованием конфокального микроскопа

DMI6000 (Leica, Германия) при постоянных настройках мощности источников возбуждающего света и усиления сигнала во всех экспериментах каждым из методов. Значения пинхола были выбраны 1 Эйри. Далее изображения обрабатывали с помощью программ LAS X (Leica, Германия) и ImageJ с поддержкой плагинов Bio-Formats (NIH, США).

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) была применена для оценки экспрессии генов в КМ-гранулоцитах мышей контрольной группы без инъекций. Суммарную РНК экстрагировали из КМ-гранулоцитов, префронтальной области коры головного мозга и тимуса мыши с помощью набора RNeasy Mini Kit по протоколу производителя (QIAGEN, Германия). Согласно данным базы NCBI в мозге взрослых мышей на высоком уровне экспрессируются субъединицы никотиновых рецепторов $\alpha 3$ (*Chrna3*), $\alpha 7$ (*Chrna7*) и $\beta 2$ (*Chrn2*), тогда как в тимусе — $\alpha 9$ (*Chrna9*) и $\alpha 10$ (*Chrna10*), поэтому указанные ткани были взяты в качестве положительного контроля. Измерение концентрации суммарной РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop Spectrophotometer 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Качество РНК оценивали электрофоретически в 1% агарозном геле. Суммарную РНК (2 мкг) использовали для проведения реакции обратной транскрипции с помощью набора для синтеза кДНК RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва) по протоколу производителя. Образцы с РНК, подвергнутой обратной транскрипции без использования обратной транскриптазы, служили отрицательным контролем. Синтезированную кДНК использовали для ПЦР с геноспецифичными праймерами (табл. 1). ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе ДТ-лайт (ДНК-Технология, Россия) с использованием набора qPCR-Mix-NS (Евроген, Россия). Реакционная смесь общим объемом 20 мкл содержала 2 мкл кДНК, 0.4 мкМ каждого праймера, 4 мкл 5-кратной смеси qPCRmix-NS. Программа ПЦР включала начальную денатурацию (1 мин, 94°C), затем 35 циклов: 94°C в течение 20 с, 58°C в течение 30 с и синтез при 72°C в течение 45 с. Продукты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза в 3% агарозном геле. Специфику продуктов ОТ-ПЦР оценивали по длине молекул ДНК с помощью маркера длин ДНК MassRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ. Обработку результатов проводили с использованием программы MatLab (MathWorks, США). Для сравнения показателей, полученных от клеток животных контрольной и “воспалительной” групп и подвергшихся различным воздействиям, использовали тест One

Таблица 1. Перечень праймеров, использованных в работе

Ген (кодируемый белок)	Прямой 5'→3'	Обратный 5'→3'
<i>Actb</i> (β-актин)	СТТСТТGGGTATGGAATCCTG	СТТGATCTTCATGGTGCTAGG
<i>Chrna3</i> (α3)	GAAGCCATCCAAAGTGTGAAG	TGTCATCTCTGGCCATCAAG
<i>Chrna7</i> (α7)	CGTGGGCCTCTCAGTGGTCG	ACCTGCGCTCAGCTCCACAC
<i>Chrna9</i> (α9)	CAGGTCACGCTCTCCCAG	CCGTCATACTGGTCTCGATCC
<i>Chrna10</i> (α10)	GGCAGACACAGACCAGACTC	GGTCCCAATGTAGGTAGGCG
<i>Chrb2</i> (β2)	AGGGCTTGGCTGGGGCTTTC	TGGAGCTGGGAGCTGAGTGTT

Way ANOVA for Ranks с поправкой Холма–Шидака и критерий Манна–Уитни (Rank Sum Test) для сравнения результатов внутри каждой из групп животных. В таблицах и на рисунках численные результаты представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка с указанием количества независимых измерений. Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение количества изолированных клеток.

Количество зрелых гранулоцитов, изолированных из брюшной полости животных, было значительно выше при наличии у них острого воспаления, что указывает на усиленную миграцию нейтрофилов в очаг инфицирования. Из костного мозга мышей с воспалением было выделено существенно меньшее количество зрелых гранулоцитов, чем из костного мозга контрольных животных (табл. 2). Вероятно, это связано с тем, что при развитии воспалительного процесса в ответ на введение зимозана зрелые нейтрофилы из крови мигрируют в очаг воспаления, а их пул в крови пополняется за счет клеток костного мозга. В дальнейших экспериментах были использованы нейтрофильные гранулоциты костного мозга (КМ-гранулоциты).

Параметры адгезии при остром воспалении. Количество прикрепившихся КМ-гранулоцитов, оцениваемое по оптической плотности, у животных с острым воспалением не отличалось по абсолютной величине от такового у контрольных животных: средние значения $OD_{492-405}$ составляли 0.056 ± 0.008 в контроле ($n = 16$) и 0.054 ± 0.006 при воспалении ($n = 16$), таким образом, различий в исходном уровне адгезии клеток мышей из разных групп не наблюдалось.

Влияние лигандов nAChR на адгезию. Никотин (0.01–100 мкМ, 30 мин) в зависимости от концентрации усиливал адгезию КМ-гранулоцитов

контрольных животных и животных с воспалением (табл. 3). В концентрациях 0.01 и 1 мкМ, примерно соответствующих уровню никотина в крови курильщиков [40, 41], никотин оказывал более сильное действие на адгезию клеток животных с воспалением, чем клеток контролей. Таким образом, в обеих группах экзогенный никотин потенцировал способность КМ-нейтрофилов к прикреплению на субстрате. Участие nAChR разного типа в регуляции адгезии и действии никотина на нее было проверено с использованием известных селективных антагонистов nAChR (тип рецептора указан в скобках): 10 нМ α-СТХ (α7); 10 нМ G1C (α3β2); 5 и 200 нМ МП (α3α6*β2 и α7/α3α6*β2 соответственно); 10 нМ Rg1A и 50 нМ Vc1.1 (α9α10) [24, 42–46]. Исследовано одиночное действие токсинов и действие никотина (100 мкМ) в присутствии одного из токсинов.

Ранее нами было показано, что в регуляции адгезии нейтрофилов из очага воспаления участвуют α3α6*β2, α7 nAChR [35], в КМ-гранулоцитах, кроме того, обнаружено участие α9α10 в регуляции данной функции. В настоящей работе с использованием α-СТХ, G1C и МП (в двух концентрациях) исследована роль α3α6*β2 и α7 nAChR в адгезии КМ-гранулоцитов контрольных мышей и животных с воспалением (рис. 1б–1д).

Селективный антагонист α7 nAChR α-СТХ (10 нМ) значительно усиливал адгезию нейтрофилов мышей обеих групп (рис. 1б, два столбца слева), что указывает на регуляторную роль α7 nAChR (с отрицательным знаком). Никотин, примененный совместно с α-СТХ, не влиял на адгезию в контрольной группе и существенно блокировал ее в группе животных с воспалением, так что величина их адгезии не отличалась от таковой у интактных клеток (рис. 1б, столбцы справа). Таким образом, в действии никотина на клетки животных с воспалением α7 nAChR обеспечивал положительную связь.

Таблица 2. Количество гранулоцитов, выделенных из перитонеального экссудата и костного мозга мышей контрольной группы (Контроль) и мышей с острым воспалением (Воспаление)

Локализация клеток	Изолированные зрелые гранулоциты, шт. $\times 10^7$		p^*
	Контроль	Воспаление	
Брюшная полость	0.23 ± 0.07 $n = 11$	$1.27 \pm 0.20 \#$ $n = 17$	< 0.001
Костный мозг	3.14 ± 0.26 $n = 22$	$2.36 \pm 0.24 \#$ $n = 22$	0.021

* – Сравнение количества выделенных зрелых гранулоцитов в контрольной группе и в группе животных с острым воспалением, # – значимое различие между показателями в контрольной группе и группе с воспалением.

Таблица 3. Влияние никотина в разных концентрациях на адгезию гранулоцитов костного мозга животных контрольной группы (Контроль) и животных с воспалением (Воспаление)

Концентрация никотина, мкМ	n	Контроль, %	Воспаление, %
0	16	100	100
0.01	7	$122 \pm 8^*$	$164 \pm 15^{*\#}$
0.1	7	$148 \pm 16^*$	$163 \pm 15^*$
1	9	$140 \pm 6^*$	$185 \pm 22^{*\#}$
10	9	$141 \pm 12^*$	$161 \pm 16^*$
100	16	$142 \pm 9^*$	$156 \pm 11^*$

* – В каждой группе (Контроль и Воспаление) адгезию в присутствии никотина в различных концентрациях выражали в % от значения в его отсутствие, которое принимали за 100%.

– Отличие от параметра в контрольной группе статистически значимо, $p < 0.05$.

Количество прикрепившихся клеток в присутствии 10 нМ G1C не отличалось от количества прикрепившихся интактных клеток в обеих группах (рис. 1в, столбцы слева), тогда как добавление никотина усиливало адгезию, но отличий между группами выявлено не было, то есть, усиливающее действие никотина сохранялось в присутствии антагониста $\alpha 3(\alpha 6^*)\beta 2$ nAHP. Также 5 нМ МП, являющийся антагонистом этого типа рецепторов в низкой концентрации, не влиял на адгезию клеток контрольных животных и незначительно уменьшал ее у животных с воспалением (рис. 1г, столбцы слева). При совместном действии 5 нМ МП и никотина адгезия усиливалась в обеих группах (рис. 1г, столбцы справа), как это наблюдалось в условиях “никотин + G1C”. Таким образом, G1C и 5 нМ МП, примененные как антагонисты $\alpha 3(\alpha 6^*)\beta 2$ nAHP, не влияли на адгезию интактных клеток и не блокировали действие никотина на нее. Это может означать, что указанные рецепторы не участвуют в регуляции адгезии.

В присутствии 200 нМ МП, действующего как антагонист $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ nAHP, наблюдалось усиление адгезии контрольных клеток по сравнению с показателем интактных клеток (рис. 1д, левые столбцы).

Добавка никотина приводила к значительному подавлению адгезии по сравнению с действием самого МП (рис. 1д, правые столбцы), что отличает данный эффект от действия 5 нМ МП совместно с никотином и, вероятно, является следствием блокирования $\alpha 7$ nAHP. В случае совместного применения никотина и 200 нМ МП (рис. 1д, столбцы справа) в клетках животных с воспалением адгезия изменялась в том же направлении, как и при совместном действии никотина и α -СТХ (рис. 1б), что можно отнести на счет доминирующей роли $\alpha 7$ nAHP в регуляции адгезии КМ-гранулоцитов при воспалении.

Оба использованных антагониста $\alpha 9\alpha 10$ nAHP α -конотоксины RgIA и Vc1.1 значительно усиливали адгезию клеток животных обеих групп без значительного различия между группами (рис. 1е, 1ж, столбцы слева в каждом блоке), что указывает на отрицательную регуляцию адгезии со стороны этих рецепторов. Добавление никотина не изменяло значительно адгезивность в их присутствии в клетках животных обеих групп (рис. 1е, 1ж, столбцы справа в каждом блоке). При использовании RgIA совместно с никотином эффект был слабее в группе с воспалением по сравнению с контролем, но он

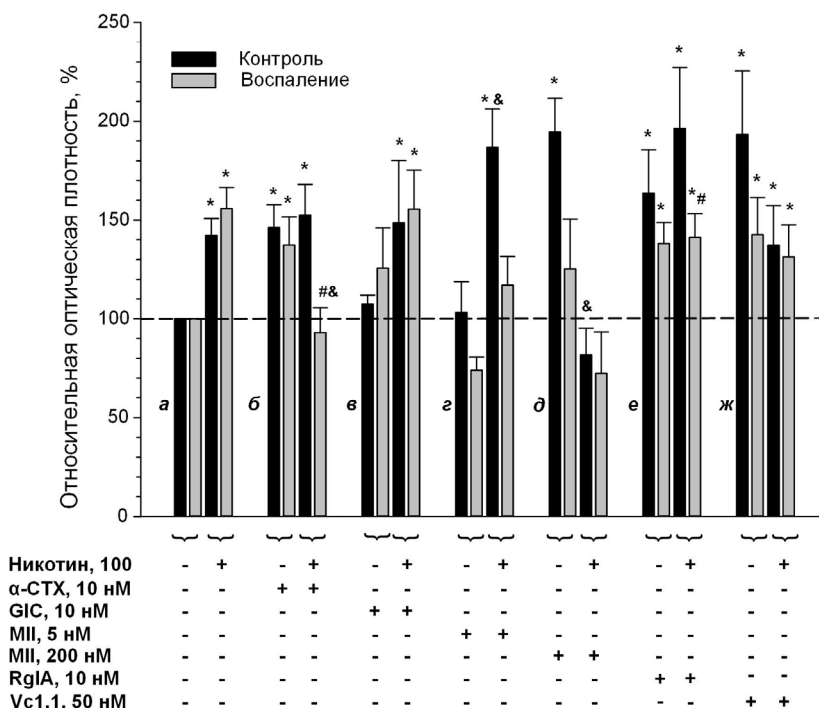


Рис. 1. Влияние лигандов нАХР на адгезию КМ-гранулоцитов контрольных животных и животных с воспалением. Показано действие 100 мкМ никотина (а) или одного из антагонистов и антагониста совместно с никотином на адгезию интактных клеток: 10 нМ α -СТХ (б), 10 нМ GIC (в), 5 нМ MII (г), 200 нМ MII (д), 10 нМ RgIA (е) или 50 нМ Vc1.1 (ж). Одиночное действие токсинов на адгезию КМ-гранулоцитов контрольных мышей и животных с воспалением представлено двумя столбцами слева соответственно, действие никотина (100 мкМ) в присутствии одного из антагонистов – двумя столбцами справа в каждой группе диаграмм (б–ж); для сравнения показано действие никотина на интактные клетки (а). Присутствие или отсутствие вещества обозначены “+” или “-” соответственно. * – Значимое отличие от параметра, принятого за 100%; # – отличие эффекта агента в контрольной и “воспалительной” группах; & – различие между действием антагониста и совместно антагонист + никотин на интактные клетки, $p < 0.05$.

не отличался от эффекта самого антагониста, то есть и в контроле, и при воспалении никотин не действовал при блокировании $\alpha 9\alpha 10$ нАХР, что указывает на значительную роль этих рецепторов в усиливающем действии никотина. Учитывая важную роль $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ нАХР в регуляции адгезии КМ-нейтрофилов, мы протестировали данные клетки на присутствие этих рецепторов на цитоплазматической мембране (рис. 2, 3).

Визуализация субъединиц $\alpha 7$ и $\alpha 10$ нАХР в КМ-гранулоцитах проведена с помощью конфокальной микроскопии. Получено, что в гранулоцитах, которые были идентифицированы по окрашенным NucRed полиморфным ядрам, наблюдалось свечение в области эмиссии флуоресцентного зонда AlexaFluor488 (AF488), с которым был конъюгирован α -СТХ (AF488- α -СТХ), что указывает на связывание AF488- α -СТХ с клеточной мембраной (рис. 2а, 2б) и конститутивную экспрессию субъединицы $\alpha 7$ нАХР на мембране КМ-гранулоцитов. Для подтверждения специфичности

флуоресцентного сигнала была измерена флуоресценция клеток, инкубированных с немеченым α -СТХ, которая не была значительной (данные не приводятся).

В другой серии экспериментов использовали первичное анти- $\alpha 10$ нАХР и вторичное AF488-анти-IgG антитела. Было обнаружено интенсивное свечение в области эмиссии флуоресцентного зонда AF488, что свидетельствует о присутствии субъединицы $\alpha 10$ нАХР на цитоплазматической мембране КМ-гранулоцитов мыши (рис. 3б). Данные результаты получены впервые для нативных КМ-гранулоцитов.

Участие компонентов внутриклеточной сигнализации в действии никотина на адгезию КМ-гранулоцитов. В нервных клетках сигнальные события, следующие за связыванием агонистов с нАХР, опосредуются катион-проводящим ионным каналом [47–50]. В КМ-гранулоцитах, как и в других нативных иммунных клетках, ионотропное действие

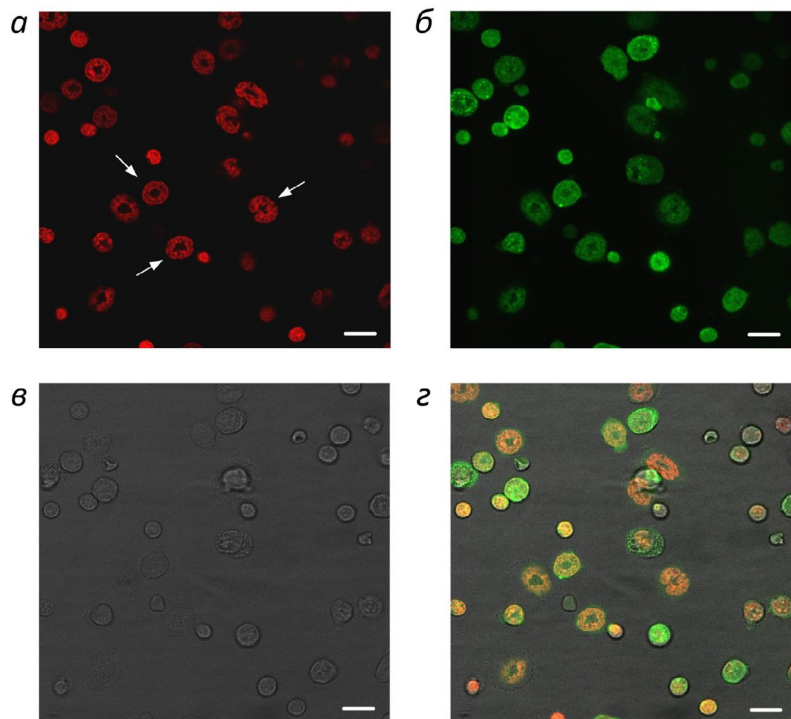


Рис. 2. Визуализация субъединицы $\alpha 7$ nAHP на КМ-гранулоцитах. Микрофотографии гранулоцитов костного мозга мыши: *a, б* – флуоресцентные сигналы NucRed и AF488- α -CTX соответственно; *в* – изображение в видимом свете; *г* – наложение изображений. Примеры гранулоцитов показаны стрелками. Масштабная линейка: 10 мкм.

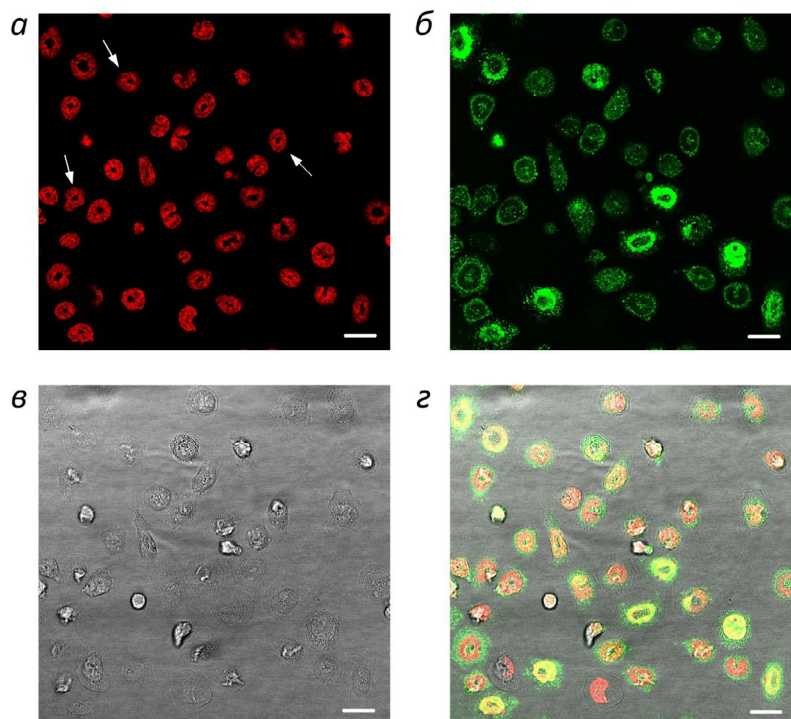


Рис. 3. Визуализация субъединицы $\alpha 10$ nAHP на КМ-гранулоцитах. Микрофотографии клеток после обработки первичным анти- $\alpha 10$ nAHP и вторичным AF488-анти-IgG антителами: *a, б* – флуоресцентные сигналы NucRed и AF488- α -CTX соответственно; *в* – изображение в видимом свете; *г* – наложение изображений. Примеры гранулоцитов показаны стрелками. Масштабная линейка: 10 мкм.

лигандов nAХР не зарегистрировано, и сигнализация nAХР остается малоисследованной. Далее с использованием специфических ингибиторов мы проанализировали участие в регуляции адгезии и действии никотина на нее компонентов внутриклеточной сигнализации, таких как гетеротримерные G-белки и протеинкиназы (PKC, PI3K, тирозиновые протеинкиназы, RhoA-ассоциированная протеинкиназа). Первоначально было исследовано действие самих ингибиторов на адгезию гранулоцитов животных разных групп.

Известно, что в нервных и опухолевых клетках $\alpha 7$ nAХР взаимодействует и передает сигналы через гетеротримерные G-белки [51, 52], также с участием гетеротримерных G-белков происходит активация $\beta 1-3$ интегринов [53]. В наших экспериментах коклюшный токсин (РТХ), ингибирующий белки G_i и G_o [54], усиливал адгезию клеток в контрольной группе и не влиял на нее при воспалении (рис. 4б). Следует отметить, что действие РТХ мы наблюдали через 2 ч после его добавки, соответственно в этой серии экспериментов действие никотина также продолжалось в течение 2 ч, при этом в контрольной группе никотин усиливал адгезию, как и при более коротком времени аппликации (30 мин), но в группе с воспалением длительная инкубация с никотином приводила к существенному подавлению адгезии (рис. 4а). При совместном применении РТХ и 10 мкМ никотина в клетках контрольных животных также наблюдалось усиление адгезии без значительного отличия от действия данных веществ по отдельности (рис. 4б, 4в, черные столбцы). Адгезия клеток животных с воспалением в присутствии обоих веществ не изменялась по сравнению с адгезией интактных клеток (рис. 4в, серый столбец). Таким образом, в присутствии РТХ никотин не действовал существенным образом на адгезию КМ-гранулоцитов, что указывает на участие блокируемых G-белков (G_i или G_o) в действии никотина.

Действие других ингибиторов сигнальной трансдукции на адгезию и их влияние на действие никотина, как агониста nAХР разного типа, показано на рис. 5а, 5б соответственно. Стауроспорин (10 нМ), действующий в используемой концентрации как ингибитор PKC, усиливал адгезию КМ-гранулоцитов в обеих группах без различия между группами (рис. 5а). Вортманнин (10 нМ), ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), значительно усиливал адгезию клеток мышей контрольной группы и не изменял ее в группе с воспалением, при этом различия в его действии между группами были значительными. Тирфостин 51 (50 нМ), ингибирующий тирозиновые протеинкиназы, не оказывал заметного действия

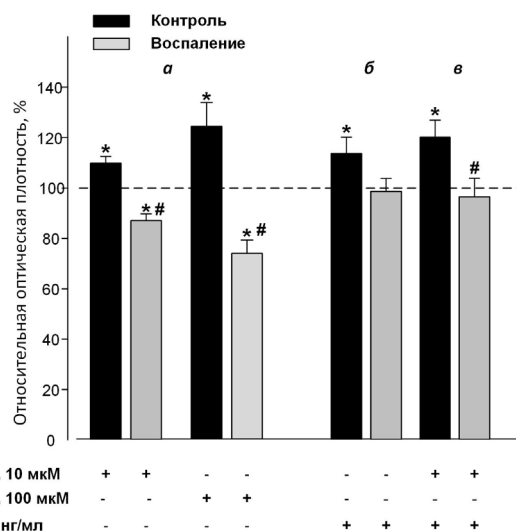


Рис. 4. Влияние никотина и коклюшного токсина (РТХ) на адгезию КМ-гранулоцитов. Клетки инкубировали с никотином, РТХ или с обоими веществами в течение 2 ч. Показано действие: 10 и 100 мкМ никотина (а); 300 нг/мл РТХ (б); совместно 10 мкМ никотина и РТХ (в). Обозначения: “+” и “-” – присутствие или отсутствие вещества соответственно; * – отличие от параметра интактных клеток; # – различие между параметром клеток контрольных животных и животных с воспалением; $n = 4$, $p < 0.05$.

на адгезию клеток животных обеих групп. Y27632 (140 нМ), блокатор Rho-зависимой протеинкиназы (ROCK), усиливал адгезию в контрольной группе и существенно не изменял ее в группе с воспалением, при этом наблюдалось достоверное различие между его эффектом в разных группах (рис. 5а). Таким образом, PKC, PI3K и ROCK участвуют в регуляции адгезии с отрицательным знаком, тогда как тирозиновые протеинкиназы слабо вовлечены в этот процесс, при остром воспалении отрицательная роль PI3K и ROCK в регуляции адгезии значительно ослабляется.

В присутствии 10 нМ стауроспорина никотин не оказывал дополнительного усиливающего действия на адгезию клеток животных обеих групп по сравнению с действием самого ингибитора (рис. 5б2). В присутствии тирфостина 51 (50 нМ) усиливающее действие никотина на адгезию сохранялось в обеих группах мышей (рис. 5б3), тогда как никотин не влиял на клетки, обработанные вортманнином или Y27632 (рис. 5б4 и 5б5 соответственно). Таким образом, согласно результатам по совместному действию ингибиторов и никотина на адгезию КМ-гранулоцитов в ее регуляции через nAХР участвуют PKC, PI3K и ROCK как в норме, так и при наличии воспалительного процесса.

Экспрессия генов субъединиц nAХР в КМ-гранулоцитах была оценена с помощью ОТ-ПЦР.

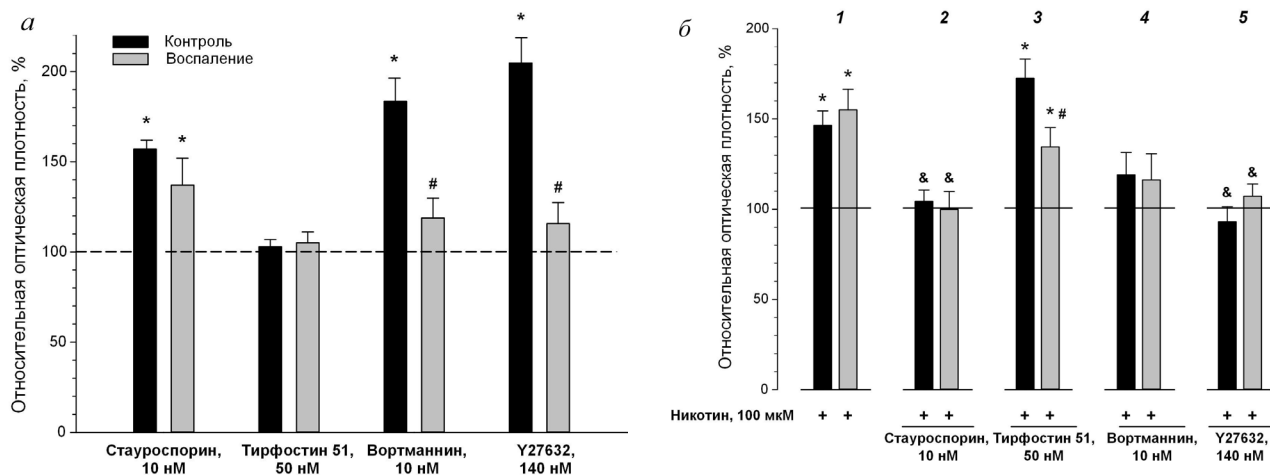


Рис. 5. Действие никотина на адгезию в присутствии ингибиторов компонентов внутриклеточной сигнализации. *а* – Сравнение действия ингибиторов на адгезию КМ-гранулоцитов мышей контрольной группы (черные столбцы) и мышей с воспалением (серые столбцы). Эффект каждого из ингибиторов в группах рассчитан по отношению величины ΔOD от клеток, обработанных одним из ингибиторов, к величине ΔOD от интактных клеток, принятой за 100%. *б* – Показаны эффекты: 100 мкМ никотина на интактные клетки (1) и 100 мкМ никотина совместно с 10 нМ стауроспорином (2); 50 нМ тирфостин 51 (3), 10 нМ вортманнином (4) или 140 нМ Y27632 (5). Эффект никотина в каждой группе рассчитан: *а* – как отношение величины ΔOD от клеток, обработанных никотином, к величине ΔOD от интактных клеток, принятой за 100%; *б* – как отношение величины ΔOD от клеток, обработанных никотином + один из ингибиторов, к величине ΔOD от клеток, обработанных тем же ингибитором, принятой за 100%. Проведено 5–16 независимых измерений. * – Значимое отличие от параметра, принятого за 100%; # – различие между параметром клеток контрольных животных и животных с воспалением; & – отличие от эффекта никотина на интактные клетки, $p < 0.05$.

Функциональные свойства нАХР, как известно, во многом определяются субъединичным составом рецептора. В КМ-гранулоцитах контрольных животных была выявлена экспрессия генов, кодирующих субъединицы $\alpha 7$ и $\beta 2$, а также подтверждена экспрессия генов субъединиц $\alpha 9$ и $\alpha 10$ (рис. 6). Экспрессия субъединицы $\alpha 3$ в образцах клеток от 5 животных не была обнаружена (пример приведен на рис. 6), хотя мы ожидали ее увидеть по аналогии с нейтрофилами из очага воспаления [35]. Полученный результат согласуется с оценкой экспрессии субъединицы $\alpha 3$ в КМ-гранулоцитах мышей этой линии, данной в работе St-Pierre и соавт. [55].

ОБСУЖДЕНИЕ

Основные результаты нашей работы следующие: 1) никотин (0.01–100 мкМ) значительно усиливал адгезию клеток животных контрольной группы и животных с воспалительным процессом, тогда как при продолжительном воздействии в клетках последних никотин подавлял ее, наблюдались различия между контрольной группой и группой с воспалением; 2) согласно действию селективных антагонистов нАХР в регуляции адгезии гранулоцитов костного мозга мыши участвуют

преимущественно $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ типы нАХР; экспрессия субъединиц $\alpha 7$ и $\alpha 10$ нАХР на мембране нативных клеток продемонстрирована экспериментально; 3) при развитии воспалительного процесса в организме усиливается роль $\alpha 7$ нАХР, которые присутствуют на мембране КМ-гранулоцитов конвенционально; 4) действие никотина на адгезию КМ-гранулоцитов опосредовано гетеротримерными G-белками, РКС, PI3K и ROCK как в норме, так и при наличии воспаления.

Известно, что регуляция воспалительного процесса нервной системой происходит с участием эндогенных холинергических медиаторов и нАХР, локализованных на иммунных клетках. Представления о роли центральной нервной системы в иммунном ответе на инфицирование, воспаление или повреждение сформулированы в виде концепции “холинергического противовоспалительного пути” (или “воспалительного рефлекса”), включающей регуляторное влияние эндогенного АХ на продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами и другими клетками врожденной иммунной системы через нАХР [56, 57]. Подтверждение данного подхода получено при исследовании заболеваний с воспалительным компонентом и на моделях воспалительных процессов у животных (см., например, [58]). Основной мишенью

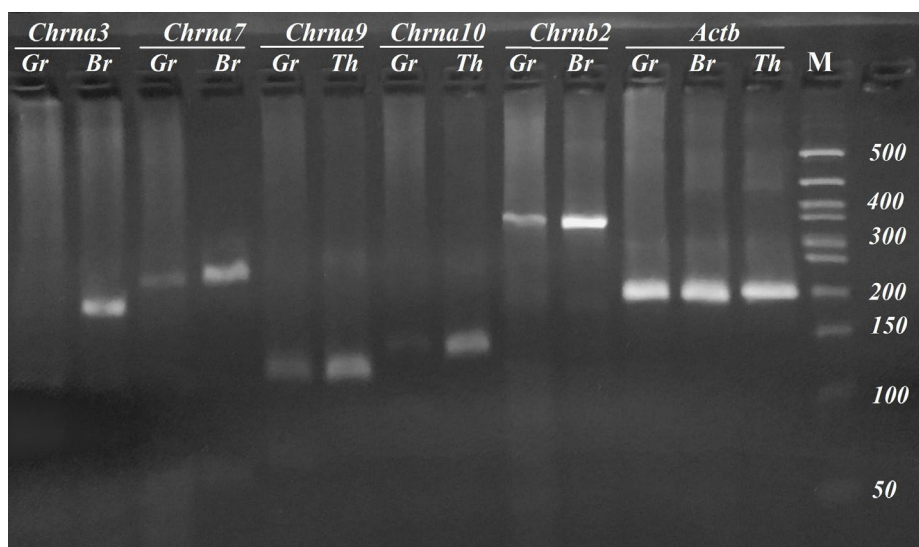


Рис. 6. Пример результата электрофореза продуктов ПЦР в агарозном геле. Показаны синтезированные ампликоны субъединиц нАХР $\alpha 3$ (*Chrna3*), $\alpha 7$ (*Chrna7*), $\alpha 9$ (*Chrna9*), $\alpha 10$ (*Chrna10*), $\beta 2$ (*Chrn2*) и β -актина (*Actb*) в пробах гранулоцитов костного мозга мыши BALB/c (*Gr*), в образце из головного мозга мыши (*Br*) и образце из тимуса мыши (*Th*). Тимус и головной мозг мыши взяты в качестве положительного контроля. М – маркер длин ДНК (п.о.).

нейрорегуляции считается $\alpha 7$ нАХР на клетках миелоидного происхождения.

Используемая нами модель воспалительной реакции имеет системный характер с распространением на костный мозг, что обнаружено по значительному уменьшению в нем количества зрелых гранулоцитов, тогда как в брюшной полости, где находился очаг воспаления, их количество существенно возросло по сравнению с количеством у контрольных животных (табл. 2). Этот факт свидетельствует об усиленной миграции из кровеносного русла в очаг воспаления зрелых гранулоцитов, пул которых пополняется из костного мозга. Известно, что цитотоксический потенциал нейтрофила устанавливается на ранней промиелоцитарной стадии [59], однако на каждом этапе миграции происходит адаптация фенотипа и функций к окружающим условиям с помощью активации определенных транскрипционных факторов [60]. При изменении условий содержания животных или при воспалительном процессе в фенотипически гетерогенном пуле КМ-нейтрофилов изменяется соотношение незрелых и зрелых клеток [61, 62]. В наших экспериментах можно было ожидать, что регуляция рецепторных функций лигандами нАХР при воспалении изменится.

Адгезия является первой стадией выхода нейтрофилов из костного мозга в кровь и миграции из кровеносных сосудов в очаг микробной инвазии или повреждения [2, 4]. Ранее мы показали, что никотин и холин усиливали адгезию КМ-гранулоцитов интактных мышей, и $\alpha 9\alpha 10$ нАХР участвуют

в их действии [21]. Никотин также усиливал адгезию клеток мышей, получивших инъекцию раствора Хенкса или суспензии зимозана, вызывающего воспаление (табл. 3). При низких концентрациях никотина КМ-гранулоциты животных с воспалением реагировали на него значительно сильнее по сравнению с клетками контрольных животных. При продолжительной инкубации с никотином клетки контрольных животных также отвечали усилением адгезии, тогда как адгезивные свойства клеток животных с воспалением значительно ослаблялись (рис. 4а). Полученные результаты согласуются с работами, в которых показано усиление адгезии под действием никотина за счет увеличения экспрессии адгезионных молекул [27–29], что представляет опасность для курильщиков особенно при воспалительных заболеваниях из-за опасности тромбообразования. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения, так как существуют и противоположные данные: в моноцитах периферической крови человека никотин подавлял экспрессию ICAM-1 с участием $\alpha 7$ нАХР в присутствии липополисахарида как воспалительного агента [26].

Согласно результатам, полученным при использовании селективных антагонистов $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ нАХР (рис. 1), в поддержании адгезивных свойств интактных КМ-гранулоцитов животных обеих групп наиболее значимы $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ нАХР, которые, судя по направлению эффекта самих антагонистов (α -СТХ, 200 нМ МП, RgIA, Vc1.1), осуществляют регуляцию адгезии с отрицательным знаком. Так как происходит конститутивная

экспрессия этих рецепторов на мембране КМ-гранулоцитов (рис. 2, 3), а также экспрессия генов их субъединиц, можно предположить, что наряду с другими рецепторами они участвуют в обеспечении нейтрофильного гомеостаза в костном мозге [63]. Вероятно, что эндогенные АХ и холин, как агонисты nAХР, регулируют адгезию гранулоцитов к эндотелию сосудов и их миграцию по механизму ауто- и паракринной регуляции [34].

При развитии воспаления роль $\alpha 9\alpha 10$ nAХР незначительно ослаблялась по сравнению с клетками контролей (рис. 1е, 1ж). Согласно нашим результатам роль $\alpha 3(\alpha 6^*)\beta 2$ nAХР в регуляции адгезии КМ-гранулоцитов нельзя интерпретировать как значительную, так как α -конотоксины G1С и МП (5 нМ), ингибирующие в использованных концентрациях указанный рецептор, не влияли на адгезию клеток в контроле и слабо модифицировали ее в “воспалительной” группе (рис. 1в, 1з). В действии никотина на адгезию участие $\alpha 3(\alpha 6^*)\beta 2$ nAХР также не было обнаружено: в присутствии G1С и 5 нМ МП эффект никотина сохранялся в обеих группах (рис. 1в, 1з). Возможно, что такие результаты объясняются низкой экспрессией субъединиц $\alpha 3$ (или $\alpha 6^?$) в КМ-гранулоцитах [55]. Нами также обнаружен низкий уровень экспрессии гена субъединицы $\alpha 3$ (рис. 6). Встает вопрос о типе субъединиц, с которыми кооперируется субъединица $\beta 2$, экспрессия гена которой довольно высокая (рис. 6). Экспрессируемая на довольно высоком уровне субъединица $\beta 2$ может формировать рецепторный тип $\alpha 4\beta 2$, как это показано, в частности, в спленocyтaх мыши [64]. В наших предварительных экспериментах обнаружено присутствие мРНК субъединицы $\alpha 4$ в некоторых образцах, однако требуются детальные исследования формирования активного рецептора с ее участием, регулирующего функции КМ-гранулоцитов. Следует отметить, что уровень мРНК не всегда характеризует изменения уровня белка, важную роль в активации рецепторов или ферментов играет посттрансляционная модификация белка [65, 66]. Были бы интересны эксперименты по определению содержания белка данных субъединиц.

Участие сигнальных компонентов в регуляции никотином адгезии КМ-гранулоцитов животных двух групп мы оценивали с помощью ингибиторов в целом, не выделяя отдельный тип nAХР. Согласно полученным результатам РКС, P13K и ROCK участвуют в регуляции адгезии с отрицательным знаком, так как их ингибирование приводило к усилению адгезии (рис. 5а). Тогда как тирозинные протеинкиназы слабо вовлечены в этот процесс. При остром воспалении отрицательная роль P13K и ROCK в регуляции адгезии значительно

ослабляется (рис. 5а). Никотин не действовал в присутствии РТХ (рис. 4в), что указывает на участие гетеротриметных G-белков в сигнализации nAХР, активируемых никотином. С учетом действия самих ингибиторов на адгезию, получено, что потенцирование адгезионных свойств КМ-гранулоцитов никотином происходит при положительной регуляции со стороны РКС, P13K и ROCK (рис. 5б). Роль РКС и P13K в сигнализации $\beta 2$ -интегринов нейтрофилов документирована [12], показано их участие в регуляции ацетилхолином адгезии кератиноцитов через $\alpha 3$, $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAХР [31–33]. Ранее не было описано участие указанных сигнальных компонентов в регуляции адгезии нейтрофилов лигандами nAХР, в том числе никотином.

Авторы благодарят А.А. Гриневича за помощь в анализе результатов, М.В. Васильчикову за техническую поддержку в работе с животными.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17–00–00058) в рамках комплексного междисциплинарного проекта КОМФИ № 17–00–00064.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Itou T., Collins L.V., Thoren F.B., Dahlgren C., Karlsson A. 2006. Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: A comparison of bone marrow and peritoneal exudate PMN. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 575–583. doi 10.1128/CVI.13.5.575–583.2006
2. Liew P.X., Kubes P. 2019. The neutrophil’s role during health and disease. *Physiol. Rev.* **99**, 1223–1248. doi 10.1152/physrev.00012.2018
3. Rosales C. 2020. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 377–396. doi 10.1002/JLB.4MIR0220–574RR
4. Nauseef W.M., Borregaard N. 2014. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* **15**, 602–611. doi 10.1038/ni.2921
5. Hajishengallis G., Moutsopoulos N.M., Hajishengallis E., Chavakis T. 2016. Immune and regulatory functions of neutrophils in inflammatory bone loss. *Semin.*

- Immunol.* **28**, 146–158.
doi 10.1016/j.smim.2016.02.002
6. Tan S.-Y., Weninger W. 2017. Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. *Current Opinion Immunol.* **44**, 34–42.
doi 10.1016/j.coi.2016.11.002
 7. Richardson I.M., Calo C.J., Hind L.E. 2021. Microphysiological systems for studying cellular crosstalk during the neutrophil response to infection. *Front. Immunol.* **27**, 12:661537. doi 10.3389/fimmu.2021.661537
 8. Root R.K. 1990. Leukocyte adhesion proteins: Their role in neutrophil function. *Trans Am. Clin. Climatol. Assoc.* **101**, 207–224.
 9. Kolaczowska E., Kubes P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175.
doi: 10.1038/nri3399
 10. Nourshargh S., Alon R. 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity.* **41**, 694–707. doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008
 11. Filippi M.-D. 2019. Neutrophil transendothelial migration: Updates and new perspectives. *Blood.* **133**, 2149–2158.
doi 10.1182/blood-2018-12-844605
 12. Bouti P., Webbers S.D.S., Fagerholm S.C., Alon R., Moser M., Matlung H.L., Kuijpers T.W. 2021. b2 Integrin signaling cascade in neutrophils: More than a single function. *Front. Immunol.* **11**, 619925.
doi 10.3389/fimmu.2020.619925
 13. Margraf A., Lowell C.A., Zarbock A. 2022. Neutrophils in acute inflammation: Current concepts and translational implications. *Blood.* **139**, 2130–2144.
doi 10.1182/blood.2021012295
 14. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., Nourshargh S. 2007. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–689.
doi 10.1038/nri2156
 15. Futosi K., Fodor S., Mócsai A. 2013. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 638–650.
doi 10.1016/j.intimp.2013.06.034
 16. Qiu D., Zhang L., Zhan J., Yang Q., Xiong H., Hu W., Ji Q., Huang J. 2020. Hyperglycemia decreases epithelial cell proliferation and attenuates neutrophil activity by reducing ICAM-1 and LFA-1 expression levels. *Front. Genet.* **11**, 616988.
doi 10.3389/fgene.2020.616988
 17. Conley H.E., Sheats M.K. 2023. Targeting neutrophil β 2-integrins: A review of relevant resources, tools, and methods. *Biomolecules.* **13**, 892.
 18. González-Amaro R. 2011. Cell adhesion, inflammation and therapy: Old ideas and a significant step forward. *Acta Pharmacol. Sinica.* **32**, 1431–1432.
doi 10.1038/aps.2011.154
 19. Ren C., Tong Y.L., Li J.C., Lu Z.Q., Yao Y.M. 2017. The protective effect of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor activation on critical illness and its mechanism. *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 46–56.
doi 10.7150/ijbs.16404
 20. Belchamber K.B.R., Hughes M.J., Spittle D.A., Walker E.M., Sapey E. 2021. New pharmacological tools to target leukocyte trafficking in lung disease. *Front. Immunol.* **12**, 704173.
doi 10.3389/fimmu.2021.704173
 21. Safronova V.G., Vulfius K.A., Astashev M.E., Tikhonova I.V., Serov D.A., Jirova E.A., Pershina E.V., Senko D.A., Zhmak M.N., Kasheverov I.E., Tsetlin V.I. 2021. α 9 α 10 nicotinic acetylcholine receptors regulate murine bone marrow granulocyte functions. *Immunobiology.* **226**, 152047.
doi 10.1016/j.imbio.2020.152047
 22. Fujii T., Mashimo M., Moriwaki Y., Misawa H., Ono S., Horiguchi K., Kawashima K. 2017. Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Front. Immunol.* **8**, 1085.
doi 10.3389/fimmu.2017.01085
 23. Herman M., Robert Tarran R. 2020. E-cigarettes, nicotine, the lung and the brain: Multi-level cascading pathophysiology. *J. Physiol.* **598**, 5063–5071.
doi 10.1113/JP278388
 24. Shelukhina I., Siniavin A., Kasheverov I., Ojomoko L., Tsetlin V., Utkin Y. 2023. α 7- and α 9-containing nicotinic acetylcholine receptors in the functioning of immune system and in pain. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 6524.
doi 10.3390/ijms24076524
 25. Slevin M., Iemma R.S., Zeinolabediny Y., Liu D., Ferris G.R., Caprio V., Phillips N., Di Napoli M., Guo B., Zeng X., Al Baradie R., Binsaleh N.K., McDowell G., Fang W.H. 2018. Acetylcholine inhibits monomeric C-reactive protein induced inflammation, endothelial cell adhesion, and platelet aggregation; A potential therapeutic? *Front. Immunol.* **9**, 2124.
doi 10.3389/fimmu.2018.02124
 26. Hamano R., Takahashi H.K., Iwagaki H., Yoshino T., Nishibori M., Tanaka N. 2006. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes. *Shock.* **26**, 358–364.
doi 10.1097/01.shk.0000228168.86845.60
 27. Sato Y., Kosuke Maruyama K., Mikami M., Sato S. 2023. Effects of nicotine and lipopolysaccharide stimulation on adhesion molecules in human gingival endothelial cells. *Odontology.* **111**, 428–438.
doi 10.1007/s10266-022-00753-1
 28. Scott D.A., Palmer R.M. 2002. The influence of tobacco smoking on adhesion molecule profiles. *Tob. Induc. Dis.* **1**, 7–25.
doi 10.1186/1617-9625-1-1-7
 29. Li Z.-Z., Guo Z.-Z., Zhang Z., Cao Q.-A., Zhu Y.-J., Yao H.-L., Wu L.-L., Dai Q.-Y. 2015. Nicotine-induced upregulation of VCAM-1, MMP-2, and MMP-9 through the α 7-nAChR-JNK pathway in RAW264.7

- and MOVAS cells. *Mol. Cell. Biochem.* **399**, 49–58. doi 10.1007/s11010-014-2231-z
30. Yong T., Zheng M.Q., Linthicum D.S. 1997. Nicotine induces leukocyte rolling and adhesion in the cerebral microcirculation of the mouse. *J. Neuroimmunol.* **80**, 158–164. doi 10.1016/s0165-5728(97)00151-3
 31. Grando S.A. 2006. Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp. Dermatol.* **15**, 265–282. doi 10.1111/j.0906-6705.2006.00410.x
 32. Chernyavsky A.I., Arredondo J., Vetter D.E., Grando S.A. 2007. Central role of alpha9 acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Exp. Cell. Res.* **313**, 3542–3555. doi 10.1016/j.yexcr.2007.07.011
 33. Chernyavsky A.I., Galitovskiy V., Grando S.A. 2015. Molecular mechanisms of synergy of corneal muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in upregulation of E-cadherin expression. *Int. Immunopharmacol.* **29**, 15–20. doi 10.1016/j.intimp.2015.04.036
 34. Mashimo M., Moriwaki Y., Misawa H., Kawashima K., Fujii T. 2021. Regulation of Immune functions by non-neuronal acetylcholine (ACh) via muscarinic and nicotinic ACh receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6818. doi 10.3390/ijms22136818
 35. Safronova V.G., Vulfius C.A., Shelukhina I.V., Mal'tseva V.N., Berezhnov A.V., Fedotova E.I., Miftahova R.G., Kryukova E.V., Grinevich A.A., Tsetlin V.I. 2016. Nicotinic receptor involvement in regulation of functions of mouse neutrophils from inflammatory site. *Immunobiology.* **221**, 761–772. doi 10.1016/j.imbio.2016.01.016
 36. Boxio R., Bossenmeyer-Pourie C., Steinckwich N., Dournon C., Nusse O. 2004. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 604–611. doi 10.1189/jlb.0703340
 37. Filina J.V., Gabdoulkhakova A.G., Safronova V.G. 2014. RhoA/ROCK downregulates FPR2-mediated NADPH oxidase activation in mouse bone marrow granulocytes. *Cell. Signal.* **26**, 2138–2146. doi 10.1016/j.cellsig.2014.05.017
 38. Shelukhina I.V., Kryukova E.V., Lips K.S., Tsetlin V.I., Kummer W. 2009. Presence of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on dorsal root ganglion neurons proved using knockout mice and selective alpha-neurotoxins in histochemistry. *J. Neurochem.* **109**, 1087–1095. doi 10.1111/j.1471-4159.2009.06033.x
 39. Lykhmus O., Voytenko L.P., Lips K.S., Bergen I., Krasteva-Christ G., Vetter D.E., Kummer W., Skok M. 2017. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 9$ and $\alpha 10$ subunits are expressed in the brain of mice. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 282. doi 10.3389/fncel.2017.00282
 40. Russell M.A., Jarvis M., Iyer R., Feyerabend C. 1980. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br. Med. J.* **280**, 972–976. doi 10.1136/bmj.280.6219.972
 41. Benowitz N.L., Hukkanen J., Jacob P. 3rd. 2009. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb. Exp. Pharmacol.* **192**, 29–60. doi 10.1007/978-3-540-69248-5_2
 42. Alama A., Bruzzo C., Cavaliere Z., Forlani A., Utkin Y., Casciano I., Romani M. 2011. Inhibition of the nicotinic acetylcholine receptors by cobra venom α -neurotoxins: Is there a perspective in lung cancer treatment? *PLoS One.* **6**, e20695. doi 10.1371/journal.pone.0020695
 43. McIntosh J.M., Dowell C., Watkins M., Garrett J.E., Yoshikami D., Olivera B.M. 2002. Alpha-conotoxin G1C from *Conus geographus*, a novel peptide antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 33610–33615. doi 10.1074/jbc.M205102200
 44. Chi S.W., Kim D.H., Olivera B.M., McIntosh J.M., Han K.H. 2004. Solution conformation of alpha-conotoxin G1C, a novel potent antagonist of alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. J.* **1**, 347–352. doi 10.1042/BJ20031792
 45. Sambasivarao S.V., Roberts J., Bharadwaj V.S., Slingby J.G., Rohleder C., Mallory C., Groome J.R., McDougal O.M., Maupin M.C. 2014. Acetylcholine promotes binding of α -conotoxin MII for $\alpha 3 \beta 2$ nicotinic acetylcholine. *Chembiochem.* **15**, 413–424. doi 10.1002/cbic.201300577
 46. Kasheverov I., Kudryavtsev D., Shelukhina I., Nikolaev G., Utkin Y., Tsetlin V. 2022. Marine origin ligands of nicotinic receptors: Low molecular compounds, peptides and proteins for fundamental research and practical applications. *Biomolecules.* **12**, 189. doi 10.3390/biom12020189
 47. Bouzat C., Sine S.M. 2018. Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 1789–1804. doi 10.1111/bph.13770
 48. Corringer P.J., Poitevin F., Prevost M.S., Sauguet L., Delarue M., Changeux J.P. 2012. Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: From bacteria to brain. *Structure.* **20**, 941–956. doi 10.1016/j.str.2012.05.003
 49. Papke R.L., Lindstrom J.M. 2020. Nicotinic acetylcholine receptors: Conventional and unconventional ligands and signaling. *Neuropharmacology.* **168**, 108021. doi 10.1016/j.neuropharm.2020.108021
 50. Stokes C., Treinin M., Papke R.L. 2015. Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 514–523. doi 10.1016/j.tips.2015.05.002
 51. King J.R., Kabbani N. 2016. Alpha 7 nicotinic receptor coupling to heterotrimeric G proteins modulates

- RhoA activation, cytoskeletal motility, and structural growth. *J. Neurochem.* **138**, 532–545. doi 10.1111/jnc.13660
52. Oz M., King J.R., Yang K.-H.S., Khushaish S., Tchugunova Y., Khajah M.A., Luqmani Y.A., Kabbani N. 2023. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor interaction with G proteins in breast cancer cell proliferation, motility, and calcium signaling. *PLoS One.* **18**, e0289098. doi 10.1371/journal.pone.0289098
53. Brown E.J., Frazier W.A. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell. Biol.* **11**, 130–135. doi 10.1016/s0962–8924(00)01906–1
54. Loch C., Antoine R. 2021. The history of pertussis toxin. *Toxins (Basel).* **13**, 623. doi 10.3390/toxins13090623
55. St-Pierre S., Jiang W., Roy P., Champigny C., LeBlanc E., Morley B.J., Hao J., Simard A.R. 2016. Nicotinic acetylcholine receptors modulate bone marrow-derived pro-inflammatory monocyte production and survival. *PLoS One.* **11**, e0150230. doi 10.1371/journal.pone.0150230
56. Tracey K.J. 2002. The inflammatory reflex. *Nature.* **420**, 853–859. doi 10.1038/nature01321
57. Pavlov V.A., Chavan S.S., Tracey K.J. 2018. Molecular and functional neuroscience in immunity. *Ann. Rev. Immunol.* **36**, 783–812. doi 10.1146/annurev-immunol-042617–053158
58. Caravaca A.S., Gallina A.L., Tarnawski L., Shavva V.S., Colas R.A., Dalli J., Malin S.G., Hult H., Arnardottir H., Olofsson P.S. 2022. Vagus nerve stimulation promotes resolution of inflammation by a mechanism that involves Alox15 and requires the $\alpha 7$ nAChR subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **119**, e2023285119. doi 10.1073/pnas.2023285119
59. Grassi L., Pourfarzad F., Ullrich S., Merkel A., Were F., Carrillo-de-Santa-Pau E., Yi G., Hiemstra I.H., Tool A.T.J., Mul E., Perner J., Janssen-Megens E., Berentsen K., Kerstens H., Habibi E., Gut M., Yaspo M.L., Linser M., Lowy E., Datta A., Clarke L., Flicek P., Vingron M., Roos D., van den Berg T.K., Heath S., Rico D., Frontini M., Kostadima M., Gut I., Valencia A., Ouwehand W.H., Stunnenberg H.G., Martens J.H.A., Kuijpers T.W. 2018. Dynamics of transcription regulation in human bone marrow myeloid differentiation to mature blood neutrophils. *Cell Reports.* **24**, 2784–2794. doi 10.1016/j.celrep.2018.08.018
60. Khoyratty T.E., Ai Z., Ballesteros I., Eames H.L., Mathie S., Martin-Salamanca S., Wang L., Hemmings A., Willemsen N., von Werz V., Zehrer A., Walzog B., van Grinsven E., Hidalgo A., Udalova I.A. 2021. Distinct transcription factor networks control neutrophil-driven inflammation. *Nat. Immunol.* **22**, 1093–1106. doi 10.1038/s41590–021–00968–4
61. Evrard M., Kwok I.W.H., Chong S.Z., Teng K.W.W., Becht E., Chen J., Sieow J.L., Penny H.L., Ching G.C., Devi S., Adrover J.M., Li J.L.Y., Liang K.H., Tan L., Poon Z., Foo S., Chua J.W., Su I.-H., Balabanian K., Bachelerie F., Biswas S.K., Larbi A., Hwang W.Y.K., Madan V., Koeffler H.P., Wong S.C., Newell E.W., Hidalgo A., Ginhoux F., Ng L.G. 2019. Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Blood.* **133**, 2149–2158. doi 10.1182/blood-2018–12–844605
62. Serov D.A., Tikhonova I.V., Safronova V.G., Astashev M.E. 2021. Calcium activity in response to nAChR ligands in murine bone marrow granulocytes with different Gr-1 expression. *Cell Biol. International.* **45**, 1533–1545. doi 10.1002/cbin.11593
63. Yvan-Charvet L., Ng L.G. 2019. Granulopoiesis and neutrophil homeostasis: A metabolic, daily balancing act. *Trends Immunol.* **40**, 598–612. doi 10.1016/j.it.2019.05.004
64. Cormier A., Paas Y., Zini R., Tillement J.-P., Lagrue G., Changeux J.-P., Grailhe R. 2004. Long-term exposure to nicotine modulates the level and activity of acetylcholine receptors in white blood cells of smokers and model mice. *Mol. Pharmacol.* **66**, 1712–1718. doi 10.1124/mol.104.000463
65. Cesaro L., Pinna L.A., Salvi M. 2015. A comparative analysis and review of lysyl residues affected by posttranslational modifications. *Curr. Genomics.* **16**, 128–138. doi 10.2174/1389202916666150216221038
66. Buccitelli C., Selbach M. 2020. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat. Rev. Genet.* **21**, 630–644. doi 10.1038/s41576–020–0258–4

Effect of Nicotinic Acetylcholine Receptor Ligands on Adhesive Properties of Murine Bone Marrow Granulocytes During Inflammation

© 2024 г. Е. А. Jirova¹, Д. А. Серов^{1,2}, Е. В. Федорова³, В. Г. Сафронова¹

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

²*Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russia*

³*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290, Russia*

*e-mail: safronova@icb.psn.ru

The first stage of mature neutrophil granulocytes leaving the bone marrow into the blood and migration to inflammatory center is attachment to vascular endothelium. Disturbance of neutrophil adhesiveness is critical for many diseases with inflammatory components. Endo- and exogenous factors modify the cell ability to adhere via different receptors, including nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). However, the involvement of nAChRs in the regulation of bone marrow (BM) granulocyte adhesion and the role of signaling components in the action of nicotine are poorly understood. In this work the role of different types of nAChRs in the regulation of murine BM granulocyte adhesion during acute inflammation was studied. The study was performed on BM granulocytes of the BALB/c mouse strain using static adhesion assay, confocal microscopy, inhibitor assay, and reverse transcription PCR (RT-PCR). The role of nAChR types was assessed using selective antagonists: 10 nM α -CTX ($\alpha 7$), 10 nM G1C and 5 nM MII ($\alpha 3\beta 2$), 200 nM MII ($\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 7$), RgIA and Vc1.1 ($\alpha 9\alpha 10$). The number of attached BM granulocytes did not differ between animals with and without inflammation. Nicotine (0.01–100 μ M, 30 min) significantly increased cell adhesion in both groups. Toxins (α -CTX, RgIA, Vc1.1) enhanced cell adhesion in both groups, as 200 nM MII did in controls. Fluorescence labelling assays showed expression of $\alpha 7$ and $\alpha 10$ nAChR subunits on cytoplasmic membrane of native BM granulocytes. Using inhibitors, we showed that the effect of nicotine on BM granulocyte adhesion was mediated by heterotrimeric G-proteins, PKC, PI3K, and ROCK both normally and in the presence of inflammation. $\alpha 7$ and $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs were predominantly involved in regulation of BM granulocyte adhesion, and participation of $\alpha 3\beta 2$ was negligible, possibly due to low expression of $\alpha 3$ subunits. In the regulation of cell adhesion by nicotine, the development of inflammation in the body enhanced the role of $\alpha 7$ nAChRs, which are conventionally expressed on the membrane of BM granulocytes.

Keywords: bone marrow, granulocyte, nicotinic acetylcholine receptors, adhesion, inflammation

УДК 577.352

ПОПРАВКИ К ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ЕМКОСТИ ДЕФОРМИРОВАННОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ

© 2024 г. О. В. Кондрашов^а, С. А. Акимов^{а, *}

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

*e-mail: akimov_sergey@mail.ru

Поступила в редакцию 11.10.2023

После доработки 21.11.2023

Принята к печати 23.11.2023

Толщина липидной мембраны является ее существенной характеристикой. Обычно толщина липидного бислоя экспериментально определяется по измерениям его электрической емкости в приближении плоскопараллельного конденсатора. Однако мембраны, сформированные из смеси липидов либо содержащие деформирующие мембранные включения, латерально неоднородны, и для них приближение плоскопараллельного конденсатора, вообще говоря, не выполняется. В настоящей работе были численно рассчитаны поправки к электрической емкости, возникающие вследствие деформации липидной мембраны. Показано, что модель плоского конденсатора (или их параллельного соединения), в общем случае, количественно не описывает эти поправки вследствие ненулевой тангенциальной компоненты напряженности электрического поля. Показано, что относительное отклонение поправок к электрической емкости, рассчитываемых в различных упрощенных моделях, от точного решения может достигать 50%.

Ключевые слова: липидная мембрана, электрическая емкость, толщина, деформация, плоскопараллельный конденсатор

DOI: 10.31857/S0233475524020023, **EDN:** xwygac

ВВЕДЕНИЕ

Биологические мембраны являются слабопроницаемыми барьерами для различных веществ. Липидные бислои характеризуются чрезвычайно малой толщиной (~ 4 нм). При этом их площадь может достигать нескольких квадратных миллиметров. Липидные бислои являются основным структурным компонентом биологических мембран. Обладая низкой проницаемостью, они позволяют клеткам поддерживать состав цитоплазмы, существенно отличающийся от состава окружающей среды, и состав органелл, отличающийся от состава цитоплазмы. Толщина липидного бислоя является важнейшей его характеристикой, которая, в свою очередь, определяет многие физические свойства мембраны. В частности, при прочих равных параметрах в липидных бислоях большей толщины энергия образования сквозных пор оказывается выше [1, 2]. При удлинении гидрофобных цепей, составляющих мембрану липидных молекул, возрастает модуль изгиба мембраны приблизительно пропорционально третьей степени толщины липидного бислоя [3]; величина модуля изгиба, в свою очередь, в значительной мере определяет

энергетику различных мембранных процессов [4–7]. Толщина мембраны является также ключевым параметром, определяющим способность мембраны к растяжению и продавливанию, которая существенно влияет на функциональные характеристики механочувствительных каналов и каналоформеров [8–11].

Экспериментально толщина мембраны может измеряться методами рентгеновского рассеяния на стопке липидных бислоев. Однако в этом случае результаты измерений могут искажаться тепловыми флуктуациями формы мембран [12, 13]. Атомно-силовая микроскопия позволяет определить толщину липидного бислоя, нанесенного на твердую, например, слюдяную подложку. При этом между мембраной и подложкой всегда имеется водная прослойка, равновесная толщина которой зависит от физико-химических параметров взаимодействия подложки и мембраны, т.е. толщина слоя воды может меняться для различных подложек и липидных составов мембран [14, 15].

При известной площади мембраны ее толщина может быть оценена из величины ее электрической емкости [13, 16, 17]. Используемая для таких

измерений мембрана может быть единичной (а не стопка бислоев) и свободной (не нанесенная на подложку). Кроме того, электрические измерения весьма точны и производятся относительно быстро, что позволяет определять электрическую емкость липидных бислоев с высоким временным разрешением. В частности, измерения емкости позволяют определять изменение средней толщины липидного бислоя, содержащего фотопереключаемые липиды, при их обратимом фотопереключении [13]. Такие липиды содержат в одной (PhoDAG) или обеих (OptoDAG) гидрофобных цепях азобензольную группу, которая обратимо *цис-транс*-изомеризуется под действием видимого света: переход из *транс*- в *цис*-конформацию происходит при освещении светом с длиной волны 365 нм, а обратный переход вызывается светом с длиной волны ~460 нм [13, 18].

Измеряя электрическую емкость, отнесенную к единице площади поверхности мембраны, можно получить ее толщину, считая мембрану идеальным плоским конденсатором, согласно зависимости (здесь и далее используются единицы СГС):

$$C = \frac{\varepsilon S}{4\pi d}, \quad (1)$$

где C – электрическая емкость, ε – диэлектрическая проницаемость липидного материала мембраны ($\varepsilon \approx 2$) [16, 17], S – площадь мембраны, d – толщина ее гидрофобного слоя, занятого преимущественно цепями липидных молекул. Формула (1) записывается в предположениях, что: а) мембрана является плоской, б) диэлектрическая проницаемость материала мембраны постоянна и равна ε , в) латеральный размер мембраны намного превышает ее толщину. Поправки, возникающие вследствие конечного латерального размера, подробно описаны, например, в работах [19, 20], в которых развит формализм расчета емкостей плоскопараллельных конденсаторов конечного размера. В подавляющем большинстве практически важных случаев для мембран эти поправки должны быть малы, поскольку обычно толщина липидной мембраны на много порядков меньше ее латеральных размеров.

Диэлектрическая проницаемость материала мембраны изменяется от ~ 10 до ~ 2 при движении от полярных групп липидной молекулы к концу ее гидрофобной цепи [16, 17, 21, 22]. Мы же в настоящей работе сфокусируемся на том, какие поправки к емкости вносит отклонение формы мембраны от плоской, считая, что мембрана представляет собой слой с некоторой постоянной диэлектрической

проницаемостью. Отклонение формы мембраны происходит, например, вследствие тепловых флуктуаций; однако такие флуктуации всегда длинноволновые (длина волны намного превышает толщину мембраны), что означает, что их вклад в емкость небольшой. Существенное отклонение формы мембраны от плоскопараллельной пластинки будет происходить при встраивании в мембрану различных деформирующих мембранных включений: амфипатических и трансмембранных пептидов или молекул липида, отличного от основного липида мембраны по своим физическим характеристикам, например, длине или спонтанной кривизне. Примерами таких липидов могут служить фотопереключаемые липиды, такие как Pho-DAG или OptoDAG: в *транс*-конфигурации эти липиды слабо деформируют мембрану, но после освещения мембраны светом определенной длины волны (~ 365 нм) возможен переход в *цис*-состояние, которое характеризуется гораздо большей (по абсолютной величине) спонтанной кривизной липида и меньшей толщиной [13, 18].

В случае малой поверхностной концентрации мембранных включений, т.е. такой концентрации, когда поля индуцируемых ими деформаций мембраны практически не перекрываются, каждому включению можно приписать некоторое изменение емкости мембраны ΔC . Практически измерения емкости часто проводятся на модельных мембранах, связанных с липидным резервуаром, формируемых, например, методом Мюллера–Рудина. За счет возможности обмена с резервуаром количество липидных молекул в таких мембранах не фиксировано. Пусть электрическая емкость исходной мембраны без включений была C_0 . Мы предполагаем, что мембранное включение при встраивании вытесняет некоторое количество липидных молекул в резервуар, и тогда ΔC – это разность электрических емкостей участка мембраны со встроенным включением и исходного участка мембраны, который был вытеснен этим включением в липидный резервуар. При низкой концентрации включений полная емкость мембраны C , содержащей N включений, будет равна:

$$C = C_0 + N\Delta C. \quad (2)$$

Для получения липидных бислоев заданной толщины могут использоваться мембраны, состоящие из смеси различных липидов [23, 24]. Для двух липидных компонентов, измеряя удельную электрическую емкость мембраны, т.е. полную емкость и площадь, и используя формулу (1), возможно получить зависимость эффективной толщины d

липидного бислоя от доли α площади на поверхности мембраны, занятой одним из липидных компонентов. После этого, считая, что $d = 2(\alpha h_1 + (1 - \alpha) h_2)$, где h_1 и h_2 — толщины липидных монослоев, составленных из чистых липидных компонентов, возможно оценить толщину h_2 . Вообще говоря, такой подход не является корректным. Прежде всего, толщина липидного включения в мембране не всегда совпадает с равновесной толщиной мембраны, целиком составленной из этого компонента. В частности, в качестве липидного включения может быть использован липид, который в чистом виде вообще не формирует мембраны, как, например, холестерин. Линейное усреднение параметров мембраны также некорректно применять для сильно неидеальных смесей, например, липидов с насыщенными углеводородными цепями и холестерином [25]. Кроме того, нет оснований предполагать, что емкость C будет зависеть от средневзвешенной по концентрациям толщины бислоя $d = 2(\alpha h_1 + (1 - \alpha) h_2)$ согласно соотношению (1). Далее мы покажем, что описанный подход описывает изменения емкости лишь качественно, но в общем случае не количественно, и дадим количественную оценку отклонения в случае деформированной мембраны.

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Введем цилиндрическую систему координат $O\varphi z$, ось Oz которая перпендикулярна плоскости невозмущенной мембраны, а ось Or лежит в плоскости межмонослойной поверхности. Липидный монослой, расположенный в области $z > 0$, будем называть верхним; величины, относящиеся к нему, будем обозначать индексом “ u ”. Липидный монослой, расположенный в области $z < 0$, будем называть нижним; величины, относящиеся к нему, будем обозначать индексом “ d ”. Форму поверхности верхнего и нижнего монослоев будем задавать их z -координатами, обозначаемыми функциями $H_u(r)$, $H_d(r)$ соответственно. Чтобы не вдаваться в подробности того, как именно конкретные типы мембранных включений деформируют мембрану, рассмотрим модельные деформации мембраны, определяемые через функции $H_u(r)$, $H_d(r)$, в виде:

$$\begin{aligned} H_u(r) &= h_0 + \Delta h \exp\left[-\frac{r^2}{2\sigma^2}\right], \\ H_d(r) &= -h_0 - \Delta h \exp\left[-\frac{r^2}{2\sigma^2}\right], \end{aligned} \quad (3)$$

где h_0 — равновесная толщина гидрофобной части липидного монослоя в отсутствии включений,

которая была принята равной 1.45 нм, как для монослоя диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) [3, 26, 27]; Δh — характерная величина изменения толщины мембраны вследствие ее деформации мембранным включением; σ — характерная латеральная длина, на которой происходит изменение толщины мембраны. Для простоты изложения деформации считаются зеркально симметричными относительно межмонослойной поверхности, а также аксиально симметричными. Подобные деформации мембраны могут возникать, например, вблизи малого упорядоченного бислоевого липидного домена, имеющего большую толщину по сравнению с окружающей мембраной ($\Delta h > 0$) [28, 29], или вблизи проводящего димера каналоформера грамицидина А, продавливающего мембрану ($\Delta h < 0$) [8, 30]. Пусть $u(r, z)$ — потенциал электрического поля в мембране. Для u запишем граничную задачу Дирихле:

$$\begin{aligned} \Delta u &= 0, \\ u(r, H_u(r)) &= u_0, \\ u(r, H_d(r)) &= 0, \end{aligned} \quad (4)$$

где Δ — оператор Лапласа; u_0 — величина разности электрических потенциалов на мембране. Величина емкости от u_0 не зависит. Тогда электрическую энергию W можно записать как интеграл от плотности энергии электрического поля, взятый по объему мембраны.

$$W = \int \frac{\varepsilon(\nabla u)^2}{8\pi} dV = \frac{C u_0^2}{2}, \quad (5)$$

откуда можно получить емкость мембраны C и отклонение емкости ΔC вследствие деформаций мембраны.

Задача Дирихле (4) решалась численно с помощью метода конечных элементов в системе вычислений Mathematica 11.3 (Wolfram Research, Champaign, Illinois, USA). Уравнение (4) было записано в цилиндрической системе координат, где было учтено, что u не зависит от полярного угла φ . Расчетная область в координатах (r, z) разбивалась на треугольники с площадью, не превышающей 5×10^{-5} нм². Размер расчетной области ограничивался максимальным значением $r = r_{\max}$; в расчетах использовалось $r_{\max} = 50$ нм. Было проверено, что при используемых параметрах уже при $r_{\max} > 10$ нм расчетная величина ΔC практически не зависит от r_{\max} .

Помимо точного решения задачи (4–5) были найдены также два решения $\Delta C_1 = C_1 - C_0$ и $\Delta C_2 = C_2 - C_0$,

соответствующие часто практически используемым приближениям для определения средней толщины мембраны по ее электрической емкости [31]. Первое приближение соответствует прямому усреднению толщины мембраны, т.е. в наших обозначениях

$$C_1 = \frac{\varepsilon S}{4\pi \langle d \rangle},$$

$$\langle d \rangle = \frac{\int (H_u - H_d) 2\pi r dr}{\int 2\pi r dr} =$$

$$= \frac{\int (H_u - H_d) 2\pi r dr}{S},$$
(6)

где угловыми скобками обозначено усреднение по всей мембране. Второе приближение соответствует усреднению обратной толщины мембраны, что эквивалентно разбиению мембраны на малые участки площадью dS и суммированию емкостей таких участков в приближении плоского конденсатора:

$$C_2 = \frac{\varepsilon S}{4\pi} \left\langle \frac{1}{d} \right\rangle,$$

$$\left\langle \frac{1}{d} \right\rangle = \frac{\int (H_u - H_d)^{-1} 2\pi r dr}{\int 2\pi r dr} =$$

$$= \frac{\int (H_u - H_d)^{-1} 2\pi r dr}{S}.$$
(7)

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлено численное решение задачи Дирихле (4) для $\Delta h = 0.5$ нм, $\sigma = 1$ нм. Видно, что линии уровня потенциала не являются горизонтальными, что говорит о том, что вблизи деформированного участка мембраны возникает тангенциальная компонента электрического поля, отсутствующая в идеальном плоскопараллельном конденсаторе. При этом отклонение линий уровня от горизонтальных относительно невелико, что в принципе указывает на разумность описанных выше приближенных решений.

На рис. 2 представлены зависимости величин ΔC , ΔC_1 и ΔC_2 от параметров деформаций мембраны Δh и σ . Все три зависимости имеют схожий вид, что в принципе позволяет обосновать их применение для качественных предсказаний. Однако зависимости отличаются количественно. Таким образом, использование приближенных решений

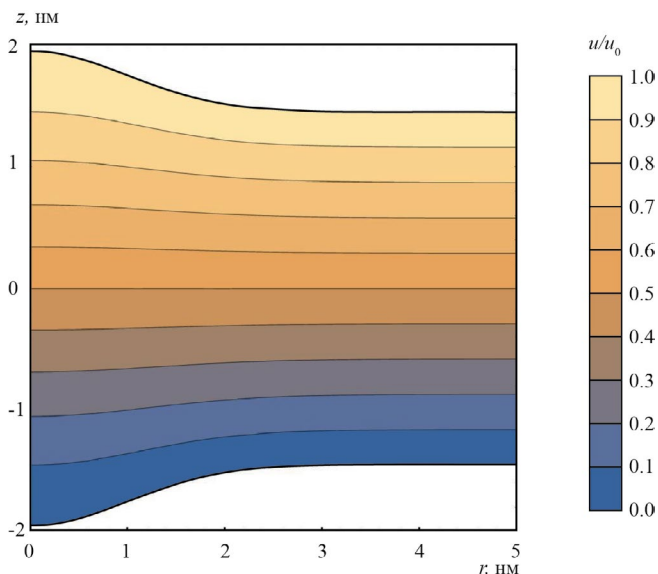


Рис. 1. Зависимость нормированного электрического потенциала u/u_0 от пространственных координат r, z в цилиндрической системе координат при $\Delta h = 0.5$ нм, $\sigma = 1$ нм. Черный контур, граничащий с белыми полями сверху и снизу рисунка, соответствует форме поверхностей верхнего и нижнего монослоев мембраны, определяемой соотношениями (3).

вместо точного вносит систематическую погрешность при расчете параметров липидных компонентов, исходя из экспериментально измеренной емкости мембраны, состоящей из смеси липидов.

Для оценки этой систематической погрешности на рис. 3 приведены относительные погрешности приближенных методов для разных деформаций мембраны, задаваемых величинами $\Delta h, \sigma$ согласно соотношениям (3). Из рис. 3 видно, что для большинства параметров $\Delta h, \sigma$ погрешность не превышает 10%. При этом приближение ΔC_2 в целом ближе к точному значению ΔC , чем приближение ΔC_1 . Однако имеются области значений параметров $\Delta h, \sigma$ такие, что погрешность может достигать порядка 50% (рис. 3). Эти параметры соответствуют большим деформациям: $\Delta h \sim \pm 0.5$ нм, т.е. когда изменение толщины составляет почти треть толщины мембраны в недеформированном состоянии, которые достаточно быстро спадают, $\sigma = 0.5$ нм (правый нижний и левый нижний углы на рис. 3а и 3б), либо, напротив, очень малым деформациям: $\Delta h \ll 1$ нм, которые также быстро спадают (средняя нижняя область рис. 3а и 3б). При больших величинах σ , которые соответствуют большим латеральным размерам деформированной области мембраны и соответственно медленному затуханию деформаций, погрешность приближений относительно мала, порядка 10%.

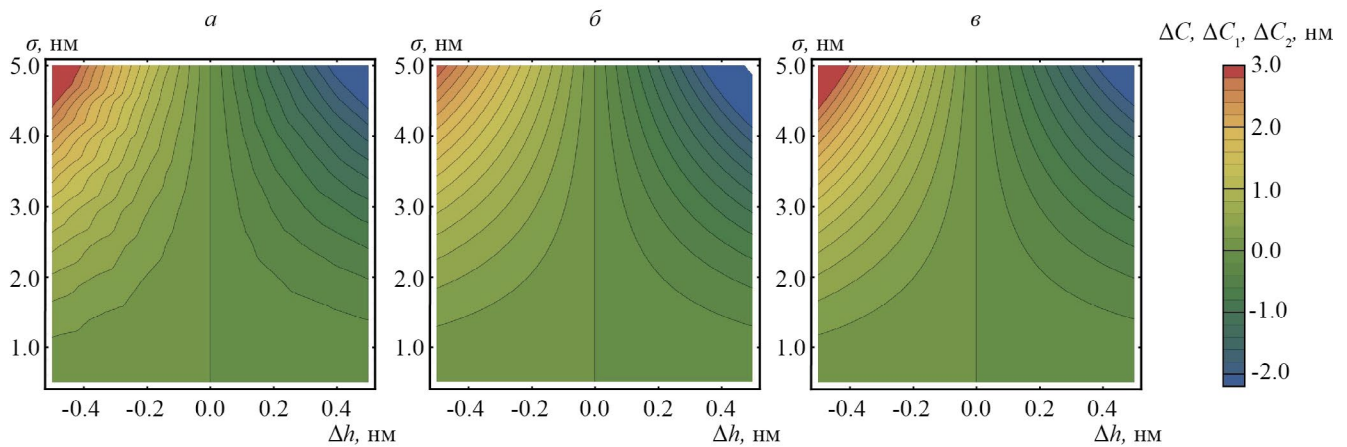


Рис. 2. Зависимость от Δh , σ поправок к электрической емкости, возникающих за счет деформаций мембраны, описываемых уравнением (3): *a* – точное решение ΔC ; *b* – приближенное решение ΔC_1 (приближение усредненной толщины (6)); *v* – приближенное решение ΔC_2 (приближение усредненной обратной толщины (7)).

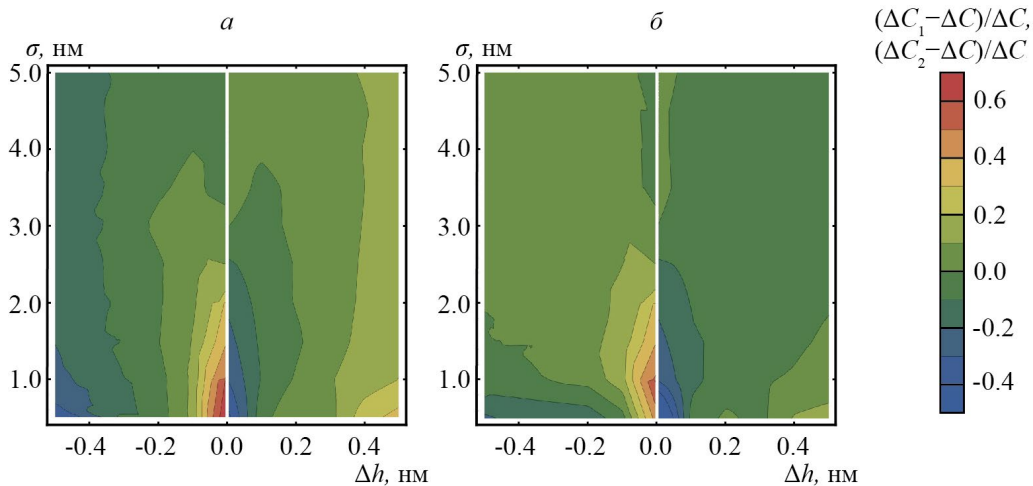


Рис. 3. Относительная погрешность приближений: *a* – приближение усредненной толщины (6); *b* – приближение усредненной обратной толщины (7). Белой прямой $\Delta h = 0$ обозначен разрыв первого рода, возникающий вследствие того, что в недеформированной мембране ($\Delta h = 0$) поправка к емкости равна нулю ($\Delta C = 0$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе была рассчитана электрическая емкость мембраны с уединенным модельным дефектом, изменяющим ее локальную толщину согласно соотношениям (3). Изменение толщины мембраны приводит к тому, что электрическое поле, возникающее в мембране при приложении разности потенциалов к водным растворам по разные стороны мембраны, становится неоднородным. Вследствие этой неоднородности деформированную таким образом мембрану, строго говоря, нельзя считать плоскопараллельным конденсатором, что, в свою очередь, приводит к тому, что нельзя простым методом точно рассчитать ее электрическую емкость, не прибегая к решению задачи Дирихле для уравнения Пуассона (4). Данная задача имеет точное аналитическое решение лишь для малых одномерных отклонений мембраны от

плоскости, получаемое методами теории функций комплексного переменного при рассмотрении конформного отображения полосы мембраны на деформированную полосу [32]. Однако малые отклонения обычно не столь интересны с экспериментальной точки зрения, и, кроме того, деформация мембраны в эксперименте никогда не является одномерной. Вычисленная поправка к емкости ΔC , возникающая вследствие деформации мембраны, сравнивалась с поправками, получаемыми в рамках простых моделей (6), (7), в которых мембрана рассматривается как идеальный плоский конденсатор, ΔC_1 (модель усреднения толщины (6)), или как параллельное соединение таких конденсаторов, ΔC_2 (модель усреднения обратной толщины (7)). Было показано, что приближенные модели дают результаты, качественно близкие к точному решению. Однако модель усреднения

обратной толщины (7) в целом лучше описывает деформированную мембрану (ср. рис. 3а и 3б). В широком диапазоне значений параметра σ при относительно плавном спаде деформаций с большой характерной латеральной длиной затухания, погрешность приближенных методов порядка 10%. При этом в области больших деформаций погрешность возрастает и становится существенной. Таким образом, при определении параметров липидного компонента по электрическим измерениям емкости смешанной мембраны погрешность получаемых результатов существенно зависит как от метода интерпретации, так и от характерных параметров деформаций, т.е. фактически от типа мембранного включения. Большие по абсолютной величине значения Δh , относительно быстро затухающие в латеральном направлении (малые σ), по всей видимости, должны быть характерны для фотопереключаемых липидов. В частности, в работе [13] в мембране состава ДОФХ: OptoDARg 9:1 изменение емкости при фотопереключении составляло ~5.5%, что в линейном приближении соответствует изменению толщины монослойного участка OptoDARg приблизительно в 1.5 раза.

Нужно отметить, что приведенный выше расчет относится к модельной деформации. В работах [33–38] были рассмотрены мембранные включения различного типа: трансмембранные и амфипатические пептиды, а также липидные включения различного вида. В этих работах было показано, что деформации мембраны в общем случае не сводятся к простому виду (3). Во многих случаях на мембране возникают осцилляции формы на латеральных расстояниях порядка 3–6 нм от мембранного включения; кроме того, дефекты не всегда симметричны, как в случае (3). Однако даже относительно простой, качественный расчет, не вдающийся в подробности конкретного вида деформаций мембраны, показывает, что, вообще говоря, емкость деформированной мембраны необходимо вычислять с учетом тангенциальной составляющей электрического поля.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22–24–00661, <https://rscf.ru/project/22–24–00661/>).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evans E., Heinrich V., Ludwig F., Rawicz W. 2003. Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes. *Biophys. J.* **85**, 2342–2350.
2. Evans E., Smith B.A. 2011. Kinetics of hole nucleation in biomembrane rupture. *New J. Phys.* **13**, 095010.
3. Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339.
4. Akimov S.A., Molotkovsky R.J., Kuzmin P.I., Galimzyanov T.R., Batishchev O.V. 2020. Continuum models of membrane fusion: Evolution of the theory. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3875.
5. Карпунин Д.В., Акимов С.А., Фролов В.А. 2005. Формирование пор в плоских липидных мембранах, содержащих лизолипиды и холестерин. *Биол. мембраны* **22**, 429–432.
6. Golani G., Leikina E., Melikov K., Whitlock J.M., Gamage D.G., Luoma-Overstreet G., Millay D.P., Kozlov M.M., Chernomordik L.V. 2021. Myomerg promotes fusion pore by elastic coupling between proximal membrane leaflets and hemifusion diaphragm. *Nature Comm.* **12**, 495.
7. Кондрашов О.В., Акимов С.А. 2022. Латеральное взаимодействие цилиндрических трансмембранных пептидов в одномерном приближении. *Биол. мембраны* **39**, 186–194.
8. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Akimov S.A. 2018. Membrane elastic deformations modulate gramicidin A transbilayer dimerization and lateral clustering. *Biophys. J.* **115**, 478–493.
9. Lundbæk J.A., Andersen O.S. 1999. Spring constants for channel-induced lipid bilayer deformations estimates using gramicidin channels. *Biophys. J.* **76**, 889–895.
10. Pan J., Tieleman D.P., Nagle J.F., Kučerka N., Tristram-Nagle S. 2009. Alamethicin in lipid bilayers: Combined use of X-ray scattering and MD simulations. *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 1387–1397.
11. Сухарев С., Анишкин А. 2023. Механочувствительные каналы: история, многообразие, механизмы. *Биол. мембраны* **40** (1), 19–42.
12. Heftberger P., Kollmitzer B., Rieder A.A., Ametsch H., Pabst G. 2015. In situ determination of structure and fluctuations of coexisting fluid membrane domains. *Biophys. J.* **108**, 854–862.
13. Pfeiffermann J., Eicher B., Boytsov D., Hanneschlaeger C., Galimzyanov T.R., Glasnov T.N., Pabst G., Akimov S.A., Pohl P. 2021. Photoswitching of model ion channels in lipid bilayers. *J. Photochem. Photobiol. B224*, 112320.
14. Peng C., Song S., Fort T. 2006. Study of hydration layers near a hydrophilic surface in water through AFM imaging. *Surface and Interface Analysis* **38**, 975–980.
15. Higgins M.J., Polcik M., Fukuma T., Sader J.E., Nakayama Y., Jarvis S.P. 2006. Structured water

- layers adjacent to biological membranes. *Biophys. J.* **91**, 2532–2542.
16. Montal M., Mueller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**, 3561–3566.
17. Benz R., Fröhlich O., Läger P., Montal M. 1975. Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **394**, 323–334.
18. Saitov A., Akimov S.A., Galimzyanov T.R., Glasnov T., Pohl P. 2020. Ordered lipid domains assemble via concerted recruitment of constituents from both membrane leaflets. *Phys. Rev. Lett.* **124**, 108102.
19. Сойбельман Я.С. 1984. Асимптотика емкости конденсатора с пластинами произвольной формы. *Сибирск. математ. журн.* **25**, 167–181.
20. Семахин А.Н., Шнеерсон Г.А. 1990. К расчету главной части поправки к конденсаторной емкости между двумя проводниками, разделенными малым зазором. *Журн. технич. физики* **60**, 5–12.
21. Cherepanov D.A., Feniouk B.A., Junge W., Mulki-djian A.Y. 2003. Low dielectric permittivity of water at the membrane interface: Effect on the energy coupling mechanism in biological membranes. *Biophys. J.* **85**, 1307–1316.
22. Merla C., Liberti M., Apollonio F., d’Inzeo G. 2009. Quantitative assessment of dielectric parameters for membrane lipid bi-layers from RF permittivity measurements. *Bioelectromagnetics* **30**, 286–298.
23. Beaven A.H., Maer A.M., Sodt A.J., Rui H., Pastor R.W., Andersen O.S., Im W. 2017. Gramicidin A channel formation induces local lipid redistribution I: Experiment and simulation. *Biophys. J.* **112**, 1185–1197.
24. García-Sáez A.J., Chiantia S., Schwille P. 2007. Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. *J. Biol. Chem.* **282**, 33537–33544.
25. Sodt A.J., Venable R.M., Lyman E., Pastor R.W. 2016. Nonadditive compositional curvature energetics of lipid bilayers. *Phys. Rev. Lett.* **117**, 138104.
26. Leikin S., Kozlov M.M., Fuller N.L., Rand R.P. 1996. Measured effects of diacylglycerol on structural and elastic properties of phospholipid membranes. *Biophys. J.* **71**, 2623–2632.
27. Reddy A.S., Warshaviak D.T., Chachisvilis M. 2012. Effect of membrane tension on the physical properties of DOPC lipid bilayer membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1818**, 2271–2281.
28. Rinia H.A., Snel M.M., van der Eerden J.P., de Kruijff B. 2001. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **501**, 92–96.
29. Saslowsky D.E., Lawrence J., Ren X., Brown D.A., Henderson R.M., Edwardson J.M. 2002. Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **277**, 26966–26970.
30. Kim T., Lee K.I., Morris P., Pastor R.W., Andersen O.S., Im W. 2012. Influence of hydrophobic mismatch on structures and dynamics of gramicidin A and lipid bilayers. *Biophys. J.* **102**, 1551–1560.
31. Huang H.W. 1986. Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime. *Biophys. J.* **50**, 1061–1070.
32. Лаврентьев М.А., Шабат Б.В. 1987. *Методы теории функции комплексной переменной*. М.: Наука.
33. Кондрашов О.В., Акимов С.А. 2022. Латеральное взаимодействие цилиндрических трансмембранных пептидов в одномерном приближении. *Биол. мембраны* **39**, 186–194.
34. Кондрашов О.В., Акимов С.А. 2022. Возможность формирования пор в липидных мембранах несколькими молекулами амфипатических пептидов. *Биол. мембраны* **39**, 384–397.
35. Pinigin K.V., Kondrashov O.V., Jiménez-Munguía I., Alexandrova V.V., Batishchev O.V., Galimzyanov T.R., Akimov S.A. 202. Elastic deformations mediate interaction of the raft boundary with membrane inclusions leading to their effective lateral sorting. *Sci. Rep.* **10**, 4087.
36. Bohinc K., Kralj-Iglič V., May S. 2003. Interaction between two cylindrical inclusions in a symmetric lipid bilayer. *J. Chem. Phys.* **119**, 7435–7444.
37. Zemel A., Ben-Shaul A., May S. 2005. Perturbation of a lipid membrane by amphipathic peptides and its role in pore formation. *Eur. Biophys. J.* **34**, 230–242.
38. Nielsen C., Goulian M., Andersen O.S. 1998. Energetics of inclusion-induced bilayer deformations. *Biophys. J.* **74**, 1966–1983.

Corrections to the Electrical Capacitance of Deformed Lipid Membrane

© 2024 г. О. В. Kondrashov¹, S. A. Akimov¹, *

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

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

The thickness of the lipid membrane is its substantial characteristics. Usually, the thickness of a lipid bilayer is experimentally determined by measuring its electrical capacitance in the approximation of a plane-parallel capacitor. However, membranes formed from a mixture of lipids or containing membrane-deforming inclusions are laterally inhomogeneous, and for them the plane-parallel capacitor approximation generally does not hold. In this work, corrections to the electrical capacitance resulting from deformation of the lipid membrane were numerically calculated. It is shown that the model of a planar capacitor (or their parallel connections), in the general case, does not quantitatively describe these corrections due to the non-zero tangential component of the electric field strength. It is shown that the relative deviation of corrections to the electrical capacitance calculated in various simplified models from the exact solution can reach 50%.

Keywords: lipid membrane, electrical capacitance, thickness, deformation, plane-parallel capacitor

УДК 577.352

РАСЧЕТ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОБРАЗОВАНИЯ МОНОСЛОЙНОГО СТАЛКА В ПРОЦЕССЕ СЛИЯНИЯ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ

© 2024 г. Р. Ю. Молотковский^{а, *}

^а *Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия*

^{*}*e-mail: rodion.molotkovskiy@gmail.com*

Поступила в редакцию 09.11.2023

После доработки 07.12.2023

Принята к печати 13.12.2023

Липидные капли – это органеллы, отвечающие за накопление и расщепление нейтральных жиров в организме человека. Липидные капли имеют монослойную оболочку из фосфолипидов, препятствующую их спонтанному слиянию. Слияние липидных капель осуществляется специализированными белками слияния и регулируется липидным составом монослойной оболочки. Эффективность слияния определяется энергией, затрачиваемой на локальное сближение липидных капель и топологическую перестройку их оболочек. В данной работе слияние монослойных оболочек моделируется в рамках теории упругости мембран. Энергетический барьер на слияние рассчитывается при различных условиях, моделирующих возможные составы монослойных оболочек, а также воздействие белков. Результаты расчетов показывают, что высота барьера в наибольшей степени зависит от расстояния между липидными каплями, которое определяется белками слияния. Липидный состав также влияет на характерное время ожидания слияния и может изменять его в несколько десятков раз, что соответствует полученным ранее данным по бислойному слиянию.

Ключевые слова: сенсоры ДНК/РНК, цитокины, интерфероны, cGAS, STING, иммунные клетки

DOI: 10.31857/S0233475524020035, **EDN:** xvuiyf

ВВЕДЕНИЕ

Эукариотические клетки, как правило, состоят из множества взаимодействующих органелл. Это взаимодействие часто осуществляется путем контакта и перестройки липидных мембран, окружающих органеллы и выполняющих барьерную функцию. Одной из форм процессов перестройки мембран является их слияние, т.е. объединение материала самих мембран и объемов воды, которые они окружают. Слияние мембран необходимо для успешного протекания множества биологических процессов, таких как экзоцитоз, оплодотворение, секреция, синаптическая передача и т.д. [1, 2].

Для осуществления слияния мембранам необходимо сблизиться на небольшое расстояние порядка нескольких нанометров и совершить топологическую реконфигурацию, для чего мембраны должны быть деформированы. Согласно имеющимся представлениям, этот процесс происходит через несколько промежуточных метастабильных состояний, разделенных энергетическими барьерами [2, 3]. Высоты энергетических барьеров определяют

кинетические параметры слияния, такие как среднее время ожидания слияния, и поэтому являются важнейшими физическими величинами. Ключевым метастабильным состоянием является стале-структура, в которой контактные монослои уже слились, а дистальные – еще нет [4, 5]. Стале является первой структурой, в которой осуществляется физический контакт сливающихся мембран; стале наблюдался в экспериментах по рентгеновскому рассеянию на мультислоях, а также в исследованиях методами молекулярной динамики [3, 5]. В дальнейшем эволюция системы может идти по разным траекториям, на которых системе необходимо преодолеть еще один или два энергетических барьера [6–8]. Классическая теория предполагает дальнейшее расширение стале и образование так называемой диафрагмы полуслияния – структуры с протяженным бислоем, образованным дистальными монослоями мембран, расположенным в центре между радиально разошедшимися слившимися контактными монослоями [9]. Затем в диафрагме полуслияния образуется сквозная

пора, и слияние завершается. Различные оценки дают для высот барьеров величины в несколько десятков $k_B T$ ($k_B T = 4 \times 10^{-21}$ Дж) [10–12].

Как правило, в слиянии участвуют бислоиные мембраны, однако в природе существует уникальный случай слияния монослойных мембран. Этот процесс реализуется при взаимодействии так называемых липидных капель, органелл, используемых для запасаения нейтральных жиров. Липидные капли имеют монослойную оболочку из фосфолипидов, которая предотвращает их спонтанное слияние [13]. Считается, что процессы слияния липидных капель контролируются специализированными белковыми комплексами и определенным липидным составом поверхностного монослоя, влияющими на высоту энергетического барьера слияния. В большинстве случаев перетекание жира из одной капли в другую полностью контролируется белковыми комплексами CideA, которые, как предполагается, формируют белковые поры в монослойных оболочках липидных капель [14]. Данный механизм взаимодействия не предполагает объединения липидных оболочек и не является слиянием в смысле определения, данного выше. В слиянии могут участвовать комплексы SNARE (soluble NSF attachment protein receptor), которые, как предполагается, удерживают вместе сливающиеся оболочки липидных капель [15]. В большинстве работ, исследующих слияние липидных капель, уделяется мало внимания влиянию липидного состава на этот процесс. В некоторых работах констатируется увеличение эффективности слияния липидных капель при модулировании их состава, в частности, при увеличении концентрации фосфатидной кислоты [16]. Известно, что изменение липидного состава влияет на упругие характеристики сливающихся бислоиных мембран, в частности на так называемую спонтанную кривизну – параметр, характеризующий равновесную форму свободного монослоя [17]. Повышенное содержание диолеилфосфатидилхолина (DOPC), имеющего примерно нулевую спонтанную кривизну, ингибирует слияние. Увеличение доли липидов с отрицательной спонтанной кривизной, таких, как диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), способствует слиянию [3]. Известно, что фосфатидная кислота, увеличивающая эффективность слияния липидных капель, имеет отрицательную спонтанную кривизну, как и DOPE [18]. Кроме того, известно, что в составе оболочек липидных капель доминируют липиды DOPC и DOPE [19, 20], поэтому можно ожидать, что и в случае монослойного слияния состав монослойных оболочек также будет иметь значение. Исследования слияния бислоиных мембран позволяют предположить, что

эффективность монослойного слияния определяется совместным действием липидной мембраны и белков, аналогично классическому случаю. При описании бислоиного слияния белки рассматриваются как объекты, приводящие к локальному изменению упругих свойств мембран или уменьшающие эффективное расстояние между ними за счет механической работы [10, 21, 22]. При этом на стадии образования столкновения влияние липидной компоненты на эффективность слияния является ключевым, поскольку для успешного слияния область контакта липидных оболочек должна быть свободна от белков.

В данной работе разрабатывается теоретическая модель безбелкового слияния монослойных оболочек. В качестве основы используются теоретические модели бислоиного и бислои-монослойного слияния [22, 23]. Для расчета деформаций применяется теория упругости липидных мембран, адаптированная для случая монослоев. Это позволяет рассчитать энергетический барьер на образование монослойного столкновения. В работе исследуется зависимость высоты данного барьера от ключевых упругих характеристик монослоев и от их липидного состава. Полученные данные сопоставляются с результатами для бислоиного и монослой-бислоиного слияния. Определение высоты энергетического барьера позволяет также оценить возможность протекания безбелкового слияния для липидных капель с разным составом оболочки.

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Мы рассматриваем образование монослойного столкновения в процессе слияния идентичных липидных капель путем локального сближения двух монослоев. Считаем, что размеры липидных капель много больше характерных размеров области слияния. Это позволяет представлять начальное состояние системы как два плоских монослоя, разделенных водной средой и расположенных на равновесном расстоянии H_0 друг от друга (рис. 1а). Равновесное расстояние по порядку величины составляет несколько нанометров и может уменьшаться до 1 нм при стягивающем воздействии белков слияния [10]. Глобальное уменьшение расстояния между монослоями не выгодно из-за действия сил гидратационного отталкивания, поэтому мы рассматриваем локальное выпячивание монослоев друг к другу при фиксированном расстоянии H_0 на удалении от этого выпячивания (рис. 1б). Считаем, что выпячивания расположены на расстоянии d симметрично друг относительно друга; это позволяет рассматривать только один монослой. Энергия системы в этом случае равна сумме

удвоенной упругой энергии монослоя и энергии межмонослойного взаимодействия. Образование монослойного сталка соответствует случаю $d = 0$ (рис. 1в).

Рассмотрим сначала упругую энергию монослоя. Она определяется деформациями монослоя и латеральным натяжением σ . Для описания деформаций мы используем энергетический функционал Хамма–Козлова [24]. Состояние деформированного участка липидного монослоя определяется векторным полем единичных векторов \mathbf{n} , называемых директорами, характеризующими среднюю ориентацию липидных молекул. Поле директоров задается на так называемой нейтральной поверхности, проходящей внутри монослоя параллельно его границе с водой в области сочленения полярных головок с гидрофобными цепями липидов. На этой поверхности деформации поперечного изгиба и латерального растяжения/сжатия энергетически независимы [24]. Форма нейтральной поверхности характеризуется векторным полем ее единичных нормалей \mathbf{N} . Деформации будем считать малыми и будем вычислять энергию в квадратичном приближении. Деформация поперечного изгиба характеризуется дивергенцией директора вдоль нейтральной поверхности, $\text{div}(\mathbf{n})$. Деформация наклона характеризуется вектором наклона, который для малых деформаций имеет вид $\mathbf{t} = \mathbf{n} - \mathbf{N}$ [24]. Энергия деформации W участка монослоя площади A при наличии ненулевого натяжения σ может быть записана в виде [17]:

$$W = \int_{A_0} \left\{ \frac{B}{2} (\text{div} \mathbf{n} + J_s)^2 - \frac{B}{2} J_s^2 + \frac{K_t}{2} \mathbf{t}^2 + \tilde{\sigma} \right\} dS - \sigma A_0, \quad (1)$$

где B и K_t – упругие модули изгиба и наклона соответственно, J_s – спонтанная кривизна монослоя, dS – элемент площади поверхности, A_0 – площадь

монослоя в недеформированном состоянии. Для описания деформаций монослоя мы вводим систему координат $\{O, z, r\}$ с осью z , направленной перпендикулярно монослою посередине его выпуклости, и осью r , направленной перпендикулярно оси z так, что она касается нейтральной поверхности монослоя на бесконечности. В предположении малости деформаций состояние монослоя описывается проекциями директора и вектора наклона на ось r $a(r)$ и $t(r)$ соответственно, а также расстоянием $H(r)$ от нейтральной поверхности до плоскости $z = 0$. Дивергенция директора при этом заменяется на выражение $da/dr + a/r$. Также мы учитываем, что вектор наклона $\mathbf{t} \approx \mathbf{n} - \mathbf{N}$ [24]; это позволяет связать проекцию вектора наклона с формой нейтральной поверхности $H(r)$ согласно формуле $t(r) = a(r) - dH(r) / dr$. В результате поверхностная энергия монослоя может быть записана в виде [25]:

$$w = 2\pi r \left(\frac{B}{2} \left(\frac{da}{dr} + \frac{a}{r} + J_s \right)^2 - \frac{B}{2} J_s^2 + \frac{K_t}{2} \left(a - \frac{dH}{dr} \right)^2 + \frac{\tilde{\sigma}}{2} \left(\frac{dH}{dr} \right)^2 \right). \quad (2)$$

Варьируя функционал $\int w dr$, мы получаем уравнения Эйлера–Лагранжа, описывающие функции $a(r)$ и $H(r)$. Решение данных уравнений позволяет найти в явном виде функции $a(r)$ и $H(r)$, зависящие от неопределенных коэффициентов. Эти коэффициенты определяются из граничных условий, задающих геометрию системы и имеющих следующий вид:

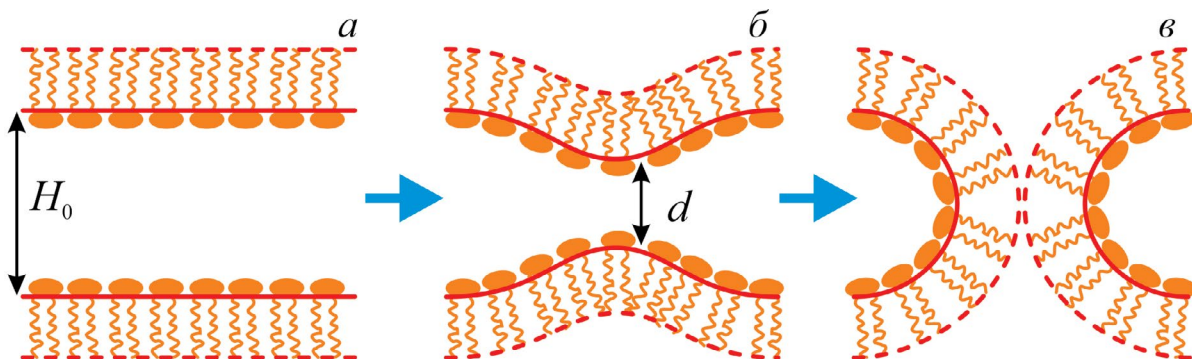


Рис. 1. Схематичное изображение процесса монослойного слияния. а – Начальное состояние: два плоских монослоя находятся на расстоянии H_0 друг от друга. б – Образование локальных симметричных выпуклостей на расстоянии d . в – Образование монослойного сталка, т.е. плотного контакта мембран друг с другом.

$$H(0) = \frac{H_0 - d}{2}, \quad (3)$$

$$H|_{r \rightarrow \infty} = 0,$$

где d – расстояние между вершинами монослойных выпуклостей. Граничные условия (3) означают, что решения уравнений должны быть ограничены как в нуле, так и на бесконечности. Для удовлетворения этим условиям мы вводим дополнительный параметр – радиус R – и делим рассматриваемую систему на две области: от 0 до R и от R до бесконечности (рис. 2а).

В первой области вводим функции $a_i(r)$ и $H_i(r)$, ограниченные в нуле, во второй области – функции $a_e(r)$ и $H_e(r)$, ограниченные на бесконечности. Каждый из этих наборов функций удовлетворяет уравнениям Эйлера–Лагранжа, но имеет меньше неопределенных коэффициентов в своем составе. В явном виде эти функции имеют следующий вид:

$$a_i(r) = c_1 I_1(r_\sigma),$$

$$H_i(r) = c_1 I_0(r_\sigma) \frac{l}{\sqrt{\sigma(\sigma+1)}} + c_2,$$

$$a_e(r) = c_3 K_1(r_\sigma),$$

$$H_e(r) = c_3 K_0(r_\sigma) \frac{l}{\sqrt{\sigma(\sigma+1)}} + c_4. \quad (4)$$

Здесь $\sigma = \frac{\tilde{\sigma}}{K_i}$ – безразмерное латеральное натяжение, $l = B/K_p$, $r_\sigma = \frac{r}{l} \sqrt{\frac{\sigma}{\sigma+1}}$, $I_j(r)$ и $K_j(r)$ – модифицированные функции Бесселя j -го порядка первого и второго типа соответственно, $c_i, i = 1..4$ – неопределенные коэффициенты. Определенные

формулой (4) функции непрерывно сшиваются на границе двух областей:

$$a_i(R) = a_e(R),$$

$$H_i(R) = H_e(R). \quad (5)$$

Совокупность граничных условий (3) и (5) позволяет определить все неопределенные коэффициенты c_i . После этого мы интегрируем поверхностную плотность энергии (2) в двух областях и в итоге получаем полную упругую энергию монослоя W_{el}^1 как функцию R и $H_0 - d$. В явном виде данная энергия имеет вид:

$$W_{el}^1 = \frac{\pi K_t}{4} \frac{R}{l} (H_0 - d)^2 \sigma^{\frac{3}{2}} \sqrt{\sigma+1} \cdot I_1(R_\sigma) \cdot K_1(R_\sigma) \times$$

$$\times \frac{I_1(R_\sigma) \cdot K_0(R_\sigma) + I_0(R_\sigma) \cdot K_1(R_\sigma)}{\left((I_0(R_\sigma) - 1) \cdot K_1(R_\sigma) + I_1(R_\sigma) \cdot K_0(R_\sigma) \right)^2}. \quad (6)$$

Здесь $R_\sigma = \frac{R}{l} \sqrt{\frac{\sigma}{\sigma+1}}$. Заметим, что энергия W_{el}^1 не зависит от спонтанной кривизны J_s и от равновесной толщины монослоя. Также мы рассматриваем гидратационное отталкивание между мембранами, возникающее из-за взаимодействия примембранных слоев воды при субнанометровых расстояниях между монослоями. Поверхностная энергия гидратационного отталкивания w_h вычисляется на основе эмпирического соотношения

$$w_h = P_0 \xi_h \exp\left(-\frac{z(r)}{\xi_h}\right), \quad (7)$$

где $z(r)$ – расстояние между мембранами как функция координаты r , ξ_h – характерная длина порядка 0.3 нм, P_0 – давление при нулевом расстоянии,

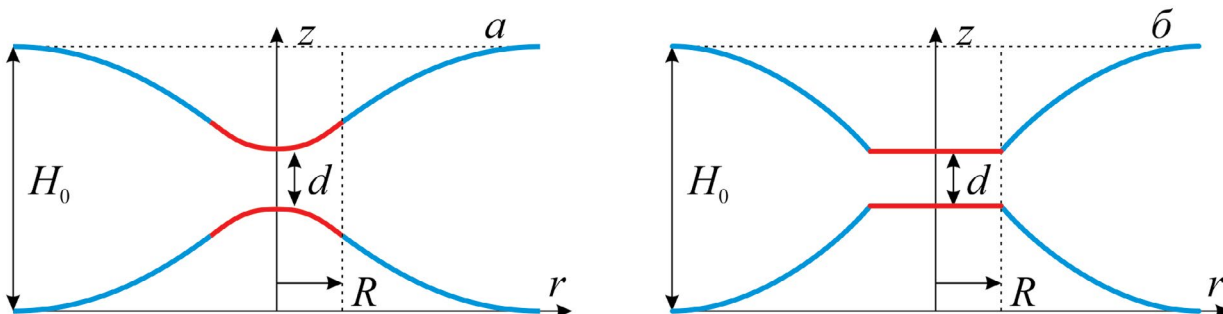


Рис. 2. Модели промежуточных стадий монослойного слияния. а – Локальные выпуклости радиуса R , находящиеся на расстоянии d друг от друга. б – Монослой с гидрофобными дефектами. Расстояние между мембранами при $r \rightarrow \infty$ равно H_0 и не меняется в процессе слияния.

варьирующее в пределах 100–1000 $k_B T/\text{нм}^3$ [8, 10]. В связи с экспоненциальным убыванием силы отталкивания при увеличении расстояния между мембранами обычно интегрирование ведется по областям мембран, соответствующим увеличению расстояния между ними на величину ξ_h . В рассматриваемом нами случае эта область определяется радиусом R_h , который находится из условия $H_i(0) - H_i(R_h) = \xi_h/2$. Проведенные нами вычисления показывают, что этот радиус мало отличается от радиуса R при достаточно больших значениях H_0 . Это позволяет нам еще больше упростить вычисления и проводить интегрирование по плоскостям, касающимся нейтральных поверхностей в точке $r = 0$ и отстоящим друг от друга на расстояние d . Таким образом, мы получаем приближенное значение энергии гидратационного отталкивания W_h :

$$W_h = \pi R^2 P_0 \xi_h \left(\exp\left(-\frac{d}{\xi_h}\right) - \exp\left(-\frac{H_0}{\xi_h}\right) \right). \quad (8)$$

Полная энергия системы W_{tot}^1 равна сумме удвоенной упругой энергии и энергии гидратационного отталкивания: $W_{tot}^1 = 2W_{el}^1 + W_h$. При небольших расстояниях d становится энергетически выгодно образование локальных гидрофобных дефектов на вершинах взаимодействующих выпуклостей (рис. 2б). Энергия взаимодействия гидрофобных дефектов определяется следующим соотношением:

$$W_p = 2\pi R^2 \sigma_p \left(1 - \exp\left(-\frac{d}{\xi_p}\right) \right), \quad (9)$$

где σ_p – натяжение на границе вода/масло, ξ_p – характерная длина гидрофобного взаимодействия. Поскольку выпуклости заменяются дефектами, меняется геометрия системы, что приводит к изменению граничных условий. При наличии дефектов монослои остаются деформированными только в области $r > R$, при этом граничные условия имеют вид:

$$\begin{aligned} H_e(R) &= \frac{H_0 - d}{2}, \\ H_e|_{r \rightarrow \infty} &= 0. \end{aligned} \quad (10)$$

Решение уравнений (10) относительно коэффициентов c_3 и c_4 позволяет найти изменившуюся энергию деформаций W_{el}^2 :

$$\begin{aligned} W_{el}^2 &= \frac{\pi K_t R}{4 l} (H_0 - d) \left((H_0 - d) \sigma + \right. \\ &\left. + 4 J_s l^2 \right) \sigma^{\frac{3}{2}} \sqrt{\sigma + 1} \frac{K_1(R_\sigma)}{K_0(R_\sigma)}. \end{aligned} \quad (11)$$

Образование дефектов также приводит к разрыву непрерывности директора; теперь директор не определен в области $r < R$. Это приводит к появлению ненулевого вклада в энергию от Гауссовой кривизны. Энергия Гаусса монослоя равна $W_{Gauss} = -\pi K_G a_e(R)^2$, где K_G – модуль Гауссовой кривизны, $K_G < 0$, $a_e(R)$ – значение граничного директора в точке $r = R$ [21]. Граничный директор задается коэффициентами c_3 и c_4 согласно уравнениям (4). В рассматриваемом случае эти коэффициенты находятся из граничных условий (10); в соответствии с этим, энергия Гаусса для одного монослоя оказывается равна

$$W_{Gauss} = -\frac{\pi K_G \sigma (\sigma + 1) (H_0 - d)^2}{l^2} \frac{K_1(R_\sigma)^2}{K_0(R_\sigma)^2}. \quad (12)$$

Полная энергия системы из двух монослоев с взаимодействующими гидрофобными дефектами будет равна $W_{tot}^2 = 2W_{el}^2 + 2W_{Gauss} + W_h$. Как видно из формулы (9), гидрофобное взаимодействие уменьшается при малых значениях d , что приводит к эффективному притяжению монослоев.

Алгоритм расчета. Описанные выше предположения позволяют найти энергетическую траекторию образования монослойного сталка в процессе слияния двух монослоев. Под энергетической траекторией понимается некоторая траектория вдоль энергетической гиперповерхности в координатах $\{R, d\}$, переводящая систему из начального состояния в состояние сталка. Мы фиксируем расстояние H_0 между монослоями и рассматриваем зависимость энергии системы от наименьшего расстояния d между мембранами. В данном случае параметр d является координатой реакции. Монослой может находиться в двух состояниях – монослой с выпуклостью или монослой с гидрофобным дефектом. При каждом фиксированном значении расстояния d находим зависимость энергии W_{tot}^1 выпуклостей от R . Эта энергия имеет минимум, соответствующий $R_{min}^1 \sim 0.5 - 1$ нм (см. рис. 3а). Минимальная энергия W_{min}^1 составляет несколько десятков $k_B T$ и быстро растет с уменьшением d . Мы находим минимальное значение энергии W_{min}^1 и соответствующее ему значение радиуса выпуклости R_{min}^1 .

Аналогичным образом рассматриваем зависимость энергии монослоев с дефектами W_{tot}^2 от R при

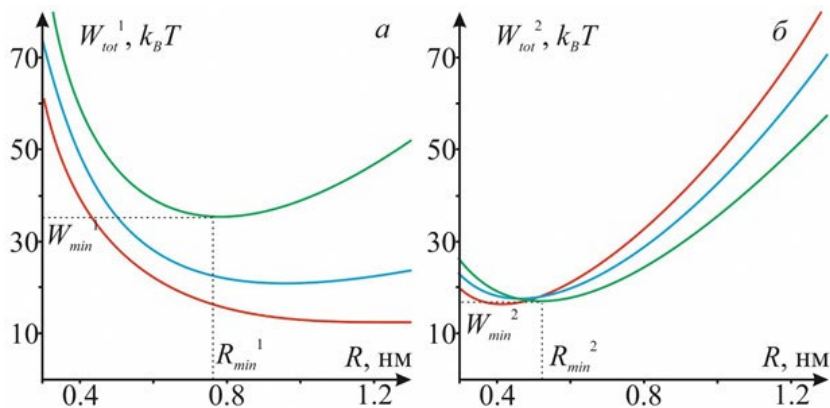


Рис. 3. Зависимость полной энергии выпуклостей W_{tot}^1 (панель *a*) и энергии дефектов W_{tot}^2 (панель *б*) от радиуса R при фиксированных значениях расстояния d между монослоями. Красные кривые соответствуют $d = 1$ нм, синие кривые соответствуют $d = 0.8$ нм, зеленые – $d = 0.6$ нм. Остальные параметры системы имеют следующие значения: $H_0 = 3$ нм, $P_0 = 800 k_B T/\text{нм}^3$, $\xi_h = 0.2$ нм, $\xi_p = 1$ нм, $J_s = -0.1 \text{ нм}^{-1}$, $K_G = -5 k_B T$, $K_t = 10 k_B T/\text{нм}^2$, $l = 1$ нм, $\sigma_p = 12.5 k_B T/\text{нм}^2$, $\sigma = 0.05 k_B T/\text{нм}^2$.

этом же фиксированном значении d (рис. 3б). Эта энергия также имеет минимум, соответствующий другому значению радиуса R_{min}^2 ; минимальное значение энергии обозначаем как W_{min}^2 . Таким образом, имеем зависимости энергий W_{min}^1 и W_{min}^2 от d . Эти две зависимости пересекаются при определенном значении d_{opt} . При $d > d_{opt}$ энергия системы определяется зависимостью W_{min}^1 , а при $d < d_{opt}$ – зависимостью W_{min}^2 . В результате получаем энергетическую траекторию системы в зависимости от координаты реакции d ; пример такой траектории показан на рис. 4. Высота барьера определяется как разность максимальной энергии на траектории и энергии начального состояния. В точке траектории, соответствующей $d = 0$, образуется монослойный сталк. При этом мы пренебрегаем изменением энергии, связанным со скачкообразным изменением радиуса системы. При малых значениях d энергия системы с гидрофобным дефектом достаточно слабо зависит от R (см. рис. 3, панель б). Поэтому искомое изменение энергии можно оценить в несколько единиц $k_B T$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы находим зависимость высоты энергетического барьера E_{Barr} от состава сливающихся монослойных оболочек. Описанный выше алгоритм позволяет определить энергетический барьер монослойного слияния, если известны упругие параметры монослоев, параметры гидратационного отталкивания и равновесное расстояние H_0 между монослоями. Изменение состава моделируется как добавление DOPE в мембрану, состоящую из DOPC. Параметры P_0 и ξ_h экспериментально определены для ограниченного набора составов мембраны, а именно – для мембран с соотношением DOPC : DOPE = 1:0, 3:1 и 1:1 [26]. Следует

отметить, что данные параметры получены при анализе расстояний между плоскими мембранами вплоть до величины 0.9 нм. В нашей работе формирование контакта между мембранами происходит при $d = 0.5–1$ нм, т.е. при несколько меньших расстояниях. В этом смысле применение данных значений параметров является экстраполяцией. В нашем анализе мы рассматриваем именно эти составы. Зависимость спонтанной кривизны от состава определяется в соответствии с формулой

$$J_s = c_{\text{DOPE}} j_{\text{DOPE}} + (1 - c_{\text{DOPE}}) j_{\text{DOPC}}, \quad (13)$$

где c_{DOPE} – поверхностная доля DOPE в составе мембраны; j_{DOPC} и j_{DOPE} – спонтанные кривизны DOPC и DOPE соответственно. Также мы учитываем зависимость модуля изгиба B_{eff} от состава [27]:

$$B_{eff} = \frac{B}{1 + \frac{Baj_{\text{DOPE}}c_{\text{DOPE}}(1 - c_{\text{DOPE}})}{k_B T}}, \quad (14)$$

где a – средняя площадь липидной молекулы, которую мы в дальнейшем принимаем равной примерно 0.7 нм^2 , B – модуль изгиба DOPC, равный $10 k_B T$ [28]. Зависимости величин от липидного состава сведены в табл. 1.

Модуль наклона K_t считаем не зависящим от липидного состава и равным $K_t = 10 k_B T/\text{нм}^2$ [30]; поверхностное натяжение мембраны задаем равным $\sigma = 0.05 k_B T/\text{нм}^2$. Также от состава не зависит длина гидрофобного взаимодействия $\xi_p \approx 1$ нм [21]. Модуль Гауссовой кривизны K_G определен в нескольких работах и варьирует от $-3.3 k_B T$

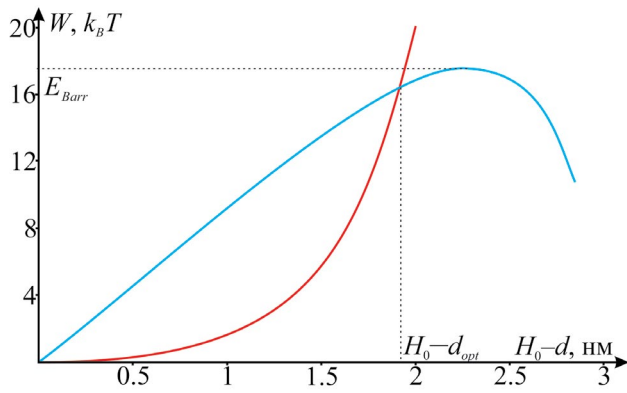


Рис. 4. Энергетическая траектория монослойного слияния в координатах $(H_0 - d, W)$. Начало слияния находится слева и соответствует отсутствию выпуклостей, конец траектории находится справа и соответствует образованию монослойного сталка ($d = 0$). Красным показана равновесная энергия выпуклостей W_{tot}^1 ; синим показана равновесная энергия монослоев с гидрофобными дефектами W_{tot}^2 . Параметры системы те же, что и на рис. 3.

до $-10 k_B T$ [31–33]. Мы используем две величины: $-5 k_B T$ и $-8 k_B T$ и приводим результаты для этих значений. Также мы варьируем начальное расстояние между монослоями H_0 и приводим зависимость высоты барьера от H_0 для различных составов. Результаты расчетов показаны на рис. 5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами результаты позволяют оценить высоту E_{Barr} энергетического барьера на образование монослойного сталка и провести сравнение со случаем классического бислойного слияния. Одним из важных вопросов теории слияния является получение зависимости высоты такого барьера от состава сливающихся мембран. Известно, что увеличение доли DOPE в составе мембран приводит к облегчению слияния и увеличению стабильности сталка [34]. Имеющиеся экспериментальные данные по слиянию липидных капель также говорят о том, что увеличение доли DOPE или фосфатидной кислоты в составе их оболочки

приводит к увеличению эффективности слияния [16]. Наши результаты согласуются с этими предположениями. Как видно из рис. 5, увеличение доли DOPE на 50% приводит к уменьшению высоты барьера примерно на $5 k_B T$, которое становится тем больше, чем больше расстояние между монослоями H_0 . При этом увеличение H_0 с 2 до 4 нм приводит к росту высоты барьера в несколько раз, с 10 до 30–40 $k_B T$, в зависимости от остальных параметров системы. Таким образом, наши расчеты показывают, что изменение состава монослоев влияет на эффективность образования сталка значительно слабее, чем изменение начального расстояния между ними. Этот результат качественно соответствует полученным ранее результатам для бислойного и бислой-монослойного слияния [23]. Он также согласуется с результатами работы [12], согласно которым барьер для бислойного слияния уменьшается примерно на $3 k_B T$ при увеличении доли фосфатидилэтаноламина в составе мембран на 50%. В этой же работе показано, что барьер на слияние чрезвычайно сильно зависит от расстояния между мембранами и увеличивается в 2 раза при двукратном увеличении расстояния. При этом следует отметить, что уменьшение барьера даже на несколько единиц $k_B T$ ощутимо влияет на экспериментально регистрируемое время ожидания слияния. Так, например, в работе [35] демонстрируется, что уменьшение времени ожидания слияния в 35 раз соответствует уменьшению барьера на $3.5 k_B T$. Полученные зависимости позволяют объяснить эффективность белок-опосредованного слияния липидных капель как результат контроля межмонослойного расстояния: эктодомены белков слияния, таких как SNARE, удерживают монослои на фиксированном небольшом расстоянии, что резко понижает барьер на слияние и делает слияние реализуемым за физически адекватное время. Варьирование липидного состава позволяет более тонко влиять на высоту барьера, дополняя влияние белков и ускоряя или замедляя слияние в несколько раз.

Таблица 1. Значения параметров, зависящих от липидного состава

Липидный состав	DOPC : DOPE=1:0	DOPC : DOPE=3:1	DOPC : DOPE=1:1
$B_{eff}, k_B T$	10	8.3	7.8
$J_s, \text{нм}^{-1}$	-0.09	-0.17	-0.25
$P_0, k_B T/\text{нм}^3$	817	151	59
$\xi_h, \text{нм}$	0.235	0.321	0.368

Примечание. Параметры P_0 и ξ_h взяты из работы [26]; модуль изгиба и спонтанная кривизна определяются в соответствии с формулами (13) и (14). При расчетах спонтанная кривизна DOPC принимается равной $J_{DOPC} = -0.09 \text{ нм}^{-1}$; спонтанная кривизна DOPE $J_{DOPE} = -0.4 \text{ нм}^{-1}$ [29].

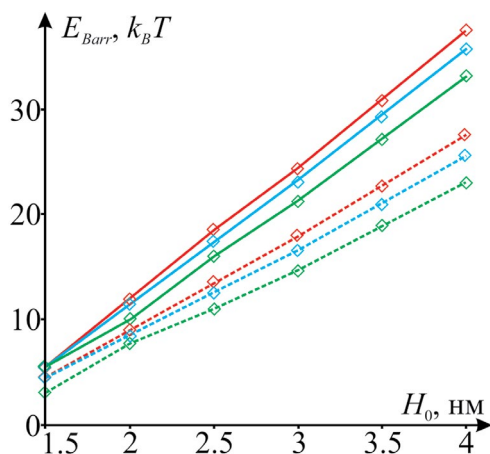


Рис. 5. Зависимость высоты барьера на образование монослойного сталка E_{Barr} ($k_B T$) от H_0 для монослоев разного состава и при разном значении модуля Гауссовой кривизны K_G . Красным показаны зависимости для монослоев из чистого DOPC, синим – для монослоев состава DOPC : DOPE = 3:1, зеленым – для монослоев состава DOPC : DOPE = 1:1. Сплошными линиями показаны зависимости для случая $K_G = -8 k_B T$, пунктирными линиями – для случая $K_G = -5 k_B T$. Значения упругих модулей и спонтанной кривизны для монослоев разного состава указаны в табл. 1.

Наши результаты показывают, что Гауссова кривизна также оказывает значительное влияние на высоту барьера; количественно это влияние определяется величиной модуля Гауссовой кривизны K_G . Экспериментально оценить эту величину достаточно сложно; наиболее достоверные результаты были получены путем молекулярно-динамических расчетов [33]. Согласно этим данным, отношение K_G/V колеблется от -0.86 до -1.05 в зависимости от параметров симуляции, таких как площадь на головку липида. Данные [32] говорят о значении -0.83 для того же соотношения. В то же время в некоторых работах используется значение -0.5 и даже -0.3 [31]. Кроме того, в работе [36] показано, что для мембраны из DOPE модуль K_G составляет $-8.3 k_B T$, а для мембраны из DOPC $-7.6 k_B T$. В силу большой неопределенности в литературных данных мы взяли два характерных значения для модуля K_G , чтобы показать степень влияния на высоту барьера; при этом зависимость K_G от состава не рассматривалась. Из приведенных на рис. 5 данных следует, что изменение модуля Гауссовой кривизны K_G с -8 до $-5 k_B T$ приводит к падению высоты барьера в 1.5 раза. Это говорит о большой чувствительности энергии интермедиатов слияния к величине K_G , что является следствием топологической перестройки в процессе слияния [32].

Результаты нашей работы позволяют оценить влияние суммарного числа монослоев в составе сливающихся мембран на энергетический профиль

системы. Ранее нами было показано, что стабильность сталка повышается при уменьшении этого числа с четырех до трех [23]. Проведенные в этой работе вычисления методом молекулярной динамики показывают, что в случае мембран из чистого DOPC бислоиный сталк является нестабильной структурой, в то время как монослойно-бислоиный сталк является метастабильной структурой. В случае монослойно-бислоиного слияния барьер на обратный переход из состояния сталка в состояние невзаимодействующих мембран составляет несколько единиц $k_B T$. В настоящей работе демонстрируется, что дальнейшее уменьшение числа монослоев приводит к возрастанию величины обратного барьера. Вне зависимости от состава мембраны, в области $d < d_{opt}$ энергия понижается на несколько десятков единиц $k_B T$, как показано на рис. 4. Высота прямого барьера также понижается на $15 k_B T$ относительно бислоиного слияния и при $H_0 \approx 2-3$ нм варьирует в интервале $10-25 k_B T$. Дальнейшая эволюция системы после образования монослойного сталка должна быть связана с его расширением. В отличие от бислоиного слияния, расширение монослойного сталка приводит сразу к образованию поры слияния. В работе [25] нами были проведены расчеты, описывающие расширение сталка в случае монослойно-бислоиного слияния. Нами была произведена оценка высоты барьера на расширение сталка в зависимости от доли DOPE в составе мембран; максимальное значение этого барьера E_{MB} составляет $10 k_B T$ в случае мембран без DOPE. Простые соображения позволяют связать с уже рассмотренной моделью случай расширения монослойного сталка и получить оценку для его барьера. В случае бислоино-монослойного слияния бислоиная мембрана практически не деформировалась, и образование сталка было связано только с деформацией монослоя [25]. Согласно формулам (6) и (11), энергия деформаций монослоя квадратично зависит от высоты его подъема относительно начального положения. Можно оценить энергию на расширение монослойно-бислоиного сталка как $E_{MB} \approx F(R) \cdot H_0 F(R)$ – функция радиуса сталка. В случае монослойного слияния в силу симметрии системы мы будем иметь два монослоя, каждый из которых поднят на высоту $H_0/2$, поэтому для энергии на расширение монослойного сталка E_M можно будет записать

$$E_M \approx 2F(R) \cdot \left(\frac{H_0}{2}\right)^2 = F(R) \frac{H_0^2}{2} = \frac{1}{2} E_{MB},$$

т.е. энергия будет уменьшаться в 2 раза. Таким образом, для расширения монослойного сталка

будет необходима энергия менее $5 k_B T$, т.е. можно считать, что расширение stalkа происходит практически безбарьерно. В этом состоит принципиальное отличие слияния монослоев от слияния бислоиных мембран; в последнем случае процесс сложнее и требует преодоления нескольких энергетических барьеров. Различным стадиям слияния способствуют липиды с разными характеристиками. Так, для облегчения расширения бислоиного stalkа до диаграммы полуслияния предпочтительны липиды с отрицательной спонтанной кривизной, а для облегчения образования поры слияния — липиды с положительной спонтанной кривизной [2]. В силу этого для повышения эффективности бислоиного слияния в живых системах бывает необходимо использовать белки слияния. В то же время монослойное слияние в силу пониженности энергетического барьера и одностадийности может регулироваться только липидным составом без непосредственного участия белков.

В рамках проведенных расчетов были сделаны некоторые упрощающие предположения. Мы считаем, что гидратационное отталкивание ограничивается областью выпуклости, т.е. $r < R$. Такое предположение оправдано, если в этой области высота мембраны $H(r)$ меняется на большую величину, чем $\xi_H/2$. Поскольку значение ξ_H мало и составляет несколько ангстрем, это условие выполняется для большей части рассматриваемых систем, однако перестает работать при небольших межмонослойных расстояниях $H_0 < 1.5–2$ нм. Таким образом, используемая модель становится неприменимой в области малых значений H_0 . Гидратационным отталкиванием при рассмотрении гидрофобных дефектов мы полностью пренебрегаем, поскольку предполагаем, что их наличие приводит к локальному разупорядочиванию слоев воды при $r > R$. Это предположение нуждается в дополнительной проверке и может приводить к занижению энергии гидрофобных дефектов, особенно в области больших расстояний H_0 . Таким образом, сформулированная модель наиболее корректно описывает поведение системы в узком диапазоне значений H_0 примерно от 2 до 3 нм. Кроме того, предполагается, что переход из состояния выпуклости в состояние гидрофобного дефекта совершается безбарьерно. В то же время, несмотря на равенство энергий этих состояний, они могут отличаться величиной равновесного радиуса, т.е. $R_{min}^1 \neq R_{min}^2$. В дальнейшем мы планируем учесть этот недостаток и разработать непрерывную траекторию слияния монослойных оболочек.

Автор выражает глубокую признательность П.И. Кузьмину за доброжелательные и конструктивные замечания при выполнении расчетов и подготовке рукописи.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22–23–00551).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martens S., McMahon H.T. 2008. Mechanisms of membrane fusion: Disparate players and common principles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 543–556.
2. Akimov S.A., Molotkovsky R.J., Kuzmin P.I., Galimzanov T.R., Batishchev O.V. 2020. Continuum models of membrane fusion: Evolution of the theory. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3875.
3. Chernomordik L.V., Kozlov M.M. 2008. Mechanics of membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 675–683.
4. Markin V., Kozlov M., Borovjagin V. 1984. On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *Gen. Physiol. Biophys.* **5**, 361–377.
5. Yang L., Huang H.W. 2002. Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science* **297**, 1877–1879.
6. Akimov S.A., Molotkovsky R.J., Galimzanov T.R., Radaev A.V., Shilova L.A., Kuzmin P.I., Batishchev O.V., Voronina G.F., Chizmadzhev Yu.A. 2014. Model of membrane fusion: Continuous transition to fusion pore with regard of hydrophobic and hydration interactions. *Biochem. (Mosc.) Suppl. A: Membr. Cell Biol.* **8**, 153–161.
7. Fuhrmans M., Marelli G., Smirnova Y.G., Müller M. 2015. Mechanics of membrane fusion/pore formation. *Chem. Phys. Lipids.* **185**, 109–128.
8. Ryham R.J., Klotz T.S., Yao L., Cohen F.S. 2016. Calculating transition energy barriers and characterizing activation states for steps of fusion. *Biophys. J.* **110**, 1110–1124.
9. Cohen F.S., Melikyan G.B. 2004. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J. Membr. Biol.* **199**, 1–14.
10. Kuzmin P.I., Zimmerberg J., Chizmadzhev Yu.A., Cohen F.S. 2001. A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 7235–7240.
11. Kawamoto S., Klein M.L., Shinoda W. 2015. Coarse-grained molecular dynamics study of membrane fusion: Curvature effects on free energy barriers along the stalk mechanism. *J. Chem. Phys.* **143**, 243112.
12. Poojari C.S., Scherer K.C., Hub J.S. 2021. Free energies of membrane stalk formation from a lipidomics perspective. *Nat. Commun.* **12**, 6594.
13. Tauchi-Sato K., Ozeki S., Houjou T., Taguchi R., Fujimoto T. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J. Biol. Chem.* **277**, 44507–44512.
14. Gao G., Chen F.J., Zhou L., Su L., Xu D., Xu L., Li P. 2017. Control of lipid droplet fusion and growth by CIDE family proteins. *BBA—Mol. Cell Biol. L.* **1862**, 1197–1204.

15. Boström P., Andersson L., Rutberg M., Perman J., Lidberg U., Johansson B.R., Fernandez-Rodriguez J., Ericson J., Nilsson T., Borén J., Olofsson S.O. 2007. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1286–1293.
16. Fei W., Shui G., Zhang Y., Krahmer N., Ferguson C., Kapterian T.S., Lin R.C., Dawes I.W., Brown A.J., Li P., Huang X., Parton R.G., Wenk M.R., Yang H. 2011. A role for phosphatidic acid in the formation of “supersized” lipid droplets. *PLoS Genet.* **7**, e1002201.
17. Chernomordik L.V., Kozlov M.M., Melikyan G.B., Abidor I.G., Markin V.S., Chizmadzhev Y.A. 1985. The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **812**, 643–655.
18. Kooijman E.E., Chupin V., Fuller N.L., Kozlov M.M., de Kruijff B., Burger K.N., Rand P.R. 2005. Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry.* **44**, 2097–2102.
19. Penno A., Hackenbroich G., Thiele C. 2013. Phospholipids and lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta.* **1831**, 589–594.
20. Mather I.H., Masedunskas A., Chen Y., Weigert R. 2019. Symposium review: Intravital imaging of the lactating mammary gland in live mice reveals novel aspects of milk-lipid secretion. *J. Dairy Sci.* **102**, 2760–2782.
21. Molotkovsky R.J., Kuzmin P.I., Akimov S.A. 2015. Membrane fusion. Two possible mechanisms underlying a decrease in the fusion energy barrier in the presence of fusion proteins. *Biochem. (Mosc.) Suppl. A: Membr. Cell Biol.* **9**, 65–76.
22. Molotkovsky R.J., Galimzyanov T.R., Jiménez-Munuguía I., Pavlov K.V., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2017. Switching between successful and dead-end intermediates in membrane fusion. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2598.
23. Kalutsky M.A., Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J. 2022. A model of lipid monolayer–bilayer fusion of lipid droplets and peroxisomes. *Membranes*, **12**, 992.
24. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
25. Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И. 2022. Слияние мембран пероксисомы и липидной капли: расширение π-образной структуры. *Биол. мембраны.* **39** (5), 404–416.
26. Aeffner S., Reusch T., Weinhausen B., Salditt T. 2012. Energetics of stalk intermediates in membrane fusion are controlled by lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E1609–E1618.
27. Bashkurov P.V., Kuzmin P.I., Vera Lillo J., Frolov V.A. 2022. Molecular shape solution for mesoscopic remodeling of cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **51**, 473–497.
28. Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339.
29. Kollmitzer B., Heftberger P., Rappolt M., Pabst G. 2013. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft Matter.* **9**, 10877–10884.
30. Hamm M., Kozlov M.M. 1998. Tilt model of inverted amphiphilic mesophases. *Eur. Phys. J.* **B6**, 519–528.
31. Shnyrova A.V., Bashkurov P.V., Akimov S.A., Pucadyil T.J., Zimmerberg J., Schmid S.L., Frolov V.A. 2013. Geometric catalysis of membrane fission driven by flexible dynamin rings. *Science.* **339**, 1433–1436.
32. Siegel D.P., Kozlov M.M. 2004. The Gaussian curvature elastic modulus of N-monomethylated dioleoylphosphatidylethanolamine: Relevance to membrane fusion and lipid phase behavior. *Biophys. J.* **87**, 366–374.
33. Hu M., Briguglio J.J., Deserno M. 2012. Determining the Gaussian curvature modulus of lipid membranes in simulations. *Biophys. J.* **102**, 1403–1410.
34. Chernomordik L.V., Kozlov M.M. 2003. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 175–207.
35. Akimov S.A., Polynkin M.A., Jiménez-Munuguía I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2018. Phosphatidylcholine membrane fusion is pH-dependent. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1358.
36. Siegel D.P. 2008. The Gaussian curvature elastic energy of intermediates in membrane fusion. *Biophys. J.* **95**, 5200–5215.

Energy Barrier of a Monolayer Stalk Formation during Lipid Droplet Fusion

© 2024 г. R. J. Molotkovsky¹, *

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

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

Lipid droplets are organelles responsible for the accumulation and breakdown of neutral fats in the human body. Lipid droplets have a monolayer shell of phospholipids, which prevents their spontaneous fusion. The fusion of lipid droplets is carried out by specialized fusion proteins and is regulated by the lipid composition of the monolayer membrane. The efficiency of fusion is determined by the energy needed for the local approach of lipid droplets and the topological rearrangement of their monolayers. In this work, the fusion of monolayers is modeled within the framework of the theory of membrane elasticity. The energy barrier for fusion is calculated under various conditions simulating possible compositions of monolayers, as well as the possible effects of proteins. The calculation results show that the height of the barrier is most dependent on the distance between lipid droplets, which is determined by the fusion proteins. Lipid composition also affects the fusion efficiency and can change it several tens of times, which is consistent with previously obtained data on bilayer fusion.

Keywords: lipid membrane, theory of elasticity, membrane fusion, lipid droplet, spontaneous curvature, hydration repulsion

УДК 577.352.465

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРА CaCCinh-A01 НА АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ ANO6

© 2024 г. Д. О. Колесников^{а, #}, Е. Р. Григорьева^{а, #}, М. А. Номеровская^а, Д. С. Решетин^а,

А. В. Шалыгин^{а, *}, Е. В. Казначеева^{а, **}

^а Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*e-mail: shalygin.alexey@gmail.com; **e-mail: evkazu@incras.ru

[#] Равный вклад

Поступила в редакцию 14.11.2023

После доработки 05.12.2023

Принята к публикации 08.12.2023

Белки семейства аноктаминов (ANO) формируют кальций-зависимые хлорные каналы (CaCC) и фосфолипидные скрамблазы. Белок ANO6 (TMEM16F), совмещающий в себе функции кальций-зависимой скрамблазы и ионного канала, рассматривается в качестве молекулярной мишени для лечения нарушений свертываемости крови, COVID-19-ассоциированной пневмонии, нейродегенеративных заболеваний и других патологий. В качестве потенциального фармакологического препарата рассматривается CaCCinh-A01, являющийся блокатором каналов семейства ANO. Ранее эффект данного блокатора был исследован с использованием методов оценки интегральных токов ионов через мембрану, что не позволяло оценивать активность отдельных каналов. Поэтому остается неизвестным, какие характеристики каналов подвержены изменению под действием блокатора: вероятность открытого состояния, амплитуда тока через открытый канал, время жизни открытого состояния канала. Регистрируя одиночные нативные каналы ANO6 в клетках HEK293, мы показали, что действие блокатора обусловлено уменьшением как амплитуды тока через одиночные каналы ANO6, так и их времени жизни, что, в свою очередь, ведет к снижению вероятности открытого состояния каналов. Полученные данные позволяют объяснить механизм снижения интегрального тока каналов ANO6 при действии блокатора CaCCinh-A01.

Ключевые слова: CaCCinh-A01, кальций-зависимые хлорные каналы (CaCC), ANO6 (TMEM16F), метод локальной фиксации потенциала, регистрация одиночных каналов, клетки HEK293.

DOI: 10.31857/S0233475524020046, EDN: xugahu

ВВЕДЕНИЕ

Кальций-зависимые хлорные каналы (CaCC) участвуют в регуляции множества внутриклеточных процессов. Каналы образованы белками семейства аноктаминов (ANO). В семействе выделяют три гомолога, формирующих CaCC: хлорные каналы ANO1 (TMEM16A) и ANO2 (TMEM16B), участвующие в секреции экзокринных желез и работе нервной системы, а также белок ANO6, совмещающий функции ионного канала и фосфолипидной скрамблазы [1–3].

Часть установленных функций ANO6, таких как слияние клеток при формировании трофобласта, регуляция активации лимфоцитов, участие в коагуляции крови, связаны с его скрамблазной активностью [2, 4, 5]. Другие функции, например, минерализация костной ткани, связаны с канальной активностью ANO6 [6]. В последние годы

интерес к белкам семейства аноктаминов и к данному белку, в частности, сильно возрос в связи с ролью ANO6 во многих патофизиологических процессах, в том числе в образовании синцития легочной ткани при тяжелом течении COVID-19, нарушении свертываемости крови, развитии нейродегенеративных заболеваний и в других патологиях [2, 7–9]. Таким образом, CaCC, в частности ANO6, представляют собой важную мишень для фармакологических препаратов.

В последние годы был разработан ряд селективных блокаторов CaCC, среди которых можно выделить вещество CaCCinh-A01. Ингибитор эффективно подавляет ток через CaCC ANO1 ($IC_{50} = 7.35$ мкМ) и ANO6 ($IC_{50} = 10$ мкМ) [10, 11]. CaCCinh-A01 связывается с внеклеточной стороной канала [11]. Методами молекулярной динамики было показано, что связывание CaCCinh-A01 вызывает переход

канала в закрытое состояние [11]. Данное вещество представляет особый интерес для разработки лекарственных препаратов для лечения патофизиологических состояний, связанных с нарушением работы каналов CaCC [11, 12].

Блокатор CaCCinh-A01 подавляет активность каналов ANO6 не только при добавлении с наружной стороны мембраны, но и при добавлении с внутриклеточной стороны [13]. Механизм действия блокатора с внутриклеточной стороны на настоящий момент является предметом дискуссий.

Подавление интегрального тока через CaCC может быть связано со следующими факторами: уменьшением вероятности открытого состояния канала, времени жизни или амплитуды тока через одиночный канал. В настоящий момент неизвестно, на какой именно параметр тока одиночных каналов влияет вещество CaCCinh-A01 при добавлении с внутриклеточной стороны мембраны.

Ранее мы зарегистрировали одиночные нативные CaCC ANO6 в клетках HEK293 [14, 15]. В работе мы использовали эти каналы в качестве модельного объекта для изучения влияния применения CaCCinh-A01 с внутриклеточной стороны на активность эндогенных каналов CaCC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная культура. Работа была проведена на клетках линии HEK293 из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировались на модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (Россия, ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 1% пенициллина, 1% стрептомицина и 1% *L*-глутамина. Клетки пересеивали на покровные стекла (3 × 3 мм) за 16–48 ч до проведения опытов.

Реактивы. Все используемые реактивы произведены Sigma Aldrich (США). CaCCinh-A01 разводили в DMSO до концентрации 20 мМ, хранили при температуре –20°C. Через 3 мес хранения при –20°C действие блокатора на активность каналов ANO6 снижалось, вероятно, в связи с деградацией блокатора.

Электрофизиологические измерения токов. Токи через одиночные каналы регистрировали методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации inside-out с использованием усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Оцифровку данных осуществляли при помощи АЦП-ЦАП Digidata 1322A (Axon Instruments, США) с частотой дискретизации 5 кГц. Сигнал обрабатывали при помощи встроенного в усилитель

низкочастотного фильтра Бесселя 2 кГц. Для анализа амплитуды тока, вероятности открытого состояния каналов и презентации данных записи дополнительно фильтровали при 110 Гц. При анализе времени открытого состояния каналов дополнительная фильтрация не применялась, при этом не учитывались события короче 0.5 мс.

Раствор регистрирующей пипетки содержал: 105 мМ CaCl₂; 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4. Расчет концентрации свободного кальция [Ca²⁺]_i проводили в программе Max Chelator (Stanford University, США). Внутриклеточный раствор с расчетным содержанием свободных ионов кальция 100 нМ [Ca²⁺]_i содержал: 130 мМ Cs-глутамат, 3.3 мМ CaCl₂, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ MgATP, 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, pH 7.2. Внутриклеточный раствор с расчетным содержанием свободных ионов кальция 10 мкМ [Ca²⁺]_i содержал: 130 мМ Cs-глутамат, 9.82 мМ CaCl₂, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ MgATP, 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, pH 7.2. Эксперименты проводились при комнатной температуре. Сопротивление стеклянных микропипеток составляло 7–15 МОм. Смена внеклеточного раствора осуществлялась за 10 с. В течение этого времени регистрация токов не производилась.

Для количественной оценки активности каналов использовали величину (NP_o), где N – число каналов, а P_o – вероятность открытого состояния канала. NP_o = (I)/i, где (I) – среднее значение тока через фрагмент мембраны, (i) – амплитуда тока через открытый канал. Для анализа использовали среднее NP_o, измеренное в течение 30-ти секундного интервала до и после аппликации блокатора.

Статистическая обработка данных. Обработка данных выполнялась в программе Origin2018 (Originlab, США) и Clampfit 10.3 (Molecular Devices, США). Данные проверяли на нормальность тестом Шапиро–Уилка, на равенство дисперсий тестом Левена. Для сравнения парных данных использовали односторонний парный тест Стьюдента. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. Различия считались значимыми, если *p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление ингибитора CaCCinh-A01 к внутриклеточной стороне мембраны клеток HEK293 снижает вероятность открытого состояния каналов CaCC ANO6

Ранее при изучении эффективности действия CaCCinhA01 на активность каналов CaCC проводились исследования с оценкой интегрального ионного тока без анализа активности одиночных каналов. Нами были описаны электрофизиологические

свойства одиночных каналов ANO6 в клетках HEK293 [14]. Данный подход позволяет нам выявить механизмы подавления интегрального тока блокатором.

Опыты проводили в конфигурации inside-out, активируя каналы CaCC ANO6 добавлением 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ при фиксированном потенциале на мембране +40 мВ. При активации каналов ANO6 мы добавляли 20 мкМ ингибитора CaCCinh-A01 к внутриклеточной стороне мембраны (рис. 1а). Применение блокатора незначительно меняло вольт-амперные характеристики одиночных каналов ANO6 (рис. 1б, [14]). Для оценки влияния блокатора CaCCinh-A01 на вероятность открытого состояния каналов CaCC мы рассчитывали NP_o .

NP_o каналов CaCC ANO6, активированных 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, составляла 1.30 ± 0.59 ($n = 5$). После добавления 20 мкМ ингибитора CaCCinh-A01 значение NP_o снижалось на 36% до 0.83 ± 0.51 ($n = 5$) (рис. 1в).

Полученные нами данные отличаются от данных, опубликованных группой Канцельманна [13]. Так, было показано, что CaCCinh-A01 подавлял

активность каналов эффективнее, чем в нашем исследовании — примерно на 70%. Возможное отличие в полученных экспериментальных данных может быть связано как с выбором объекта исследований, так и с дизайном эксперимента. Группа Канцельманна использовала в качестве объекта клетки линии Jurkat и A549. Известно, что эффективность CaCCinh-A01 различается в разных клеточных линиях [16]. Кроме того, в своей работе авторы добавляли блокатор к внутриклеточной стороне мембраны только на несколько секунд, после чего блокатор отмывали, что приводило к восстановлению активности каналов [13]. Мы оценивали активность каналов на протяжении как минимум 30 с после добавления. Также мы использовали раствор с большей концентрацией ионов кальция, чем в работе группы Канцельманна.

Таким образом, мы показали, что в наших условиях применение блокатора CaCCinh-A01 с внутриклеточной стороны мембраны приводит к снижению вероятности открытого состояния каналов ANO6 в клетках HEK293.

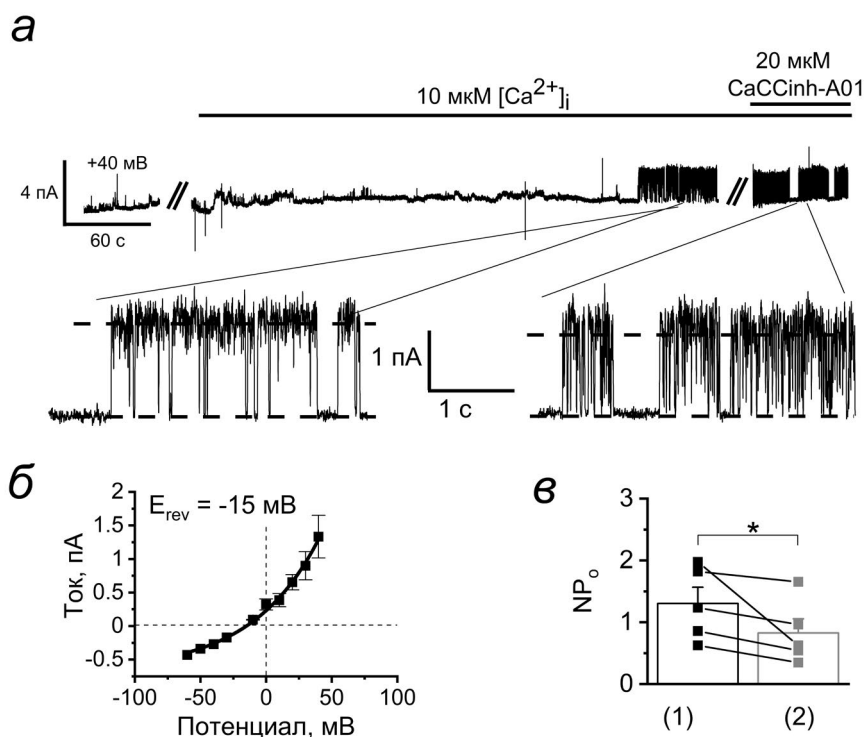


Рис. 1. Влияние CaCCinh-A01 на вероятность открытого состояния одиночных каналов ANO6 клеток HEK293. Для анализа использовали эксперименты, проведенные в конфигурации inside-out, при потенциале +40 мВ. а — Фрагмент записи тока через каналы CaCC ANO6 после добавления 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ и последующей аппликации 20 мкМ CaCCinh-A01. Расширенные фрагменты записи токов и амплитудные гистограммы указаны под фрагментом записи тока. б — Вольт-амперная характеристика каналов CaCC ANO6 после добавления 20 мкМ CaCCinh-A01 к внутриклеточной стороне мембраны. в — Вероятность открытого состояния каналов CaCC ANO6, активированных добавлением 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, в интервалах 30 с непосредственно до (1, черные квадраты) и после применения CaCCinh-A01 (2, серые квадраты) ($p < 0.05$).

Снижение вероятности открытого состояния каналов CaCC ANO6 при действии CaCCinh-A01 обусловлено уменьшением времени жизни открытого состояния каналов

Снижение вероятности открытого канала может быть обусловлено несколькими факторами: либо уменьшается время жизни канала, либо канал реже открывается. Для оценки влияния ингибитора CaCCinh-A01 на время жизни каналов ANO6 клеток НЕК293 мы сравнивали время открытого состояния каналов на промежутках длительностью 8 с до и сразу после добавления блокатора (рис. 2а, 2б).

Мы обнаружили, что добавление 20 мкМ CaCCinh-A01 уменьшает время жизни каналов CaCC ANO6, активированных 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, на 34% с 1.43 ± 0.33 мс ($n = 4$) до 0.94 ± 0.17 мс ($n = 4$, $p < 0.05$) (рис. 2в).

Снижение времени открытого состояния каналов на 34% коррелировало с уменьшением вероятности открытого состояния каналов (рис. 1в — снижение на 36%). Исходя из полученных данных, мы можем заключить, что CaCCinh-A01 снижает вероятность открытого состояния каналов ANO6 при добавлении к внутриклеточной стороне мембраны, в первую очередь, за счет уменьшения времени жизни канала в открытом состоянии.

Ингибитор CaCCinh-A01 снижает амплитуду тока через одиночные каналы CaCC ANO6

Величина интегрального тока через плазматическую мембрану зависит не только от вероятности открытого состояния и времени жизни, но также и от амплитуды тока через каналы. Для оценки влияния CaCCinh-A01 на амплитуду тока через каналы ANO6 мы сравнили амплитуду тока через канал непосредственно перед добавлением и сразу после применения ингибитора в конфигурации inside-out.

Амплитуда тока через каналы ANO6 при потенциале +40 мВ, активированные аппликацией 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, составляла 1.44 ± 0.22 пА ($n = 4$). После добавления ингибитора CaCCinh-A01 амплитуда тока через каналы ANO6 уменьшилась на 10%, до 1.29 ± 0.18 пА ($n = 4$, $p < 0.05$) (рис. 3).

Таким образом, наши данные позволяют предположить, что подавление интегрального тока через каналы ANO6 при воздействии ингибитора связано как с уменьшением времени жизни каналов, что приводит к снижению вероятности их открытого состояния, так и с изменением амплитуды тока через каналы.

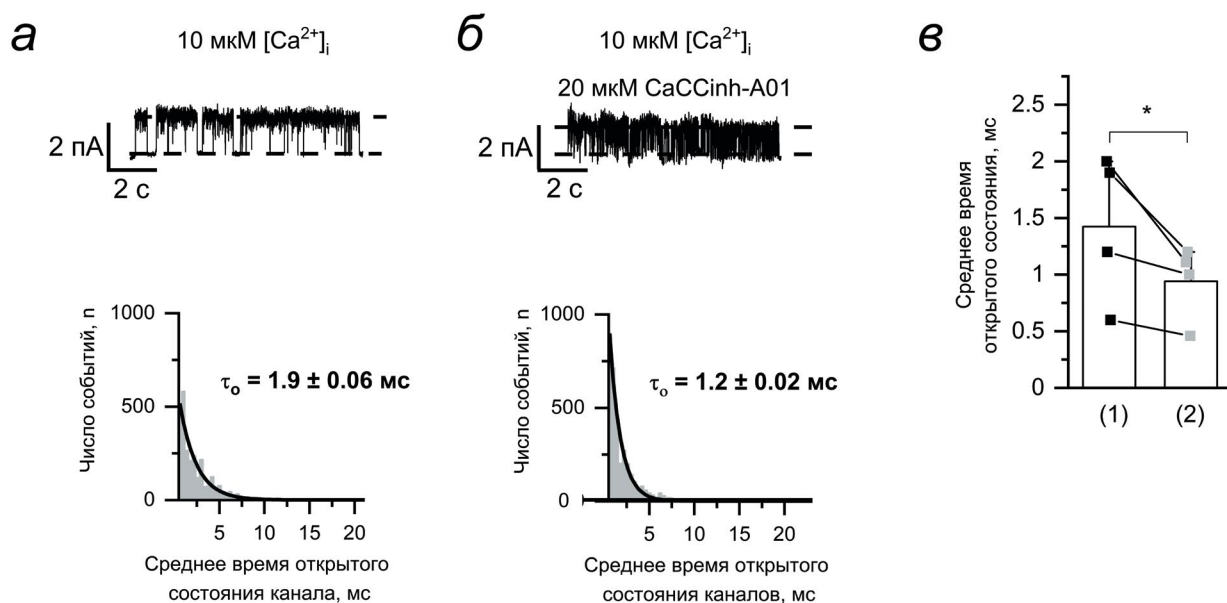


Рис. 2. Влияние CaCCinh-A01 на время жизни открытого состояния одиночных каналов ANO6 клеток НЕК293. Для анализа использовали эксперименты, проведенные в конфигурации inside-out, при потенциале +40 мВ. а — Фрагмент записи тока через одиночные CaCC ANO6, активированные 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$. б — Фрагмент записи тока через одиночные CaCC ANO6 в присутствии 20 мкМ CaCCinh-A01. Соответствующие гистограммы времени жизни каналов приведены под фрагментами записи тока. в — Суммарный график, отражающий изменение времени жизни одиночных каналов CaCC ANO6 при добавлении 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ (1, черные квадраты) и после последующей аппликации 20 мкМ CaCCinh-A01 (2, серые квадраты) ($n = 4$, $p < 0.05$).

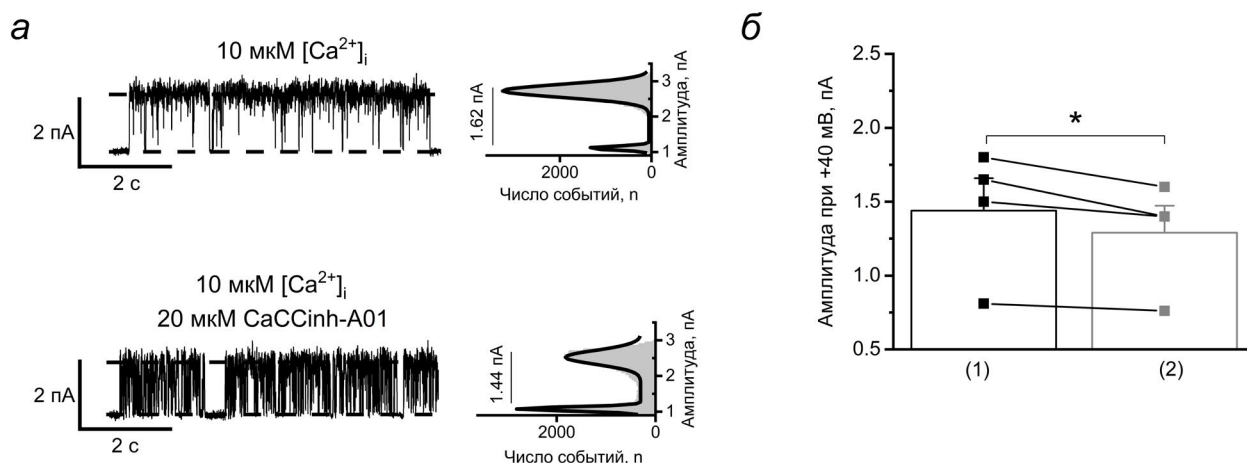


Рис. 3. Влияние CaCCinh-A01 на амплитуду тока через каналы CaCC ANO6 клеток HEK293. Для анализа использовали эксперименты, проведенные в конфигурации inside-out, при потенциале +40 мВ. *a* – Расширенные фрагменты записи тока каналов CaCC ANO6, активированных 10 мкМ [Ca²⁺]_i до и после добавления 20 мкМ CaCCinh-A01. Амплитудные гистограммы указаны рядом с фрагментами записи тока. *б* – График изменения амплитуды тока через каналы CaCC ANO6 до (1, черные квадраты) и после (2, серые квадраты) применения ингибитора CaCCinh-A01 ($p < 0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что при воздействии блокатора CaCCinh-A01 с внутриклеточной стороны мембраны клеток HEK293 происходит уменьшение тока через каналы ANO6 за счет уменьшения времени жизни открытого состояния и амплитуды тока через каналы. В свою очередь, уменьшение времени жизни каналов ANO6 ведет к снижению их вероятности открытого состояния. Полученные данные объясняют механизмы действия блокатора на каналы ANO6.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22–24–00761).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kalienkova V., Clerico Mosina V., Paulino C. 2021. The groovy TMEM16 family: Molecular mechanisms of lipid scrambling and ion conduction. *J. Mol. Biol.* **433**, 166941.
- Yang H., Kim A., David T., Palmer D., Jin T., Tien J., Huang F., Cheng T., Coughlin S.R., Jan Y.N., Jan L.Y. 2012. TMEM16F forms a Ca²⁺-activated
- cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell.* **151**, 111–122.
- Kostritskii A.Y., Machtens J.P. 2021. Molecular mechanisms of ion conduction and ion selectivity in TMEM16 lipid scramblases. *Nat. Commun.* **12**, 2826.
- Zhang Y., Le T., Grabau R., Mohseni Z., Kim H., Natale D.R., Feng L., Pan H., Yang H. 2020. TMEM16F phospholipid scramblase mediates trophoblast fusion and placental development. *Sci. Adv.* **6**, 19.
- Ousingsawat J., Wanitchakool P., Kmit A., Romao A.M., Jantarajit W., Schreiber R., Kunzelmann K. 2015. Anoctamin 6 mediates effects essential for innate immunity downstream of P2X7 receptors in macrophages. *Nat. Commun.* **6**, 6245.
- Ousingsawat J., Wanitchakool P., Schreiber R., Wueling M., Vortkamp A., Kunzelmann K. 2015. Anoctamin-6 controls bone mineralization by activating the calcium transporter NCX1. *J. Biol. Chem.* **290**, 6270–6280.
- Cabrera I., Benedetto R., Schreiber R., Kunzelmann K. 2019. Niclosamide repurposed for the treatment of inflammatory airway disease. *JCI Insight.* **4**, e128414.
- Braga L., Ali H., Secco I., Chiavacci E., Neves G., Goldhill D., Penn R., Jimenez-Guardeño J.M., Ortega-Prieto A.M., Bussani R., Cannata A., Rizzari G., Collesi C., Schneider E., Arosio D., Shah A.M., Barclay W.S., Malim M.H., Burrone J., Giacca M. 2021. Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia. *Nature.* **594**, 88–93.
- Zhang Y., Li H., Li X., Wu J., Xue T., Wu J., Shen H., Li X., Shen M., Chen G. 2020. TMEM16F aggravates neuronal loss by mediating microglial phagocytosis of

- neurons in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model. *Front. Immunol.* **11**, 1144.
10. De La Fuente R., Namkung W., Mills A., Verkman A.S. 2008. Small-molecule screen identifies inhibitors of a human intestinal calcium-activated chloride channel. *Mol. Pharmacol.* **73**, 758–768.
 11. Shi S., Guo S., Chen Y., Sun F., Pang C., Ma B., Qu C., An H. 2020. Molecular mechanism of CaCCinh-A01 inhibiting TMEM16A channel. *Arch. Biochem. Biophys.* **695**, 108650.
 12. Taylor K.A., Mahaut-Smith M.P. 2019. A major interspecies difference in the ionic selectivity of megakaryocyte Ca²⁺-activated channels sensitive to the TMEM16F inhibitor CaCCinh-A01. *Platelets.* **30**, 962–966.
 13. Martins J.R., Faria D., Kongsuphol P., Reisch B., Schreiber R., Kunzelmann K. 2011. Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 18168–18172.
 14. Kolesnikov D., Perevoznikova A., Gusev K., Glushankova L., Kaznacheeva E., Shalygin A. 2021. Electrophysiological properties of endogenous single Ca²⁺ activated Cl-channels induced by local Ca²⁺ entry in HEK293. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4767.
 15. Kolesnikov D.O., Nomerovskaya M.A., Grigorieva E.R., Reshetin D.S., Skobeleva K.V., Gusev K.O., Shalygin A.V., Kaznacheeva E.V. 2024. Calcium chelation independent effects of BAPTA on endogenous ANO6 channels in HEK293T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **693**, 149378. doi 10.1016/j.bbrc.2023.149378.
 16. Tian X.Q., Ma K.T., Wang X.W., Wang Y., Guo Z.K., Si J.Q. 2018. Effects of the calcium-activated chloride channel inhibitors T16Ainh-A01 and CaCCinh-A01 on cardiac fibroblast function. *Cell Physiol. Biochem.* **49**, 706–716.

The Mechanism of Calcium-Activated Chloride ANO6 Channel Inhibition by CaCCinh-A01

© 2024 г. D. O. Kolesnikov^{1, #}, E. R. Grigorieva^{1, #}, M. A. Nomerovskaya¹, D. S. Reshetin¹, A. V. Shalygin^{1, *}, E. V. Kaznacheeva^{1, **}

¹*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: shalygin.alexey@gmail.com; ^{**}e-mail: evkazn@incras.ru*

[#]*These authors contributed equally*

Proteins of the anoctamine family (ANO) form calcium-activated chloride channels (CaCC) and phospholipid scramblases. The ANO6 (TMEM16F) protein, which combines the functions of a calcium-dependent scramblase and those of an ion channel, is considered as a molecular target for the treatment of blood clotting disorders, COVID-19-associated pneumonia, neurodegenerative diseases, and other pathologies. CaCCinh-A01, which is a channel blocker of the ANO family, is studied as a potential pharmacological drug. Previously, the effect of this inhibitor was studied using methods representing the integral ion current through the membrane, which does not allow the properties of single channels to be distinguished. Therefore, it remains unknown which characteristics of single channels are sensitive to the blocker: channel open probability, the current amplitude, or the dwelling time of the channel open state. By registration of single ANO6 channels in HEK293 cells, we showed that the action of the inhibitor is due to a decrease in both the current amplitude and the open state dwelling time of single ANO6 channels, which, in turn, leads to a decrease in their open state probability. Thus, we have characterized the mechanism of current reduction through ANO6 channels by the inhibitor CaCCinh A01.

Keywords: CaCCinh-A01, calcium-activated chloride channels (CaCC), ANO6 (TMEM16F), patch-clamp, single-channel recording, HEK293 cells

УДК 571.27, 616-005.6, 578.834.1

НОВЫЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА У БОЛЬНЫХ COVID-19. ПИЛОТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© 2024 г. П. П. Авдонин^{а, *}, Л. А. Комлева^а, М. С. Блинова^а, Е. С. Иванова^б,
О. Н. Котенко^б, Н. Ф. Фролова^б, Е. С. Столяревич^б, Е. Ю. Рыбакова^а, П. В. Авдонин^а

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

^б ГБУЗ Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения города Москвы,
Москва, 123182 Россия

*e-mail: ppavdonin@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2023

После доработки 11.12.2023

Принята к печати 13.12.2023

Одним из факторов риска при инфекции, вызванной SARS-CoV-2, является гиперактивация системы комплемента, которая может приводить к активации и повреждению эндотелия, тромбозу и, в ряде тяжелых случаев, развитию полиорганной недостаточности. Методом количественной иммуноцитохимии мы исследовали опсонизацию факторами комплемента C3/C3b эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) при воздействии на них плазмы крови пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, чтобы оценить возможность использования данного подхода к изучению состояния системы комплемента при COVID-19 *ex vivo*. Для этих целей были использованы FITC-меченые антитела, специфичные к C3c домену факторов C3/C3b. В качестве параметров для оценки связывания C3/C3b с клетками были выбраны интегральная интенсивность регистрируемой флуоресценции и число C3/C3b-иммунопозитивных структур. Мы показали, что при инкубации HUVES с плазмой больных общее число C3/C3b-иммунопозитивных структур, регистрируемых на мембране этих клеток, в 5.8 ± 2.8 раз (mean \pm SD, $p < 0.001$) выше, чем при воздействии плазмы здоровых людей. При этом интегральная интенсивность флуоресценции возрастала в 6.3 ± 3.2 раз (mean \pm SD, $p \leq 0.0001$) по сравнению с контролем. Площадь иммунопозитивных структур, регистрируемых после воздействия на клетки плазмы здоровых доноров и больных COVID-19 и выбранных для анализа, составляла от 2.2 до 70 мкм². Иммунопозитивные частицы площадью 2.2–10.9 мкм² после инкубации с плазмой больных COVID-19 имели более вытянутую форму в сравнении с контролем. Среднее число частиц на клетку составляло в контроле 0.49 ± 0.06 (mean \pm SD, $n = 6$), при инкубации с плазмой больных 2.4 ± 0.4 (mean \pm SD, $n = 13$, $p < 0.001$). Анализ распределения частиц по площади показал, что наиболее выраженные отличия в количестве C3/C3b-иммунопозитивных структур в сравнении с контролем наблюдались среди крупных частиц. Таким образом, мы показали рост уровня опсонизации эндотелиальных клеток факторами комплемента C3/C3b в присутствии плазмы больных COVID-19 в сравнении с контрольной плазмой. Прирост обусловлен увеличением числа C3/C3b-иммунопозитивных структур, в большей степени крупных. Мы предполагаем, что разработанный нами подход позволит исследовать роль системы комплемента в повреждении клеток эндотелия сосудов у больных COVID-19 на модели *ex vivo*, а также оценивать уровень активации комплемента в плазме больных и эффективность их лечения.

Ключевые слова: комплемент, эндотелиальные клетки, COVID-19, фактор C3, мембраноатакующий комплекс

DOI: 10.31857/S0233475524020058, **EDN:** xttsen

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) появилась в 2019 г. в КНР в г. Ухане и в кратчайшие сроки распространилась по всему миру. В первые два года пандемии общее количество заболевших превысило 700 млн человек, и смертность составила 2–3% (<https://covid19.who.int/>). Борьба с этим заболеванием прежде всего была направлена на разработку вакцин. С их помощью удалось устранить вал заболеваемости и смертности. Заболеваемость была стабилизирована на низком уровне, однако полностью справиться с этим инфекционным заболеванием не удастся. Смертность в настоящее время от коронавирусной инфекции остается достаточно высокой и доходит до 0.5–1%. Созданные вакцины оказываются неэффективными по отношению к новым штаммам вируса SARS-CoV-2.

Параллельно с разработкой методов прямой защиты от вируса проводятся исследования патогенетических механизмов данного заболевания. Одним из критических моментов прогрессирования COVID-19 является цитокиновый шторм, сопровождающийся гиперактивацией комплемента [1]. Комплемент – это врожденная система иммунной защиты организма, включающая более 30 белковых факторов [2]. При нормальной работе основная функция системы комплемента заключается в инактивации и удалении чужеродных биологических объектов и собственных отмирающих клеток. В случае же гиперактивации объектом атаки становятся нормальные клетки организма. К числу первых мишеней относится эндотелий сосудов. Его повреждение приводит к активации системы свертывания крови, секреции фактора Виллебранда, тромбозу микрососудов и в тяжелых случаях к полиорганной недостаточности и смерти больного. Этот патологический процесс описан при гемолитико-уремическом синдроме – заболевании, вызванном врожденными и приобретенными дефектами системы комплемента [3].

Многочисленные исследования пациентов с COVID-19 подтвердили, что нарушение регуляции комплемента является одним из основных, если не главным, патогенетическим фактором этого заболевания [4, 5]. По этой причине определение функциональной активности системы комплемента у больных может иметь важное значение как для более детальной оценки их состояния и подбора терапии, так и для прогнозирования течения болезни. Для оценки активности комплемента проводится определение ряда параметров: литической активности C5, концентраций фактора C3, анафилактических пептидов C3a и C5a, содержания

в плазме мембраноатакующего комплекса (МАК). В состав МАК входят факторы комплемента C5b, C6, C7, C8 и C9, поэтому его также обозначают аббревиатурой C5b-9. Встраиваясь в мембрану микроорганизмов и поврежденных клеток организма, МАК формирует пору, проницаемую для ионов, воды и небольших молекул. Уровень растворенного в плазме МАК косвенно отражает его количество на поверхности инородных объектов (в данном случае на липидной оболочке вируса SARS-CoV-2) и на мембране собственных клеток организма.

В настоящей работе для оценки активности системы комплемента в плазме крови больных COVID-19 был применен уже использованный нами ранее подход [6], позволяющий непосредственно исследовать процесс формирования МАК на поверхности эндотелиальных клеток. Для этого в экспериментах *ex vivo* эндотелиальные клетки (ЭК) из пупочной вены человека (HUVES – human umbilical vein endothelial cells) инкубировали с плазмой пациентов, больных COVID-19, либо с плазмой здоровых людей. Известно, что при всех путях активации комплемента к поверхности атакуемого объекта присоединяется ключевой компонент каскада протеолитических реакций – фактор C3b [2]. Ковалентное связывание его с мембраной запускает финальную фазу активации системы комплемента – протеолиз фактора C5 и формирование МАК. Для визуализации связанного с мембраной HUVES фактора C3b были использованы конъюгированные с флуоресцеином антитела, специфичные к фактору C3 и к его активированной форме C3b. Мы показали, что при инкубации HUVES с плазмой больных сорбция C3/C3b на мембране многократно выше, чем при инкубации с плазмой здоровых людей. Таким образом, наши результаты показывают, что, во-первых, при коронавирусной инфекции резко усиливается активация комплемента на ЭК кровеносных сосудов. Во-вторых, используя данный метод оценки состояния системы комплемента *ex vivo*, можно непосредственно определять, каково повреждающее действие комплемента на сосуды у каждого конкретного больного и какова эффективность проводимого лечения и применяемых лекарственных препаратов. Также данная модель может быть использована для исследований патогенетических механизмов повреждения эндотелия сосудов при COVID-19.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были выбраны пациенты, проходящие лечение в стационаре и отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ).

Критериями отбора были наличие подтвержденной методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА) инфекции SARS-CoV-2 и вирусной пневмонии, подтвержденной компьютерной томографией (КТ). Плазму получали из крови, взятой из локтевой вены с антикоагулянтом, содержащим цитрат натрия.

HUVEC выделяли согласно методу, описанному ранее [7]. Клетки выращивали в покрытых желатином пластиковых флаконах в среде M199 с солями Эрла и 20 мМ HEPES, содержащей 20% фетальной телячьей сыворотки (Invitrogen, США). К среде добавляли фактор роста эндотелия (300 мкг/мл), выделенный из мозга кролика, 100 мкг/мл гепарина и смесь антибиотиков (пенициллин со стрептомицином). Использовали клетки ранних пассажей. Для пассирования HUVEC применяли аккутазу® (Sigma-Aldrich, США).

Для определения связывания фактора C3b с клетками их пересаживали в 48-луночный планшет. HUVEC трижды отмывали от среды роста физиологическим солевым раствором (ФСР, pH 7.4), содержащим NaCl (145 мМ), KCl (5 мМ), HEPES (5 мМ), MgCl₂ (1 мМ), CaCl₂ (1.2 мМ), глюкозу (10 мМ). Далее HUVEC инкубировали 10 мин при комнатной температуре в присутствии 100 мкМ ADP, трижды отмывали ФСР и инкубировали 4 ч с плазмой крови, смешанной с ФСР в соотношении 1:2 при 35°C. После инкубации клетки отмывали холодным фосфатным солевым буфером (PBS – phosphate buffered saline) и фиксировали холодным 3% параформальдегидом в течение 25 мин. Клетки отмывали 3 раза раствором PBS, инкубировали 45 мин с 2% раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS и далее в течение ночи инкубировали при 4°C с разведенными в 100 раз поликлональными FITC-конъюгированными антителами, специфичными к C3c-фрагменту фактора C3 и C3b и не связывающимися с C3a (DAKO, F0201) [8]. Затем клетки отмывали 3 раза PBS и инкубировали в растворе ядерного красителя Hoechst 33342 в PBS (2 мкг/мл) 15 мин при 35°C. Несвязавшийся краситель отмывали 3 раза PBS. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 (Leica, Германия) с использованием объектива ×10, диодного осветителя с длиной волны 488 нм и флуоресцентного фильтра L5 ET (Leica, Германия), оснащенного камерой. С центрального участка каждой лунки получали 16 снимков не перекрывающихся друг друга микроскопических полей площадью 1.4 мм². Анализ снимков проводили с использованием компьютерной программы Cell Profiler. В рамках анализа производилось определение интегральной интенсивности флуоресценции, числа ядер

и C3/C3b-иммунопозитивных частиц площадью 2.2–70 мкм², минимального и максимального диаметра Ферета регистрируемых C3/C3b-иммунопозитивных частиц. Форму иммунопозитивных частиц оценивали по отношению максимального диаметра Ферета к минимальному.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Excel 10 и MedCalc 14.8.1. Каждое значение представляет собой среднее 6 независимых измерений ± стандартное отклонение.

Для проверки выборок на нормальность распределения использовали W-тест Шапиро–Уилка (уровень значимости >0.05).

Достоверность различий уровня опсонизации C3, а также количества ядер в поле зрения после инкубации клеток с плазмой крови здоровых доноров и больных COVID-19 (рис. 1) оценивали согласно t-критерию Стьюдента для независимых выборок, а также однофакторного параметрического дисперсионного анализа ANOVA.

Среднее число (*N*) иммунопозитивных структур заданного диапазона размеров и среднее значение интегральной интенсивности флуоресценции, полученные с 16 независимых случайных снимков, сравнивалось между опытной и контрольной группами при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Достоверность различий формы C3/C3b-иммунопозитивных структур (dF_{max}/dF_{min}) среди частиц одного размера (мкм²) между контролем и опытом (рис. 3) оценивали согласно t-критерию Стьюдента для независимых выборок.

Наличие корреляции между интегральной интенсивностью флуоресценции и числом выявляемых C3/C3b-иммунопозитивных структур проверялась путем расчета коэффициента корреляции Пирсона.

Значения *p* менее 0.05 считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследований была выбрана группа больных возрастом от 32 до 81 года с установленным диагнозом COVID-19, отягощенным вирусной пневмонией и нефрологической патологией разной степени тяжести. Данные о больных представлены в табл. 1. В качестве контроля была использована плазма от 6 здоровых добровольцев в возрасте от 22 до 68 лет.

За основу теста для определения активности компонента нами был взят подход, разработанный Norris с соавторами [9] для анализа активности

системы комплемента в плазме больных атипичным гемолитико-уремическим синдромом (аГУС) с некоторыми изменениями [6]. В экспериментах исследователей активность системы комплемента в плазме крови оценивали по уровню связывания C3/C3b с ЭК микрососудов человека (НМЕС). Вместо культуры иммортализованных клеток НМЕС-1, которые по ряду свойств (скорости роста, чувствительности к плазме) отличаются от нативных эндотелиальных клеток, нами была выбрана первичная культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC. Опсонизацию клеток фактором C3/C3b оценивали двумя способами: по интегральной интенсивности флуоресценции и по количеству C3/C3b-иммунопозитивных частиц в мозаичном кадре.

Предварительно нами был проведен анализ динамики накопления C3/C3b на поверхности клеток HUVEC во время их инкубации с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19 в течение 4 ч. Клетки отмывали от плазмы и фиксировали через 15 мин, 30 мин, 1, 2, 3 и 4 ч после начала инкубации с раствором плазмы. Выявленные различия в опсонизации клеток HUVEC C3/C3b наблюдались уже на 3 ч инкубации и сохранялись без значительных изменений вплоть до 4 ч (данные не представлены). В дальнейшем инкубация клеток с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19 проводилась 4 ч при 37°C.

После инкубации с раствором плазмы в ФСР клетки фиксировали, окрашивали и определяли интегральную интенсивность флуоресценции, как это ранее предлагалось Noris с соавторами [9], и число окрашенных антителами к C3/C3b структур на клетку. Сравнение опсонизации клеток HUVEC фактором комплемента C3/C3b показало, что после инкубации клеток с плазмой больных COVID-19 ($n = 13$) количество C3/C3b-иммунопозитивных структур возрастало в 5.76 ± 2.79 раз ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $p < 0.001$) по сравнению с контрольной плазмой ($n = 6$) (табл. 1, рис. 1). Среднее число частиц на клетку составляло в контроле 0.49 ± 0.06 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n = 6$), при инкубации с плазмой больных 2.4 ± 0.4 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n = 13$, $p < 0.001$). Регистрируемая интегральная интенсивность флуоресцентного сигнала с антител к C3/C3b после инкубации с плазмой больных возрастала в 6.31 ± 3.18 раз ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $p < 0.001$) в сравнении с контрольной плазмой (табл. 1). Сопоставление полученных данных показало практически полную положительную линейную корреляцию между числом C3/C3b-иммунопозитивных структур и интегральной интенсивностью флуоресценции ($r = 0.985$). Из этих данных следует, что рост интегральной интенсивности флуоресценции обусловлен увеличением

количества C3/C3b-иммунопозитивных структур. Подсчет ядер относительно площади сканирования не выявил различий в количестве клеток, инкубированных с плазмой здоровых доноров (254 ± 4.1 ; $\text{mean} \pm \text{SD}$) и плазмой больных COVID-19 (255 ± 2.2 ; $\text{mean} \pm \text{SD}$). Таким образом, можно говорить о том, что наблюдаемая разница в связывании C3/C3b не была обусловлена гибелью клеток (табл. 1, рис. 1).

Разница в опсонизации клеток HUVEC C3/C3b при их инкубации с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19 может отражать более высокий уровень активности системы комплемента у больных. При этом в основе связывания клетками C3/C3b из плазмы больных может лежать сразу несколько механизмов. Следуя рекомендациям, данным Noris с соавторами [9] в описании предлагаемого ими подхода для оценки активности системы комплемента в плазме крови, мы также проводили предварительную активацию эндотелиальных клеток ADP. Эти авторы показали, что предварительная инкубация клеток с ADP вызывает экспонирование на их поверхности P-селектина. P-селектин синтезируется в эндотелиальных клетках, накапливается в специальных гранулах — тельцах Вейбеля—Паладе — и в случае повреждения тканей, развития воспаления и активации эндотелия экспонируется на клеточной поверхности, обеспечивая адгезию лейкоцитов [10]. P-селектин способен связывать C3b, обеспечивая сборку C3-конвертазы альтернативного пути системы комплемента [10, 11]. Можно предположить, что преинкубация клеток HUVEC с ADP также вызывает экспонирование P-селектина на их поверхности, делая их восприимчивыми к C3b. В этом случае разница в связывании C3/C3b обусловлена различиями в концентрации активной формы C3b в плазме здоровых доноров и больных COVID-19. Но также необходимо отметить, что в плазме больных коронавирусной инфекцией содержится целый комплекс факторов, которые могут стимулировать экспонирование P-селектина на поверхности эндотелиальных клеток. Их стимулирующая экспонирование P-селектина активность может быть выше, чем у ADP. В этой роли могут выступать тромбин, гистамин, анафилотоксины и провоспалительные цитокины. Ранее было показано, что тромбин, гистамин, анафилотоксин C5a, провоспалительные цитокины IL-3, IL-4, TNF α могут активировать эндотелиальные клетки, вызывая экспонирование на их поверхности молекул P-селектина [12–17]. В свою очередь, клинические исследования показали рост уровня данных факторов в плазме больных на фоне заболевания COVID-19. Был отмечен рост уровня гистамина, как и других медиаторов воспаления, в плазме

Таблица 1. Связывание C3/C3b клетками HUVEC: влияние плазмы крови больных COVID-19

Пациенты	Возраст	Стационар – 1, ОРИТ – 2	Пневмония, КТ	Среднее число ядер в поле зрения	Среднее число структур C3/C3b на клетку	Средняя интегральная интенсивность флуоресценции, ОЕФ	Связывание C3, % от контроля	
							Количество C3/C3b структур, %	Интегральная интенсивность флуоресценции, %
1	81	2	3	243±9	2.2±0.3	16611±3962	453±71	321±78
2	50	1	1	244±7	4.2±0.3	49244±11623	861±108	953±227
3	60	1	2	252±5	1.1±0.1	14433±3477	229±30	279±68
4	68	2	3	251±6	5±0.3	53588±1660	1016±125	1037±34
5	60	1	2	258±4	2.6±0.1	33336±4126	528±57	645±81
6	61	1	2	253±2	3±0.2	35648±5122	620±74	690±100
7	37	1	3	259±7	4.7±0.3	57797±4216	955±119	1118±84
8	32	1	2	264±1	3.4±0.4	43897±5796	699±108	850±113
9	37	1	3	262±7	2.1±0.1	26279±2472	437±48	509±48
10	75	1	1	251±3	1.2±0.1	12439±1654	251±37	241±32
11	58	1	3	267±7	0.5±0.1	6681±2636	104±13	129±51
12	40	1	2	262±9	3.3±0.2	39562±993	665±83	766±20
13	52	1	1	247±10	3.3±0.2	33493±3001	667±81	648±59
Пациенты, среднее	54	-	-	254±4	2.8±0.4***	32539±16439***	576±279***	631±318***
Контроль								
1	23	-	-	249±4	0.5±0.01	5110±1384	98±10	99±27
2	24	-	-	264±3	0.5±0.02	5373±1871	104±12	104±36
3	19	-	-	262±1	0.36±0.02	4372±248	74±9	85±4
4	69	-	-	259±9	0.65±0.07	6650±1680	132±19	129±32
5	39	-	-	251±3	0.34±0.01	3679±337	69±8	71±7
6	34	-	-	237±6	0.62±0.04	5759±1350	126±15	111±27
Контроль, среднее	34	-	-	255±2	0.49±0.13	5158±1045	100	100

Примечание. ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии. КТ – степень поражения легких, определяемая на основании компьютерной томограммы. ****p* < 0.001.

больных COVID-19 [18]. Есть данные о том, что прием блокатора H2-рецепторов гистамина фоматидина больными COVID-19 сопровождался достоверным снижением риска развития тромботических осложнений и более легким течением данного заболевания [18]. Нами, в свою очередь, показано, что гистамин увеличивает связывание C3/C3b с HUVEC при инкубации их с плазмой здоровых людей [6]. Эти данные свидетельствуют об активной роли гистамина в патогенезе инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Также течение COVID-19 сопровождается активацией системы свертывания крови, продуктом функциональной активности которой является тромбин [19]. У больных COVID-19 отмечается существенный рост эндогенного тромбинового потенциала [20]. Наконец, в процессе исследования роли провоспалительных

цитокинов в патогенезе COVID-19 был отмечен рост уровня IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и TNFα у больных COVID-19 и установлена корреляция между уровнем IL-1β, IL-3, IL-6, IL-8, TNFα и тяжестью заболевания [21–24]. Можно предположить, что перечисленные выше факторы могут усиливать экспонирование P-селектина на поверхности клеток HUVEC, создавая тем самым дополнительные сайты связывания C3b при действии плазмы больных COVID-19 на клетки.

Помимо P-селектина связывание C3/C3b клетками HUVEC может быть опосредовано другими белками. В качестве такого белка может выступать фактор Виллебранда [25]. Этот сложный гликопротеин синтезируется эндотелиальными клетками и, так же как P-селектин, накапливается в тельцах

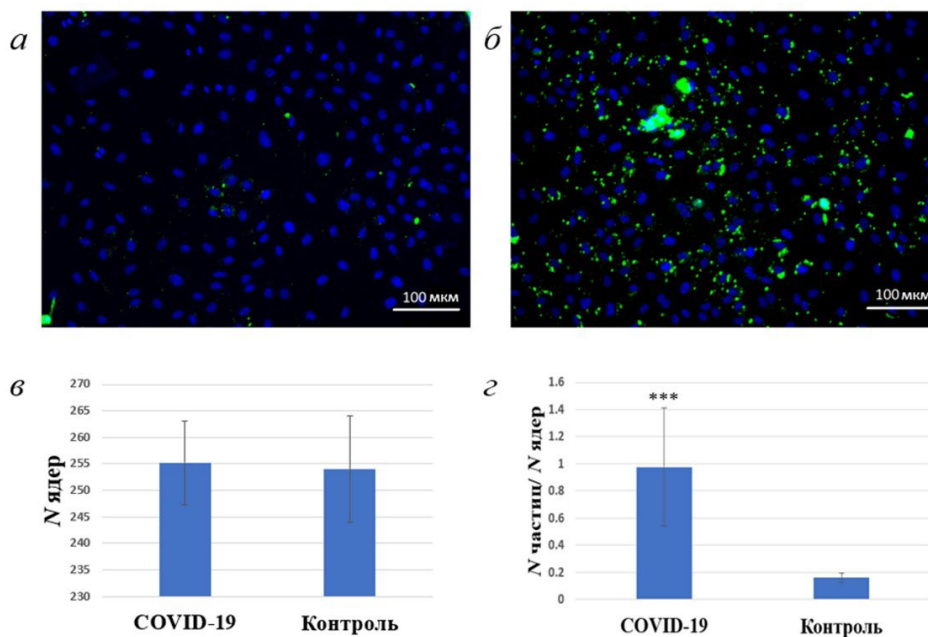


Рис. 1. Связывание С3/С3b клетками HUVEC под воздействием плазмы крови здоровых доноров и больных COVID-19. *a* – Окрашивание клеток антителами к С3/С3b и ядерным красителем Hoechst 33258 после инкубации с плазмой крови здоровых доноров; *б* – окрашивание клеток антителами к С3/С3b и ядерным красителем Hoechst 33258 после инкубации с плазмой крови больных COVID-19; *в* – количество ядер в поле зрения после инкубации клеток с плазмой крови здоровых доноров и больных COVID-19 ($p \geq 0.8$); *г* – среднее количество С3/С3b-иммунопозитивных частиц на ядро в культуре клеток HUVEC после инкубации с плазмой крови здоровых доноров и больных COVID-19 (***) ($p < 0.001$).

Вейбеля–Паладе. В процессе секреции фактор Виллебранда подобно Р-селектину экспонируется на поверхности ЭК. Перед поступлением в кровеносное русло он подвергается расщеплению специальным ферментом – металлопротеиназой ADAMTS13 на мультимеры различной молекулярной массы. Фактор Виллебранда выполняет две важные функции в системе гемостаза. Он обеспечивает связывание тромбоцитов в месте повреждения сосуда и формирование тромбоцитарного тромба, а также является носителем фактора VIII, защищая его от инактивации. Фактор Виллебранда взаимодействует с С3b через три своих домена типа А (А1, А2, А3) и инициирует активацию альтернативного пути системы комплемента, однако сборка активной С5-конвертазы и образование МАК происходят только на домене А2 [25]. Приводимые в литературе данные говорят о повышенной секреции клетками эндотелия фактора Виллебранда при COVID-19 [26]. Поскольку фактор Виллебранда имеет с Р-селектином общие гранулы депонирования – тельца Вейбеля–Паладе, его секреция может запускаться теми же факторами. Показано, что тромбин, гистамин, анафилотоксин С5а и IL-6 стимулируют секрецию фактора Виллебранда [27–30]. При этом важно отметить, что активаторы ЭК стимулируют

экспонирование Р-селектин и секрецию фактора Виллебранда с разной эффективностью. В частности, это связано со способностью дифференциально запускать экзоцитоз разных популяций телец Вейбеля–Паладе. Так, гистамин, в отличие от тромбина, активирует экзоцитоз телец Вейбеля–Паладе, содержащих Р-селектин и фактор Виллебранда, одновременно запуская перемещение субпопуляции телец Вейбеля–Паладе, не содержащих Р-селектин, в центр организации микротрубочек [31]. В свою очередь, стабилизация связавшегося с Р-селектином и фактором Виллебранда С3b, источником которого, по всей видимости, является плазма, и локальная активация альтернативного пути системы комплемента приводят к образованию и накоплению нового С3b, амплификации сигнала и увеличению регистрируемых различий.

Наконец, С3b способен образовывать стабильные комплексы с другими компонентами плазматических мембран, в том числе с зимозаном [32]. Данные комплексы, по-видимому, являются результатом гидрофобного взаимодействия и ковалентного связывания [32].

Таким образом, наблюдаемые нами отличия в связывании С3b клетками HUVEC при их инкубации с плазмой здоровых доноров и больных

COVID-19 могут быть обусловлены как различиями в его концентрации, так и воздействием на клетки HUVEC целого комплекса активных биологических веществ, присутствующих в высоких концентрациях в плазме крови больных.

Также нами были проанализированы размеры и форма C3/C3b-иммунопозитивных частиц, выявляемых после инкубации клеток с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19. Выявляемые при анализе иммунопозитивные частицы имели разный размер. Площадь частиц варьировала от 2.2 до 72.5 мкм². Все частицы были распределены на группы согласно их площади. Видно, что количество частиц малого размера значительно превышало число крупных частиц. После инкубации HUVEC с плазмой больных количество иммунопозитивных частиц выше для всех представленных размеров (рис. 2), однако различия в группах, включающих небольшие частицы площадью 2.2–11 мкм², были менее выражены в сравнении с группами больших размеров. Для объяснения этого можно предположить, что гиперактивация системы комплемента в плазме больных COVID-19 приводит к локальной генерации C3b на мембране, следствием чего является образование на поверхности клеток более крупных иммунопозитивных частиц.

Для оценки формы нами было использовано отношение максимального диаметра Ферета к минимальному, или, иными словами, отношение условной длины к условной ширине объекта, имеющего неправильную форму. Было установлено, что иммунопозитивные частицы разного размера, регистрируемые в культуре клеток после инкубации с плазмой больных и здоровых, различались по форме (рис. 3). Иммунопозитивные частицы площадью 2.2–11 мкм², образующиеся на поверхности HUVEC после инкубации с плазмой

больных COVID-19, имели более вытянутую форму в сравнении с контролем.

Причины выявленной нами гетерогенности C3/C3b-иммунопозитивных структур остаются невыясненными. Можно предположить, что выявленные различия в форме малых частиц обусловлены влиянием плазмы больных на экспонирование дополнительных участков связывания C3/C3b и разной локальной активностью системы комплемента. Так, как уже отмечалось выше, в плазме больных COVID-19 повышена концентрация веществ, стимулирующих секрецию фактора Виллебранда. Фактор Виллебранда представляет собой набор мультимеров разной длины, которая определяет их емкость связывания C3b. При этом мультимеры фактора Виллебранда в сравнении с P-селектином способны связать больше молекул C3b и создать больше сайтов активации альтернативного пути комплемента. При связывании C3b с гипермультимерами фактора Виллебранда возможно формирование иммунопозитивных частиц вытянутой формы. Помимо присоединения к нормальным клеткам, C3b может связываться с апоптотическими и некротическими клетками и их фрагментами, что необходимо для ускорения их фагоцитоза [33]. Как уже было отмечено, мы не выявили различий в плотности ядер в культурах клеток, подвергшихся воздействию плазмы здоровых доноров и больных COVID-19. Косвенно это говорит о том, что плазма больных не привела к значимому снижению жизнеспособности клеток и их гибели. С другой стороны, нельзя исключить, что данный процесс мог быть запущен, но не успел вступить в активную фазу в отведенный нами на инкубацию период времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы установили, что клетки HUVEC способны связывать C3/C3b при взаимодействии с плазмой

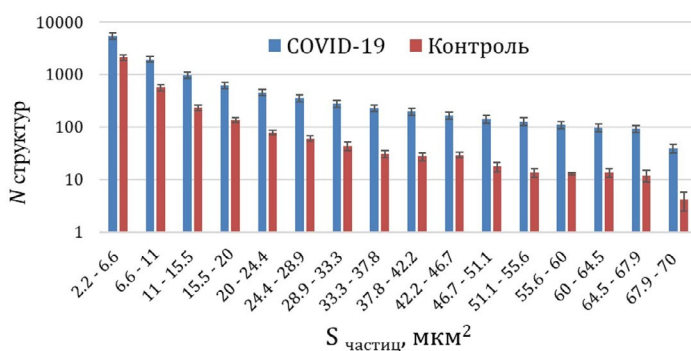


Рис. 2. Распределение C3/C3b-иммунопозитивных структур по количеству и площади в культуре клеток HUVEC после инкубации с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19. N – среднее число иммунопозитивных структур за данного диапазона размеров в сканируемом поле зрения, полученное с 12 независимых случайных кадров ($p \leq 0.001$).

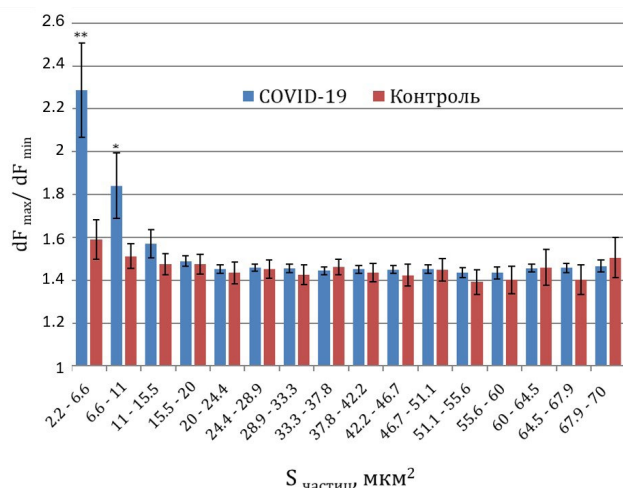


Рис. 3. Различия в форме С3/С3b-иммунопозитивных структур, регистрируемых после инкубации клеток HUVEC с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19. dF_{\max} – максимальный диаметр Ферета объекта, dF_{\min} – минимальный диаметр Ферета объекта. Форму оценивали по отношению dF_{\max}/dF_{\min} . Чем выше это соотношение, тем более вытянутую форму имеют частицы. Иммунопозитивные частицы площадью 2.2–10.9 мкм² после инкубации с плазмой больных COVID-19 имели более вытянутую форму в сравнении с контролем (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

крови человека. Количество связавшегося С3/С3b с мембраной клеток при их контакте с плазмой крови больных COVID-19 была в несколько раз выше, чем при контакте с плазмой здоровых доноров. Полученные нами данные говорят о том, что связывание С3/С3b на поверхности клеток HUVEC может отражать уровень активности системы комплемента в плазме. Мы предполагаем, что этот подход может найти свое применение как способ комплексной оценки активности комплемента и его повреждающего воздействия на эндотелий при COVID-19 и других вирусных заболеваниях, сопровождаемых гиперактивацией комплемента и развитием тромботических микроангиопатий.

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

Источники финансирования. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21–15–00441).

Соответствие принципам этики. Выполненные исследования соответствуют этическим принципам Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям и этическим правилам клинических исследований, принятых в Российской Федерации. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное письменное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cugno M., Meroni P.L., Gualtierotti R., Griffini S., Grovetti E., Torri A., Lonati P., Grossi C., Borghi M.O., Novembrino C., Boscolo M., Uceda Renteria S.C., Valenti L., Lamorte G., Manunta M., Prati D., Pesenti A., Blasi F., Costantino G., Gori A., Bandera A., Tedesco F., Peyvandi F. 2021. Complement activation and endothelial perturbation parallel COVID-19 severity and activity. *J. Autoimmun.* **116**, 102560. doi 10.1016/j.jaut.2020.102560
- Noris M., Benigni A., Remuzzi G. 2020. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney Int.* **98**, 314–322. doi 10.1016/j.kint.2020.05.013
- Cugno M., Gualtierotti R., Possenti I., Testa S., Tel F., Griffini S., Grovetti E., Tedeschi S., Salardi S., Cresseri D., Messa P., Ardisino G. 2014. Complement functional tests for monitoring eculizumab treatment in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 1440–1448. doi 10.1111/jth.12615
- Zelek W.M., Harrison R.A. 2023. Complement and COVID-19: Three years on, what we know, what we don't know, and what we ought to know. *Immunobiology.* **228**, 152393. doi 10.1016/j.imbio.2023.152393
- Afzali B., Noris M., Lambrecht B.N., Kemper C. 2022. The state of complement in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 77–84. doi 10.1038/s41577-021-00665-1
- Avdonin P.P., Markitantova Yu. V., Rybakova E.Yu., Goncharov N.V., Avdonin P.V. 2023. Activation of complement factor C3/ C3b deposition on the endothelial cell surface by histamine as one of the causes of endothelium damage in COVID-19. *Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **17** (Suppl.1), S51–S58. doi 10.1134/S1990747823070012
- Goncharov N.V., Sakharov I., Danilov S.M., Sakan-delidze O.G. 1987. [Use of collagenase from the hepatopancreas of the Kamchatka crab for isolating and culturing endothelial cells of the large vessels in man]. *Bull. Eksp. Biol. Med.* **104**, 376–378.
- Galbusera M., Noris M., Gastoldi S., Bresin E., Mele C., Breno M., Cuccarolo P., Alberti M., Valoti E., Piras R., Donadelli R., Vivarelli M., Murer L., Pecoraro C., Ferrari E., Perna A., Benigni A., Portalupi V., Remuzzi G. 2019. An *ex vivo* test of complement activation on endothelium for individualized eculizumab therapy in hemolytic uremic syndrome. *Am.J. Kidney Dis.* **74**, 56–72. doi 10.1053/j.ajkd.2018.11.012
- Noris M., Galbusera M., Gastoldi S., Macor P., Banterla F., Bresin E., Tripodo C., Bettoni S., Donadelli R., Valoti E., Tedesco F., Amore A., Coppo R., Ruggenti P., Gotti E., Remuzzi G. 2014. Dynamics of complement activation in aHUS and how to

- monitor eculizumab therapy. *Blood*. **124**, 1715–1726. doi 10.1182/blood-2014-02-558296
10. Naß J., Terplane J., Gerke V. 2021. Weibel palade bodies: Unique secretory organelles of endothelial cells that control blood vessel homeostasis. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 813995. doi 10.3389/fcell.2021.813995
 11. Del Conde I., Cruz M.A., Zhang H., Lopez J.A., Afshar-Kharghan V. 2005. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J. Exp. Med.* **201**, 871–879. doi 10.1084/jem.20041497
 12. Cleator J.H., Zhu W.Q., Vaughan D.E., Hamm H.E. 2006. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood*. **107**, 2736–2744. doi 10.1182/blood-2004-07-2698
 13. Whiss P.A., Andersson R.G., Srinivas U. 1998. Kinetics of platelet P-selectin mobilization: Concurrent surface expression and release induced by thrombin or PMA, and inhibition by the NO donor SNAP. *Cell Adhes. Commun.* **6**, 289–300. doi 10.3109/15419069809010788
 14. Burns A.R., Bowden R.A., Abe Y., Walker D.C., Simon S.I., Entman M.L., Smith C.W. 1999. P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 299–306. doi 10.1002/jlb.65.3.299
 15. Repka-Ramirez M.S. 2003. New concepts of histamine receptors and actions. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**, 227–231. doi 10.1007/s11882-003-0044-3
 16. Foreman K.E., Vaporciyan A.A., Bonish B.K., Jones M.L., Johnson K.J., Glovsky M.M., Eddy S.M., Ward P.A. 1994. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **94**, 1147–1155. doi 10.1172/JCI117430
 17. Khew-Goodall Y., Butcher C.M., Litwin M.S., Newlands S., Korpelainen E.I., Noack L.M., Berndt M.C., Lopez A.F., Gamble J.R., Vadas M.A. 1996. Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood*. **87**, 1432–1438.
 18. Conti P., Caraffa A., Tete G., Gallenga C.E., Ross R., Kritas S.K., Frydas I., Younes A., Di Emidio P., Ronconi G. 2020. Mast cells activated by SARS-CoV-2 release histamine which increases IL-1 levels causing cytokine storm and inflammatory reaction in COVID-19. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* **34**, 1629–1632. doi 10.23812/20-2EDIT
 19. Conway E.M., Mackman N., Warren R.Q., Wolberg A.S., Mosnier L.O., Campbell R.A., Gralinski L.E., Rondina M.T., van de Veerdonk F.L., Hoffmeister K.M., Griffin J.H., Nugent D., Moon K., Morrissey J.H. 2022. Understanding COVID-19-associated coagulopathy. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 639–649. doi 10.1038/s41577-022-00762-9
 20. Campello E., Bulato C., Spiezia L., Boscolo A., Polletto F., Cola M., Gavasso S., Simion C., Radu C.M., Cattelan A., Tiberio I., Vettor R., Navalesi P., Simioni P. 2021. Thrombin generation in patients with COVID-19 with and without thromboprophylaxis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **59**, 1323–1330. doi 10.1515/cclm-2021-0108
 21. Chang Y., Bai M., You Q. 2022. Associations between serum interleukins (IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10) and disease severity of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Biomed. Res. Int.* **2022**, 2755246. doi 10.1155/2022/2755246
 22. Benard A., Jacobsen A., Brunner M., Krautz C., Klosch B., Swierzy I., Naschberger E., Podolska M.J., Kouhestani D., David P., Birkholz T., Castellanos I., Trufa D., Sirbu H., Vetter M., Kremer A.E., Hildner K., Hecker A., Edinger F., Tenbusch M., Muhl-Zurbes P., Steinkasserer A., Richter E., Streeck H., Berger M.M., Brenner T., Weigand M.A., Swirski F.K., Schett G., Grutzmann R., Weber G.F. 2021. Interleukin-3 is a predictive marker for severity and outcome during SARS-CoV-2 infections. *Nat. Commun.* **12**, 1112. doi 10.1038/s41467-021-21310-4
 23. Del Valle D.M., Kim-Schulze S., Huang H.H., Beckmann N.D., Nirenberg S., Wang B., Lavin Y., Swartz T.H., Madduri D., Stock A., Marron T.U., Xie H., Patel M., Tuballes K., Van Oekelen O., Rahman A., Kovatch P., Aberg J.A., Schadt E., Jagannath S., Mazumdar M., Charney A.W., Firpo-Betancourt A., Mendu D.R., Jhang J., Reich D., Sigel K., Cordon-Cardo C., Feldmann M., Parekh S., Merad M., Gnjjatic S. 2020. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat. Med.* **26**, 1636–1643. doi 10.1038/s41591-020-1051-9
 24. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. **395**, 497–506. doi 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
 25. Bettoni S., Galbusera M., Gastoldi S., Donadelli R., Tentori C., Sparta G., Bresin E., Mele C., Alberti M., Tortajada A., Yebenes H., Remuzzi G., Noris M. 2017. Interaction between Multimeric von Willebrand Factor and Complement: A fresh look to the pathophysiology of microvascular thrombosis. *J. Immunol.* **199**, 1021–1040. doi 10.4049/jimmunol.1601121
 26. Favalaro E.J., Henry B.M., Lippi G. 2021. Increased VWF and decreased ADAMTS-13 in COVID-19: Creating a milieu for (micro)thrombosis. *Semin.*

- Thromb. Hemost.* **47**, 400–418.
doi 10.1055/s-0041–1727282
27. McConnell M.J., Kawaguchi N., Kondo R., Sonzogni A., Licini L., Valle C., Bonaffini P.A., Sironi S., Alessio M.G., Previtali G., Seghezzi M., Zhang X., Lee A., Pine A.B., Chun H.J., Zhang X., Fernandez-Hernando C., Qing H., Wang A., Price C., Sun Z., Utsumi T., Hwa J., Strazzabosco M., Iwakiri Y. 2021. Liver injury in COVID-19 and IL-6 trans-signaling-induced endotheliopathy. *J. Hepatol.* **75**, 647–658
doi 10.1016/j.jhep.2021.04.050
28. Bernardo A., Ball C., Nolasco L., Moake J.F., Dong J.F. 2004. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood.* **104**, 100–106.
doi 10.1182/blood-2004–01–0107 2004–01–0107
29. Wagner D.D. 1990. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 217–246.
doi 10.1146/annurev.cb.06.110190.001245
30. Aiello S., Gastoldi S., Galbusera M., Ruggenti P., Portalupi V., Rota S., Rubis N., Liguori L., Conti S., Tironi M., Gamba S., Santarsiero D., Benigni A., Remuzzi G., Noris M. 2022. C5a and C5aR1 are key drivers of microvascular platelet aggregation in clinical entities spanning from aHUS to COVID-19. *Blood Adv.* **6**, 866–881.
doi 10.1182/bloodadvances.2021005246
31. Miteva K.T., Pedicini L., Wilson L.A., Jayasinghe I., Slip R.G., Marszalek K., Gaunt H.J., Bartoli F., Deivasigamani S., Sobradillo D., Beech D.J., McKeown L. 2019. Rab46 integrates Ca²⁺ and histamine signaling to regulate selective cargo release from Weibel-Palade bodies. *J. Cell Biol.* **218**, 2232–2246.
doi 10.1083/jcb.201810118
32. Law S.K., Levine R.P. 1977. Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 2701–2705.
doi 10.1073/pnas.74.7.2701
33. Martin M., Blom A.M. 2016. Complement in removal of the dead – balancing inflammation. *Immunol. Rev.* **274**, 218–232.
doi 10.1111/imr.12462

A New Approach to Analyze the State of the Complement System in Patients with COVID-19. Pilot Study

© 2024 г. P. P. Avdonin^{1, *}, L. A. Komleva¹, M. S. Blinova¹, E. S. Ivanova², O. N. Kotenko², N. F. Frolova², E. S. Stolyarevich², E. Y. Rybakova¹, P. V. Avdonin¹

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

² Moscow City Clinical Hospital 52, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: ppavdonin@gmail.com

One of the risk factors for infection caused by SARS-CoV-2 is hyperactivation of the complement system, which can lead to activation and damage to the endothelium, thrombosis and, in some severe cases, the development of multiple organ failure. Using quantitative immunohistochemistry, we studied the opsonization of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by complement factors C3/C3b when exposed to blood plasma from patients with a confirmed diagnosis of COVID-19 in order to evaluate the possibility of using this approach to study the state of the complement system in COVID-19 ex vivo. For these purposes, FITC-labeled antibodies specific to the C3c domain of factors C3/C3b were used. The integral intensity of the recorded fluorescence and the number of C3/C3b-immunopositive structures were chosen as parameters for assessing the binding of C3/C3b to cells. We have shown that when HUVEC are incubated with plasma from patients, the total number of C3/C3b-immunopositive structures recorded on the membrane of these cells is 5.8 ± 2.8 times (mean \pm SD, $p < 0.001$) higher than when exposed to plasma from healthy people. In this case, the integrated fluorescence intensity increased by 6.3 ± 3.2 times (mean \pm SD, $p \leq 0.0001$) compared to the control. The area of immunopositive structures recorded after exposure to plasma cells from healthy donors and patients with COVID-19 and selected for analysis ranged from 2.2 to 70 μm^2 . Immunopositive particles with an area of 2.2–10.9 μm^2 after incubation with plasma of COVID-19 patients had a more elongated shape compared to controls. The average number of particles per cell was 0.49 ± 0.06 (mean \pm SD, $n = 6$) in the control, and 2.4 ± 0.4 (mean \pm SD, $n = 13$, $p < 0.001$) during incubation with patient plasma. Analysis of particle area distribution showed that the most pronounced differences in the number of C3/C3b-immunopositive structures compared to the control were observed among large particles. Thus, we showed an increase in the level of opsonization of endothelial cells by complement factors C3/C3b in the presence of plasma from COVID-19 patients in comparison with control plasma. The increase is due to an increase in the number of C3/C3b-immunopositive structures, mostly large ones. We assume that the proposed approach will allow us to study the role of the complement system in damage to vascular endothelial cells in patients with COVID-19 using an ex vivo model, as well as to evaluate the level of complement activation in the plasma of patients and the effectiveness of their treatment.

Keywords: complement system, endothelial cells, COVID-19, factor C3, membrane attack complex

УДК 577.1

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ He-Ne-ЛАЗЕРА НА СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ И СТЕРИНОВ В ТКАНЯХ КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ *Triticum aestivum* L.

© 2024 г. Л. В. Дударева^а, Е. Г. Рудиковская^а, *, Н. В. Семенова^а, А. В. Рудиковский^а,
В. Н. Шмаков^а

^а Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: rudal69@mail.ru

Поступила в редакцию 19.09.2023

После доработки 20.10.2023

Принята к печати 08.11.2023

Методами хроматомасс-спектрометрии и тонкослойной хроматографии изучено влияние облучения светом He-Ne-лазера на состав и содержание компонентов клеточных мембран в каллусных тканях пшеницы: фосфолипидов (ФЛ) и стеринов. Показано, что облучение каллусов светом лазера в дозе 3.6 Дж/см² приводило к значительным изменениям в содержании этих компонентов. Так, содержание фосфатидилинозита увеличилось в облученных каллусах в 8 раз, фосфатидилэтоноламина в 2 раза, содержание фосфатидной кислоты снизилось на 20% от суммы ФЛ. Для стеринов установлено, что наиболее существенные изменения облучение вызвало в содержании доминирующего в растениях β -ситостерина (увеличение с 1453 ± 170 мкг/г сухого веса в необлученном контроле до 2001 ± 111 мкг/г сухого веса через час после воздействия) и за счет этого в суммарном содержании стеринов. Анализ полученных результатов позволяет предположить, что ФЛ и стерины, в первую очередь те, для которых известны регуляторные и сигнальные функции, участвуют в реакции растительной ткани на воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением He-Ne-лазера. Это участие реализуется как стрессовый (неспецифический) ответ на интенсивное излучение.

Ключевые слова: фосфолипиды, стерины, He-Ne-лазер, культура ткани, *Triticum aestivum* L.

DOI: 10.31857/S0233475524020064 , **EDN:** хррхпу

ВВЕДЕНИЕ

Свет является одним из важнейших факторов окружающей среды, определяющих рост, развитие и метаболизм растений как в целом растении, так и в культуре растительной ткани [1–7]. Наличие или отсутствие света, его количество и качество, а также периодичность освещения является одним из важнейших факторов, определяющих метаболизм культуры растительной ткани на всех стадиях ее развития. Поэтому изучение влияния такого источника света, как низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) на растения, интересно как с практической, так и с теоретической точек зрения. Важными направлениями таких исследований являются количественная оценка эффективности воздействия НИЛИ на процессы каллусогенеза, морфогенеза и последующей регенерации растения, а также изучение качественных и количественных биохимических изменений

в культивируемой ткани, вызванных облучением. В отличие от естественного (рассеянного) света и излучения светодиодных ламп, широко используемых в агрокультуре, свет лазера является когерентным, монохроматическим, поляризованным и узконаправленным. Хотя механизмы влияния НИЛИ на растения все еще остаются предметом дискуссии, оно достаточно широко используется (в настоящее время, наряду со светодиодными лампами) для стимуляции процессов роста и развития в растительной ткани *in vivo* и *in vitro*. При этом наличие положительного (при определенных условиях) действия НИЛИ на растения, в том числе на семена, считается доказанным [6–13]. Однако роль физических характеристик излучения, а также ключевые соединения, участвующие в реализации действия света лазера, по-прежнему изучены недостаточно. Литературные данные и результаты наших собственных исследований показывают, что воздействие низкоинтенсивного

лазерного излучения на растения и на культуру растительной ткани вызывает в ряде случаев реакцию, аналогичную стрессовой, особенно на ранней стадии ответа на облучение. Нами было продемонстрировано усиление процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в облученных каллусах пшеницы [14], разнонаправленное влияние света He-Ne-лазера на активность двух гидролитических ферментов H^+ -АТФ-азы и пиродифосфатазы [15], на содержание и структуру липидных компонентов в клетках каллусов пшеницы [16, 17], на состав и содержание фотопротекторных соединений в листьях *A. thaliana* [18]. Для более глубокого понимания путей действия НИЛИ He-Ne-лазера и подтверждения стрессовой природы ответа растительной ткани на облучение необходим анализ изменений в составе и содержании ключевых соединений, для которых показано участие в стрессовых реакциях растительного организма. Такие изменения происходят, среди прочего, в составе и содержании липидных соединений. Известно, что липиды – главные структурные компоненты мембран и участники многих сигнальных каскадов у растений [19]. Липиды мембран являются частью “интерфейса” взаимодействия между клеткой и внешней средой и служат субстратами для генерации множества сигнальных липидов: фосфатидной кислоты (ФК), фосфатидилинозитов, сфинголипидов, лизофосфолипидов, оксипинов, N-ацилэтанолламинов, свободных жирных кислот (ЖК) и некоторых других [19, 20]. Общеизвестно, что суть многих неспецифических реакций организма на воздействие стрессоров в значительной степени сводится к тем изменениям, которые обнаруживаются в мембранных структурах, в том числе в их липидной составляющей [19, 21–23]. По состоянию мембран (увеличение их проницаемости, повышение активности процессов перекисного окисления липидов, изменение индекса ненасыщенности ЖК, качественные и количественные изменения в составе липидов и их производных) можно, в определенной степени, диагностировать состояние растения, находящегося под давлением неблагоприятных факторов. Поэтому логично предположить, что комплексный анализ динамики изменения содержания мембранных липидов при действии света лазера может внести ясность в понимание механизмов его влияния и, возможно, дать новые доказательства стрессового характера реакции растений на облучение НИЛИ. Три основных типа мембранных липидов – это фосфолипиды (ФЛ), гликолипиды и стеринны [24, 25]. Биосинтез и метаболизм сигнальных молекул регулируются, среди прочего, внешними условиями и быстро активируются при абиотическом стрессе. ФЛ

занимают среди активных участников сигнальных сетей липидной природы особое место. Абиотические воздействия, такие как низкая или высокая температура, интенсивное освещение или дефицит воды, запускают фосфолипид-зависимую передачу сигналов, которые контролируют экспрессию генов кластеров и включают адаптационные процессы [26–30]. Другими словами, ФЛ являются важными участниками быстрого ответа растений на изменения условий среды [19, 31, 32]. Логично предположить, что и сильный свет, в частности НИЛИ, также активирует связанные с липидами сигнальные сети. Избыточное освещение индуцирует стресс в растительных тканях [26, 33–35]. Поэтому поглощение квантов света He-Ne-лазера при облучении может инициировать не только уже показанные ранее реакции растительной ткани (усиление ПОЛ, изменения в конформации мембранных белков и т.д.), но также и изменения в составе и содержании фосфолипидов.

Вторым важным классом мембранных липидов, задействованным во многих клеточных процессах и обеспечивающим стабильность мембран растительной клетки, являются стеринны [36, 37]. Так, например, стеринны играют важную роль в регуляции текучести мембраны и ее проницаемости, β -ситостерин и кампестерин являются наиболее эффективными соединениями для ограничения подвижности фосфолипидных жирных ацильных цепей. Кроме того, β -ситостерин и кампестерин, в отличие от стигмастерина, снижают проницаемость мембран [37]. Изменения в составе стериннов являются частью реакции растительных клеток на большинство воздействий внешней среды. Поэтому можно думать, что интенсивный свет НИЛИ He-Ne-лазера способен оказывать влияние на состав и содержание стериннов в тканях каллусов пшеницы. Поскольку гликолипидов, являющихся основными липидами фотосинтетических мембран [26], в тканях каллусов, культивируемых в темноте, содержится незначительное количество, то реакцию на облучение этого типа липидов в представляемой работе не рассматривали.

Итак, на основании литературных и собственных данных целевыми липидами для анализа влияния НИЛИ на липидный обмен в каллусной культуре ткани пшеницы *T. aestivum* были выбраны основные компоненты клеточных мембран – первой линии защиты клеток и от стрессующих воздействий: фосфолипиды и стеринны. Каллусы пшеницы нами были использованы в качестве объекта исследования в комплексной работе по изучению влияния низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) He-Ne-лазера на растительные ткани. Представляемая работа

является частью этих исследований [6, 7, 12–15]. Мы предположили, что подробный анализ влияния НИЛИ He-Ne-лазера на состав и содержание этих, наиболее значимых в отношении реакции на различные стрессоры, липидных компонентов в тканях каллусов пшеницы может дать важную информацию об участии липидов в ответе растительных тканей в культуре *in vitro* на облучение лазерным светом. Проведенный анализ позволяет рассматривать изменения в составе и содержании липидов как один из возможных путей действия НИЛИ на растительные ткани в культуре *in vitro*. С практической точки зрения такая информация может быть полезной для оптимизации условий культивирования растений при выборе условий освещения (интенсивности, длины волны и периодичности), обеспечивающих получение растений с полезными признаками.

Поэтому целью настоящей работы был анализ влияния НИЛИ He-Ne-лазера в стимулирующей морфогенетические процессы дозе (3.6 Дж/см²) на состав и содержание фосфолипидов и стероидов в тканях каллусов пшеницы *T. aestivum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракция липидов. Для экстракции липидов использовали модифицированный метод [38]. навеску растительного материала (0.2 г) фиксировали в жидком азоте, добавляли 0.001% ионола и растирали до получения гомогенной массы. Затем добавляли 10 мл смеси хлороформ: метанол (1:2 по объему), тщательно перемешивали и оставляли на 30 мин до полной диффузии липидов в растворитель. Раствор переносили количественно в делительную воронку через фильтр, трижды промывая ступку и фильтр той же смесью растворителей. Для лучшего расслаивания водной и органической фаз добавляли воду. Для анализа суммарных липидов и липидов отдельных групп отделяли нижнюю хлороформную фракцию. Хлороформ (ос.ч., стабилизированный 0.005% амилена) из липидного экстракта удаляли под вакуумом с помощью ротационного испарителя RVO-64 (Микротехна, Чехия). Для контроля экстрагируемости липидов использовали не содержащуюся в образце нонадекановую кислоту (C19:0), добавляя ее известное количество на этапе гомогенизации (выход оценивали в % от добавленного).

Фосфолипиды. Для обнаружения и идентификации ФЛ в растительном материале использовали специфические реагенты: для фосфорсодержащих компонентов молибденовый синий [39], для липидов, содержащих аминогруппу, – 0.2% раствор нингидрина в ацетоне [40], пластинки проявляли над

водяным паром кипящей водяной бани. ФЛ количественно определяли с помощью аналитической тонкослойной хроматографии по неорганическому фосфору методом Васьковского [39]. Для этого на ТСХ-пластинку (Sorbfil ПТСХ-АФ-В, Россия) наносили экстракт липидов. Для разделения липидов использовали двумерную систему: первое направление – хлороформ–метанол–28% NH₄OH–бензол (65:30:10:5), второе направление – хлороформ–метанол–ацетон–уксусная кислота–вода–бензол (70:30:5:4:1:10). После разделения смеси липидов, ФЛ обнаруживали обработкой 10% серной кислотой в этаноле с последующим нагреванием пластинки до проявления пятен. Силикагель из зон, содержащих разделенные ФЛ, переносили микрошпателем в жаростойкие пробирки, добавляли в каждую 0.05 мл 72% хлорной кислоты. Для холостых проб отбирали силикагель, взятый с чистого участка нижней части хроматограммы, площадью, равной средней величине площади хроматографической зоны. Сжигание проводили на песчаной бани при 180–200°C в течение 20 мин. После охлаждения в пробирки вносили по 0.45 мл рабочего реагента, для получения которого к 5.5 мл исходного молибдатного реагента добавляли 26 мл 1N серной кислоты и доводили объем до 100 мл дистиллированной водой. Исходный молибдатный реагент готовили следующим образом: к 10 г молибдата натрия добавляли 60 мл 4N HCl, 0.4 г гидразина солянокислого добавляли к 14 мл 4N HCl, два реактива соединяли и нагревали 20 мин на кипящей водяной бани, затем добавляли к холодному раствору 14 мл концентрированной серной кислоты и доводили объем до 100 мл дистиллированной водой (реактив хранился в посуде из темного стекла при комнатной температуре). Смесь в пробирке тщательно перемешивали с помощью шейкера. Пробирки помещали на кипящую водяную баню на 15 мин, охлаждали, силикагель удаляли центрифугированием (10 мин при 700 g). Количество фосфора в ФЛ определяли по калибровочной кривой, используя для ее построения аликвотные части стандартного раствора фосфата (Na₂HPO₄), содержащего от 0.1 до 0.5 мкг фосфора, путем измерения величины оптической плотности при 815 нм (спектрофотометр УФ-ВИД – Specord S100, Analytic Jena, Германия). Для перерасчета использовали коэффициенты, которые представляют собой отношение молекулярной массы каждого ФЛ к атомной массе фосфора. В данном исследовании использовали пересчет фосфора в ФЛ путем умножения на средний коэффициент 25. Результаты представлены в мг ФЛ / г сухого веса образца.

Выделение стеринных компонентов. Обнаружение и выделение стеринных осуществляли с помощью метода тонкослойной хроматографии (ТСХ). Фракцию, содержащую суммарные липиды, повторно растворяли в 200 мкл хлороформа и наносили тонкой полосой на высокоэффективную пластинку Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия) (сорбент силикагель СТХ-1ВЭ, зернение 8–12 мкм, толщина слоя 80–100 мкм), операцию нанесения пробы повторяли дважды. Пластину помещали в хроматографическую камеру и осуществляли хроматографирование элюентом следующего состава: гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (80:20:1 v/v/v). По окончании хроматографирования (когда элюент доходил до края пластины) пластину вынимали из камеры и высушивали. Для обнаружения стеринных компонентов край пластины (0.5 см) обрабатывали 10% раствором серной кислоты в этаноле, а затем нагревали до 110°C. Зоны обнаружения стеринных компонентов проявлялись на пластинке розово-голубыми пятнами. Рассчитанные значения R_f для свободных стеринных ($R_f = 0.19$) совпадали со значениями R_f для стандартных образцов (холестерин, стигмастерин, кампестерин (Sigma, США), β -ситостерин (European pharmacopoeia reference standard, Франция)) и с табличными значениями. После хроматографирования с высушенной необработанной пластины шпателем удаляли сорбент в зонах обнаружения стеринных компонентов. Сорбент с хроматографической пластины количественно переносили в центрифужные пробирки (10 мл) и добавляли в них по 1.5 мл хлороформа. Извлечение стеринных компонентов с адсорбента в среду хлороформа осуществляли с помощью облучения ультразвуком (с частотой 35 кГц и мощностью 80 Вт, 15 мин), используя ультразвуковую ванну (Bandelin Sonorex, Германия). Суспензию адсорбента в хлороформе центрифугировали (5 мин) при 3000 об/мин (центрифуга ЦЛК-1, Россия). После центрифугирования надосадочный раствор переносили в стеклянные флаконы (2 мл). Из полученных растворов упаривали (досуша) хлороформ в инертной атмосфере (в токе азота) во избежание окисления выделяемых субстанций. Для полноты выделения стеринных компонентов к сорбенту, оставшемуся в пробирке, добавляли 1.5 мл этилацетата и повторяли экстракцию с использованием ультразвукового воздействия дважды. К полученным стеринам в качестве внутреннего стандарта добавляли эргостерин (20 мкг) (Sigma, США) – соединение, не встречающееся в объектах исследования. Для получения необходимых для анализа методом ГХ–МС (газовой хроматографии–масс-спектрометрии) летучих производных стерина подвергали

модификации – силилированию путем обработки N, O-бис-(триметилсилил)трифторацетамидом с триметилхлорсиланом (200 мкл) (Fluka, США). Силилирование проводили в сушильном шкафу (Binder, Германия) в течение 30 мин при 70°C. Полученные триметилсилил – производные целевых компонентов анализировали с помощью метода ГХ–МС.

ГХ–МС-анализ стеринных. Анализ проводили с помощью хроматомасс-спектрометра Triple Quad, Agilent Technologies (США), в состав которого входят: 1) газовый хроматограф 7890А (колонка HP-5MS, 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм со стационарной фазой метилполисилоксан) и 2) масс-селективный детектор 7000 QQQ с трехквadrupольным масс-анализатором (в режиме квадруполь). Температурная программа хроматографирования: при 70°C – изотерма 1 мин; далее программируемый нагрев до 280°C со скоростью 5°C/мин; при 280°C – изотерма 5 мин; далее программируемый нагрев до 300°C со скоростью 20°C/мин; при 300°C – изотерма 3 мин. Инжектор с делением потока 1:5. Температура инжектора 250°C; температура детектора 150°C; температура зоны сопряжения хроматографа с масс-спектрометром 280°C. Газ-носитель – гелий; скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл. Хроматограмма образцов – по полному ионному току (SCAN). Условия масс-спектрометрического детектирования: энергия ионизирующих электронов 70 эВ; регистрация масс-спектров положительных ионов в диапазоне (m/z) от 50 до 600 а.е.м. со скоростью 1.9 скан/с. Программное обеспечение – MassHunter GC/MS Acquisition B.05.00.412 и Mass Hunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.03.01 Build 3.1.346.14 Service Pack 3 (Agilent Technologies, Inc., США).

Детектирование и количественный анализ стеринных. Идентификацию компонентного состава (качественный анализ) проводили в соответствии с базой данных полных масс-спектров (NIST08 и Wiley7), с учетом фрагментных диагностических пиков, присутствующих в масс-спектрах и характеризующих структурные особенности исследуемых соединений, а также в соответствии со значениями хроматографических времен удерживания (Retention Time, RT) стандартных образцов. В качестве стандартных образцов использовали холестерин, стигмастерин, кампестерин и β -ситостерин. Количественный анализ исследуемых компонентов проводили методом внешней калибровки с учетом отклика внутреннего стандарта по формуле:

$$C_{\text{СТЕРИНА}} = \frac{C_{\text{СТ}} \cdot S_{\text{СТЕРИНА}}}{a \cdot S_{\text{СТ}} + b \cdot S_{\text{СТЕРИНА}}},$$

где $C_{\text{СТЕРИНА}}$ – концентрация искомого стерина, $C_{\text{СТ}}$ – концентрация стандарта, $S_{\text{СТЕРИНА}}$ – площадь искомого стерина, $S_{\text{СТ}}$ – площадь стандарта, a и b – поправочные коэффициенты.

Статистическая обработка. В таблицах представлены средние данные из четырех-пяти биологических повторностей и их стандартные отклонения. В одну биологическую повторность входили 2–3 каллуса. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа в среде Microsoft Office Excel 2010. Нормальность распределения полученных значений проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистическую значимость различий сравниваемых средних значений оценивали с помощью t -критерия ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из результатов, представленных в табл. 1, соотношение абсолютных и относительных (в %) содержаний основных липидных групп в тканях каллусов пшеницы *T. aestivum* L. характерно для нефотосинтезирующих тканей: гликолипидов, главных липидов фотосинтетического аппарата, содержится существенно меньше, чем нейтральных и фосфолипидов.

Влияние НИЛИ на содержание фосфолипидов в каллусах пшеницы

Среди ФЛ в тканях каллусов пшеницы были идентифицированы следующие типы: фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозит (ФИ), фосфатидилглицерин (ФГ), дифосфатидилглицерин (ДФГ), фосфатидная кислота (ФК). Как видно из рис. 1, содержание отдельных ФЛ в тканях облученных каллусов заметно отличалось от их содержания в тканях контрольных образцов.

Таблица 1. Абсолютное (мг/г сухого веса) и относительное (%) содержание основных липидных групп в тканях каллусов пшеницы *Triticum aestivum* L.

Тип липидов	Содержание	
	мг/г сухого веса	%
Нейтральные	22.8±1.1	52.6±2.8
Гликолипиды	2.7±0.1	6.2±0.2
Фосфолипиды	17.9±0.8	41.2±1.9

Примечание. В таблице приведены средние арифметические величины четырех биологических повторностей и их стандартные отклонения.

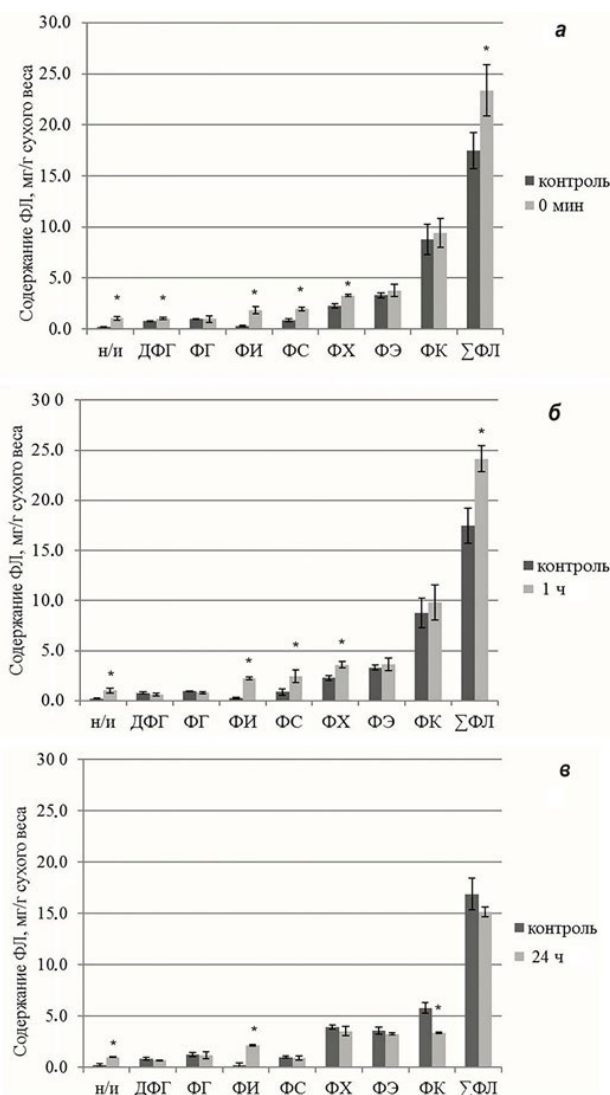


Рис. 1. Содержание фосфолипидов в тканях каллусов пшеницы (*T. aestivum*) сразу (а), через 1 (б) и 24 ч (в) после облучения НИЛИ He-Ne-лазера дозой 3.6 Дж/см². Приведены средние арифметические величины пяти биологических повторностей и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали с помощью t -критерия ($p < 0.05$).

Анализ полученных результатов показал, что содержание ФИ в облученных каллусах значительно, в 8 и более раз, превышало содержание этого ФЛ в контрольных образцах на протяжении всего времени наблюдения. В ранней работе [41] было впервые показаны изменения в составе ФИ в ответ на гиперосмотический шок. К настоящему времени известно, что содержание этого липида и его активных изоформ быстро изменяется как в ответ на стрессорирующие воздействия, так и в процессах эндогенного развития растения [19, 42]. Обнаруженное нами значительное увеличение его содержания в ответ на облучение НИЛИ He-Ne-лазера может служить одним из доказательств стрессорирующего влияния этого излучения на ткани каллусов пшеницы. Таким образом, облучение вызвало значительное увеличение содержания одного из ключевых регуляторных соединений липидной природы, что свидетельствует о его участии в реакции растительной ткани на действие НИЛИ.

В отношении фосфатидной кислоты, одного из важных сигнальных липидов [17] и ключевого посредника в синтезе всех глико- и фосфолипидов [19, 30], следует отметить, что в нашем объекте она являлась мажорным фосфолипидом, так как ее содержание было самым высоким среди остальных ФЛ в тканях каллусов пшеницы на протяжении всего эксперимента. Оно составляло от 40 до 50% от суммарного содержания ФЛ в контроле и в облученных каллусах на начальных этапах наблюдения. Через сутки после облучения содержание ФК снизилось в контроле до 30%, и еще более значительное снижение наблюдали в опыте: до 20% от суммы ФЛ. Снизилось и абсолютное содержание ФК. В целом, ее высокое относительное содержание может быть связано как с видовой специфичностью, так и с фазой культивирования. Например, в каллусной культуре яблони *Malus sylvestris* содержание этого ФЛ составляло всего 8.4% от суммарного содержания фосфолипидов [43]. Однако в отличие от наших образцов, отобранных для анализа на 36-й день культивирования, это была долгоживущая культура – образцы были взяты для анализа на 130-й день. Достоверных различий между облученными и контрольными образцами по содержанию ФК выявлено не было, однако наблюдалась некоторая тенденция к увеличению ее содержания сразу после облучения и через 1 ч. Через сутки после воздействия содержание этого ФЛ было достоверно ниже в облученных каллусах. Возможно, что это связано с расходом ФК в процессе биосинтеза других ФЛ, в первую очередь ФИ, содержание которого в облученных каллусах значительно возросло после воздействия НИЛИ. Содержание

кардиолипина – ДФГ, одного из основных липидов внутренней мембраны митохондрий, достоверно увеличивалось сразу после облучения. В дальнейшем, через 1 и 24 ч после воздействия, содержание этого ФЛ снизилось и оставалось более низким, чем в контроле. Митохондрии называют “сигнальным хабом” внутри растительной клетки. Эти органеллы являются частью сложных метаболических путей, взаимосвязанных с другими клеточными компартментами [44]. Митохондрии считаются ключевой органеллой при формировании ответа растений на изменения условий внешней среды, они входят в первую линию защиты растения от стрессорирующего воздействия. Поэтому обнаруженные нами изменения в содержании митохондриального фосфолипида ДФГ после облучения НИЛИ, по-видимому, свидетельствуют об участии митохондрий в реакции на это воздействие. На ранних (0 мин; 5 мин после облучения) этапах ответа каллусной ткани на действие света He-Ne-лазера заметно выросло содержание ФХ – одного из основных ФЛ в мембранах эукариот, а также содержание ФС, для которого показано активное участие в реакции растений на абиотические стрессоры, например, на солевой стресс [45].

Значительные изменения вызвало облучение НИЛИ и в суммарном содержании фосфолипидов в тканях каллусов пшеницы (табл. 2).

Этот показатель увеличился на 30% по сравнению с контролем после 5 мин воздействия светом лазера и оставался более высоким, чем в необлученных образцах, по крайней мере, в течение часа после облучения. Затем, через сутки после воздействия, суммарное содержание фосфолипидов в тканях облученных каллусов не отличалось от контрольных. Изменения в суммарном содержании ФЛ происходили в основном за счет значительного увеличения количества фосфатидилинозита, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина. Соотношение содержания двух фосфолипидов ФХ/ФЭ используют в качестве параметра, отражающего особенности структуры мембран, связанные с их функциональностью. Так, для ламеллярных мембранных структур характерны более высокие значения соотношения ФХ/ФЭ, в то время как снижение этого показателя может указывать на формирование гексагональных структур в мембране. Снижение значения ФХ/ФЭ сопровождается дегидратацией, увеличением проницаемости мембран, приводящее к нарушению их целостности [44]. На первом этапе реакции каллусной ткани на облучение этот показатель достоверно увеличивался, что, возможно, свидетельствовало о снижении проницаемости мембран. По истечении

Таблица 2. Динамика изменений в суммарном содержании ФЛ и соотношении ФХ/ФЭ в тканях каллусов пшеницы после облучения НИЛИ He-Ne-лазера

	Контроль	0 мин	Контроль	1 ч	Контроль	24 ч
ΣФЛ	17.5±1.0*	23.4±1.2*	17.9±0.9*	24.2±1.2*	15.2±1.4	16.9±1.3
ФХ/ФЭ	0.7±0.0*	0.9±0.0*	0.7±0.0*	1.0±0.0*	1.1±0.1	1.1±0.1

Примечание. В таблице приведены средние арифметические величины пяти биологических повторностей и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия ($p < 0.05$).

суток соотношение ФХ/ФЭ было одинаковым в опыте и контроле.

В целом, анализ полученных данных показал, что облучение каллусной культуры тканей пшеницы светом He-Ne-лазера в дозе, стимулирующей морфогенетические процессы, вызвало заметные изменения в количественном составе и соотношении содержаний фосфолипидов. В первую очередь, это касалось тех из них, которые активно участвуют в процессах адаптации растений к биотическим и абиотическим стрессорам. Известно, что липиды, в том числе фосфолипиды, не имеют специфических полос поглощения в видимой области спектра, где излучает гелий-неоновый лазер, поэтому логично предположить, что влияние НИЛИ такого лазера на состав и содержание липидов происходит сходным со стрессовой реакцией образом: известно, что при действии абиотических стрессоров в растительных тканях повышается активность процессов ПОЛ, увеличивается содержание “стрессовых” липидных компонентов: жирных кислот, некоторых стерина, ФИ, ФК,ДФГ [19, 31, 32]. Изменяется и работа ферментов биосинтеза липидов. Прямых свидетельств влияния НИЛИ на такие ферменты нет, но есть, например, сведения о действии облучения на ферменты антиоксидантной защиты, такие как аскорбатпероксидаза, пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза, ферменты глутатионового метаболизма [46]. Логично предположить, что и сильный свет, в частности, НИЛИ также активизирует связанные с липидами сигнальные сети. Как уже упоминалось выше, избыточное освещение индуцирует стресс в растительных тканях [33–35]. Поэтому поглощение квантов света He-Ne-лазера при облучении может инициировать не только уже показанные ранее реакции растительной ткани: усиление ПОЛ [14], изменения в составе и содержании жирных кислот [17], но также и изменения в составе и содержании липидных компонентов, что мы и наблюдали в наших экспериментах, по крайней мере, в отношении ФИ, ФК, ДФГ и ФХ на разных этапах ответа на облучение.

Влияние НИЛИ на содержание свободных стерина в каллусах пшеницы

Данные, представленные на рис. 2, показывают, что основными стеринами в тканях каллусов пшеницы были (по порядку увеличения содержания в необлученных образцах) холестерин, стигмастерин, кампестерин и β-ситостерин.

Такое распределение соответствует сведениям о содержании преобладающих мембранных стерина в тканях высших растений [34]. Содержание холестерина достоверно не изменялось сразу (0 мин) и в течение часа после облучения. Через 4 ч количество этого стерина увеличилось относительно точки 1 ч. Более существенные изменения под влиянием НИЛИ He-Ne-лазера были обнаружены в содержании кампестерина: оно значительно снизилось по сравнению с контролем и оставалось более низким на протяжении времени наблюдения. Количество стигмастерина, считающегося стрессовым стерина, не имело достоверных различий с необлученным контролем, демонстрируя тенденцию к снижению

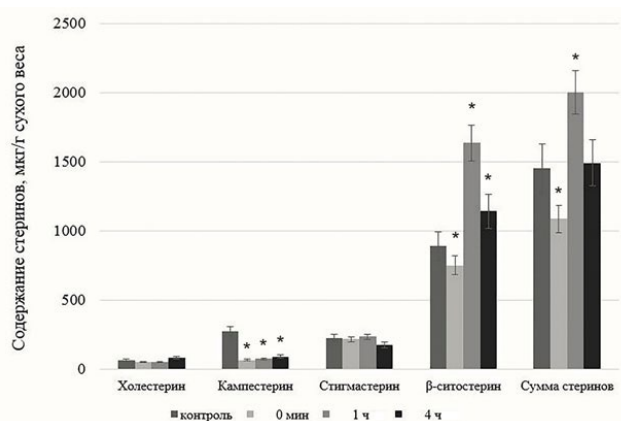


Рис. 2. Динамика изменений в содержании свободных стерина в тканях каллусов пшеницы (*T. aestivum*), вызванных облучением НИЛИ He-Ne лазера дозой 3.6 Дж/см². Приведены средние арифметические величины пяти биологических повторностей и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия ($p < 0.05$).

к концу эксперимента. Наиболее значимые изменения облучение вызвало в содержании доминирующего в растениях β -ситостерина. Сразу после воздействия оно снизилось на 25%, к исходу 1 ч наблюдения повысилось на 80% относительно необлученного контроля, а затем к концу эксперимента этот показатель снизился, но был все еще достоверно выше, чем в контрольных образцах. Такие колебания в содержании характерны для ответной реакции растительной ткани на стрессующие воздействия. Вероятно, в данном случае после снижения содержания этого стерина на первом этапе реакции на облучение, последующее увеличение вызвано активацией его биосинтеза в процессе адаптации к воздействию интенсивного света лазера. Это, возможно, объясняется участием β -ситостерина в процессах стабилизации и восстановления мембран. В пользу этого предположения говорят некоторые литературные данные. Так, увеличение содержания β -ситостерина показано для процесса холодовой адаптации [47] и для раневого стресса [48]. За счет повышения содержания β -ситостерина с такой же временной динамикой повышается и общее содержание стероидов в тканях облученных каллусов. Следует отметить большой разброс величин в результатах анализа стероидов. Это обстоятельство позволяет говорить лишь о тенденциях в динамике изменений их содержания в реакции на НИЛИ He-Ne-лазера. О влиянии света на биосинтез стероидов известно немного. Например, в работе [49] показано влияние интенсивности освещения и соотношения света и темноты на способность растений *Medicago sativa* к накоплению стероидов: свет инициирует накопление мононенасыщенных Δ^7 -стероидов, а темнота — диненасыщенных. Спектры поглощения стероидов располагаются в ультрафиолетовом диапазоне, у них, как и у ФЛ, нет характерных полос поглощения в красной области спектра. Поэтому возможное влияние НИЛИ He-Ne-лазера на содержание этих соединений в каллусной ткани может быть связано, вероятно, только с относительно высокой интенсивностью этого излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных результатов показал, что облучение НИЛИ He-Ne-лазера в стимулирующей морфогенетические процессы дозе (3.6 Дж/см²) приводило к существенным изменениям в составе и содержании ФЛ в тканях каллусов пшеницы *T. aestivum*. Характерной реакцией на воздействие были изменения в содержании тех ФЛ, для которых доказаны регуляторные и сигнальные функции и активное участие в ответе растительных тканей

на стрессоры: ФИ, ФК, соотношения содержаний ФХ/ФЭ, ДФГ и ФГ. Наиболее существенные изменения в составе ФЛ каллусных тканей облучение вызвало в содержании ФИ, оно было выше в 8 и более раз по сравнению с необлученным контролем. ФИ и его производные — это важный класс сигнальных липидов, баланс состава и содержания которых быстро изменяется в ответ на стимуляцию внешними факторами. Они являются предшественниками многих вторичных мессенджеров, тем самым оказывая влияние на большинство ключевых клеточных процессов [28]. Другой важный сигнальный липид — фосфатидная кислота была основным фосфолипидом в каллусных тканях пшеницы (40–50% суммы ФЛ). Хотя известно, что ФК является активным участником стрессовых реакций у растений, однако достоверных различий между облученными и контрольными образцами по содержанию ФК выявлено не было, за исключением тенденции к увеличению ее количества на раннем этапе ответа на облучение. Мы полагаем, что ФК активно расходовалась в биосинтезе ФИ, содержание которого в облученных каллусах значительно возросло после воздействия НИЛИ. Заметно увеличивалось на раннем этапе ответа каллусной ткани на облучение и содержание ДФГ, основного ФЛ митохондрий, ключевых клеточных органелл при формировании ответа растений на изменения условий среды. Изменения в содержании стероидов в тканях каллусов пшеницы под влиянием облучения происходили в основном за счет колебаний в содержании β -ситостерина, которое снижалось на первом этапе ответа на облучение, затем, к исходу первого часа после воздействия, по-видимому, на этапе адаптации тканей к стрессу, вызванному облучением, значительно увеличивалось. Известно, что стероиды, обеспечивая структурную целостность мембран клеток и клеточных органелл, активно участвуют в формировании стрессоустойчивости растительных организмов [36, 37]. У стероидов нет характерных полос поглощения в красной области спектра. Поэтому влияние НИЛИ He-Ne-лазера на содержание этих соединений в каллусной ткани может быть связано с относительно высокой интенсивностью этого излучения. На справедливость этого предположения указывает характерный для стрессового ответа колебательный характер изменений в суммарном содержании стероидов в облученных каллусах пшеницы.

Итак, по-видимому, интенсивный свет гелий-неонового лазера вызывает в тканях каллусов пшеницы реакцию, сходную со стрессовой. Полученные результаты дают основание полагать, что липидные компоненты мембран принимают

Таблица 3. Динамика изменений в содержании свободных стеринов в тканях каллусов пшеницы после облучения НИЛИ He-Ne-лазера (длина волны 632.8 нм, доза 3.6 Дж/см²)

Вариант опыта (время после облучения)	Содержание стеринов, мкг/г сухого веса				
	Холестерин	Кампестерин	Стигмастерин	β-ситостерин	Сумма стеринов
Контроль	65±7	273±71*	223±13	889±78*	1453±170*
0 мин	51±18	66±15*	217±49	752±11*	1087±131*
1 ч	53±2*	75±34*	236±16	1636±88*	2001±111*
4 ч	81±13*	92±23*	176±55	1142±93*	1492±173

Примечание. В таблице приведены средние арифметические величины пяти биологических повторностей и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия ($p < 0.05$).

участие в реакции растительной ткани на облучение. Эта реакция выражается в увеличении содержания таких фосфолипидов, как ФИ, ФХ, ФС, основного липида митохондрий ДФГ, снижении содержания ФК и повышении содержания ситостерина на этапе адаптации к воздействию облучения. В практическом отношении, полученные сведения о динамике изменения мембранных липидов в каллусной ткани *T. aestivum* в ответ на облучение НИЛИ He-Ne-лазера в стимулирующей процессы морфогенеза дозе могут дать возможность целенаправленно влиять на продукцию липидных компонентов в культуре растительных тканей, а также могут быть использованы при выборе оптимальных условий освещения для успешного культивирования растений.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kreslavski V.D., Carpentier R., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I. 2009. Transduction mechanisms of photoreceptor signals in plant cells. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **10**, 63–80.
- Kreslavski V.D., Fomina I.R., Los D.A., Carpentier R., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. 2012. Red and near infra-red signaling: Hypothesis and perspectives. *J. Photochem. Photobiol.* **13**, 190–203. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.01.002>
- Demotes-Mainard S., Péron T., Corot A., Bertheloot J., Gourrierc J.L., Pelleschi-Travier S., Crespel L., Morel P., Huché-Thélier L., Boumaza R., Vian A., Guérin V., Leduc N., Sakr S. 2016. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environ. Exp. Bot.* **121**, 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.010>
- Huché-Thélier L., Crespel L., Gourrierc J.L., Morel P., Sakr S., Leduc N. 2016. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations – Perspectives for applications in horticulture. *Environ. Exp. Bot.* **121**, 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.009>
- Cavallaro V., Pellegrino A., Muleo R., Forgione I. 2022. Light and plant growth regulators on in vitro proliferation. *Plants.* **11** (7), 844. <https://doi.org/10.3390/plants11070844>
- Салаяев Р.К., Дударева Л.В., Ланкевич С.В., Сумцова В.М. 2001. Влияние низкоинтенсивного когерентного излучения на морфогенетические процессы в каллусной культуре пшеницы. *ДАН.* **376**, 830–832.
- Салаяев Р.К., Дударева Л.В., Ланкевич С.В., Сумцова В.М. 2001. Влияние низкоинтенсивного когерентного излучения на каллусогенез у дикорастущих злаков. *ДАН.* **379**, 819–820.
- Hernández-Aguilar C., Dominguez P.A., Cruz O.A., Ivanov R., Carballo C.A., Zepeda B.R. 2010. Laser in agriculture. *Int. Agrophys.* **24**, 407–422.
- Gao L., Li Y-F., Z. Shen Z., Han R. 2018. Responses of He-Ne laser on agronomic traits and the crosstalk between UVR8 signaling and phytochrome B signaling pathway in *Arabidopsis thaliana* subjected to supplementary ultraviolet-B (UV-B) stress. *Protoplasma.* **255** (3), 761–771. <https://doi.org/10.1007/s00709–017–1184-y>
- Klimek-Копыра А., Czech T. 2022. Complementary photostimulation of seeds and plants as an effective tool for increasing crop productivity and quality in light of new challenges facing agriculture in the 21st century – A case study. *Plants.* **11**, 1649. <https://doi.org/10.3390/plants11131649>

11. Klimek-Kopyra A., Neugschwandtner R.W., Ślizowska A., Kot D., Dobrowolski J.W., Pilch Z., Dacewicz E. 2022. Pre-sowing laser light stimulation increases yield and protein and crude fat contents in soybean. *Agriculture*. **12**, 1510. <https://doi.org/10.3390/agriculture12101510>
12. Korrani M.F., Amooaghaie R., Ahadi A. 2023. He–Ne laser enhances seed germination and salt acclimation in *Salvia officinalis* seedlings in a manner dependent on phytochrome and H₂O₂. *Protoplasma*. **260**, 103–116. <https://doi.org/10.1007/s00709–022–01762–1>
13. Swathy P.S., Kiran K.R., Joshi M.B., Mahato K.K., Muthusamy A. 2021. He–Ne laser accelerates seed germination by modulating growth hormones and reprogramming metabolism in brinjal. *Sci. Rep.* **11**, 7948. <https://doi.org/10.1038/s41598–021–86984–8>
14. Салаяев Р.К., Дударева Л.В., Ланкевич С.В., Екимова Е.Г., Сумцова В.М. 2003. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на процессы перекисного окисления липидов в культуре ткани пшеницы. *Физиол. растений*. **50** (4), 498–500.
15. Озолина Н.В., Прадедова Е.В., Дударева Л.В., Салаяев Р.К. 1997. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на гидролитическую активность протонных насосов вакуолярной мембраны. *Биол. мембраны*. **14**, 125–127.
16. Салаяев Р.К., Дударева Л.В., Ланкевич С.В., Макаренко С.П., Сумцова В.М., Рудиковская Е.Г. 2007. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на химический состав и структуру липидов в культуре ткани пшеницы. *ДАН*. **412** (3), 422–423.
17. Дударева Л.В., Рудиковская Е.Г., Шмаков В.Н. 2014. Влияние низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера на жирнокислотный состав каллусных тканей пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Биол. мембраны*. **31** (5), 364–370. <https://doi.org/10.7868/S0233475514050041&>
18. Dudareva L., Tarasenko V., Rudikovskaya E. 2020. Involvement of photoprotective compounds of a phenolic nature in the response of *Arabidopsis thaliana* leaf tissues to low-intensity laser radiation. *Photochem. Photobiol.* **96** (6), 1243–1250. <https://doi.org/10.1111/php.13289>
19. Hou Q., Ufer G., Bartels D. 2016. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant, Cell and Environ.* **39**, 1029–1048. <https://doi.org/10.1111/pce.12666>
20. Munnik T., Irvine R.F., Musgrave A. 1998. Phospholipid signalling in plants. *Biochim. Biophys. Acta*. **1389**, 222–272.
21. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. 2013. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth. Res.* **343**, 489–509. <https://doi.org/10.1007/s11120–013–9823–4>
22. Cassim A.M., Mongrand S. 2019. Lipids light up in plant membranes. *Nat. Plants*. **5**, 913–914. <https://doi.org/10.1038/s41477–019–0494–9>
23. Жуков А.В. 2021. О качественном составе липидов мембран растительных клеток. *Физиол. растений*. **68** (2), 206–224. <https://doi.org/10.31857/S001533032101022X>
24. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. 2002. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W.H. Freeman. 1050 p. <https://doi.org/www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22361>
25. Reszczyńska E., Hanaka A. 2020. Lipids composition in plant membranes. *Cell Biochem. Biophys.* **78**, 401–414. <https://doi.org/10.1007/s12013–020–00947–w>
26. Klyachko-Gurvich G.L., Tsoglin L.N., Doucha J., Kopetskii J., Ryabykh I.B.S., Semenenko V.E. 1999. Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Physiol. Plant.* **107**, 240–249. <https://doi.org/10.1034/j.1399–3054.1999.100212.x>
27. Ruelland E., Kravets V., Derevyanchuk M., Martinec J., Zachowski A., Pokotylo I. 2015. Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Envir. Exp. Bot.* **114**, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.08.009>
28. Heilmann I. 2016. Plant phosphoinositide signaling – dynamics on demand. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids*. **1861** (9), 1345–1351. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.013>
29. Lim G.H., Singhal R., Kachroo A., Kachroo P. 2017. Fatty acid- and lipid-mediated signaling in plant defense. *Ann. Rev. Phytopathol.* **55**, 505–536. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516–035406>
30. Pokotylo I., Kravets V., Martinec J., Ruelland E. 2018. The phosphatidic acid paradox: Too many actions for one molecule class? Lessons from plants. *Prog. Lipid Res.* **71**, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.05.003>
31. Rogowska A., Szakiel A. 2020. The role of sterols in plant response to abiotic stress. *Phytochem. Rev.* **19**, 1525–1538. <https://doi.org/10.1007/s11101–020–09708>
32. Lu J., Xu Y., Wang J., Singer S.D., Chen G. 2020. The role of triacylglycerol in plant stress response. *Plants*. **9**, 472. <https://doi.org/10.3390/plants9040472>
33. Banerjee A., Roychoudhury A. 2016. Plant responses to light stress: Oxidative damages, photoprotection, and role of phytohormones. In: *Plant Hormones under Challenging Environmental Factors*. Eds. Ahammed G., Yu J.Q. Dordrecht: Springer, p. 181–213. https://doi.org/10.1007/978–94–017–7758–2_8
34. Pascual J., Rahikainen M., Kangasjärvi S. 2017. Plant light stress. *eLS*. 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001319.pub3>
35. Roeber V.M., Bajaj I., Rohde M., Schmulling T., Corbleven A. 2021. Light acts as a stressor and influences abiotic and biotic stress responses in plants. *Plant Cell Environ.* **44** (3), 645–664. <https://doi.org/10.1111/pce.13948>
36. Schaller H. 2003. The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.* **42** (3), 163–75. [https://doi.org/10.1016/s0163–7827\(02\)00047–4](https://doi.org/10.1016/s0163–7827(02)00047–4)

37. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. 2016. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции. *Биохимия*. **81** (8), 1050–1068.
<https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
38. Bligh E.C., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917.
39. Vaskovsky V.E., Latyshev N.A. 1975. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms. *J. Chromatog.* **115**, 246–249.
40. Kates M. 1986. *Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids*. 2 ed. Amsterdam-NY-Oxford: Elsevier. 464 p.
41. Einspahr K.J., Peeler T.C., Thompson G.A. Jr. 1988. Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism associated with the response of *Dunaliella salina* to hypoosmotic shock. *J. Biol. Chem.* **263**, 5775–5779.
42. Meijer H.J.G., Munnik T. 2003. Phospholipid-based signaling in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **54**, 265–306.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134748>
43. Prabha T.N., Raina P.L., Patwardhan M.V. 1988. Lipid profile of cultured cells of apple (*Malus sylvestris*) and apple tissue. *J. Biosci.* **13** (1), 33–38.
44. Welchen E., Canal M.V., Gras D.E., Gonzalez D.H. 2021. Cross-talk between mitochondrial function, growth, and stress signaling pathways in plants. *J. Exp. Bot.* **72** (11), 4102–4118.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa608>
45. Yu Y., Kou M., Gao Z., Liu Y., Xuan Y., Liu Y., Tang Z., Cao Q., Li Z., Sun J. 2019. Involvement of phosphatidylserine and triacylglycerol in the response of sweet potato leaves to salt stress. *Front. Plant Sci.* **10**, 1086–1092.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01086>
46. Qiu Z., He Y., Zhang Y., Guo J., Wang L. 2018. Characterization of miRNAs and their target genes in He-Ne laser pretreated wheat seedlings exposed to drought stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **164**, 611–617.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.077>
47. Uemura M., Steponkus P.L. 1994. A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol.* **104**, 479–496.
48. Гордон Л.Х. 1992. Дыхательный газообмен и содержание структурных липидов в процессе роста каллусных клеток. *Физиол. биохим. культ. растений*. **24**, 24–29.
49. Huang L.S., Grunwald C. 1988. Effect of light on sterol changes in *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* **88** (4), 1403–1406.
<https://doi.org/10.1104/pp.88.4.1403>

Influence of Low-Intense Laser Radiation He-Ne Laser on the Composition and Content of Phospholipids and Sterols in the Tissue of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Callus Tissues

© 2024 г. L. V. Dudareva¹, E. G. Rudikovskaya¹, *, N. V. Semenova¹, A. V. Rudikovskii¹, V. N. Shmakov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664032 Russia

*e-mail: rudal69@mail.ru

Using chromatography-mass spectrometry and thin-layer chromatography, the effect of irradiation with He-Ne laser light on the composition and content of cell membrane components – phospholipids and sterols – in wheat callus tissues was studied. It was shown that irradiation of callus with laser light at a dose of 3.6 J/cm² led to significant changes in the content of these components. Thus, the content of phosphatidylinositol increased in irradiated callus by 8 times, phosphatidylethanolamine by 2 times, the content of phosphatidic acid decreased by 20% of the sum of phospholipids. For sterols, it was established that irradiation caused the most significant changes in the content of β-sitosterol, which is dominant in plants (an increase from 1453 ± 170 μg/g of dry weight in the non-irradiated control to 2001 ± 112 μg/g of dry weight 1 h after exposure) and, due to this, in the total content of sterols. Analysis of the results obtained suggests that phospholipids and sterols, primarily those for which regulatory and signaling functions are known, are involved in the response of plant tissue to exposure to low-intensity laser radiation from a He-Ne laser. This participation is realized as a stressful (nonspecific) response to intense radiation.

Keywords: phospholipids, sterols, He-Ne laser, callus tissues, *Triticum aestivum* L.

УДК 581.11.2:581.573.4

РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМЫ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ИЗ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К сАМР И ИОНАМ КАЛЬЦИЯ

© 2024 г. Л. А. Ломоватская^{а,*}, О. В. Захарова^а, А. М. Гончарова^а, А. С. Романенко^а,
Т. А. Кишинская^б

^а Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук,
Иркутск, 664033 Россия

^б Байкальский государственный университет, Иркутск, 664002 Россия

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

Поступила в редакцию 02.10.2023

После доработки 21.12.2023

Принята к печати 28.12.2023

Установлено, что циклический аденозин монофосфат (сАМР) и ионы кальция (Ca^{2+}) способны дозозависимо модулировать активность различных форм супероксиддисмутазы (СОД) в клетках корня проростков гороха сорта Рондо. Влияние сАМР на активность СОД исследовали на интактных проростках, инкубируя их корни в растворе жирорастворимого аналога сАМР *n*-дибутирил-сАМР, что приводило к повышению внутриклеточной концентрации сАМР, а общая активность СОД, измеряемая в супернатанте, полученном из гомогената корней, возрастала до 230%. Инкубация аналогичных корней в растворе ингибитора трансмембранной аденилатциклазы сурамина существенно снижала эндогенный уровень сАМР, а активность СОД уменьшалась до 40%. В работе проводили ингибиторный анализ СОД: в присутствии 3мМ KCN или 3мМ H_2O_2 активность этого фермента уменьшалась на 40 или 50%. Инкубация проростков в растворе LaCl_3 приводила к снижению общей активности СОД до 73%, ингибиторы незначительно уменьшали активность фермента. Предварительная обработка проростков 1мМ EGTA снижала общую активность СОД до 68%, а ингибиторы фермента не оказывали никакого дополнительного эффекта. Влияние недостатка или избытка Ca^{2+} на активность СОД изучали в гомогенате корней проростков гороха. 100 мМ EGTA снижал активность этого фермента до 81%, а ингибиторы СОД (H_2O_2 и KCN) уменьшали ее активность до 65 и 51% соответственно. Добавление к гомогенату 500 нМ CaCl_2 незначительно повышало общую активность СОД, при этом KCN немного уменьшал активность фермента. Добавление 500 мкМ CaCl_2 не изменяло активность СОД, применение на этом фоне KCN снижало ее на 30%, а добавление H_2O_2 не влияло на активность фермента. Сделан вывод о том, что сАМР оказывает косвенное влияние на активность СОД, тогда как ионы кальция, вероятно, воздействуют непосредственно на активный центр молекулы фермента; при этом каждая форма СОД отличается по чувствительности к кальцию.

Ключевые слова: Cu,Zn-СОД, Fe-СОД, Mn-СОД, корень проростков гороха, сАМР, Ca^{2+}

DOI: 10.31857/S0233475524020073, **EDN:** xngoeb

ВВЕДЕНИЕ

Супероксиддисмутаза (СОД) (КФ 1.15.1.1) является первой линией защиты от окислительного стресса в живых клетках, катализируя дисмутацию супероксидного радикала до молекулярного кислорода и перекиси водорода. Характерной особенностью этого фермента является наличие металлов в составе активного центра. У растений этот фермент представлен Cu, Zn-, Fe- и Mn-содержащими формами СОД [1]. Отличительной особенностью растительных СОД

является множественность изоформ каждой из форм, которые локализуются как в цитозоле, так и в органеллах растений [2]. У всех эукариотов регуляция активности СОД может осуществляться на генетическом уровне (транскрипция, трансляция) [2, 3]. В этих процессах существенная роль принадлежит внутриклеточным вторичным мессенджерам. В литературе имеется много данных о влиянии различных видов активных форм кислорода (АФК) и ионов кальция (Ca^{2+}) на экспрессию генов СОД в растениях [4, 5]. Предполагается, что одним из механизмов их

действия может быть активация протеинкиназ, фосфорилирующих соответствующие факторы транскрипции [4]. Экспрессия генов и синтез новых форм фермента является долгосрочным процессом, направленным на перестройку и адаптацию метаболизма в стрессовых условиях [5, 6]. Однако помимо таких способов регуляции вторичные мессенджеры могут оказывать воздействие на уже имеющиеся молекулы СОД, приводя к активации или ингибированию ее активности в течение нескольких минут [7]. Такая модуляция активности фермента необходима как для регуляции роста и развития растений, так и для адаптации к кратковременным стрессовым условиям.

По литературным данным, обработка целых растений экзогенными ионами кальция может приводить к изменению активности общего пула СОД [8]. Механизм этого явления пока неизвестен, но предполагается, что в нем участвует кальций-кальмодулин-активируемая протеинкиназа, т.е. Ca^{2+} оказывают косвенный эффект на активность СОД [8]. В то же время в литературе отсутствуют сведения о непосредственной роли Ca^{2+} в регуляции активности некоторых форм СОД у растений. Между тем кальций хорошо известен как модулятор активности многих видов ферментов, непосредственно влияя на их конформационные перестройки.

Известно, что в регуляции уровня внутриклеточного кальция принимает участие вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы циклический аденозин монофосфат (сАМР) [9]. Вместе с тем участие сАМР в регуляции активности ферментов практически не исследовано, помимо его способности активировать/ингибировать соответствующие протеинкиназы/протеинфосфатазы растений [9].

Поэтому целью данного исследования являлось изучение влияния сАМР и ионов кальция на активность различных форм СОД в корнях проростков гороха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили проростки гороха сорта Рондо. Семена гороха последовательно стерилизовали в течение 30 мин в 94% этаноле, 5 мин в 3% перексиде водорода и 5 мин в 5% растворе перманганата калия. На конечном этапе отмывали стерильной дистиллированной водой и замачивали в воде (56°C) на 4 ч. Затем семена проращивали в стерильных чашках Пети на увлажненной фильтровальной бумаге

в течение 3 сут в темноте при 23–25°C. В каждом варианте эксперимента использовали по 10 проростков.

Определение активности различных форм СОД. Корни 10 проростков гороха гомогенизировали в среде следующего состава: 0.02 М фосфатный буфер, рН 7.2; 1 мМ дитиотрейтол; 10 мкг/мл фенолметилсульфонилфторид; 50 мкг/мл гидроксимеркурийбензоат; 1 мкг/мл лейпептин. Гомогенат фильтровали через капрон и центрифугировали при 16000g в течение 10 мин (Allegra 64 R). Об активности СОД судили по степени торможения восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) (Sigma-Aldrich, США) в присутствии NADH и феназинметасульфата (ФМС) (Sigma-Aldrich) [10]. Для этого к 0.1 мл растительного супернатанта добавляли 3.9 мл реакционной среды. К контрольному образцу объемом 0.1 мл H_2O добавляли также 3.9 мл реакционной среды; образцы инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре.

Реакционная среда для определения активности СОД содержала: 3.5 мл 150 мМ Na, К-фосфатного буфера (рН 7.8), 0.1 мл 0.01 мМ EGTA, 0.1 мл 0.186 мМ феназинметасульфата, 0.1 мл 0.4 мМ нитросинего тетразолия, 0.1 мл 1 мМ NADH.

Содержание бисформаза определяли на планшетном спектрофотометре при длине волны 560 нм. Активность СОД (мкмоль формаза/на/мг белка/мин) рассчитывали по формуле:

$$\text{Акт. СОД (мкмоль формаза/на/мг белка/мин)} = \frac{[(\text{Оп}_{\text{контр.}} - \text{Оп}_{\text{оп.}}) / t] \times V_1 \times V_2 \times 10^3}{V_3 \times \epsilon_{560} \times m}$$

где $\text{Оп}_{\text{контр.}}$ – оптическая плотность контрольного образца; $\text{Оп}_{\text{оп.}}$ – оптическая плотность опытного образца; V_1 – суммарный объем реакционной смеси, мл; V_2 – объем буферной смеси, используемый для гомогенизации и экстракции проростков, мл; V_3 – объем экстракта, вносимый в реакционную смесь и используемый для анализа, мл; m – концентрация белка, мг/мл; ϵ_{560} – молярный коэффициент экстинкции бисформаза, $3.98 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ингибиторный анализ. В супернатант после гомогенизации и центрифугирования корней добавляли 3мМ KCN или 3мМ H_2O_2 . В контрольные варианты добавляли аналогичный объем воды. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд. Концентрацию сАМР измеряли методом иммуноферментного анализа (ИФА), применяя первичные поликлональные антитела к сАМР (Santa Cruz Biotechnology, США) и

вторичные, меченные пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology) [11].

Влияние *n*-дibuтирил-сАМР (д-б-сАМР) на активность СОД. Корни интактных проростков гороха инкубировали 30 мин в 50нМ растворе *n*-бутирил-сАМР (д-б-сАМР).

(Sigma-Aldrich), затем корни промывали в воде, гомогенизировали по вышеприведенной схеме, центрифугировали и в супернатанте определяли активность СОД.

Влияние сурамина на активность СОД. Аналогичные проростки гороха инкубировали 30 мин в 800 мкМ растворе сурамина (ингибитора трансмембранной аденилатциклазы, Sigma-Aldrich). Далее эксперимент проводили по той же схеме, как и в случае с д-б-сАМР.

Влияние ингибитора неспецифических кальциевых каналов LaCl_3 и хелатора кальция EGTA на активность СОД. Проростки гороха инкубировали 30 мин в 400 мкМ растворе LaCl_3 или в 1мМ растворе EGTA. Далее эксперимент проводили по той же схеме, как и в случае с д-б-сАМР.

Во всех экспериментах (“д-б-сАМР”, “сурамин”, “ LaCl_3 ”, “EGTA”) полученные результаты сравнивали с контролем, которым служили проростки, инкубированные в воде (контроль, H_2O). В каждом варианте эксперимента проводили ингибиторный анализ (с добавлением KCN, H_2O_2) и результаты сравнивали с аналогичными без добавления ингибиторов (контроль I).

Влияние дефицита/избытка Ca^{2+} на активность СОД. К супернатанту, полученному из гомогената корней проростков, инкубированных в воде, добавляли растворы следующих веществ: 100 мМ EGTA или 500 нМ CaCl_2 , или 500 мкМ CaCl_2 , инкубировали 10 мин при 23°C, затем нагревали 3 мин до 100°C и определяли активность СОД. Контролем служили образцы супернатанта без добавления EGTA и CaCl_2 . В каждом варианте эксперимента проводили ингибиторный анализ (с добавлением KCN, H_2O_2) и результаты сравнивали с аналогичными без добавления ингибиторов.

Статистический анализ данных. Эксперименты проводили в трех биологических и восьми аналитических повторностях. Для оценки статистической значимости результатов использовали *t*-критерий. Результаты считали статистически значимо различающимися при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления активности отдельных форм СОД применяли специфические ингибиторы [2, 12]: добавление к гомогенату корней 3мМ KCN (ингибитора Cu-Zn-СОД) приводило к снижению общей активности фермента на 70%, тогда как инкубация с 3мМ H_2O_2 (ингибитором Cu-Zn-СОД и Fe-СОД) уменьшала активность на 49% (табл. 1).

Влияние сАМР на активность СОД в клетках корней гороха исследовали на интактных проростках, инкубируя корни проростков гороха в 50нМ растворе *n*-дibuтирил-сАМР, что приводило к повышению внутриклеточной концентрации сАМР (табл. 2). Инкубация аналогичных корней с ингибитором трансмембранной аденилатциклазы сурамином [11] способствовала существенному снижению эндогенного уровня сАМР (табл. 2).

Во всех вариантах экспериментов изменялась активность разных форм СОД. Под воздействием *n*-дibuтирил-сАМР общая активность достигала 230%, добавление к гомогенату ингибиторов СОД (H_2O_2 и KCN) вызывало уменьшение ее активности до 180–190% соответственно. На фоне инкубации с сурамином общая активность снижалась до 40% от контроля, тогда как при дополнительном применении ингибиторов СОД – до 50–60% (рис. 1). Возможно, что увеличение детектируемой активности произошло за счет изменения активности Mn-СОД, на которую не действуют ингибиторы KCN и пероксид водорода.

Инкубация проростков с 400 мкМ раствором LaCl_3 приводила к снижению общей активности СОД до 73%, 3мМ H_2O_2 уменьшали активность СОД до 67%, а под влиянием 3мМ KCN ее активность опускалась до 56% от контроля (контролем служил вариант “+ LaCl_3 ”) (табл. 1). Предварительная обработка проростков 1 мМ EGTA приводила к снижению общей активности фермента на 32%, но ингибиторы не оказывали никакого дополнительного эффекта (табл. 1).

Влияние недостатка или избытка ионов кальция на активность СОД изучали в гомогенате корней проростков гороха. При добавлении к гомогенату корней хелатора ионов кальция EGTA (100мМ) наблюдалось снижение общей активности СОД до 81%, при применении ингибиторов выявлено еще большее уменьшение активности – до 65% (в случае применения KCN) и 51% (в случае применения H_2O_2) (рис. 2). Добавление к гомогенату 500 нМ раствора CaCl_2 незначительно повышало общую активность СОД, однако дополнительная обработка KCN снижала

Таблица 1. Изменение активности СОД после инкубации интактных корней проростков гороха в 400 мкМ LaCl₃ или 1 мМ EGTA

Вариант опыта	H ₂ O, контроль I		3 мМ H ₂ O ₂ (ингибитор Cu, Zn-СОД)		3 мМ KCN (ингибитор Cu, Zn-СОД и Fe-СОД)	
	мкМ формазана/мг белка/мин	% к контролю	мкМ формазана/мг белка/мин	% к контролю I*	мкМ формазана/мг белка/мин	% к контролю I*
Контроль, H ₂ O	0.37 ± 0.02	100	0.19 ± 0.01	51	0.11 ± 0.01	30
400 мкМ LaCl ₃	0.27 ± 0.01	73	0.18 ± 0.01	67	0.15 ± 0.01	56
1 мМ EGTA	0.25 ± 0.01	68	0.17 ± 0.01	68	0.16 ± 0.01	64

* В вариантах экспериментов “LaCl₃”, “EGTA” полученные результаты сравнивали с контролем, которым служили проростки, инкубированные в воде (контроль, H₂O). Результаты ингибиторного анализа (с добавлением KCN, H₂O₂) сравнивали с аналогичными экспериментами (“LaCl₃”, “EGTA”) без добавления ингибитора (контроль I).

Таблица 2. Влияние 50 нМ *n*-дibuтирил-сАМР и 800 мкМ сурамина на содержание эндогенного сАМР в корне проростков гороха

Вариант опыта	сАМР	
	нмоль/г сыр. веса	% к контролю
H ₂ O, контроль	5.2 ± 0.5	100
д-б-сАМР, 50 нМ	9.8 ± 0.8	188
Сурамин, 800 мкМ	2.2 ± 0.2	42

активность фермента примерно на 20%, а H₂O₂ не оказывал влияния на этот показатель (рис. 2). При добавлении более высокой концентрации CaCl₂ (500 мкМ) общая активность СОД не изменялась (100%), на фоне этого KCN уменьшал этот показатель на 30%, а при добавлении H₂O₂ активность фермента оставалась практически неизменной (рис. 2).

Сигнальная система растений формируется и функционирует за счет взаимодействующих компонентов различных сигнальных путей [13]. Одним из наиболее известных примеров этого является взаимозависимое изменение содержания внутриклеточных Ca²⁺ и H₂O₂. Считается, что концентрация цитозольных Ca²⁺ регулируется АФК, и наоборот, Ca²⁺ имеют решающее значение для производства АФК [14, 15].

Исследованию растительной СОД посвящено достаточно много работ, в которых этот фермент чаще всего рассматривается как маркер стрессовых реакций растений [6, 16]. В связи с этим возникает вопрос о том, какие внутриклеточные события, например, изменение ионного окружения под влиянием вторичных мессенджеров могут непосредственно вызывать изменение активности СОД. В отдельных работах исследовалось влияние экзогенного кальция, применяемого в качестве удобрения, на общую активность исследуемого фермента [17]. В некоторых

источниках обсуждается взаимосвязь между абсцизовой кислотой, кальцием и активностью СОД в растениях кукурузы [18]. Результаты этих исследований не дают четкого представления о механизмах кратковременной модуляции активности СОД, в которой могут участвовать внутриклеточные сигнальные молекулы. Это важно и по той причине, что этот фермент представлен в растениях несколькими формами, которые могут обладать индивидуальной чувствительностью к вторичным мессенджерам. Краткосрочное влияние сигнальных молекул на активность различных форм СОД может осуществляться как в условиях нормального роста и развития растений, так и под воздействием стрессоров.

Наши эксперименты показали, что все формы СОД из клеток корней проростков гороха реагировали на изменение эндогенного уровня сАМР (рис. 1). Согласно результатам ингибиторного анализа (табл. 1), при повышении концентрации сАМР в наибольшей степени активировалась Mn-СОД. Известно, что действие вторичного мессенджера аденилатциклазной сигнальной системы, сАМР, направлено на индукцию активности внутриклеточных сигнальных каскадов. В основном, от него зависит активация соответствующих протеинкиназ, которые фосфорилируют специфические белки и факторы транскрипции, передавая таким образом

информацию в геном. Кроме того, эта сигнальная молекула является регулятором активности нуклеотид-зависимых кальциевых ионных каналов [19]. В литературе показано, что кратковременное и локальное повышение уровня эндогенного сАМР приводит к их активации и повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [19], за которым следует резкое увеличение уровня АФК [20]. Таким образом, сАМР напрямую не оказывает влияние на ферменты, генерирующие АФК, но участвует опосредованно, модулируя уровень эндогенных Ca^{2+} , которые могут непосредственно взаимодействовать с активными центрами соответствующих ферментов. Очевидно, что такая многоступенчатая взаимосвязь вторичных мессенджеров должна быть дозозависимой. Подтверждением этому может служить дифференцированное ингибирование всех форм СОД при уменьшении уровня эндогенного сАМР (рис. 1): заметно, что активность Mn-СОД в этих условиях снижалась в меньшей степени. Согласно литературным данным можно предположить, что непосредственной причиной изменения активности СОД в клетках корней гороха в этих условиях могло быть изменение концентрации эндогенного кальция. В связи с этим показательны результаты по изменению активности всех форм СОД под влиянием неспецифического ингибитора кальциевых каналов LaCl_3 и хелатора кальция EGTA, применяемого в низкой концентрации на интактных корнях проростков (табл. 1). LaCl_3 , вероятно, блокировал выход внутриклеточных Ca^{2+} , что отразилось на

активности СОД. Применение различных концентраций EGTA на разных моделях (на корнях интактных проростков и в гомогенате корней) показало существенные изменения в активности всех форм СОД, причем в меньшей степени они наблюдались в Mn-СОД, что указывает на чувствительность исследуемого фермента к кальцию.

Ингибиторный анализ не дает точного представления о вкладе каждой формы СОД в ее общую активность, однако можно отметить, что все формы фермента из корней гороха проявляли разнонаправленную чувствительность к 500 нМ CaCl_2 , которая близка к физиологической у растений: активности Cu,Zn-СОД и Fe-СОД незначительно снижались, тогда как Mn-СОД повышалась. Увеличение концентрации экзогенного кальция на три порядка (500 мкМ) оказывало подавляющий эффект на все формы СОД, однако на Mn-СОД в меньшей степени. Таким образом, можно сделать вывод о том, что СОД из клеток корней проростков гороха является кальций-зависимым ферментом, а каждая форма СОД имеет индивидуальную чувствительность к Ca^{2+} .

Можно полагать, что дифференцированная чувствительность различных форм СОД к кальцию является одним из способов тонкой регуляции внутриклеточной сигнализации у растений. Это представляется вполне возможным, поскольку известно, что наиболее низкий уровень Ca^{2+} наблюдается в цитоплазме (в покое составляет 100–200 нМ), тогда как во внутриклеточных компартментах может достигать 1 мМ, как, например, в митохондриях [21]. В связи с этим

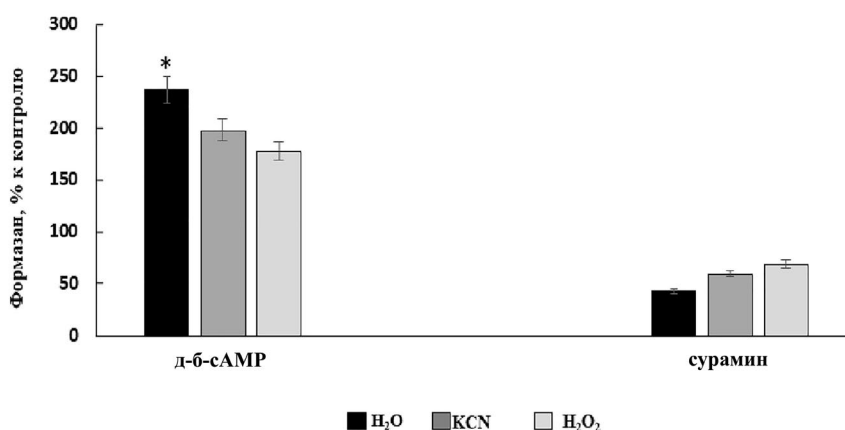


Рис. 1. Изменение активности СОД в интактных корнях проростков гороха под влиянием 50 нМ *n*-дibuтирил-сАМР или 800 мкМ сурамина. Расчет активности СОД проводили, сравнивая значения СОД, полученные в опытных вариантах (д-б-сАМР, сурамин), со значениями, полученными из корней проростков, инкубированных в воде (контроль). % ингибирования рассчитывали, сравнивая значение “H₂O” и значение СОД, полученное при добавлении ингибитора. В опыте сравнивали значение активности СОД (д-б-сАМР или сурамин) со значением, полученным в присутствии ингибиторов. * - $p < 0.05$.

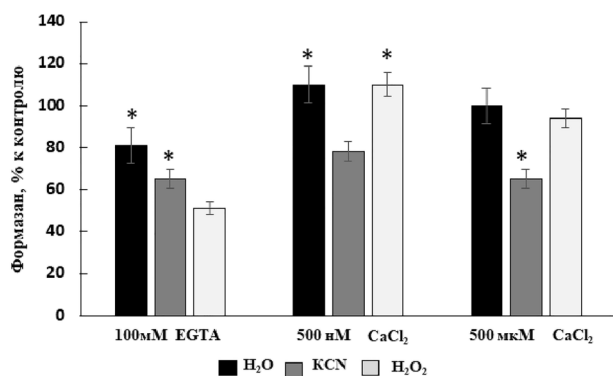


Рис. 2. Влияние EGTA и CaCl₂ на активность СОД в гомогенате из корней проростков гороха. Расчет проводили, сравнивая значения СОД, полученные в опытных вариантах (EGTA, CaCl₂) со значениями, полученными при добавлении к супернатанту воды (контроль). % ингибирования рассчитывали, сравнивая значение “H₂O” и значение СОД, полученное при добавлении ингибитора. В каждом из опытных вариантов проводили ингибиторный анализ и результаты сравнивали с аналогичными (100 мМ EGTA/500 нМ CaCl₂/500 мкМ CaCl₂) без добавления ингибиторов. * - $p < 0.05$.

следует упомянуть локализацию различных форм СОД в растительной клетке. Cu,Zn-СОД считается наиболее широко распространенной формой и обнаружена в цитоплазме и большинстве внутриклеточных органелл [2], Fe-СОД преимущественно локализуется в различных участках хлоропластов, тогда как Mn-СОД – в митохондриях и пероксисомах [2]. При этом в большинстве органелл расположены компоненты и других сигнальных систем, как, например, растворимая аденилатциклаза и нуклеотид-зависимые кальциевые ионные каналы [22, 23]. Тем самым, внутриклеточные органеллы растений выполняют роль сигнальных микродоменов. В частности, они участвуют в ретроградной передаче сигнала в клетке, в том числе путем генерации H₂O₂ [24]. Так, в литературе есть сведения о том, что повышенный синтез H₂O₂ пероксисомами способствует индукции экспрессии генов, определяющих адаптацию растений к стрессу и/или толерантности, тогда как пероксид водорода, образуемый в хлоропластах, обеспечивает экспрессию генов, связанных с синтезом вторичных сигнальных молекул [25]. Более того, H₂O₂, поступающий от хлоропластов и пероксисом, модулирует транскрипцию генов, участвующих в ретроградной регуляции сигналинга митохондрий [25].

Таким образом, вторичные мессенджеры аденилатциклазной и кальциевой сигнальных систем сАМР и Ca²⁺ могут оказывать

модулирующий эффект на активность СОД из клеток корней проростков гороха. Эндогенный сАМР действует опосредованно, а Ca²⁺, вероятно, могут дозозависимо взаимодействовать с активным центром каждой из форм этого фермента. При этом формы СОД обладают индивидуальной чувствительностью к ионам кальция, что позволяет точно передавать и интегрировать внутриклеточные сигналы.

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

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта исследований СИФИБР № 0277-2021-0004.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dvořák P., Krasylenko Y., Zeiner A., Šamaj J., Takáč T. 2021. Signaling toward reactive oxygen species-scavenging enzymes in plants. *Front. Plant Sci.* **11**, 618835. doi 10.3389/fpls.2020.618835
- Бараненко В.В. 2006. Супероксиддисмутаза в клетках растений. *Цитология.* **48** (6), 465–474.
- Del Rio L. A., Sandalio L.M., Altomare D., Zilinskas B. 2003. Mitochondria and peroxisomal manganese superoxide dismutase: Different expression during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **54**, 923–933. doi 10.3389/fpls.2013.00191
- Herbette S., Lene C., de Iabrouhe D., Drevet J., Roeckel-Drevet P. 2003. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, photohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. *Physiol. Plant.* **119**, 418–428.
- Zameer R., Fatima K., Azeem F., Hussah I.M. AlGwaiz H.I.M, Sadaqat M., Rasheed A., Batool R., Shah A.N., Zaynab M., Shah A.A., Attia K.A., AlKahtani M.D.F., Fiaz S. 2022. Genome-wide characterization of superoxide dismutase (SOD) genes in *Daucus carota*: Novel insights into structure, expression, and binding interaction with hydrogen peroxide (H₂O₂) under abiotic stress condition. *Front. Plant Sci.* **13**, 870241. doi 10.3389/fpls.2022.870241
- Babitha M.P., Bhat S.G., Prakash H.S., Shetty H.S. 2002. Different induction of superoxide dismutase in downy mildew-resistant and -susceptible genotypes of pearl millet. *Plant Pathol.* **51** (4), 480–486. doi 10.1046/j.1365-3059.2002.00733.x

7. Casano L.M., Gomes L.D., Lascano H.R., Gonzales C.A., Trippi V.S. 1997. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell Physiol.* **38**, 433–440. doi 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029186
8. Yan J., Guan L., Sun Y., Zhu Y., Liu L., Lu R., Jiang M., Tan M., Zhang A.C. 2015. Calcium and ZmCCaMK are involved in brassinosteroid-induced antioxidant defense in maize. *Plant Cell Physiol.* **56** (5), 883–896. doi 10.1093/pcp/pcv014
9. Blanco E., Fortunato S., Viggiano L., Concetta de Pinto M. 2020. Cyclic AMP: A polyhedral signalling molecule in plants. *J. Mol. Sci.* **21**, 4862. doi 10.3390/ijms21144862
10. Beuchamp I., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276–287. doi 10.1016/0003-2697(71)90370-8
11. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. 2011. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method. *Plant Cell Rep.* **30**, 125–132. doi 10.1007/s00299-010-0950-5
12. Ahmed H., Schott E.J., Gauthier J.D., Vasta J.R. 2003. Superoxide dismutases from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: Purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. *Anal. Biochem.* **318**, 132–141. doi 10.1016/S0003-2697(03)00192-1
13. Ma Yi, Zhao Y., Robin K. Walker R.K., Berkowitz G.A. 2013. Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca²⁺-dependent protein kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca²⁺ signal. *Plant Physiol.* **163**, 1459–1471. doi 10.1104/pp.113.226068
14. Choi W.G., Toyota M., Kim S.H., Hilleary R., Gilroy S. 2014. Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 6497–6502. doi 10.1073/pnas.1319955111
15. Gaupels F., Durner J., Kogel K.-H. 2017. Production, amplification and systemic propagation of redox messengers in plants? The phloem can do it all! *New Phytol.* **214** (2), 554–560. doi 10.1111/nph.14399
16. Kunos V., Cséplő M., Seress D., Eser A., Kende Z., Uhrin A., Bányai J., Bakonyi J., Pál M., Mészáros K. 2022. The stimulation of superoxide dismutase enzyme activity and its relation with the pyrenophora teres f. teres infection in different barley genotypes. *Sustainability.* **14** (2597), 1–15. doi 10.3390/su14052597
17. Sairam R.K., Vasanthan B., Arora A. 2011. Calcium regulates gladiolus flower senescence by influencing antioxidative enzymes activity. *Acta Physiol. Plant.* **33**, 1897–1904. doi 10.1007/s11738-011-0734-8
18. Hu X., Jiang M., Zhang J., Zhang A., Lin F., Tan M. 2007. Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O₂ production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. *New Phytol.* **173**, 27–38. doi 10.1111/j.1469-8137.2006.01888.x
19. Jarratt-Barnham E., Wang L., Ning Y., Davies Y.M. 2021. The complex story of plant cyclic nucleotide-gated channels. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 874. doi 10.3390/ijms22020874
20. Saxena I., Srikanth S., Chen Z. 2016. Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response. *Front. Plant Sci.* **7**, 570. doi 10.3389/fpls.2016.00570
21. Швартау В.В., Вирыч П.А., Маковейчук Т.И., Артеменко А.Ю. 2014. Кальций в растительных клетках. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* **22** (1), 19–32. doi 10.15421/011403
22. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Криволапова Н.В., Копытчук В.Н. 2007. Функционирование “растворимой” и связанной с мембраной форм аденилатциклазы в органеллах растительных клеток при биотическом стрессе. *Биол. мембраны.* **24** (5), 363–371.
23. Романенко А.С., Ломоватская Л.А. 2017. Влияние экзополисахаридов бактериального возбудителя кольцевой гнили на субклеточную локализацию регулируемых циклическими нуклеотидами ионных каналов (CNGC) в клетках корней картофеля. *Биол. мембраны.* **34** (3), 231–238. doi 10.7868/S0233475517020062
24. Юрина Н.П., Одинцова М.С. 2019. Ретроградная сигнальная система хлоропластов. *Физиол. растений.* **66** (4), 243–255. doi 10.1134/S0015330319040146
25. Sewelama N., Jasperta N., Van Der Kelenc K., Tognetti V.B., Schmitza J., Frerigmanne H., Stahl E., Zeier J., Van Breusegem F., Maurino V.G. 2014. Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially. *Mol. Plant.* **7**, 1191–1210. doi 10.1093/mp/ssu070

Different Forms of Superoxide Dismutase from Pea Seedling Roots Differ in Sensitivity to cAMP and Calcium

© 2024 г. L. A. Lomovatskaya¹*, O. V. Zaharova¹, A. M. Goncharova¹, A. S. Romanenko¹,
T. A. Kishinskaya²

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

² *Baikal State University, Irkutsk, 664002 Russia*

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

It has been established that cyclic adenosine monophosphate (cAMP), a second messenger of the adenylate cyclase signaling system, and Ca^{2+} are able to dose-dependently modulate the activity of various forms of superoxide dismutase (SOD) in the root cells of pea seedlings of the Rondo variety. The effect of cAMP on SOD activity in pea root cells was studied on intact seedlings by incubating their roots in 50 nM n-dibutyryl-cAMP, a fat-soluble analogue of cAMP, which led to an increase in the intracellular concentration of cAMP. Incubation of similar roots in 800 μM suramin, an inhibitor of transmembrane adenylate cyclase, contributed to a significant decrease in endogenous cAMP levels. In each of these variants, the SOD activity measured in the supernatant obtained from the root homogenate changed. Under the influence of n-dibutyryl-cAMP, the total SOD activity increased to 230%; SOD inhibitors, 3 mM KCN or 3 mM H_2O_2 , added to the homogenate, reduced its activity (180 and 190% of the control, respectively). During incubation with suramin, the total activity decreased to 40% of the control value, while with the additional use of SOD inhibitors it decreased to 50–60%. Incubation of seedlings in 400 μM LaCl_3 solution resulted in a decrease in total SOD activity to 73% and in the presence of 3 mM KCN, to 56% of the control, and when 3 mM H_2O_2 was added to the homogenate, to 67%. A similar incubation of seedlings in 1 mM EGTA led to a decrease in total activity by 32%, and the inhibitors had no additional effect. The effect of calcium deficiency or excess on SOD activity was studied in a homogenate of pea seedling roots. When a calcium ion chelator, 100 mM EGTA, was added to the root homogenate, a decrease in the total SOD activity to 81% was observed; when inhibitors (H_2O_2 or KCN) were added, an even greater decrease in SOD activity occurred, up to 65 and 51%, respectively. The addition of 500 nM CaCl_2 to the homogenate slightly increased the total SOD activity; KCN reduced SOD activity by approximately 20%, and H_2O_2 had no effect on this indicator. When a higher concentration of CaCl_2 , 500 μM , was added, the total activity did not change (100%), in the variant with KCN it decreased by 30%, and when H_2O_2 was added it remained almost unchanged. We conclude that cAMP most likely has an indirect effect on SOD activity, while calcium ions probably act directly on the active site of the enzyme molecule; Moreover, each form of SOD differs in sensitivity to calcium.

Keywords: Cu, Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD, pea seedling root, cAMP, Ca^{2+}

ОРГАНИЗАЦИЯ РЕЗЕРВНОГО ПУЛА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ С УДАЛЕННЫМИ КОМПОНЕНТАМИ БЕЛКОВОЙ ЖИДКОЙ ФАЗЫ

© 2024 г. Н. В. Нифантова^a, А. Г. Шишков^a, О. М. Коренькова^a, Е. С. Сопова^{a, b},
Л. Бродин^b, О. В. Шупляков^{a, b, *}

^a Санкт-Петербургский государственный университет, Институт трансляционной биомедицины,
лаборатория биологии синапсов, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^b Отдел нейронаук, Каролинский институт, Стокгольм, 17177 Швеция

*e-mail: oleg.shupliakov@ki.se

Поступила в редакцию 02.10.2023

После доработки 05.11.2023

Принята к публикации 08.11.2023

Белок эндофилин А, который в геноме млекопитающих кодируется тремя генами – эндофилин А1, А2 и А3, участвует в регуляции синаптического цикла на стадиях экзо- и эндоцитоза и присутствует в резервном пуле синаптических везикул (СВ), где его функция не ясна. Эксперименты, проведенные *in vitro*, позволяют предполагать, что посредством SH3-домен-опосредованных взаимодействий эндофилин А обеспечивает вхождение ряда белков в состав жидкой белковой фазы, организующей СВ в резервном пуле. Мы исследовали эффект удаления генов эндофилина и одного из его партнеров, участвующих в этих взаимодействиях, – динамина, на организацию СВ в синапсах, образованных кортикальными нейронами в культуре. Исследования показали, что удаление генов эндофилина не приводит к изменениям плотности СВ в резервном пуле. В то же время удаление генов динамина 1 и динамина 3 вызывает значительное увеличение плотности везикул. Мы предполагаем, что функции эндофилина в синапсах дополняются другими SH3-домен-содержащими белками, которые являются компонентами белковой жидкой фазы резервного пула СВ.

Ключевые слова: синапс, резервный пул синаптических везикул, разделение жидких фаз, эндофилин, динамин, цикл синаптических везикул

DOI: 10.31857/S0233475524020087, EDN: xkdssv

ВВЕДЕНИЕ

Резервный пул синаптических везикул (СВ) – специализированный немембранный компартмент химического синапса, находящийся на расстоянии около 100 нм над активной зоной и содержащий везикулы, заполненные нейромедиатором, которые используются для синаптической передачи при повышенной активности синапса [1, 2]. Истощение запаса СВ в резервном пуле (РП) приводит к невозможности длительного поддержания синаптической передачи и к синаптической депрессии. Основным структурным компонентом РП является белок синапсин, способный при определенных условиях переходить из растворимого состояния в состояние жидкой фазы, образуя белковый конденсат, включающий в себя СВ [3–5]. В состоянии покоя в РП также локализуется ряд эндоцитозных белков [6], в частности N-BAR белок эндофилин А [6–8].

Исследования, проведенные с изолированными белками, показали, что эндофилин способен образовать жидкую фазу вместе в синапсине. Его присутствие позволяет войти в состав жидкой фазы целому ряду других белков, находящихся в РП *in vivo*, таких как интерсектин, динамин и амфилизин [9]. Это свойство делает эндофилин кандидатом на роль главного регулятора состава жидкой фазы и структуры РП. Выполняет ли эндофилин эту функцию в живом синапсе, остается неизвестным.

В данной работе мы исследовали эффект удаления генов эндофилина на организацию РП в синапсах, образованных кортикальными нейронами в культуре, в состоянии покоя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток и электронная микроскопия. Кортикальные нейроны с тройным нокаутом по

генам эндофилина A1–3 (*EndoТКО*; $n = 3$), с двойным нокаутом по генам динамина 1,3 (*Dyn1,3DKO*; $n = 3$) и контрольных животных ($n = 3$) культивировали согласно описанному ранее протоколу [7, 10, 11]. Мыши *EndoТКО* и *Dyn1,3DKO* получены скрещиванием животных с нокаутом отдельных генов, как описано ранее [10, 11]. Препараты культур нейронов были приготовлены в лаборатории P. De Camilli (Yale University School of Medicine, USA) и любезно предоставлены проф. P. De Camilli. Первичные культуры клеток получали из животных на стадии развития P0 в одинаковых условиях. Нейроны фиксировали через 2 недели *in vitro* в 1.3% глutarовом альдегиде, приготовленном на 66 мМ натрий-какодилатном буфере, постфиксировали в 1% OsO_4 , 1.5% $K_4Fe(CN)_6$ в 0.1 М натрий-какодилатном буфере, окрашивали в 0.5% уранилацетате, дегидратировали в спиртах, заключали в смолу Embed 812 (EMS). Серии из 5–10 ультратонких 70-нм срезов изготавливали на ультратоме Leica UC и помещали на покрытые формваром бленды. Срезы контрастировали в 1% водном растворе уранилацетата и цитрата свинца, исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Jeol-1400 с камерой Olympus-SIS Veleta (2048×2048), фотографировали на увеличениях ×30000 и ×50000.

Анализ изображений и статистика. Синапсы отбирали случайным образом на серийных срезах. Для сравнения гомогенных популяций в различных культурах исследования проводили на асимметричных синапсах. Для анализа электронных микрофотографий и измерения параметров РП использовали ПО Image J. Значения площади РП на идентифицированном центральном срезе синапса нормализовали к длине активной зоны. На некоторых срезах было сложно провести измерение всех интересующих структур, например, из-за наклонной ориентации плоскости среза. С этим связаны различия в количестве измерений отдельных параметров в графиках. Статистическую обработку данных проводили с помощью ПО Prism 9 (GraphPad).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При тройном нокауте по генам эндофилина A1–3 (*EndoТКО*) фенотипическим признаком межнейронных синапсов на ультраструктурном уровне является наличие клатриновых везикул в непосредственной близости от активной зоны [10]. Это связано с тем, что основной функцией эндофилина при эндоцитозе является привлечение (рекрутинг) к мембране везикул фосфоинозитидфосфатазы синаптоянина, которая запускает процесс снятия клатринового окаймления [10, 12].

Действительно, в синапсах *EndoТКО* вокруг кластера СВ мы обнаружили клатрин-окаймленные везикулы (КВ) (рис. 1в). Преимущественно КВ находились на расстоянии до 200 нм от границы кластера. Количество КВ в этой зоне составило в среднем 24.82 против 2.92 КВ/мкм² в контроле ($p < 0.0001$, *t*-тест; рис. 1у). В ряде случаев КВ наблюдали в аксоплазме на расстоянии более 1 мкм от границы кластера (максимум – 1.44 мкм), далеко за пределами зоны эндоцитоза.

Синапсы *EndoТКО* имели выраженные кластеры СВ, включающие везикулы РП (рис. 1в). Площадь РП в синапсах *EndoТКО* была в среднем в 1.6 раза меньше, чем в контроле ($p = 0.0108$, *t*-тест; рис. 1з), что объясняется замедлением эндоцитоза в синапсах. Неполное блокирование клатрин-зависимого эндоцитоза, вероятно, является следствием частичного дублирования функций эндофилина другими белками, такими как интерсектин и амфифизин, которые имеют свойство взаимодействовать с партнерами эндофилина [13]. Чтобы выяснить, повлияло ли отсутствие эндофилина на структуру РП, мы измерили плотность расположения СВ в кластерах синапсов *EndoТКО* и в контроле. Статистически значимых различий между этими группами выявлено не было (*t*-тест; рис. 1ж).

Для сравнения мы исследовали плотность расположения СВ в синапсах с двойным нокаутом по генам динамина (*Dyn1,3DKO*). Как и синаптоянин, динамины 1,3 взаимодействуют с эндофилином в процессе эндоцитоза [8] и необходимы для поддержания эндоцитоза в центральных синапсах [11]. Фенотип *Dyn1,3DKO* характеризуется многочисленными инвагинациями пресинаптической мембраны, образующими клатрин-окаймленные ямки [11, 14], что также наблюдалось в наших экспериментах. Размеры РП были значительно уменьшены (рис. 1д, 1з). Кластеры СВ были обнаружены только в отдельных синапсах, а в большинстве отсутствовали, что объясняется полной блокадой клатрин-зависимого эндоцитоза в отсутствие динамина и неспособностью клатрин-независимых механизмов эффективно формировать СВ [11]. Плотность везикул в РП оказалась существенно выше в синапсах *Dyn1,3DKO* по сравнению с *EndoТКО* ($p < 0.0001$) (рис. 1г, 1е, 1ж). Различий в средней длине активной зоны в исследованных синапсах обнаружено не было (рис. 1к).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования последних лет показали, что ключевую роль в организации жидкой фазы везикул РП играет белок синапсин [4, 5]. Наличие дополнительных белков в составе РП позволяет

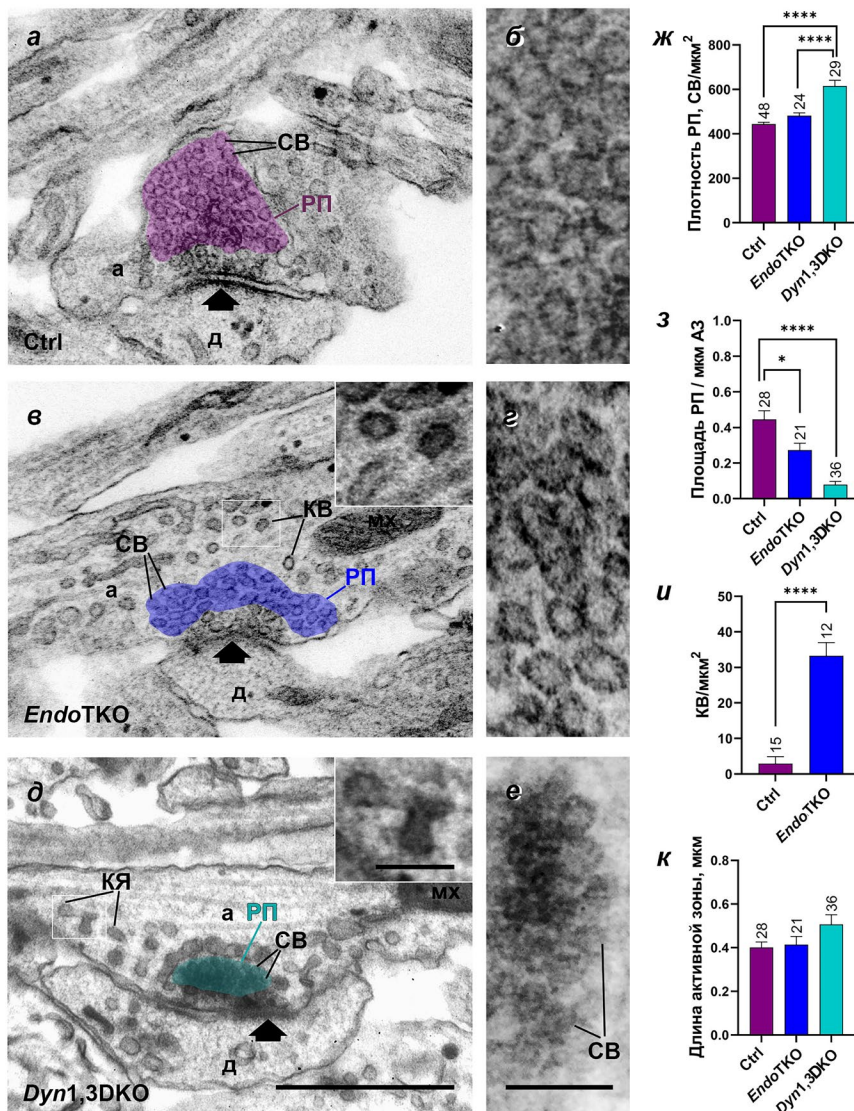


Рис. 1. Эффекты удаления генов эндофилина и динамина на организацию резервного пула СВ в асимметричных синапсах в культуре кортикальных нейронов. *a, в, д* – Электронные микрофотографии асимметричных синапсов в контрольной культуре нейронов (*a*), в культуре нейронов с тройным нокаутом по генам эндофилина (*в*) и с двойным нокаутом по генам динамина 1 и 3 (*д*) в покое. Зоны, содержащие клатриновые везикулы (*в*) и клатрин-окаймленные ямки (*д*), выделены белой рамкой и показаны на вставках при большем увеличении. На микрофотографиях *б, з, е* участки РП, изображенных на *a, в, д*, показаны при большем увеличении. Масштаб для *a, в, д*: 500 нм; для вставок на *в, д*: 100 нм; для *б, з, е*: 100 нм. Обозначения: *a* – аксон, *д* – дендрит, СВ – синаптические везикулы, РП – резервный пул СВ, мх – митохондрия, КВ – клатрин-окаймленные везикулы, КЯ – клатрин-окаймленные ямки, черная стрелка – активная зона. *ж, з* – Плотность (*ж*) и площадь (*з*) резервных пулов в контрольных, *EndoTKO* и *Dyn1,3DKO* синапсах; площадь РП нормализована к длине активной зоны. *и* – Плотность КВ в зоне 200 нм от границы РП в контрольных и *EndoTKO* синапсах. *к* – Средняя длина активных зон в исследованных группах. Данные представлены как среднее ± SEM. Цифры над столбцами указывают число исследованных синапсов.

менять свойства жидкой фазы, вследствие чего может изменяться динамика и организация РП при синаптической активности [3]. Так, в исследованиях *in vitro* было показано, что жидкая фаза СВ и синапсина способна рекрутировать α-синуклеин, что снижает плотность СВ в кластере [15]. В гиппокампальных синапсах с тройным

нокаутом генов α, β, γ-синуклеинов везикулы РП кластеризуются плотнее, чем в синапсах дикого типа [16]. В отношении эндоцитозных белков, находящихся в РП в состоянии покоя и имеющих SH3-домены, способные взаимодействовать с синапсином, также высказывались предположения, что они регулируют восстановление структуры РП

при рекластеризации СВ после синаптической активности и необходимы для поддержания этой структуры в покое [13].

В недавних исследованиях было показано, что эндоцитозный белок эндофилин способен формировать жидкую фазу совместно с синапсином *in vitro* [9]. Коэкспрессия эндофилина и синапсина в COS7 клетках повышала способность смешанной жидкой фазы кластеризовать СВ-подобные везикулы и увеличивала площадь таких псевдо-синаптических кластеров. Однако какое значение имеет эндофилин для поддержания структуры РП в живом синапсе, осталось невыясненным [9].

В настоящей работе на кортикальных нейронах мы показали, что генетическое удаление эндофилинов А1, А2 и А3 в синапсах не нарушает плотность упаковки везикул в РП, что указывает на то, что эндофилин и белки, которые включаются в резервный пул с его помощью, не оказывают существенного влияния на организацию жидкой фазы СВ. Неожиданным оказалось значительное увеличение плотности везикул в РП при удалении динаминов 1 и 3. Возможным объяснением этому может быть отсутствие дублирования функций динамина при организации жидкой фазы. Для выяснения роли динамина в организации РП нужны дальнейшие исследования.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке РФФ (№ 21–15–00227) и Шведского Совета по научным исследованиям (grants 2020–01731, 2020–01952), Шведского фонда исследований мозга (Hjärnfonden), а также гранта СПбГУ (ID93026594). Мы бы хотели поблагодарить д-ра I. Milosević (University of Oxford) за помощь в получении культур и обсуждении результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие принципам этики. Работа выполнена с соблюдением международных принципов по использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pieribone V.A., Shupliakov O., Brodin L., Hilfiker-Rothenfluh S., Czernik A.J., Greengard P. 1995. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature*, **375**, 493–497.
- Rizzoli S.O., Betz W.J. 2004. The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science*, **303**, 2037–2039.
- Brodin L., Milovanovic D., Rizzoli S.O., Shupliakov O. 2022. alpha-Synuclein in the synaptic vesicle liquid phase: Active player or passive bystander? *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 891508.
- Milovanovic D., Wu Y., Bian X., De Camilli P. 2018. A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science*, **361**, 604–607.
- Pechstein A., Tomilin N., Fredrich K., Vorontsova O., Sopova E., Evergren E., Haucke V., Brodin L., Shupliakov O. 2020. Vesicle clustering in a living synapse depends on a synapsin region that mediates phase separation. *Cell Rep.*, **30**, 2594–2602.e3.
- Shupliakov O. 2009. The synaptic vesicle cluster: a source of endocytic proteins during neurotransmitter release. *Neuroscience*, **158**, 204–210.
- Denker A., Kröhnert K., Bückers J., Neher E., Rizzoli S.O. 2011. The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17183–17188.
- Sundborger A., Soderblom C., Vorontsova O., Evergren E., Hinshaw J.E., Shupliakov O. 2011. An endophilin-dynamain complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Sci.*, **124**, 133–143.
- Yoshida T., Takenaka K.I., Sakamoto H., Kojima Y., Sakano T., Shibayama K., Nakamura K., Hanawa-Suetsugu K., Mori Y., Hirabayashi Y., Hirose K., Takamori S. 2023. Compartmentalization of soluble endocytic proteins in synaptic vesicle clusters by phase separation. *iScience*, **26**, 106826.
- Milosevic I., Giovedi S., Lou X., Raimondi A., Collesi C., Shen H., Paradise S., O'Toole E., Ferguson S., Cremona O., De Camilli P. 2011. Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron*, **72**, 587–601.
- Raimondi A., Ferguson S.M., Lou X., Armbruster M., Paradise S., Giovedi S., Messa M., Kono N., Takasaki J., Cappello V., O'Toole E., Ryan T.A., De Camilli P. 2011. Overlapping role of dynamain isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*, **70**, 1100–1114.
- Gad H., Ringstad N., Low P., Kjaerulf O., Gustafsson J., Wenk M., Di Paolo G., Nemoto Y., Crun J., Ellisman M.H., De Camilli P., Shupliakov O., Brodin L. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron*, **27**, 301–312.
- Шишков А.Г., Нифантова Н.В., Коренькова О.М., Сопова Е.С., Бродин Л., Шупляков О.В. 2023. BAR-домен-содержащие белки как возможные регуляторы белковой жидкой фазы в нервных окончаниях в центральной нервной системе. *Биол. мембраны*, **40** (3), 155–171.
- Shishkov A.G., Nifantova N.V., Korenkova O.M., Sopova E.S., Brodin L., Shupliakov O. 2023. BAR domain proteins as putative regulators of the protein liquid phase in nerve terminals in the central nervous system. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, **17**, 69–82.
- Ferguson S.M., Brasnjo G., Hayashi M., Wolfel M., Collesi C., Giovedi S., Raimondi A., Gong L.W.,

- Ariel P., Paradise S., O'Toole E., Flavell R., Cremona O., Miesenbock G., Ryan T.A., De Camilli P. 2007. A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science*, **316**, 570–574.
16. Hoffmann C., Sansevrino R., Morabito G., Logan C., Vabulas R.M., Ulusoy A., Ganzella M., Milovanovic D. 2021. Synapsin condensates recruit alpha-synuclein. *J. Mol. Biol.*, **433**, 166961.
17. Vargas K.J., Schrod N., Davis T., Fernandez-Busnadiego R., Taguchi Y.V., Laugks U., Lucic V., Chandra S.S. 2017. synucleins have multiple effects on presynaptic architecture. *Cell Rep.*, **18**, 161–173.

Organization of the Reserve Pool of Synaptic Vesicles in Nerve Terminals Lacking Protein Liquid Phase Components

© 2024 г. N. V. Nifantova¹, A. G. Shishkov¹, O. M. Korenkova¹, E. Sopova^{1,2}, L. Brodin²,

O. Shupliakov^{1,2,*}

¹*Institute of Translational Biomedicine, St.-Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

²*Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, 17177 Sweden*

*e-mail: oleg.shupliakov@ki.se

Protein endophilin A regulates the synaptic vesicle cycle during exo- and endocytosis, and it is present in the reserve pool of synaptic vesicles (SVs), where its function is unknown. In vitro experiments suggest that endophilin via its SH3 domain interactions incorporates several components into the protein liquid phase that organizes SVs in the reserve pool. We investigated the effect of deletion of the genes encoding endophilin and one of its binding partners, dynamin, on the organization of SVs in living synapses formed by cortical neurons in culture. Experiments showed that deletion of endophilin genes does not change the density of SVs in the reserve pool. At the same time, deletion of the major dynamins 1 and 3 leads to a significant increase in the vesicle density. These results suggest that other SH3-domain-containing proteins, which are components of the protein liquid phase, complement the function of endophilin in the SV reserve pool.

Keywords: synapse, reserve pool of synaptic vesicles, liquid–liquid phase separation, endophilin, dynamin, synaptic vesicle cycle