

ISSN 0233-4755

Том 40, Номер 2

Март - Апрель 2023



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 40, номер 2, 2023

ОБЗОРЫ

Влияние наночастиц перфторуглеродов на кровь как клеточную систему

И. Н. Кузнецова, А. Ю. Лянгузов

83

Электронный транспорт в мембранах хлоропластов теневыносливого и светолюбивого видов традесканции

*И. С. Сусличенко, М. А. Беньков, Д. А. Ковалишина,
М. О. Петрова, Б. В. Трубицин, А. Н. Тихонов*

92

Обратимое повышение устойчивости клеток карциномы А-431 к TRAIL-индуцированному апоптозу в конфлюэнтных культурах соответствует снижению представленности рецепторов DR4 и DR5

*Р. С. Фадеев, Н. В. Долгих, А. В. Чеканов, А. С. Сенотов, К. С. Краснов,
М. И. Кобякова, Я. В. Ломовская, И. С. Фадеева, В. С. Акатов*

105

Теоретическое объяснение вариабельности активации тромбоцитов через рецептор GPVI

А. А. Мартьянов, М. Г. Степанян, А. Н. Свешникова

112

Применение N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин и α,ω -гексадекандикарбоновой кислоты для определения коэффициентов H^+/O комплексов III и IV дыхательной цепи митохондрий печени в условиях свободного дыхания

В. Н. Самарцев, А. А. Семенова, К. Н. Белослудцев, М. В. Дубинин

122

Катионные липоаминокислотные производные диэтаноламина как потенциально мембрано-активные антибактериальные агенты

М. К. Гусева, З. Г. Дениева, У. А. Буданова, Ю. Л. Себякин

133

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Моноклональная линия клеток, коэкспрессирующих генетически кодируемые сенсоры cAMP и Ca^{2+}

П. Д. Котова, О. А. Рогачевская, С. С. Колесников

142

Сравнение изменений в содержании стеринах плазмалеммы и тонопласта при окислительном и осмотических стрессах

*Н. В. Озолина, В. В. Гурина, И. С. Капустина,
Е. В. Спиридонова, В. Н. Нурминский*

147

PERSONALIA

Памяти Владимира Петровича Скулачева (21.02.1935–05.02.2023)

151

Contents

Vol. 40, No. 2, 2023

REVIEWS

Influence of Perfluorocarbon Nanoparticles on Blood As a Cellular System

I. N. Kuznetsova, A. Yu. Lyanguzov

83

Electron Transport in Chloroplast Membranes of Shade-Tolerant and Light-Loving Tradescantia Species

*I. S. Suslichenko, M. A. Benkov, D. A. Kovalishina,
M. O. Petrova, B. V. Trubitsin, A. N. Tikhonov*

92

Reversible Increase in Resistance of A-431 Carcinoma Cells to TRAIL-Induced Apoptosis in Confluent Cultures Corresponds to a Decrease in Expression of DR4 and DR5 Receptors

*R. S. Fadeev, N. V. Dolgikh, A. V. Chekanov, A. S. Senotov, K. S. Krasnov,
M. I. Kobayakova, Ya. V. Lomovskaya, I. S. Fadeeva, V. S. Akatov*

105

Theoretical Explanation for the Variability in Platelet Activation through the GPVI Receptor

A. A. Martyanov, M. G. Stepanyan, A. N. Sveshnikova

112

Application of N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-Phenylenediamine and α,ω -Hexadecanedioic Acid for Determination of the H/O Ratios of Complexes III and IV of the Liver Mitochondrial Respiratory Chain under Free Respiration Conditions

V. N. Samartsev, A. A. Semenova, K. N. Belosludtsev, M. V. Dubinin

122

Cationic Lipoaminoacid Derivatives of Diethanolamine as Potentially Membrane-Active Antibacterial Agents

M. K. Guseva, Z. G. Denieva, U. A. Budanova, Yu. L. Sebyakin

133

SHORT COMMUNICATIONS

Genetically Encoded Sensors of cAMP and Ca^{2+}

P. D. Kotova, O. A. Rogachevskaja, S. S. Kolesnikov

142

Comparison of Changes in the Content of Plasma Membrane and Tonoplast Sterols under Oxidative and Osmotic Stress

N. V. Ozolina, V. V. Gurina, I. S. Kapustina, E. V. Spiridonova, V. N. Nurminsky

147

PERSONALIA

In Memory of Vladimir Petrovich Skulachev (21.02.1935–05.02.2023)

151

УДК 544.032.14

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ПЕРФТОРУГЛЕРОДОВ НА КРОВЬ КАК КЛЕТОЧНУЮ СИСТЕМУ

© 2023 г. И. Н. Кузнецова^а *, А. Ю. Лянгузов^б

^аРоссийский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, 191024 Россия

^бСанкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: kuz-ir@inbox.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 09.09.2022 г.

Принята к публикации 13.09.2022 г.

Рассмотрено влияние наночастиц перфторуглеродов (ПФУ) на функционирование клеток крови. Показано, что эмульгированные наночастицы ПФУ в малых объемах влияют на газотранспортную функцию крови, увеличивая скорость диффузии кислорода от эритроцитов к тканям. Обнаружено, что наночастицы ПФУ оказывают влияние и на состояние клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) дозозависимым способом. Предполагается, что в зависимости от дозы эмульсии, т.е. плотности наночастиц в окружающем пространстве клеток, реакция рецепторного аппарата может вызвать активацию или ухудшение их функционирования.

Ключевые слова: наночастицы, перфторуглероды, фосфолипиды клетки крови

DOI: 10.31857/S0233475523010061, **EDN:** CNUXXW

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы на основе перфторуглеродов (ПФУ) и фосфолипидов (ФЛ) являются активным началом эмульсионных препаратов, которые рассматривают как кровезаменители, способные переносить кислород. Создание инфузионных сред данного типа является социально значимой задачей, решение которой позволит снизить потребность в донорской крови, особенно в условиях критических ситуаций. Создание и изучение сред данного типа было начато в 60–70 гг. прошлого века. За сравнительно небольшой срок, к началу следующего тысячелетия, проблема прошла несколько этапов: от выбора объекта исследования (ПФУ, эмульгаторы) и решения ряда технологических вопросов получения эмульсий до создания эмульсионных препаратов и их изучения в эксперименте и клинике.

В табл. 1 приведены сводные данные по составу препаратов, разрешенных к клиническому применению, представленные в работе [1] (расшифровка названий ПФУ см. в примечании к табл. 1).

Для первых двух препаратов к перфтордекалину (ПФД), составляющему большую часть масляной фазы, введены добавки перфторированных соединений ПФТПА и ПФМЦП, более высококипящих и менее растворимых в воде. В качестве эмульгатора для Флюосола и Перфторана исполь-

зован водорастворимый плуроник F-68 или проксанол 268 соответственно. По физико-химическим свойствам препараты незначительно отличаются друг от друга. Их общий недостаток заключается в необходимости хранения в замороженном состоянии из-за недостаточной стабильности. В случае препарата Оксигент к его фторуглеродной основе ПФОБ добавлен ПФДБ, который имеет более высокую температуру кипения и менее растворим в воде. Преимуществом препарата Оксигент является возможность его хранения в незамороженном состоянии. Кроме того, ПФОБ быстро выводится из организма, примерно с той же скоростью, что и ПФД. Для всех ПФУ характерно отсутствие химической связи с газами крови. Различия эмульсионных препаратов, наряду с ПФУ-фазой, касаются в основном водно-солевого состава. Однако до настоящего времени ни один из названных препаратов (табл. 1) не вышел на рынок лекарственных средств, предназначенных для внутривенного введения.

Общей причиной неудач разработчиков и исследователей этих препаратов является наличие побочных реакций системного характера (реактогенность) разной степени тяжести и выраженности [2–4]. Причиной проявления реактогенности является активация системы комплемента [5, 6]. Комплемент — это сложно организованная систе-

Таблица 1. Состав препаратов Флюосол-ДА (Япония), Перфторан (Россия), Оксигент (США) [1]

Составные части препаратов	Флюосол ДА	Перфторан	Оксигент		
			AF0104	AF0143	AF0144
			концентрация, % вес/объем		
ПФД	14	13	—	—	—
ПФТПА	6	—	—	—	—
ПМЦП	—	6.5	—	—	—
ПФОВ	—	—	90	87	58
ПФДБ	—	—	—	3	2
Плюроник F-68 (проксанол-268)	2.72	4	—	—	—
Фосфолипиды	0.4	—	4	5.4	3.6
Калия олеат	0.032	—	—	—	—
Буфер	CO_3^{2-}	CO_3^{2-}	PO_4^{3-}	PO_4^{3-}	PO_4^{3-}
Двухвалентные катионы	+	+	—	—	—

Примечание. ПФД — перфтордекалин; ПФТПА — перфтортрипропиламин; ПМЦП — перфторметилциклогексилпиперидин; ПФОВ — перфтороктилбромид; ПФДБ — перфтордецилбромид.

ма белковых агрегатов. Его активация вызывает изменения в микроциркуляторном звене, нарушает процессы тромбоцитарного и коагуляционного гомеостаза и оказывает влияние на функциональную активность и кооперацию клеток [7]. Причины проявления реактогенности эмульсионных препаратов при введении их пациентам до конца не установлены.

Согласно документам фармкомитета, предусмотрена оценка эффективности и безвредности препарата в условиях целостного организма.

По отношению к целому организму наночастицы эмульгированных ПФУ выступают как “биоматериал”. Биоматериал рассматривается как “нежизнеспособное вещество, используемое для взаимодействия с биологической системой в медицинских целях” [8]. Исследования таких взаимодействий с биологической системой требуют развития новых методологических подходов для создания эффективных инфузионных сред на основе ПФУ. Реальные условия применения эмульсий ПФУ в клинике предполагают совместную циркуляцию частиц ПФУ с большим количеством эритроцитов, поэтому функциональную активность эмульсий необходимо рассматривать в связи с газотранспортными и другими функциональными свойствами крови.

Отсюда вытекает постановка двух вопросов. Во-первых, каковы должны быть свойства наночастиц как биоматериала для доставки газов тканям при совместной циркуляции с кровью. Во-вторых, каким образом можно оценить взаимодействие биоматериала на основе ПФУ с кровью. Сложная организация крови как клеточной системы предполагает поэтапное изучение влияния наночастиц на функции клеток крови в модельных условиях *in vitro*. Анализ этих взаимодей-

ствий позволит оценить биологическую активность наночастиц, используемых для создания новых ПФУ-биопрепаратов.

В настоящем обзоре рассмотрены следующие вопросы:

- особенности газотранспортных свойств наночастиц в смешанной системе кровь/наночастицы эмульгированных ПФУ (эмульсия), а также методы контроля стабильности их структуры, т.е. качества ПФУ-препаратов;
- влияние наночастиц ПФУ на физиологический процесс доставки газов эритроцитами;
- анализ влияния наночастиц в различных дозах на морфофункциональные показатели клеток крови (эритроцитов, нейтрофилов, тромбоцитов);
- теоретическое обоснование и практическая значимость предложенных методических подходов.

ОСОБЕННОСТИ ГАЗОТРАНСПОРТНЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ПФУ ПРИ ЦИРКУЛЯЦИИ В УСЛОВИЯХ *in vivo*

ПФУ, используемые для медико-биологических целей — это прозрачные жидкости, по удельному весу в 2 раза тяжелее воды, практически не растворимые в воде и и плохо растворимые в других растворителях. Для использования в качестве инфузионной среды их диспергируют в водном эмульгирующем растворе ПАВ. Дисперсные наночастицы ПФУ представляют двухслойный шар, в центре которого находится жидкий ПФУ, а на его поверхности — структурно-механический барьер ПАВ, который обеспечивает стабильность частиц [9]. Толщина оболочки ПАВ составляет 5–10% от размера частиц [9, 10]. В настоящее время перспективным эмульгатором в составе ПФУ-пре-

парата принято считать природные фосфолипиды (ФЛ), использование которых обеспечивает тепловую стерилизацию конечной лекарственной продукции препарата (требование GMP). Для частиц размером 100–200 нм толщина фосфолипидной оболочки будет сопоставима с размером бислойных мембран [11].

Из-за отсутствия химической связи “ПФУ $\leftrightarrow$ O₂ и CO₂” частицы при внутривенном введении сохраняют способность к транспорту газов при обязательном сохранении своей корпускулярной природы. Способность к доставке газов частицами при совместной циркуляции с эритроцитами определяется временем их пребывания в сосудистом русле. Это требует высокой стабильности этих сред, т.е. длительного сохранения целостности структуры частиц ПФУ.

До практического использования эмульсионных ПФУ-препаратов в качестве инфузионной среды необходимо иметь критерии их стабильности *in vitro* более информативные, чем просто сохранение размера частиц [12].

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЦЕЛОСТНОСТИ СТРУКТУРЫ НАНОЧАСТИЦ

Стабильность эмульсионной инфузионной среды определяется сохранностью структуры частиц, их размера и прочности оболочки.

Тонкодисперсные эмульсии ПФУ являются мутными средами. ФЛ плохо растворимы в H₂O и в ПФУ. Поэтому в процессе диспергирования ПФУ наряду с двухслойными частицами ПФУ/ФЛ с прочно прикрепленным слоем эмульгатора могут находиться свободные липосомальные или мицеллярные структуры эмульгирующего компонента.

Качество эмульсии может быть охарактеризовано комплексом параметров. Разработаны методические подходы, которые позволяют получить информацию о прочности структуры частиц эмульгированных ПФУ [12]. Для определения размера и распределения частиц по размерам используют различные методы. Для оценки дисперсности коллоидных мутных сред наиболее быстрым и информативным является метод спектра мутности (СМ) [13]. В работе [14] были рассмотрены особенности метода СМ применительно к тонкодисперсным эмульсиям ПФУ и подобраны условия для определения среднего диаметра частиц. Метод не требует дополнительного определения концентрации частиц в исследуемом образце. В силу этого данный метод использовался также для оценки распределения частиц по размерам в эмульсиях после их центрифугирования и фракционирования.

Поверхностные свойства частиц характеризовали с помощью индекса взаимодействия K_t эмульсии с модифицированной сывороткой кро-

ви как модельной средой. В работе [15] обнаружены различия в реакции сыворотки крови при добавлении к ней эмульсии или ее эмульгатора в эквивалентных количествах. Добавление эмульсии к сыворотке вызывало резкое увеличение мутности τ . При введении тех же объемов эмульгатора значения τ не менялись. Разница в ответной реакции сыворотки на введение эмульсии ПФУ и эмульгатора связана с особенностями структуры частиц эмульсии ПФУ. При одинаковой исходной концентрации ПАВ в эмульсии и эмульгаторе его распределение в объеме этих сред различно. В растворе эмульгатора молекулы ПАВ распределены равномерно. В эмульсиях эмульгатор, стабилизируя частицы, находится в основном на их поверхности, образуя структурно-механический барьер с повышенной концентрацией молекул ПАВ. Макромолекулы плазмы могут легко сорбироваться на такой поверхности, изменяя ее оптические свойства. Предложен критерий K_t , который позволяет количественно определить степень выраженности реакции сыворотки крови на введение эмульсии с помощью определения индекса взаимодействия или относительной мутности: $K_t = \tau_1/\tau_2$, где τ_1 – мутность исследуемой смеси сыворотка/эмульсия ПФУ (опыт); τ_2 – мутность смеси сыворотка/физиологический раствор при соответствующих соотношениях компонентов (контроль).

В данном случае K_t выступает в качестве меры сохранения или изменения поверхностных свойств частиц. Сохранение индекса в узком интервале значений свидетельствует о том, что поверхностные свойства частиц остаются на одном и том же уровне при различных воздействиях (при хранении в различных условиях, стерилизации, изменении топографии поверхности при введении различных добавок в эмульгирующий состав и др.).

ПФУ практически нерастворимы в воде и являются плохими растворителями для большинства веществ, в том числе и для ФЛ. Поэтому в эмульсии могут присутствовать два типа частиц: частицы с прочной связью ФЛ с фторуглеродным ядром частиц и свободные или липосомальные ФЛ. Присутствие частиц другой природы, свободных или липосомальных форм эмульгирующего ФЛ агента, определяют с помощью центрифугирования исследуемого образца эмульсии ПФУ/ФЛ. Для эмульсии, содержащей только однородные по своей природе частицы ПФУ/ФЛ, при центрифугировании наблюдается равномерное оседание частиц. На присутствие в эмульсии свободных ФЛ, не связанных с ядром частиц, как более легких форм по удельному весу, указывает присутствие верхней фракции в пробе исследуемого препарата. Оптические свойства этой части эмульсии отличаются от остальных фракций. Для подтверждения отсутствия в эмульсии сво-

бодных ФЛ методом спектрофотометрии-определяют экспериментальные и расчетные значения мутности (τ) эмульсий в разные сроки наблюдений:

$$\tau_{\text{эксп}} = 2.3D/l, \quad \tau_{\text{расч}} = \sum V_i \tau_i \quad (\sum V_i = 1),$$

где D и l — оптическая плотность и длина оптического пути в данной среде; τ_i и V_i — мутность и объемная доля выделенной фракции эмульсии после центрифугирования.

Совпадение значений $\tau_{\text{эксп}}$ и $\tau_{\text{расч}}$ свидетельствует о сохранении связи эмульгирующего ФЛ агента с фторуглеродным ядром частиц, т.е. о сохранении корпускулярной природы частиц ($\tau_{\text{эксп}}$ и $\tau_{\text{расч}}$) [15–17].

Анализ всего комплекса указанных биофизических параметров представляет новую методологию оценки качества наночастиц эмульгированных ПФУ/ФЛ. Ее можно обозначить как “ПФУ-биоинформатика” и рассматривать как необходимый этап тестирования качества эмульсионных ПФУ препаратов медико-биологического назначения до начала их доклинического и клинического исследования.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ПФУ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ДОСТАВКИ КИСЛОРОДА ЭРИТРОЦИТАМИ

Целью использования эмульсионных ПФУ препаратов является снижение гипоксии за счет улучшения доставки кислорода тканям. Поэтому их функциональную активность необходимо рассматривать в связи с газотранспортными свойствами крови.

Процесс доставки газов кровью определяется скоростью диффузии молекул O_2 от эритроцитов к тканям и молекул CO_2 в противоположном направлении. Схематически этот процесс представлен на рис. 1 [12, 18].

Частицы ПФУ находятся на пути диффузии молекул O_2 и CO_2 и могут оказывать влияние на этот процесс, ускоряя поток кислорода от эритроцитов к тканям. Поскольку слой ПАВ вокруг частиц ПФУ не играет существенной роли для проницаемости газов [19], присутствие частиц ПФУ в токе крови должно сказаться на скоростях оксигенации и деоксигенации эритроцитов.

Этот процесс был изучен на установке, моделирующей циркуляцию крови при гемодилюции. В ней кровь циркулировала по замкнутому контуру, содержащему газообменник, помещенный в закрытый бокс, который заполняли воздухом (оксигенация) или аргоном (деоксигенация). Степень оксигенации эритроцитов определялась с помощью оптического оксиметра. Условия проведения эксперимента: гематокрит $H_t = 25\text{--}30\%$,

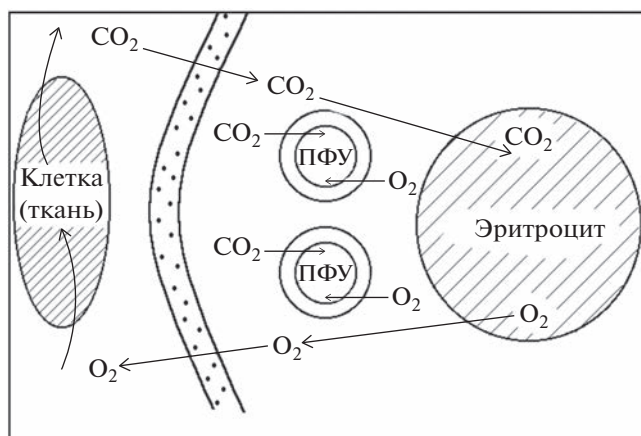


Рис. 1. Иллюстрация биофизического процесса доставки O_2 и CO_2 кровью при совместной циркуляции наночастиц ПФУ и эритроцитов.

содержание фторуглеродной эмульсии $C_v \sim 1\%$ по объему, средний диаметр частиц $a \sim 100$ нм [20].

Согласно полученным данным, эмульсии ПФУ при совместной циркуляции с кровью увеличивали как скорость оксигенации (da/dt), так и скорость деоксигенации (рис. 2а и 2б).

Таким образом, было установлено увеличение скоростей оксигенации и деоксигенации эритроцитов при их совместной циркуляции с частицами ПФУ в результате увеличения скорости диффузии кислорода, т.е. доказан эффект изменения условий транспорта кислорода эритроцитами в присутствии небольшого объема эмульгированных наночастиц ПФУ.

Доставка кислорода тканям определяется также скоростью кровотока. Частицы ПФУ в токе крови являются новыми гетерогенными включениями и могут изменить пространственную структуру движущейся крови [21]. На примере препарата Флюозол ДА [10] было показано, что эмульсии ПФУ, так же как и кровь, являются неньютоновскими жидкостями. Их вязкость зависит от напряжения сдвига. Показано, что асимптотическая вязкость (μ_a) в смесях кровь/эмульсия нелинейно меняется с увеличением фторуглеродной фазы в смеси [22]. Для смеси плазма/эмульсия эта зависимость была линейной. Обнаруженное различие свидетельствовало о выраженных взаимодействиях наночастиц ПФУ с эритроцитами. Для оценки этого взаимодействия определяли “коэффициент агрегации” A (μ_a), который характеризует способность клеток к агрегации и их прочность [10, 22]. Было обнаружено, что в смешанной среде кровь/эмульсия величины A сопоставимы с такими же значениями для смеси кровь/эмульгатор при содержании наночастиц эмульсии не более 2–3% (по объему). С увеличением содержания фторуглеродной эмульсии (более $\sim 5\%$) было отмечено возрастание A , что сви-

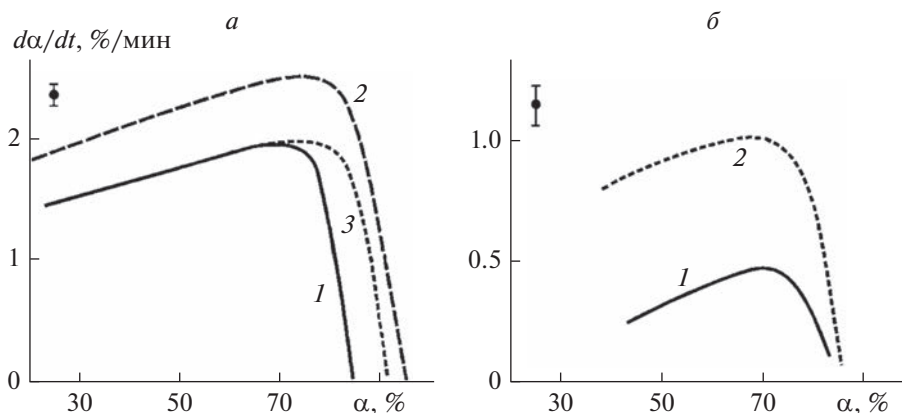


Рис. 2. Зависимости скорости оксигенации (а) и деоксигенации (б) $d\alpha/dt$ от степени оксигенации α при добавлении к крови (гематокрит Гт = 25–30) физиологического раствора (1), эмульсий ПФУ (2) и раствора эмульгатора П-268 (3) с учетом дополнительного сигнала вследствие рассеяния света эмульсией. Объемная доля фторуглеродной фазы $C_v = 0.6$ –1.0 об. %; средний диаметр частиц $a = 0.05$ –0.14 мкм).

детельствует об образовании новых структур, обусловленных дополнительным взаимодействием частиц и эритроцитов.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ НАНОЧАСТИЦ ПФУ НА КЛЕТКИ КРОВИ

Средний диаметр частиц ПФУ препаратов составляет 0.1 мкм, что более чем на порядок меньше размера клеток: эритроцитов (5.5–9.5 мкм), лейкоцитов (10–20 мкм) и тромбоцитов (2.5–3 мкм). Согласно проведенным расчетам [23], при внутривенном введении 10% (по объему) эмульсии ПФУ в дозе 5–10 мл/кг массы тела число частиц в единице объема 1 мм³ составляет $(2.5\text{--}1.2) \times 10^{10}$. Это количество частиц ПФУ на 4 порядка превышает число эритроцитов ($\sim 5 \times 10^6$) и почти на 7 порядков превышает число лейкоцитов ($\sim 9 \times 10^3$) и тромбоцитов ($\sim 3 \times 10^3$) в том же объеме 1 мм³. Таким образом, на каждую клетку, циркулирующую в сосудистом русле, приходится от одной тысячи до одного миллиона наночастиц эмульгированных ПФУ, которые могут оказывать влияние на их функциональную активность.

Проведен анализ результатов экспериментальных работ [24–26]. Дозозависимое влияние эмульгированных наночастиц ПФУ на состояние клеток крови оценивали по изменению ряда параметров (состояние мембраны эритроцитов, функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов, фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов, процесс агрегации тромбоцитов) при различных соотношениях кровь/эмульсия от 100/1 до 1/1. Число наблюдений в каждом исследуемом образце варьировали от 5 до 17.

Для оценки влияния эмульсии на состояние мембраны эритроцитов подсчитывали число эхиноцитов в мазке крови или кровь/эмульсия на

1000 эритроцитов по методике, описанной в работе [27].

Функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов определялась по их способности восстанавливать бесцветный краситель нитросиний тетразолий до диформаза, окрашенного в синий цвет (НСТ-тест) [28]. Определялась доля из 100 клеток (в мазке) нейтрофильных гранулоцитов, содержащих гранулы восстановленного диформаза (НСТ-позитивные клетки).

Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов в исходном состоянии (контроль) определялась по методике [29, 30] с микробной культурой *S. aureus* Р-209. Аналогичным образом ее оценивали в смеси кровь/эмульсия (опыт).

Гемолиз эритроцитов после инкубации крови с эмульсией АТ оценивали в соответствии с инструкцией, принятой в Службе крови, предусматривающей “отсутствие видимого гемолиза”. В норме свободный гемоглобин составляет не более 0.1 г/л.

Результаты экспериментальных данных работ [24–26] представлены в настоящей работе на рис. 3–6 в новом графическом отображении.

Статистический анализ экспериментальных данных и представление результатов в графической форме были выполнены посредством скриптов на открытом языке программирования R [31] на базе ресурсного центра “Обсерватория экологической безопасности” Научного парка СПбГУ.

На рис. 3 показано влияние эмульгированных наночастиц на состояние мембраны эритроцитов [24, 25]. С увеличением доли эмульсии в смеси кровь/эмульсия в образце отмечается увеличение числа эхиноцитов (кривая 1), т.е. шиповидных эритроцитов. При этом наблюдается увеличение содержания малонового диальдегида (МДА) (кривая 2), который является маркером процесса пе-

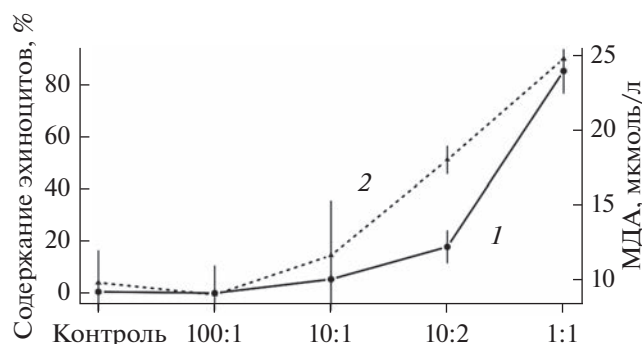


Рис. 3. Изменение числа эхиноцитов (1) и содержания МДА (2) с увеличением доли эмульгированных наночастиц ПФУ в смеси кровь/эмульсия.

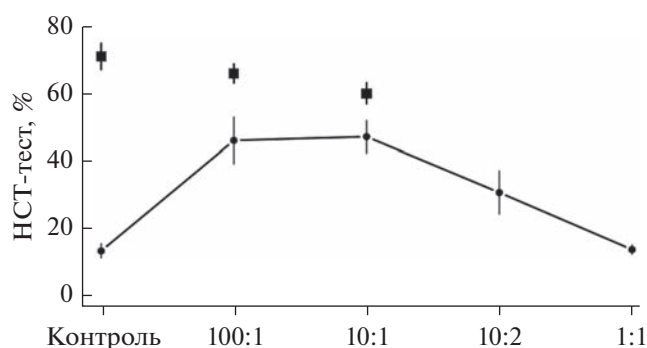


Рис. 4. Изменение метаболической активности нейтрофилов (ломаная кривая) согласно значениям НСТ-теста и уровню фагоцитарной активности ФА (“ящик-с-усами”) нейтрофилов с увеличением доли наночастиц эмульгированных ПФУ в смеси кровь/эмульсия. Значение ФА в контроле 72 ± 8 (95% уровень), средневзвешенное значение для соотношений кровь/эмульсия 100 : 1 и 10 : 1 составляет 64 ± 4 . Эти значения статистически неотличимы (доверительные интервалы пересекаются).

рекисного окисления липидов. Таким образом, происходит однонаправленное изменение двух независимых параметров (числа эхиноцитов и МДА) с увеличением числа частиц ПФУ, контактирующих с эритроцитами, что свидетельствует о нарушении целостности плазматической мембраны клеток. Подтверждением этого являлось появление свободного гемоглобина в плазме, т.е. проявление видимого гемолиза эритроцитов при соотношении кровь/эмульсия 1/1 и 1/2. Содержание свободного гемоглобина при этом составляло 0.925 и 3.42 г/л, что в несколько раз превышает предельно допустимые нормы ~ 0.1 г/л.

Рисунок 4 демонстрирует изменения метаболической активности нейтрофилов, о которой судили по способности этих клеток восстанавливать краситель нитросиний тетразолий (НСТ-тест) и фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов. Первоначальное резкое увеличение

значений НСТ-теста отражает активацию кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов. Этот процесс является закономерной реакцией на появление чужеродного агента, т.е. частиц ПФУ, в смеси кровь/эмульсия. При увеличении содержания эмульсии (соотношение кровь/эмульсия 10/2 и более) отмечается снижение способности нейтрофилов восстанавливать бесцветный краситель нитросиний тетразолий до диформазана, что может быть связано с блокированием механизмов фагоцитоза.

Однако оказалось, что средние значения фагоцитарной активности (ФА) нейтрофилов в области возросших значений НСТ теста при низком содержании эмульсии (соотношение кровь/эмульсия 100/1 и 10/1) статистически неотличимы от контроля (рис. 4, фигуры “ящик с усами”) и составляют 66.6 ± 2.9 согласно проведенному расчету.

В работе [26] было изучено влияние эмульгированных наночастиц на процесс агрегации тромбоцитов, индуктором которого являлся АДФ в концентрации 1 мкМ. Использовали фотометрический метод Борна, основанный на непрерывном измерении изменения коэффициента светопропускания перемешиваемой и термостатируемой суспензии тромбоцитов [32]. Запись процесса индуцируемой агрегации тромбоцитов в плазме здоровых лиц проводили на агрегометре Solar2110 с программным обеспечением для регистрации и анализа результатов. Изменение агрегационной функции тромбоцитов оценивали по определенным параметрам кривой агрегации: максимальная амплитуда, %; скорость агрегации, %/мин; процент дезагрегации тромбоцитов, %; время процесса агрегации, с.

Предварительные исследования показали, что исследуемые наночастицы эмульгированных ПФУ не являются индуктором агрегации нормальных тромбоцитов, что и позволило провести настоящие исследования.

На рис. 5 приведены примеры записи агреграмм тромбоцитов при введении различных доз эмульгированных ПФУ в плазму одного донора.

Выявлено разнонаправленное влияние эмульгированных ПФУ на индуцируемую агрегацию тромбоцитов. При низком содержании эмульсии (4% от общего объема, кривая 2) наночастицы усиливали исходно нормальную агрегацию (кривая 1). С увеличением содержания эмульсии ПФУ в пробе до 10% отмечено снижение индуцируемой агрегации по сравнению с нормой.

На рис. 6 представлено изменение усредненных (из 10 опытов) значений параметров агрегации тромбоцитов в зависимости от введенной дозы эмульсий ПФУ. При низких концентрациях (4% от общего объема образца) эмульгированные частицы усиливают исходно нормальную агрега-

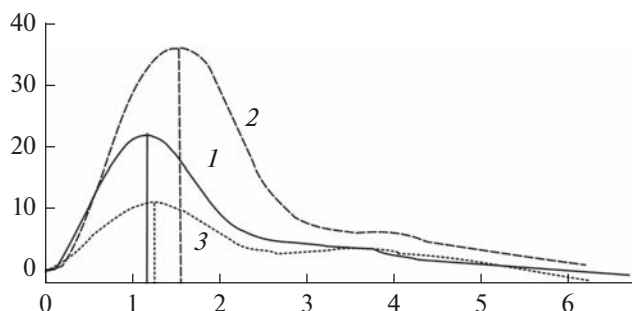


Рис. 5. Пример регистрации агрегатограмм при введении разных доз эмульсии в плазму одного донора: 1 — исходное состояние; 2 — содержание эмульсии в плазме 4%; 3 — содержание эмульсии в плазме 15%. Запись проводили на агрегометре SolarAC 2110 с программным обеспечением для анализа агрегационных свойств тромбоцитов. По оси ординат — коэффициент светопропускания (%), по оси абсцисс — время протекания индуцируемого процесса агрегации (мин).



Рис. 6. Изменение усредненных значений регистрируемых параметров: скорости агрегации тромбоцитов на 30-й с в зависимости от введенной дозы эмульсии (получено для 10 опытов).

цию тромбоцитов. С увеличением содержания эмульсии (до 10 и 15%) отмечено снижение индуцируемой агрегации кровяных пластинок ниже исходного уровня.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном аналитическом обзоре рассматривается механизм взаимодействия биопрепарата эмульсионного типа на основе наночастиц ПФУ/ФЛ с живой системой. Показано, что стабильность эмульсионной инфузионной среды ПФУ/ФЛ обеспечивается сохранением структуры частиц, их размера и прочности оболочки. Обоснована необходимость стабильности структуры биопрепарата для выполнения им газотранспортной функции *in vivo*. Комплекс физико-химических методов контроля целостности структуры наночастиц послужил информационной базой для отработки воспроизводимой технологии диспергирования ПФУ. Использование

такого инновационного подхода позволило получить эмульсии ПФУ/ФЛ, в которых сохранялась однородность частиц ПФУ/ФЛ, их поверхностные свойства, средний диаметр и распределение частиц по размерам в течение одного-двух лет хранения [33, 34]. В проанализированных работах во всех экспериментах были использованы стабильные однотипные (по составу и способу получения) эмульсии.

Интерпретировать полученные результаты необходимо как воздействие наночастиц ПФУ на функционирование сложной системы крови. В первую очередь, это воздействие касается изменения условий доставки газов крови O_2 и CO_2 в смешанной системе кровь/эмульсия. Оказалось, что небольшое количество эмульсии в крови улучшает условия доставки O_2 эритроцитами за счет увеличения скорости диффузии молекул кислорода от эритроцитов к тканям, а также путем нормализации кровотока за счет снижения агрегации эритроцитов (реология крови).

Приведенные экспериментальные и теоретические результаты позволяют расширить представление о механизме газотранспортной активности наночастиц эмульгированных ПФУ. При совместной циркуляции с эритроцитами частицы ПФУ выполняют, во-первых, роль пассивного переносчика газов O_2 и CO_2 пропорционального перепаду парциального давления соответствующего газа; во-вторых, роль усилителя потока O_2 и CO_2 за счет увеличения их скорости диффузии, обусловленного повышенной растворимостью газов в ПФУ и возможностью свободного прохождения газов через частицы; в третьих, роль демпфера за счет образования дополнительной емкости для газов в плазме.

Реализация названных механизмов в условиях *in vivo* означает, что небольшой объем наночастиц, циркулирующих вместе с эритроцитами, несмотря на небольшое количество растворенного в них кислорода, может обеспечить большую скорость его поступления в ткани и органы за счет ускоренной диффузии молекул O_2 через плазму и тем самым способствовать развитию компенсаторных механизмов пациента.

Это воздействие наночастиц на газотранспортную функцию эритроцитов следует рассматривать как макроуровень регуляции газотранспортной функции системы крови.

Другой аспект влияния наночастиц на клетки крови — микроуровень, который обусловлен взаимодействием поверхностей двух дисперсных систем — клеток крови и чужеродных организму наночастиц. Важным обстоятельством в данном случае являются свойства поверхности и клеток, и наночастиц. Рецепторный аппарат плазматической мембраны клеток запускает определенные биохимические процессы внутри клеток. Кон-

такт наночастиц с рецепторным аппаратом можно рассматривать как приходящий извне сигнал. Соотношение размеров рецептор/частица составляет ~10 нм/100 нм. На начальном этапе в результате слабого сигнала или малого информационного воздействия, при низкой плотности частиц вокруг клеток, происходит изменение конфигурации рецептора, которое может вызвать или слабую реакцию клетки (активация нейтрофилов, НСТ-тест; активация тромбоцитов) или отсутствие внутреннего реагирования клетки и сохранение ее стационарного состояния (сохранение фагоцитарной активности нейтрофилов; отсутствие эхиноцитов и гемолиза у эритроцитов). Увеличение доли эмульгированных наночастиц в образце и, тем самым, увеличение плотности частиц вокруг клеток, приводит к увеличению контактных взаимодействий клетка/частицы. В результате происходит “контактное торможение” и ухудшение функционирования клетки. Подобная реакция отмечена для всех типов исследованных форменных элементов крови, несмотря на специфику их рецепторного аппарата. Такое торможение, или “контактное ингибирование”, присуще всем живым системам и является регуляторным механизмом роста клеток или тканей.

Исследование влияния эмульсионных ПФУ-препаратов на различные клеточные системы в предыдущие годы проводили в опытах на животных. По аналогии с живыми системами, влияние наночастиц ПФУ на функционирование клеток крови можно рассматривать как “микроуровень” регуляции биологических свойств системы крови. Взаимодействие наночастиц с плазматической мембраной клеток открывает возможность их направленного воздействия на специфическую активность форменных элементов крови. В частности, поскольку нейтрофилы относятся к клеткам врожденного иммунитета, особый интерес представляет активация этих клеток при контакте с малой дозой наночастиц. Это явление заслуживает отдельного исследования. Подтверждение и уточнение этой реакции в живом организме на введение малых доз наночастиц ПФУ позволит использовать это явление для усиления иммунного ответа при вакцинировании пациентов для активации ответной реакции против патогенов (вирусов и бактерий).

Приведенные результаты свидетельствуют о целесообразности использования малых доз при лечении гипоксических состояний, а также о целесообразности снижения содержания ПФУ фазы, т.е. кислородной емкости, при создании новых инфузионных сред данного типа.

Авторы настоящего аналитического обзора благодарны всем авторам опубликованных ранее работ. Благодарны за понимание новых идей, которые были положены в свое время в основу по-

становки эксперимента, благодарны за профессионализм при их осуществлении и обсуждение при подготовке публикации. Несмотря на то, что исследования были проведены почти 10 лет тому назад, дополнительный их анализ показал актуальность поставленных задач. В результате расширены представления о биологической активности наночастиц ПФУ, и это обстоятельство открывает перспективы создания новых эффективных ПФУ-препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Riess J.G., Flaim S.F., Klein D.H., Weers J.G. 1995. The relative physicochemical and biological attributes of perflubron emulsions. В сб.: *Физиологическая активность фторсодержащих соединений (эксперимент и клиника)*. Ред. Воробьев С.И., Иваницкий Г.Р. Пушино, с. 73–90.
2. Coch C.S., Cushing M.M. 2009. Oxygen therapeutics: Perfluorocarbons and blood substitute safety. *Crit. Care Clin.* **25**, 399–414.
<https://doi.org/1016/j/cc. 2008.12.007>
3. Henkel-Hanke T., Oleck M. 2007. Artificial oxygen carriers: A current review. *Am. As. Nurse Anest. J.* **75** (3), 205–211.
4. Маевский Е.И., Аксёнова О.Г., Богданова Л.А., Иваницкий Г.Р. 2004. Анализ побочных клинических эффектов, выявленных в ходе I–II фазы клинических исследований Перфторана. *Вестник службы крови России*. (4), 23–29.
5. Vercellotti G.M., Hammerschmidt D.E., Craddock P.R., Jacob H.S. 1982. Activation of plasma complement by perfluorocarbon artificial blood: Probable mechanism of adverse pulmonary reactions in treated patients and rationale corticosteroids prophylaxis. *Blood*. **59**, 1299–1304.
6. Flaim S.F. 1994. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes (review). *Artif. Cells, Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **22**, 1043–1054.
7. Ложкина А.Н. 1987. Участие системы комплемента в регуляции системы гомеостаза. *Успехи современной биологии*. **104** (4). 36–54.
8. Лысенко П.Н. 2005. Биоматериаловедение: вклад в прогресс современных медицинских технологий. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. (2), 56–61.
9. Кузнецова И.Н., Безрукова А.Г., Лопатин В.Н., Паршин А.В. 1988. Определение показателя преломления и толщины оболочки частиц дисперсного кровезаменителя на основе перфторсоединений. *Биофизика*. **33** (1), 126–129.
10. Naito R., Yokoyama K. 1978. *Perfluorochemical blood substitutes. Technical Information Series No. 5*. Chome, Joto-ku, Osaka, Japan: The Green Cross Corporation, p. 1–47.
11. Накагаки М. 1991. *Физическая химия мембран*. М.: Мир. 254 с.
12. Кузнецова И.Н. 1999. *Функциональная активность и стабильность эмульсий перфторуглеродов*. Автореф. дис. докт. биол. наук. С.-Петербург: РосНИИГТ. 38 с.

13. Кленин В.И., Щеголев С.Ю., Лаврушин В.И. 1977. *Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем*. Саратов: Изд-во Саратовского ун-та. 177 с.
14. Кузнецова И.Н., Кругляк З.А. 1987. Определение размеров частиц водных дисперсных препаратов методом спектротурбидиметрии. *Хим.-фарм. журн.* **31** (12), 1492–1503.
15. Кузнецова И.Н., Гохман Н.С., Лаврова Ю.В. 1993. Взаимодействие частиц эмульсий перфторуглеродов с сывороткой крови. *Журн. физ. химии.* **67** (9), 1884–1888.
16. Кузнецова И.Н., Юрченко В.С. 2006. Стабильность структуры эмульсий на основе перфторуглеродов и фосфолипидов при хранении. *Хим.-фарм. журн.* **40** (12), 35–38.
17. Kuznetsova I.N. 2015. About mechanism of gas transport function and side reactions of perfluorocarbon nano-dispersions. *Current Bionanotechnology.* **1**, 51–59.
18. Мусил Я., Новакова О., Кунц К. 1984. *Современная биохимия в схемах*. Пер. с англ. М.: Мир. 213 с.
19. Miuro K., Watanabe H., Kato H. 1983. Study of the behavior of uptake and release of oxygen into perfluorocarbon-water emulsion. *Bull. Chem. Soc. Japan.* **56** (2), 386–388.
20. Зарицкий А.Р., Кузнецова И.Н., Переведенцева Е.В., Фок М.В. 1993. Влияние эмульсий перфторуглеродов на скорость оксигенации и деоксигенации крови. *Журн. физ. химии.* **67** (3), 591–594.
21. Чижевский А.Л. 1959. *Структурный анализ движущейся крови*. М.: АН СССР. 474 с.
22. Кузнецова И.Н. 2001. Влияние эмульсий перфторуглеродов на реологические параметры крови. *Биофизика.* **46** (4), 761–765.
23. Кузнецова И.Н. 2001. О воздействии эмульсий перфторуглеродов на организм. В сб. *Перфторуглеродные соединения в биологии и медицине*. Ред. Иваницкий Г.Р., Мороз В.В. Пушино, с. 70–76.
24. Кузнецова И.Н., Волкова С.Д., Рыбакова Л.П., Юрченко В.С., Кочеткова Г.А. 2009. Эмульсии перфторуглеродов влияют на морфофункциональное состояние клеток крови – эритроцитов и лейкоцитов *in vitro*. *Вестн. службы крови России.* (2), 23–26.
25. Волкова С.Д., Кузнецова И.Н., Бессемельцев С.С. 2014. Влияние эмульсий перфторуглеродов на функциональное состояние клетки крови. *Med-line.ru (Биомедицинский журнал).* **15** (статья 12), 117–133.
26. Тарковская Л. Р., Кузнецова И. Н., Морозова Т. В., Папаян Л. П. 2009. Дозозависимое влияние эмульсий перфторуглеродов на индуцируемую агрегацию тромбоцитов. *Вестн. службы крови России.* (3), 25–30.
27. Филёв Л.В., Захаров И.И., Селиванова Г.В. 1989. Цитоспектрофотометрическое исследование гемоглобина в эритроцитах человека. *Цитология.* **31** (3), 336–343.
28. Нагоев Б.С., Шубич М.Г. 1981. Значение теста восстановления нитросинего тетразолия для изучения функциональной активности лейкоцитов. *Лаб. дело.* (4), 195–198.
29. Егорова А.П., Лебединский В.А. 1949. Значение фагоцитарной реакции в определении инвазивности гемолитического стрептококка. *Микробиол. и эпидемиол.* (5), 8–9.
30. Савченко З.И., Ерасова В.И. 1981. Функциональное состояние нейтрофилов периферической крови у больных бронхиальной астмой. *Лаб. дело.* (11), 661–664.
31. *The R Project for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org>.
32. Вавилова Т.В., Головина О.Г., Зайнулина М.С., Иванов И.В., Миндукшев И.В., Папаян Л.П., Петищев Н.Н., Шитикова А.С., Эмануэль В.Л. 1999. *Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний*. Ред. Петрищев Н.Н., Папаян Л.П. С.-Петербург: Изд-во СПбГМУ. 117 с.
33. Кузнецова И.Н., Юрченко В.С., Кочеткова Г.А. 2012. Стабильные нанодисперсии на основе перфторуглеродов и фосфолипидов. *Хим.-фарм. журн.* **46** (2), 52–56. <https://doi.org/10.1007/s11094-0120-0745-9>
34. Кузнецова И.Н., Старицына Н.Н., Лянгузов А.Ю. 2020. Биофизические свойства и стабильность наночастиц на основе перфторуглеродов и фосфолипидов. *Журн. физ. химии.* **94** (3), 443. <https://doi.org/10.31857/S0044453720020211>

Influence of Perfluorocarbon Nanoparticles on Blood As a Cellular System

I. N. Kuznetsova^{1, *}, A. Yu. Lyanguzov²

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, 191024 Russia

²St.-Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: kuz-ir@inbox.ru

The influence of perfluorocarbon (PFC) nanoparticles on functioning of blood cells is considered. Emulsified PFC nanoparticles in small volumes affect the gas transport function of the blood by increasing the rate of oxygen diffusion from erythrocytes to tissues. PFC nanoparticles were found to affect blood cells (erythrocytes, leukocytes, platelets) in a dose-dependent manner. It is assumed that depending on the emulsion dose, i.e., the density of nanoparticles in the surrounding milieu, the response of the cell receptor apparatus can cause activation or deterioration of the cell functioning.

Keywords: perfluorocarbons, nanoparticles, emulsions, phospholipids, blood cells

УДК 577.355.3

ЭЛЕКТРОННЫЙ ТРАНСПОРТ В МЕМБРАНАХ ХЛОРОПЛАСТОВ ТЕНЕВЫНОСЛИВОГО И СВЕТОЛЮБИВОГО ВИДОВ ТРАДЕСКАНЦИИ

© 2023 г. И. С. Сусличенко^а, М. А. Беньков^а, Д. А. Ковалишина^а,
М. О. Петрова^а, Б. В. Трубицин^а, А. Н. Тихонов^{а, *}

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
физический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: an_tikhonov@mail.ru

Поступила в редакцию 07.11.2022 г.

После доработки 01.12.2022 г.

Принята к публикации 03.12.2022 г.

В работе исследованы процессы электронного транспорта в хлоропластах двух контрастных видов традесканции, теневыносливого вида *Tradescantia fluminensis* и светолюбивого вида *T. sillamontana*, выращенных в условиях умеренной или сильной освещенности. В качестве показателей, отражающих фотохимическую активность фотосистемы 2 (ФС2), использовали параметры быстрой (ОЖР-тест) и медленной индукции флуоресценции (МИФ) хлорофилла *a* в хлоропластах *in vivo* и *in situ*. По кинетике МИФ определяли коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a*, обеспечивающего защиту фотосинтетического аппарата от светового стресса. За функционированием фотосистемы 1 (ФС1) следили по кинетике фотоиндуцированных изменений редокс-состояния P_{700} — реакционного центра ФС1, регистрируемой методом электронного парамагнитного резонанса. Показано существенное различие в динамике изменений фотосинтетических показателей теневыносливого и светолюбивого видов традесканции в условиях длительной акклимации растений (до 5 месяцев) к умеренной ($50\text{--}125$ мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) или сильной ($850\text{--}1000$ мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) освещенности фотосинтетически активным белым светом. У светолюбивого вида *T. sillamontana* фотосинтетические показатели хлоропластов при акклимации растений к умеренному и к сильному свету изменялись незначительно. Фотосинтетические характеристики листьев теневыносливого вида *T. fluminensis* чувствительны к условиям освещения, что свидетельствует об ослаблении фотохимической активности при повышении интенсивности света при акклимации растений. Эффект ослабления фотосинтетических показателей листьев был обратимым — параметры флуоресценции возвращались к исходному уровню после ослабления света.

Ключевые слова: традесканция, теневыносливый и светолюбивый виды, акклимация, индукция флуоресценции хлорофилла, ЭПР

DOI: 10.31857/S023347552302007X, EDN: KWQRNW

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтезирующие организмы кислородного типа (растения, водоросли, цианобактерии) содержат пигмент-белковые комплексы двух типов — фотосистему 1 (ФС1) и фотосистему 2 (ФС2), которые поглощают свет и обеспечивают пере-

нос электронов от воды, разлагаемой в ФС2, к NADP^+ — конечному акцептору электронов в ФС1. Перенос электронов по цепи электронного транспорта (ЦЭТ) происходит с участием цитохромного b_6f -комплекса и подвижных электронных переносчиков — пластохинона и пластоцианина [1–6]. У растений переносчики ЦЭТ встроены в тилакоидные мембраны хлоропластов. Функционирование ЦЭТ приводит к генерации транс-тилакоидной разности электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$), являющейся источником энергии для работы АТФ-синтазы [7–9]. АТФ и NADPH — макроэнергетические продукты “световых” стадий фотосинтеза, используются в реакциях цикла Кальвина–Бенсона для фиксации CO_2 и синтеза углеводов [10].

Сокращения: БИФ — быстрая индукция флуоресценции; БС — белый свет; ДКС — дальний красный свет; МИФ — медленная индукция флуоресценции; НФТ — нефотохимическое тушение; P_{700} — первичный донор электрона в фотосистеме 1; СС и УС — сильный и умеренный свет соответственно; ФСА — фотосинтетический аппарат; ФС1 и ФС2 — фотосистема 1 и фотосистема 2 соответственно; ЦЭТ — цепь электронного транспорта; ЦКБ — цикл Кальвина–Бенсона; Хл — хлорофилл; ЭПР — электронный парамагнитный резонанс; NPQ — коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции; Рс — пластоцианин; PQ — пластохинон; q_E , q_Z и q_I — три компоненты NPQ.

Структурная организация фотосинтетического аппарата (ФСА) растений хорошо изучена. В настоящее время одной из основных задач биофизики и биохимии фотосинтеза является выяснение механизмов регуляции электронного транспорта в хлоропластах. В природных условиях интенсивность и спектральный состав света меняются в течение суток и зависят от погодных условий. Недостаток света уменьшает продуктивность фотосинтеза. Избыток света может приводить к деструктивным процессам, например, вызывать окислительный стресс и нарушение работы ФСА растений [11, 12]. В ходе биологической эволюции фотосинтезирующие организмы выработали механизмы, позволяющие оптимизировать биоэнергетические процессы при варьировании внешних условий (освещение [13], температура [14–17]). Эти механизмы обеспечивают “быструю” (секунды-минуты) и “долгосрочную” (часы-сутки) регуляцию фотосинтеза. “Быстрые” процессы регуляции осуществляются за счет обратных связей, влияющих на: 1) активацию/деактивацию реакций ЦКБ [18, 19], 2) рН-зависимую регуляцию работы ЦЭТ [20–23], 3) перераспределение поглощаемой энергии света между ФС1 и ФС2 [24], 4) структурно-функциональные перестройки ФСА в мембранах [25–29]. “Долгосрочные” механизмы регуляции связаны с синтезом или деградацией тех составляющих ФСА (включая пигмент-белковые комплексы), которые влияют на “архитектуру” и функциональные свойства хлоропластов. Способность растений приспосабливаться к изменяющимся условиям внешней среды определяется видом растений [30].

В контексте задачи о механизмах акклимации¹ растений к условиям обитания несомненный интерес представляет сравнительное исследование близкородственных видов растений, принадлежащих к “контрастным” видам (например, виды растений одного рода, приспособленные расти в теневых условиях или при интенсивном освещении). Ранее нами были изучены фотосинтетические показатели двух видов традесканции (*Tradescantia*) — теневыносливого вида *T. fluminensis* (эндемичный вид, произрастающий во влажных

тропических лесах юго-востока Бразилии) и светолюбивого вида *T. sillamontana* [31–37], исторической родиной которого являются полупустынные районы Мексики и Перу [38]. Другой пример подобного рода исследований — сравнительное изучение свойств ФСА двух видов растений рода *Cucumis*, произрастающих в районах с жарким и умеренным климатом; к ним относятся *C. melo* (дыня) и *C. sativum* (огурец). С помощью липидорастворимых спиновых зондов ранее были изучены свойства мембран хлоропластов, выделенных из проростков дыни и огурца, выращенных в одинаковых экспериментальных условиях [39]. При этом, однако, оказалось, что термоиндуцированные структурные переходы в тилакоидных мембранах хлоропластов дыни происходят при более высоких температурах ($\geq 35^\circ\text{C}$), чем в хлоропластах огурца ($\sim 20\text{--}25^\circ\text{C}$). Очевидно, что это наблюдение — отражение того факта, что дыня (*C. melo*) приспособилась произрастать при сравнительно высоких температурах, характерных для жаркого климата в местах происхождения этого вида.

В настоящей работе приведены результаты сравнительного исследования динамики акклимации листьев двух “контрастных” видов традесканции (*T. fluminensis* и *T. sillamontana*), происходящей при долговременном (месяцы) выращивании растений при высокой или низкой интенсивности света. Наиболее уязвимым пигмент-белковым комплексом ФСА растений, повреждаемым при световом стрессе или при повышении температуры, является ФС2 [40–44]. Для определения функциональных показателей, отражающих активность ФС2 в хлоропластах *in situ* (листья растений), мы изучали индукцию флуоресценции хлорофилла *a* (Хл *a*), испускаемой в основном пигментами светособирающей антенны ФС2 [45–48]. Оценивали также вклад нефотохимического тушения (НФТ) флуоресценции Хл *a*, отражающего эффективность защитных механизмов, обусловленных усилением диссипации избытка энергии в светособирающей антенне ФС2 [42, 49–53]. Используя флуоресцентные методы анализа, мы изучили изменения эффективности работы ФС2 и генерации НФТ в ходе длительной (несколько месяцев) акклимации *T. fluminensis* и *T. sillamontana* к свету высокой или низкой интенсивности. В дополнение к этому, мы исследовали функционирование ФС1, регистрируя редокс-превращения фотореакционных центров P_{700} (первичный донор электрона в ФС1) методом электронного парамагнитного резонанса. Наши исследования показали, что с увеличением длительности акклимации теневыносливых растений *T. fluminensis* у них усиливается защитная реакция, проявляющаяся в генерации НФТ уже при умеренных потоках света (~ 200 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$). В результате длительной акклимации (более 2 меся-

¹ Согласно общепринятой терминологии, термин “акклимация” относится к процессам приспособления растений к условиям их произрастания (освещение, температура, влажность, режим питания и т.д.). Термином “адаптация” называют процессы, связанные с видообразованием в ходе биологической эволюции. В настоящей работе сравниваются два вида растений рода *Tradescantia* (*T. fluminensis* и *T. sillamontana*), появившихся в разных регионах и различающихся по структурно-функциональным свойствам. Мы также используем выражение “адаптация образца к темноте”, подразумевая, что после кратковременного (1–2 мин) предварительного освещения, выполнявшегося для стандартизации условий эксперимента непосредственно перед измерениями, образец листа находился определенное время в темноте.

цев) к свету высокой интенсивности (≥ 500 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) хлоропласты *T. fluminensis* быстрее теряют фотохимическую активность, что не характерно для светолюбивого вида *T. sillamontana*. Ослабление фотохимической активности ФСА у *T. fluminensis* обратимо — после возвращения к свету умеренной интенсивности их фотохимическая активность восстанавливается до уровня, характерного для растений, акклиматизированных к умеренному свету.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения. Объектами исследования служили листья традесканции *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, полученные из Главного ботанического сада Российской академии наук. Растения выращивали в почвенной культуре при комнатной температуре (24–26°C) и относительной влажности 40–60%. Горшки с растениями помещали в темную камеру, внутри которой были два освещаемых отсека, различающихся по интенсивности света. Источником света служила лампа “УСС 90 магистраль Ш” (ООО “ТД ФОКУС”, Россия), укомплектованная белыми светодиодами с цветовой температурой 5000 К (Nichia, Япония). Спектральный состав этой лампы включает компоненты синего, красного и дальнего красного света, необходимые для нормального роста и развития растений. Интенсивность освещения измеряли с помощью квантометра Li250A (LiCOR Biosciences, США). Длительность светового периода в дневное время составляла 14 ч. Потоки света были равны 800–1000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (“сильный” свет, СС) или 50–125 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (“умеренный” свет, УС). Для измерений фотосинтетических показателей листьев использовали второй или третий зрелый лист, расположенный в верхней части побега. При измерениях характеристик листа биофизическими методами (флуоресцентный анализ и ЭПР) образец освещали с абаксимальной (дорзальной) стороны листа, обращенной в сторону верхнего эпидермиса. Было проведено несколько серий длительных экспериментов по акклиматизации для различных посадок растений в весенне-летне-осенний сезоны 2015–2022 гг. Общие закономерности динамики изменений биофизических показателей листьев двух видов традесканции, *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, изученные в разные сезоны, были одинаковыми. В настоящей работе для иллюстрации этих закономерностей мы приводим результаты исследований, проведенных в 2019–2021 гг.

Измерения флуоресценции, определение НФТ. Флуоресценцию Хл *a in vivo* измеряли с помощью РАМ-флуориметра модели FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Чешская республика), как описано ранее [32–37, 54]. Спектры непрерывного действующего (“актиничного”) света и

слабого импульсного измерительного света, возбуждающего флуоресценцию Хл *a*, имели максимум при 475 нм и полуширину спектральной полосы $\Delta\lambda_{1/2} = 25$ нм. Перед началом измерений лист предварительно освещали актиничным светом в течение 1 мин (для стандартизации условий опыта), а затем выдерживали в темноте в течение 10 мин. Параметры кривых индукции флуоресценции Хл *a* и нефотохимического тушения флуоресценции определяли согласно традиционным протоколам, описанным в работах [46–48].

Характерные кинетические кривые быстрой индукции флуоресценции (БИФ) Хл *a* листьев у двух видов растений (*T. fluminensis* и *T. sillamontana*), произраставших в течение 2 месяцев на сильном (СС) или умеренном свете (УС), показаны на рис. 1. Из кинетических кривых БИФ видно, как изменяется уровень флуоресценции во время действия насыщающей вспышки света длительностью 2 с (световой поток 3000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$). Все эти кривые имеют характерные особенности (перегибы или локальные экстремумы), обозначенные символами О, J, I и Р. Параметр F_0 — начальный уровень флуоресценции Хл *a* листьев, адаптированных к темноте. F_m — максимальный уровень флуоресценции, измеренной в ответ на действие насыщающего импульса света. Параметр варибельной флуоресценции (отношение $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) является мерой максимальной фотохимической активности ФС2 (относительным квантовым выходом) в листьях, адаптированных к темноте [46–48].

На рис. 2 показана типичная кинетика медленной индукции флуоресценции (МИФ) Хл *a*, вызванной действием непрерывного света (часто называемого в литературе актиничным светом, actinic light) и подаваемыми на его фоне короткими (1 с) вспышками света ($\lambda_{\text{макс}} = 475$ нм) высокой интенсивности (3000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$). Значения F_m и F'_m — уровни флуоресценции при действии интенсивных вспышек на образец листа, адаптированного к темноте (F_m) или во время его освещения актиничным светом (F'_m). $F(t)$ — интенсивность флуоресценции, измеренной непосредственно перед подачей интенсивной вспышки. Параметры $\Phi_{\text{PSII}} = 1 - F(t)/F'_m$ и $q_{\text{NPQ}} = F_m^0/F'_m - 1$ характеризуют так называемую операционную эффективность срабатывания фотохимических центров ФС2 (Φ_{PSII}) и коэффициент НФТ (q_{NPQ}), соответственно [46–48].

Электронный парамагнитный резонанс. Наблюдая за характерным сигналом ЭПР от окисленных центров P_{700}^+ , можно следить за электронным транспортом в хлоропластах *in situ* [54, 55]. Образец (свежесрезанный кусочек листа размерами

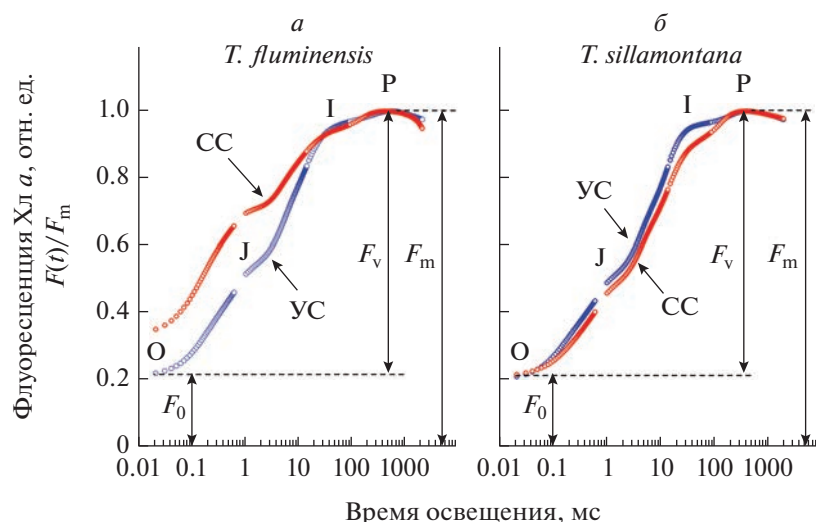


Рис. 1. Кинетика быстрой индукции флуоресценции (БИФ) хлорофилла *a* в листьях *T. fluminensis* (а) и *T. sillamontana* (б), выращенных в течение 2 месяцев в условиях сильного (СС) и умеренного (УС) освещения. Измерения выполнены в соответствии с протоколом, описанным в разделе Материалы и методы. Началу измерений предшествовала адаптация образцов к темноте в течение 10 мин. Все кривые БИФ нормированы на максимальную интенсивность флуоресценции F_m .

4 × 25 мм) закрепляли в хорошо вентилируемом держателе и помещали в прямоугольный резонатор спектрометра ЭПР модели E-4 (Varian, США). Мощность микроволнового излучения составляла 10 мВт, амплитуда ВЧ-модуляции была равна 0.4 мТ. Образцы освещали белым светом (БС, 320 Вт м⁻²), эффективно возбуждающим обе фотосистемы, или дальним красным светом (ДКС, $\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм, 8 Вт м⁻²), возбуждающим преимущественно ФС1. За кинетикой редокс-превращений P_{700} следили по изменениям величины низкополевого экстремума первой производной сигнала ЭПР от P_{700}^+ . Условия освещения и особенности регистрации сигналов ЭПР в листьях растений подробно описаны в работе [54].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция флуоресценции хлорофилла *a*

Быстрая индукция флуоресценции. Показанные на рис. 1 кинетические кривые были получены на высечках из листьев растений, акклиматизированных к условиям “сильного” или “умеренного” освещения. Перед началом измерений каждый образец адаптировали к темноте в течение 10 мин. Все кривые БИФ нормированы на максимальную величину сигнала F_m . Эти кривые имеют общие закономерности: в ответ на короткую вспышку интенсивного света с $\lambda_{\text{макс}} = 475$ нм флуоресценция Хл *a* быстро достигает уровня F_0 , а затем растет до максимального уровня P , характеризуемого параметром F_m , проходя при этом через точки перегиба или локальные экстремумы, отмеченные сим-

волами J и I. После достижения максимального уровня P наблюдается некоторый спад флуоресценции. Согласно общепринятой точке зрения, стадия роста O–J отражает восстановление пер-

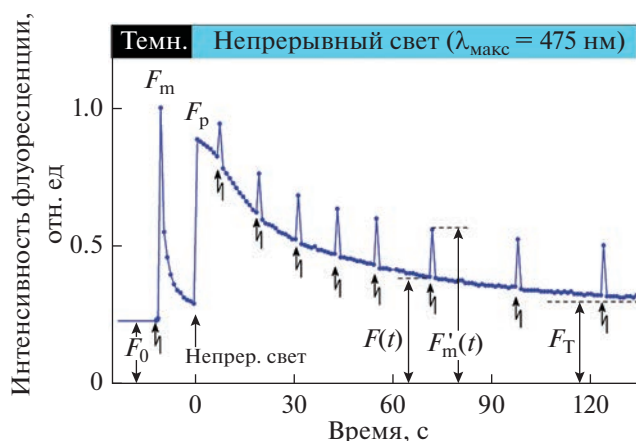


Рис. 2. Кинетика индукции флуоресценции хлорофилла *a* в листьях *T. fluminensis*, выращенных в условиях освещения растений “сильным” светом. Измерения выполнены в соответствии с протоколом, описанным в разделе “Материалы и методы”. Зигзагообразными стрелками показаны моменты подачи коротких насыщающих вспышек света. Вертикальной стрелкой показан момент включения непрерывного (актиничного) света. Кинетическая кривая нормирована на величину F_m , определяемую уровнем флуоресценции на первую насыщающую вспышку, подаваемую после адаптации листа к темноте в течение 10 мин. F_T — стационарный уровень флуоресценции, устанавливающийся после длительного (~10 мин) освещения листьев актиничным светом интенсивностью 800 мкмоль фотонов см⁻² с⁻¹.

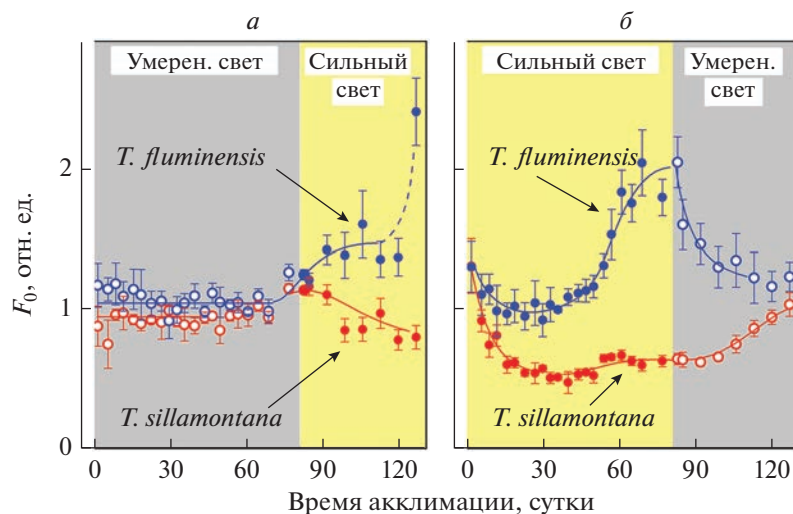


Рис. 3. Динамика изменений параметра F_0 кривой быстрой индукции флуоресценции, измеренного в листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, произраставших в условиях освещения “сильным” и “умеренным” светом. Вертикальные линии — стандартное отклонение от средних значений, полученных для $n = 4–8$ измерений.

вичного пластохинона PQ_A , прочно связанного с ФС2 [45–48]. Следующая фаза роста сигнала (участок J–I–P), называемая “тепловой фазой” флуоресценции [56, 57], отражает восстановление вторичного пластохинона PQ_B (перенос электрона $PQ_A \rightarrow PQ_B$) и дальнейший перенос электронов в ЦЭТ между ФС2 и ФС1, а также перераспределение поглощенной энергии между ФС2 и ФС1 [58]. Сравнивая кинетику БИФ в листьях теневыносливого вида *T. fluminensis* для растений, акклимированных в течение 2 месяцев к сильному или к умеренному свету, можно заметить, что в первом случае начальный уровень флуоресценции F_0 был выше, чем у листьев того же вида, акклимированных к “умеренной” интенсивности света. Учитывая, что параметр F_0 отражает эффективность переноса энергии от светособирающей антенны к реакционному центру P_{680} [48], можно предположить, что наблюдаемое различие является следствием повреждения антенны ФС2 при экспозиции листьев *T. fluminensis* к сильному свету (световой стресс). Этого не происходило в случае листьев светолюбивого вида *T. sillamontana*, что может свидетельствовать о сравнительно слабой восприимчивости растений этого вида к усилению интенсивности света при акклимации.

Параметры кривой БИФ зависят от длительности акклимации растений в условиях различной освещенности (рис. 3). Нами были проведены наблюдения за флуоресцентными показателями листьев *in vivo* (без отрыва листьев от стебля) при длительном культивировании растений (более 4 месяцев), начиная с двухнедельного возраста листьев, когда у растений уже сформировались

листовые пластинки. На рис. 3а показаны результаты измерений в опыте, когда сначала в течение 80 суток растения росли на умеренном свету (50–125 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$), а затем их начали освещать сильным светом (850–1000 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$) того же спектрального состава. Видно, что при выращивании растений на свету умеренной интенсивности значения параметра F_0 у обоих видов традесканции оставались практически неизменными. После существенного (на порядок) усиления светового потока зависимости F_0 от времени акклимации листьев *T. fluminensis* и *T. sillamontana* изменились. В листьях *T. fluminensis* параметр F_0 стал возрастать по мере увеличения длительности акклимации. В отличие от *T. fluminensis*, в листьях *T. sillamontana* статистически значимого роста F_0 не наблюдалось (рис. 3а).

На рис. 3б приведены результаты другой серии измерений, в которой последовательность условий освещения была противоположной: растения сначала росли на сильном свету, а затем интенсивность света была ослаблена. У теневыносливых растений (*T. fluminensis*) в течение первых 50 суток роста на сильном свету параметр F_0 изменялся, но незначительно. Затем параметр F_0 начал заметно увеличиваться. Рост F_0 , наблюдавшийся при освещении растений сильным светом, был обратимым. После ослабления света на 80-е сутки величина F_0 стала уменьшаться, возвращаясь к исходному уровню F_0 . В случае светолюбивого вида *T. sillamontana*, выращиваемого на сильном свету, вначале наблюдалось некоторое уменьшение F_0 . Можно думать, что это происходит потому, что при избытке света в условиях ак-

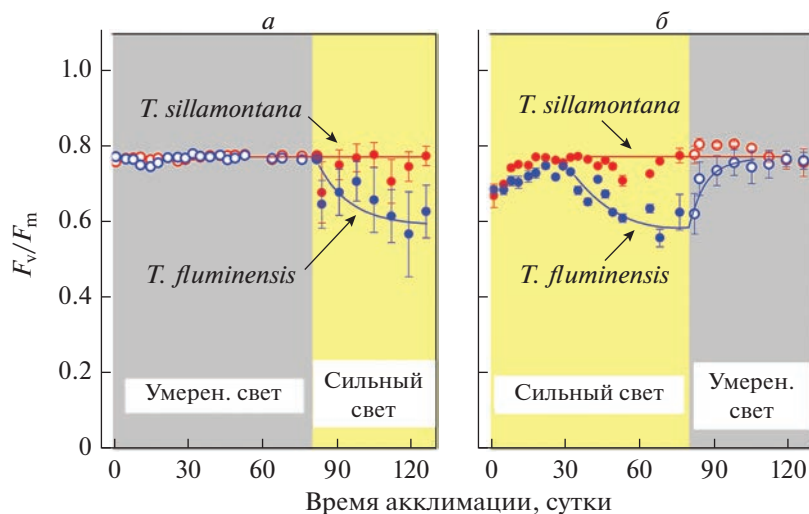


Рис. 4. Динамика изменений параметра варибельной флуоресценции F_v/F_m кривой быстрой индукции флуоресценции, измеренного в листьях растений *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, произраставших в условиях освещения “сильным” и “умеренным” светом. Вертикальные линии — стандартное отклонение от средних значений, полученных для $n = 4–8$ измерений.

климации к сильному свету растениям хватает квантов света для оптимального функционирования, поэтому им “выгодно” уменьшить число пигмент-белковых комплексов, чтобы избежать негативных последствий от светового стресса. После ослабления света, по мере акклимации растений значение F_0 возрастает, возвращаясь к исходному уровню F_0 . Описанные изменения параметра F_0 отражают процессы структурно-функциональной реорганизации ФСА, происходящие в ходе акклимации растений. При этом, как показали результаты обеих серий экспериментов (рис. 3а и 3б), в листьях теневыносливого растения *T. fluminensis* флуоресцентный параметр F_0 оказывается более чувствительным к вариациям интенсивности света при акклимации, чем в листьях светолюбивого вида *T. sillamontana*.

Межвидовое различие динамики изменений параметра F_0 при акклимации характерно и для варибельной флуоресценции Хл *a*, определяемой как отношение $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. Из рис. 4 видно, что в листьях *T. sillamontana* это отношение сохраняется на одном и том же уровне ($F_v/F_m \approx 0.78$) независимо от условий произрастания растений (сильный или умеренный свет). Это указывает на то, что максимальный квантовый выход флуоресценции Хл *a* в хлоропластах *T. sillamontana* остается высоким как при умеренной, так и при высокой интенсивности света. В случае *T. fluminensis* наблюдалась другая картина: выращивание этих растений на сильном свете приводит к некоторому падению варибельной флуоресценции F_v/F_m , что отражает уменьшение фотохимической активности ФС2. Уменьшение отношения F_v/F_m об-

ратимо, после ослабления интенсивности света при акклимации *T. fluminensis* этот параметр возвращается к исходному значению $F_v/F_m \approx 0.78$, характерному для растений, растущих при умеренных интенсивностях света (рис. 4б). Обратимость эффекта ослабления F_v/F_m , происходящего при выращивании *T. fluminensis* на сильном свете, может свидетельствовать о функциональной “гибкости” ФСА этих растений — фотохимическая активность хлоропластов сравнительно быстро (в течение нескольких суток) восстанавливается после ослабления освещенности.

Нефотохимическое тушение флуоресценции. Обратимость параметров БИФ в листьях *T. fluminensis*, происходящих при акклимации растений к свету различной интенсивности (рис. 3 и 4), свидетельствует о функциональной “гибкости” ФСА этих растений, которая позволяет защищать ФСА от светового стресса. Защита ФСА от повреждений при избыточном освещении (сильный свет) проявляется в усилении нефотохимического тушения возбуждения молекул Хл *a* в светособирающей антенне ФС2. Коэффициент нефотохимического тушения (величина НФТ) можно определить из параметров кривой медленной индукции флуоресценции (МИФ), показанных на рис. 2.

На рис. 5 показано как меняется параметр NPQ в ходе освещения листьев *T. fluminensis* непрерывным (актиничным) светом, у растений, акклиматизированных в течение разного времени при высокой (СС, рис. 5а) или умеренной (УС, рис. 5б) интенсивности света. Интенсивность актиничного света, используемого при регистрации МИФ, была достаточно высокой, 800 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$, что по порядку величины соответствует интен-

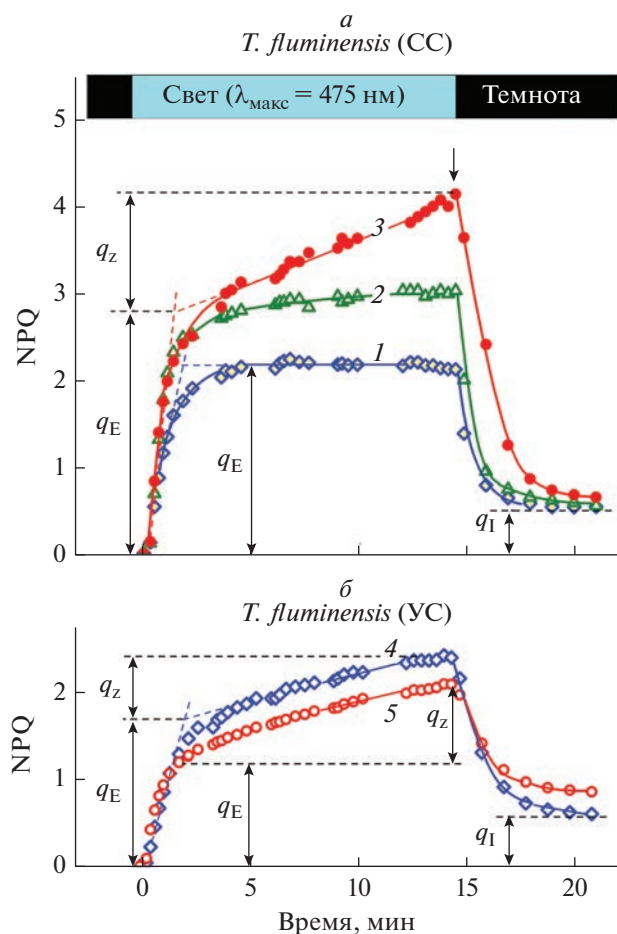


Рис. 5. Влияние длительности акклимации растений *T. fluminensis*, выращиваемых на свете сильной (CC) и умеренной (UC) интенсивности, на кинетику светоиндуцированных изменений коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ). Кривые 1, 2 и 3 получены для растений, акклимированных к “сильному” свету в течение 8, 20 и 40 суток. Кривые 4 и 5 получены для листьев растений, акклимированных к “умеренному” свету в течение 8 и 45 суток. Интенсивность непрерывного (актиничного) света, действующего на измеряемый образец, составляла $800 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

сивности сильного света, используемого при акклимации растений. В кинетике роста параметра NPQ, показанной на рис. 5, можно выделить несколько компонент, которые отражают разные механизмы регуляции световых стадий фотосинтеза. Обратимая компонента НФТ, обозначаемая как q_E (так называемая энергетическая составляющая), характеризуется сравнительно быстрым ростом ($\sim 0.5\text{--}2$ мин). Эта компонента обусловлена созданием *транс*-тилакоидной разности pH (ΔpH), когда в результате закисления внутритилакоидного пространства (люмена) активируется регуляторный белок PsbS, усиливающий НФТ [59]. Считается, что белок PsbS выполняет роль

сенсора, обеспечивающего чувствительность к светоиндуцированному снижению внутритилакоидного pH (pH_{in}). Вслед за быстрым ростом НФТ (компонента q_E) часто наблюдается сравнительно медленное увеличение НФТ (обозначаемое как компонента q_Z [50–52]). Эта стадия роста НФТ может быть обусловлена двумя основными причинами: 1) реакциями ксантофилевого цикла (диэпоксидация виолаксантина и появление зеаксантина) и 2) перераспределением энергии между ФС2 и ФС1 (переходы состояние “1” $\leftrightarrow$ состояние “2”) [24, 29]. Зеаксантин усиливает связь регуляторного белка PsbS со светособирающей антенной ФС2 (LHCII). Это вызывает агрегацию светособирающих комплексов ФС2 (LHCII), что приводит к росту НФТ — усиливается диссипация энергии возбужденных пигментов антенны ФС2 и уменьшается эффективность фотохимических процессов в ФС2 (см. подробное обзор [29]). На основании наших предыдущих исследований [34], можно заключить, что в листьях традесканции рост НФТ связан с усилением экспрессии белка PsbS.

После выключения актиничного света наблюдается спад НФТ. Падение НФТ в темноте обратимо, но не полностью — достаточно долго (десятки минут) сохраняется остаточный уровень НФТ, характеризуемый параметром q_I (рис. 5). Величина q_I отражает, по крайней мере частично, степень инактивации части фотохимических центров ФС2 в результате действия достаточно интенсивного актиничного света [30, 48–53]. Ингибирование ФС2 происходит в основном из-за повреждения белка D1 в результате его фотоокисления при действии сильного света. Репарация ФС2 осуществляется за счет того, что поврежденный белок D1 удаляется из ФС2, а на его место встраивается заново синтезированный активный белок D1 [60].

Способность растений к усилению НФТ зависит от условий освещения при культивировании растений, а также от времени акклимации. Из рис. 5a видно, что с увеличением длительности акклимации растений *T. fluminensis*, произрастающих на сильном свете, наблюдается сравнительно небольшое увеличение обратимой (“энергетической”) составляющей q_E . Следует обратить внимание на то, что по мере старения растений становится все более заметным вклад второй (медленной) компоненты НФТ (q_Z). Это позволяет предположить, что по мере созревания листьев *T. fluminensis* их ФСА приобретает дополнительную способность защищаться от светового стресса. Заметим, что у растений, произрастающих при умеренном освещении, также наблюдались две фазы роста НФТ (рис. 5б), но значения параметров q_E и q_Z , отражающих два механизма генерации НФТ, у них были несколько ниже, чем у рас-

тений, выращивавшихся на сильном свете (рис. 5а). Очевидно, что у растений, произрастающих при умеренном освещении, усиление защитной реакции, обусловленное ростом НФТ, выражено слабее, чем у растений того же вида, произрастающих на сильном свете. Естественно, что на сильном свете растения не испытывают дефицита в энергии для фотосинтеза, но при этом они должны защищаться от светового стресса.

Мы показали, что динамика изменений НФТ в ходе освещения листьев традесканции, адаптированных к темноте, зависит от длительности акклимации растений к свету высокой или умеренной интенсивности. Это особенно наглядно проявляется в опытах с тенелюбивым видом *T. fluminensis*. У растений, произрастающих на сильном свете, значение q_E заметно возрастает по мере акклимации (рис. 5а). При этом становится более выраженной медленная компонента q_Z . Это понятно, растения тенелюбивого вида *T. fluminensis*, растущего на сильном свете, приобретают в ходе акклимации дополнительную способность защищаться от светового стресса. По мере увеличения времени акклимации такая реакция ФСА растений становится более выраженной. В то же время при длительном нахождении растений на свету умеренной интенсивности этого не происходит, наблюдается даже небольшой спад q_E по мере акклимации растений. Можно предположить, что спад q_E вызван изменениями хлоропластов по мере старения растений, что может быть обусловлено, например, уменьшением биосинтеза и/или усилением деградации некоторых белков ФСА.

Электронный парамагнитный резонанс

Различия во флуоресцентных характеристиках листьев растений, выращенных при сильном и умеренном освещении, проявляются также в кинетике редокс-превращений P_{700}^+ — первичного донора электрона в реакционном центре ФС1. На рис. 6 показаны типичные кривые фотоиндуцированных изменений интенсивности сигнала ЭПР от P_{700}^+ в листьях растений, адаптированных к темноте в течение 10 мин. Протокол измерений P_{700}^+ был таким же, как в наших предыдущих работах [54, 55]: после предварительного освещения белым светом (БС) в течение 1 мин (для стандартизации условий эксперимента) образцы адаптировали к темноте в течение 10 мин. Видно, что в ответ на включение БС, возбуждающего обе фотосистемы, сигнал ЭПР от P_{700}^+ возрастает, достигая стационарного уровня. В листьях, адаптированных к темноте, наблюдается многофазная кинетика роста сигнала. Сразу после включения БС происходит небольшой скачок сигнала, потом

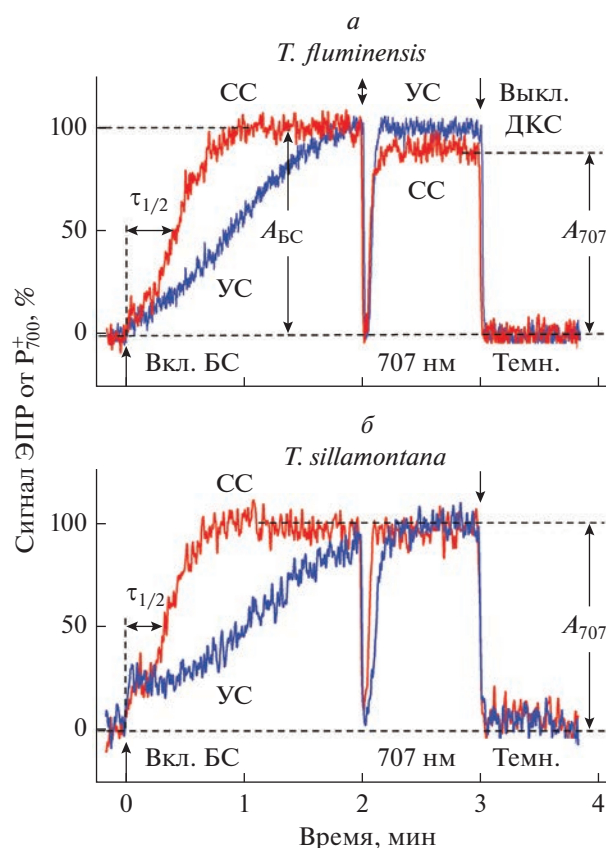


Рис. 6. Кинетика фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР от P_{700}^+ в листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, выращенных при освещении “сильным” (СС) или “умеренным” (УС) светом. Перед началом включения белого света (БС) образцы адаптировали к темноте в течение 10 мин.

наблюдается его сравнительно медленный рост к стационарному уровню $A_{БС}$. Задержка роста сигнала, характеризующая параметром $\tau_{1/2}$, обусловлена тем, что при адаптации листа к темноте реакции ЦКБ инактивируются, поэтому вследствие переизбытка NADPH затрудняется отток электронов от ФС1 к NADP⁺ [10, 61]. По мере освещения хлоропластов активируются реакции ЦКБ и отток электронов от ФС1 ускоряется; кроме этого, уменьшается скорость притока электронов от ФС2 к P_{700}^+ в результате закисления люмена, а также ослабляется активность ФС2 вследствие генерации НФТ. Наряду с этим происходит перераспределение энергии поглощаемого света в пользу ФС1 (переход состояние “1” → состояние “2”), и наступает перераспределение электронных потоков (нециклический/циклический транспорт электронов) в пользу нециклического потока [61]. Все это должно способствовать росту сигнала ЭПР от P_{700}^+ .

Из рис. 6 также видно, что скорость окисления P_{700} при действии БС зависит от условий произрастания растений. У обоих видов традесканции, акклиматизированных к сильному свету, фотоокисление P_{700} происходит заметно быстрее, чем у растений, произрастающих при умеренном освещении.

После переключения БС на более слабый дальний красный свет (ДКС, $\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм), возбуждающий преимущественно ФС1, концентрация P_{700}^+ сначала падает, а затем монотонно возрастает. Быстрое падение сигнала после переключения БС на ДКС объясняется притоком электронов к P_{700}^+ от пула восстановленных переносчиков (это в основном молекулы пластохинола), накопившихся в ЭТЦ между ФС2 и ФС1 во время действия БС. Характерное время спада сигнала от P_{700}^+ после отключения БС составляет $t_{1/2} \sim 5\text{--}30$ мс (в зависимости от длительности действия БС, данные не приведены), что соответствует времени переноса электронов от пластохинола к P_{700}^+ [1, 4–6, 62–64]. В дальнейшем, после реокисления переносчиков ЦЭТ между ФС2 и ФС1 за счет работы ФС1, возбуждаемой при действии ДКС, сигнал от P_{700}^+ снова возрастает. После выключения ДКС окисленные центры P_{700}^+ восстанавливаются за счет эндогенных доноров электрона [48, 49]. Восстановление P_{700}^+ после выключения ДКС происходит на несколько порядков медленнее ($t_{1/2} \sim 2\text{--}5$ с), чем после выключения БС (см. подробные результаты наших исследований, описанные в работе [64]).

Описанная выше закономерность – ускорение фотоокисления P_{700} в листьях растений, выращенных при высокой интенсивности света, обычно проявляет себя и в кинетике МИФ листьев *T. fluminensis* и *T. sillamontana*. Ранее, изучая влияние условий произрастания (интенсивность света) на кинетику МИФ, мы установили, что в листьях этих растений, выросших на сильном свете, МИФ спадает быстрее, чем в листьях растений, выросших при умеренной интенсивности света [65]. Ускорение спада флуоресценции Хл *a* во время индукционного периода может быть обусловлено теми же регуляторными механизмами, что и ускорение фотоокисления P_{700} при действии БС: светоиндуцированной активацией реакций ЦКБ, усилением НФТ, ионной регуляцией электронного транспорта между ФС2 и ФС1, переходами типа состояние “1” ↔ состояние “2” и др. (см. обзоры [66–68]). Очевидно, что закономерности, характерные для кинетики редокс-превращений P_{700} и для МИФ в листьях растений, акклиматизированных к сильному и умеренному свету, отражает то, что в результате акклимации

растений к сильному свету их ФСА быстрее реагирует на флуктуации освещения, а потому эти растения могут успешно противостоять световому стрессу.

Следует обратить внимание на то, что отношение амплитуд сигналов ЭПР от окисленных центров P_{700}^+ , индуцированных при действии БС и ДКС (параметры $A_{\text{БС}}$ и A_{707}), зависит от вида растений и условий их произрастания. Отношение $A_{\text{БС}}/A_{707}$ было несколько выше для листьев *T. fluminensis*, выращенных на сильном свете, по сравнению с растениями, выращенными на слабом свете (рис. 6а). Как мы предположили ранее [65], это может указывать на то, что в листьях *T. fluminensis*, акклиматизированных к сильному свету, возрастает вклад циклического транспорта электронов вокруг ФС1, что проявляется при действии ДКС, возбуждающего преимущественно ФС1. В случае листьев *T. sillamontana* подобного различия не наблюдалось. Точные причины этого пока остаются неизвестными.

Таким образом, листья обоих изученных нами видов традесканции, культивируемых при разных интенсивностях света, обнаруживают различия в кинетике фотоиндуцированных изменений P_{700} . Основное различие касается скорости окисления P_{700} под действием БС. Так, например, по мере старения листьев теневыносливого вида *T. fluminensis*, произрастающего при умеренном освещении, происходит замедление окисления P_{700} , индуцируемого при действии БС (рис. 7). При этом листья этого же вида растений, выращиваемые на сильном свете, показывают более быструю скорость фотоокисления P_{700} по сравнению с растениями, акклиматизированными к умеренному свету. Это значит, что ФС1 растений, выращенных на сильном свете, быстрее “реагирует” на включение БС, что согласуется с данными флуоресцентных исследований.

Вопрос о том, как в ходе длительной акклимации традесканций к свету различной интенсивности изменяется количественный состав электрон-транспортных комплексов и пигментов светособирающих антенн ФС1 и ФС2 требует специального анализа. По нашим предварительным данным, у обоих видов традесканций, акклиматизированных к сильному свету, суммарное содержание Хл *a* и Хл *b*, отнесенное к единице массы зеленого листа, уменьшается (данные не приведены, будут представлены в нашей следующей работе). Это наблюдение хорошо согласуется с известными литературными данными о том, что в листьях других видов растений относительные размеры светособирающей антенны ФС2 уменьшаются при акклимации растений к сильному свету [25–27, 33, 40, 66].

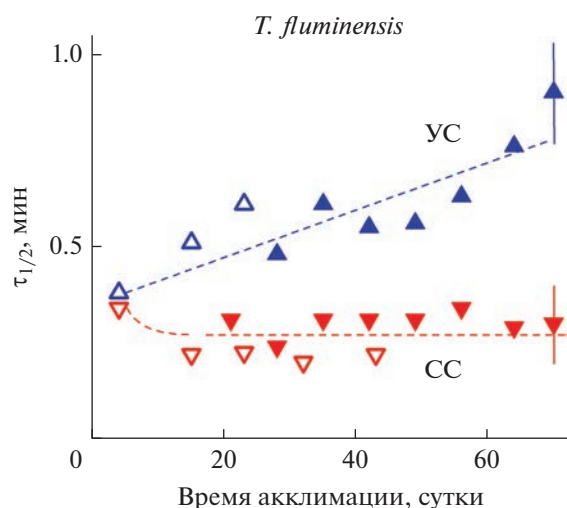


Рис. 7. Зависимость кинетического параметра $\tau_{1/2}$, характеризующего скорость фотоокисления P_{700} под действием белого света (см. определение $\tau_{1/2}$ на рис. 6) в листьях *T. fluminensis*, в зависимости от длительности акклимации растений к свету “сильной” и “умеренной” интенсивности. Закрытые и открытые символы соответствуют данным, полученным для разных серий экспериментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование двух “контрастных” видов традесканции показало заметное различие в динамике изменений фотосинтетических показателей теневыносливых (*T. fluminensis*) и светолюбивых (*T. sillamontana*) видов традесканции при длительной акклимации этих растений к свету сильной или умеренной интенсивности. Выявлено заметное различие в функционировании ФСА этих видов, проявляющееся при длительной акклимации растений (до 5 месяцев). У световыносливого вида *T. sillamontana* фотосинтетические показатели ФСА сравнительно слабо изменяются при акклимации растений к свету различной интенсивности. Фотосинтетические показатели хлоропластов теневыносливого вида *T. fluminensis* обнаруживают более высокую лабильность. “Повреждаемость” их ФСА при повышении интенсивности света сопровождается усилением НФТ, что проявляется по мере увеличения длительности экспозиции листьев (рис. 6). Одним из наиболее эффективных механизмов усиления защиты ФСА листьев традесканции от светового стресса является усиление экспрессии регуляторного белка PsbS, приводящее к дополнительному росту НФТ [33].

Благодарности. Авторы признательны В.В. Птушенко за предоставленный нам осветительный прибор, использованный для выращивания растений, а также за ценные консультации, касающиеся различных аспектов биохимии и физиологии растений.

Вклад авторов. И.С. Сусличенко — проведение флуоресцентных измерений и получение данных методом ЭПР. М.А. Беньков, Д.А. Ковалишина, М.О. Петрова — участие в долгосрочных опытах по измерению флуоресцентных характеристик листьев. Б.В. Трубицин — приборное обеспечение работы и проведение ЭПР-измерений. А.Н. Тихонов — общий план работы, анализ литературных данных, подготовка графических материалов, написание статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20047).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haehnel W. 1984. Photosynthetic electron transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **35**, 659–693.
2. Nelson N., Yocum C.F. 2006. Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 521–565.
3. Mamedov M., Govindjee, Nadtochenko V., Semenov A. 2015. Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms. *Photosynth. Res.* **125**, 51–63.
4. Tikhonov A.N. 2014. The cytochrome b_6f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways. *Plant Physiol. Biochem.* **81**, 163–183.
5. Malone L.A., Proctor M.S., Hitchcock A., Hunter C.N., Johnson M.P. 2021. Cytochrome b_6f – Orchestrator of photosynthetic electron transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1862, **148380**. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148380>
6. Höhner R., Pribil M., Herbstová M., Lopez L.S., Kunz H.-H., Li M., Wood M., Svoboda V., Puthiyaveetil S., Leister D., Kirchhoff H. 2020. Plastocyanin is the long-range electron carrier between photosystem II and photosystem I in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 15354–15362.
7. Boyer P.D. 1997. The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749.
8. Junge W., Nelson N. 2015. ATP synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 631–657.
9. Романовский Ю.М., Тихонов А.Н. 2010. Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-синтаза – вращающийся молекулярный мотор. *Успехи физических наук*, **180**, 931–956.
10. Эдвардс Дж., Уокер Д. 1986. *Фотосинтез С3 и С4 растений: механизмы и регуляция*. М.: Мир. 598 с.
11. Allakhverdiev S.I., Murata N. 2004. Environmental stress inhibits the synthesis *de novo* of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in

- Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta*. **1657**, 23–32.
12. Järvi S., Suorsa M., Aro E.-M. 2015. Photosystem II repair in plant chloroplasts — Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. **1847**, 900–909.
 13. Kono M., Terashima I. 2014. Long-term and short-term responses of the photosynthetic electron transport to fluctuating light. *J. Photochem. Photobiol. B*. **137**, 89–99.
 14. Berry J., Björkman O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 491–543.
 15. Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P. 2008. Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth. Res.* **98**, 541–550.
 16. Allen D.J., Ort D.R. 2001. Impact of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants. *Trends Plant Sci.* **6**, 36–42.
 17. Tikhonov A.N., Vershubskii A.V. 2020. Temperature-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts *in vitro* and *in silico*. *Photosynth. Res.* **146**, 299–329.
 18. Michelet L., Zaffagnini M., Morisse S., Sparla F., Pérez-Pérez M.E., Francia F., Danon A., Marchand C.H., Fermani S., Trost P., Lemaire S.D. 2013. Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: Something old, something new. *Front. Plant Sci.* **4**, 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470>
 19. Balsera M., Schumann P., Buchanan B.B. 2016. Redox regulation in chloroplasts. In: *Chloroplasts. Current research and future trends*. Ed. Kirchhoff H. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 187–207.
 20. Rumberg B., Siggel U. 1969. pH changes in the inner phase of the thylakoids during photosynthesis. *Naturwissenschaften*. **56**, 130–132.
 21. Kramer D.M., Sacksteder C.A., Cruz J.A. 1999. How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.* **60**, 151–163.
 22. Tikhonov A.N. 2013. pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth. Res.* **116**, 511–534.
 23. Schanser G. 2022. Determining photosynthetic control, a probe for the balance between electron transport and Calvin–Benson cycle activity, with the DUAL-KLAS-NIR. *Photosynth. Res.* **153**, 191–204.
 24. Lemeille S., Rochaix J.-D. 2010. State transitions at the crossroad of thylakoid signalling pathways. *Photosynth. Res.* **106**, 33–46.
 25. Lichtenthaler H.K., Babani F. 2004. Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. In: *Chlorophyll a Fluorescence*. Springer, p. 713–736.
 26. Lichtenthaler H.K., Babani F., Navrátil M., Buschmann C. 2013. Chlorophyll fluorescence kinetics, photosynthetic activity, and pigment composition of blue-shade and half-shade leaves as compared to sun and shade leaves of different trees. *Photosynth. Res.* **117**, 355–366.
 27. Kirchhoff H. 2013. Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* **116**, 481–487.
 28. Tikkanen M., Jarvi S., Aro E.-M. 2015. Light acclimation involves dynamic re-organization of the pigment–protein megacomplexes in non-appressed thylakoid domains. *The Plant J.* **84**, 360–373.
 29. Puthiyaveetil S., Kirchhoff H., Höhner R. 2016. Structural and functional dynamics of the thylakoid membrane system. In: *Chloroplasts. Current research and future trends*. Ed. Kirchhoff H. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 59–87.
 30. Demmig-Adams B. 1998. Survey of thermal energy dissipation and pigment composition in sun and shade leaves. *Plant Cell Physiol.* **39**, 474–482.
 31. Samoilova O.P., Ptushenko V.V., Kuvykin I.V., Kiselev S.A., Ptushenko O.S., Tikhonov A.N. 2011. Effects of light environment on the induction of chlorophyll fluorescence in leaves: A comparative study of *Tradescantia* species of different ecotypes. *BioSystems*. **105**, 41–48.
 32. Ptushenko V.V., Ptushenko E.A., Samoilova O.P., Tikhonov A.N. 2013. Chlorophyll fluorescence in the leaves of *Tradescantia* species of different ecological groups: Induction events at different intensities of actinic light. *Biosystems*. **114**, 85–97.
 33. Mishanin V.I., Trubitsin B.V., Benkov M.A., Minin A.A., Tikhonov A.N. 2016. Light acclimation of shade-tolerant and light-resistant *Tradescantia* species: Induction of chlorophyll *a* fluorescence and P₇₀₀ photooxidation, expression of PsbS and Lhcb1 proteins. *Photosynth. Res.* **130**, 275–291.
 34. Mishanin V.I., Trubitsin B.V., Patsaeva S.V., Ptushenko V.V., Solovchenko A.E., Tikhonov A.N. 2017. Acclimation of shade-tolerant and light-resistant *Tradescantia* species to growth light: Chlorophyll *a* fluorescence, electron transport, and xanthophyll content. *Photosynth. Res.* **133**, 87–102.
 35. Ptushenko V.V., Zhigalova T.V., Avercheva O.V., Tikhonov A.N. 2019. Three phases of energy-dependent induction of P₇₀₀⁺ and Chl *a* fluorescence in *Tradescantia fluminensis* leaves. *Photosynth. Res.* **139**, 509–522.
 36. Benkov M.A., Yatsenko A.M., Tikhonov A.N. 2019. Light acclimation of shade-tolerant and sun-resistant *Tradescantia* species: Photochemical activity of PSII and its sensitivity to heat treatment. *Photosynth. Res.* **139**, 203–214.
 37. Suslichenko I.S., Tikhonov A.N. 2019. Photo-reducible plastoquinone pools in chloroplasts of *Tradescantia* plants acclimated to high and low light. *FEBS Lett.* **593**, 788–798.
 38. Randall R.P. 2012. *A global compendium of weeds*. 2nd edn. Department of Agriculture and Food, Western Australia. 1125 p.
 39. Лютова М.И., Тихонов А.Н. 1988. Сопоставление температурной зависимости подвижности липидо-растворимой спиновой метки в тилакоидных мембранах хлоропластов дыни и огурца. *Биофизика*. **33**, 460–464.
 40. Anderson J.M., Chow W.S., Park Y., Franklin L.A., Robinson S.P.-A., van Hasselt P.R. 2001. Response of *Tradescantia albiflora* to growth irradiance: Change versus changeability. *Photosynth. Res.* **67**, 103–112.
 41. Gounaris K., Brain A.P.R., Quinn P.J., Williams W.P. 1984. Structural reorganization of chloroplast thylakoid

- membranes in response to heat-stress. *Biochim. Biophys. Acta*. **766**, 198–208.
42. Li Z., Wakao S., Fischer B.B., Niyogi K.K. 2009. Sensing and responding to excess light. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 239–260.
 43. Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta*. **1767**, 414–421.
 44. Tikhonov A.N. 2020. Structure-function relationships in chloroplasts: EPR study of temperature-dependent regulation of photosynthesis, an overview. In *Photosynthesis: molecular approaches to solar energy conversion*. Eds. Shen J.R., Satoh K., Allakhverdiev S.I. p. 343–373, https://doi.org/10.1007/978-3-030-67407-6_13
 45. Lazár D. 1999. Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochim. Biophys. Acta*. **1412**, 1–28.
 46. Baker N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 89–113.
 47. Adams W.W. III, Demmig-Adams B. 2004. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. In: *Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration*. Eds. Papageorgiou G.C., Govindjee G. Springer, Dordrecht, p. 583–604.
 48. Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dąbrowski P., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Neubauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Serôdio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M. 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: Practical issues. *Photosynth. Res.* **122**, 121–158.
 49. Niyogi K.K., Truong T.B. 2013. Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 307–314.
 50. Nilkens M., Kress E., Lambrev P., Miloslavina Y., Müller M., Holzwarth A.R., Jahns P. 2010. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta*. **1797**, 466–475.
 51. Jahns P., Holzwarth A.R. 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*. **1817**, 182–193.
 52. Ruban A.V. 2016. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol.* **170**, 1903–1916.
 53. Murchie E.H., Ruban A.V. 2020. Dynamic non-photochemical quenching in plants: From molecular mechanism to productivity. *Plant J.* **101**, 885–896.
 54. Kuvykin I.V., Ptushenko V.V., Vershoubsky A.V., Tikhonov A.N. 2011. Regulation of electron transport in C3 plant chloroplasts *in situ* and *in silico*. Short-term effects of atmospheric CO₂ and O₂. *Biochim. Biophys. Acta*. **1807**, 336–347.
 55. Trubitsin B.V., Vershubskii A.V., Priklonskii V.I., Tikhonov A.N. 2015. Short-term regulation and alternative pathways of photosynthetic electron transport in *Hibiscus rosa-sinensis* leaves. *J. Photochem. Photobiol. B*. **152**, 400–415.
 56. Stirbet A. 2012. Chlorophyll *a* fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise. *Photosynth. Res.* **113**, 15–61.
 57. Stirbet A., Govindjee G. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and photosystem II: Basics and applications of the *OJIP* fluorescence transient. *J. Photochem. Photobiol. B*. **104**, 236–257.
 58. Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. 2006. Dark recovery of the Chl *a* fluorescence transient (*OJIP*) after light adaptation: The *qT*-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochim. Biophys. Acta*. **1757**, 787–797.
 59. Jallet D., Cantrell M., Peers G. 2016. New players for photoprotection and light acclimation. In: *Chloroplasts. Current research and future trends*. Ed. Kirchhoff H. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 133–159.
 60. Tikkanen M., Mekala N.R., Aro E.-M. 2014. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochim. Biophys. Acta*. **1837**, 210–215.
 61. Strand D.D., Fisher N., Kramer D.M. 2016. Distinct energetics and regulatory functions of the two major cyclic electron flow pathways in chloroplasts. In: *Chloroplasts: Current Research and Future Trends*. Ed. Kirchhoff H. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 89–100.
 62. Stiehl H.H., Witt H.T. 1969. Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis. *Z. Naturforsch.* **24b**, 1588–1598.
 63. Рыжиков С.Б., Тихонов А.Н. 1988. Регуляция скорости переноса электрона в фотосинтетических мембранах высших растений. *Биофизика*. **33**, 642–646.
 64. Suslichenko I.S., Trubitsin B.V., Vershubskii A.V., Tikhonov A.N. 2022. The noninvasive monitoring of the redox status of photosynthetic electron transport chains in *Hibiscus rosa-sinensis* and *Tradescantia* leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **185**, 233–243.
 65. Kalmatskaya O.A., Trubitsin B.V., Suslichenko I.S., Karavaev V.A., Tikhonov A.N. 2020. Electron transport in *Tradescantia* leaves acclimated to high and low light: Thermoluminescence, PAM-fluorometry, and EPR studies. *Photosynth. Res.* **146**, 123–141.
 66. Eberhard S., Finazzi G., Wollman F.-A. 2008. The dynamics of photosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 463–515.
 67. Foyer C.H., Neukermans J., Queval G., Noctor G., Harbinson J. 2012. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J. Exp. Bot.* **63**, 1637–1661.
 68. Tikhonov A.N. 2015. Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts: An overview. *Photosynth. Res.* **125**, 65–94.

Electron Transport in Chloroplast Membranes of Shade-Tolerant and Light-Loving Tradescantia Species

I. S. Suslichenko¹, M. A. Benkov¹, D. A. Kovalishina¹,
M. O. Petrova¹, B. V. Trubitsin¹, A. N. Tikhonov^{1,*}

¹*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow, 119991 Russia*

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

In this work we investigated the electron transport processes in chloroplasts of two contrasting species of Tradescantia, the shade-tolerant species *T. fluminensis* and the light-loving species *T. sillamontana*, grown under moderate or strong light conditions. Plants were acclimated to a moderate or high intensity of photosynthetically active radiation. Photochemical activity of Photosystem 2 (PS2) was assayed by measuring chlorophyll a (Chl a) fluorescence, using the OJIP test, and by monitoring a slow induction of Chl a fluorescence (SIF) in Tradescantia leaves *in vivo* and *in situ*. The coefficient of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl a fluorescence was determined from the SIF kinetics. Photochemical activity of photosystem 1 (PS1) was determined by electron paramagnetic resonance from the light-induced redox transients of P700, photoreaction center of PS1. Shade-tolerant (*T. fluminensis*) and light-loving (*T. sillamontana*) species showed clear differences in their photosynthetic characteristics depending on long-term (up to 5 months) acclimatization to moderate ($50\text{--}125\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) or strong ($850\text{--}1000\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) irradiation with photosynthetically active white light. In the leaves of light-loving species *T. sillamontana*, the photosynthetic characteristics changed only slightly upon variations of light intensity. Leaves of the shade-tolerant species *T. fluminensis* exhibited a pronounced sensitivity to changes in light intensity during acclimatization, showing a reversible increase in NPQ accompanied by an attenuation of PS2 photochemistry. After the reduction of light intensity, photochemical activity of PS2 recovered.

Keywords: Tradescantia, shade tolerant and light loving species, acclimation, chlorophyll fluorescence induction, EPR

УДК 576.385.5

ОБРАТИМОЕ ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ А-431 К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ В КОНФЛЮЭНТНЫХ КУЛЬТУРАХ СООТВЕТСТВУЕТ СНИЖЕНИЮ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ РЕЦЕПТОРОВ DR4 И DR5

© 2023 г. Р. С. Фадеев^{а, б, *}, Н. В. Долгих^а, А. В. Чеканов^а, А. С. Сенотов^а,
К. С. Краснов^{а, б}, М. И. Кобякова^а, Я. В. Ломовская^а, И. С. Фадеева^{а, б}, В. С. Акатов^{а, б}

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

^бПушинский государственный естественно-научный институт,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: fadееvrs@gmail.com

Поступила в редакцию 07.10.2022 г.

После доработки 03.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Исследование механизмов действия цитокина TRAIL (TNF alpha Related Apoptosis Inducing Ligand) представляет большой интерес для разработки противоопухолевых препаратов направленного действия. Ранее нами было показано обратимое повышение устойчивости опухолевых клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу в конфлюэнтных культурах. В клетках А-431 это происходит на фоне снижения экспрессии проапоптотических рецепторов DR4 и DR5 при отсутствии антиапоптотических рецепторов DcR1 и DcR2 на поверхности клеток, что сопровождается отсутствием активации проапоптотического белка Bid, эффекторной каспазы-3 при действии рекомбинантного белка izTRAIL, приводящее к повышению TRAIL-резистентности. Полученные результаты указывают на то, что обратимое повышение устойчивости клеток А-431 карциномы человека к TRAIL-индуцированному апоптозу в конфлюэнтных культурах обусловлено снижением экспрессии рецепторов DR4 и DR5 на клеточной поверхности.

Ключевые слова: клетки карциномы человека, TRAIL-индуцированный апоптоз, конфлюэнтная культура, TRAIL-резистентность, TRAIL-рецепторы

DOI: 10.31857/S0233475523020020, EDN: LALOSK

ВВЕДЕНИЕ

Для разработки противоопухолевых препаратов направленного действия большой интерес представляет белок Apo2L/TRAIL (TNF alpha Related Apoptosis Inducing Ligand). Белок TRAIL представлен на поверхности таких иммунокомпетентных клеток, как NK-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, и является элементом иммунного надзора. Данный белок связывается с проапоптотическими рецепторами DR4 и DR5 на поверхности опухолевых клеток и вызывает их апоптотическую гибель, не повреждая нормальные клетки [1–4]. Некоторые опухолевые клетки обладают конститутивной устойчивостью к TRAIL, что ограничивает противоопухолевый потенциал этого белка [5]. Также известно, что в условиях *in vitro* резистентность опухолевых клеток к противоопухолевым средствам, в том числе к TRAIL-индуцированному апоптозу, может повышаться в многоклеточных структурах, таких как трехмерные клеточные сфероиды, имитирующие *in vitro* бессосудистые

участки солидных опухолей [6]. Причины данного явления могут быть различны: от изменения внутриклеточных сигнальных путей до нарушения транспорта белка в центр сфероидов [7]. Ранее нами было показано, что повышение устойчивости опухолевых клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу происходит не только в трехмерных клеточных сфероидов, но и в двумерных конфлюэнтных культурах [8]. Такое повышение TRAIL-устойчивости опухолевых клеток является обратимым. После пересева клеток из высокоплотных культур в культуры с низкой плотностью TRAIL-чувствительность клеток восстанавливается [9]. Есть основания полагать, что причина повышения TRAIL-устойчивости опухолевых клеток в высокоплотных конфлюэнтных культурах определяется не межклеточными контактами, а изменением состава цитокинов в околоклеточном микроокружении, и это может моделировать подобные изменения *in vivo* [10, 11]. Ясного понимания механизмов этого феномена в настоящее время нет. Определение механизмов обратимой

TRAIL-резистентности опухолевых клеток в высокоплотных культурах позволит выявить основные молекулярные мишени для повышения эффективности противоопухолевого действия белка TRAIL.

В представленной работе было выполнено исследование экспрессии TRAIL-рецепторов и проапоптотической активации проапоптотического белка Bid, каспазы-3 и PARP (поли-ADP-рибоза полимеразы) при повышении TRAIL-резистентности клеток эпидермоидной карциномы кожи человека A-431 в конфлюэнтных культурах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали питательную среду DMEM (Sigma-Aldrich, США), эмбриональную телячью сыворотку (Gibco, США), сульфат гентамицина (Sigma-Aldrich), раствор трипсина-EDTA (Панэко, Россия), кристаллический фиолетовый (Sigma-Aldrich), фосфатно-солевой буфер (PBS, ЭкоСервис, Россия), додецилсульфат натрия (Applichem, США), параформальдегид (Applichem).

Получение рекомбинантного человеческого белка izTRAIL. Последовательность синтетического изолейцинового зиппера (IEKKIEA)₄ (RM-KQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGE) синтезирована *de novo* [12]. Ген izTRAIL синтезировали так, как описано ранее [13]. Синтезированный ген клонировали в плазмидный вектор pET101 (Novagen, США). Бактериальный штамм *E. coli* BL21(DE3) был трансформирован полученным экспрессирующим вектором pET101/izTRAIL. Белок экспрессировали в среде ТВ в течение 12 ч при 18°C. Затем белок экстрагировали из клеточной биомассы в буфере, содержащем 0.1 М трис, 0.2 М NaCl, 50 мМ EDTA (pH 8.0). Полученный таким образом белок izTRAIL в основном находился в тельцах включения. Ренатурацию белка осуществляли с использованием 6 М раствор гуанидинхлорида, затем белок переводили в буфер, содержащий 0.5 М аргинин, 0.5 М NaCl и 100 мМ трис-HCl (pH 8.0) и 2 мМ ДТТ, до конечной концентрации 500 мкг/мл. Полученный izTRAIL (тримерная форма около 80 кДа, мономерная форма около 27 кДа) очищали методом металл-аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Ni Sepharose High Performance. Чистоту полученного белка определяли с использованием SDS-PAGE и окрашиванием Coomassie blue G 250.

Культура клеток. В работе использовали клетки эпидермоидной карциномы кожи человека A-431, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина сульфата при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Рост числа клеток начинался через 20 ч после посева. Время

удвоения числа клеток в растущих культурах составляло 20 ± 2 ч.

Анализ цитотоксического действия белка izTRAIL. Клетки A-431 высевали в 96-луночные культуральные планшеты в количестве 5×10^3 клеток в 100 мкл ростовой среды на лунку и культивировали в течение 24 ч (пролиферирующая культура) или 96 ч (конфлюэнтная культура). Далее в опытные культуры добавляли izTRAIL и через 24 ч после добавления оценивали соотношение количества живых клеток в опытных и контрольных (без добавления izTRAIL) культурах. Для этого культуры клеток промывали PBS и окрашивали в течение 15 мин в 0.2% растворе кристаллического фиолетового в 20% этаноле, промывали PBS, добавляли 1% раствор додецилсульфата натрия и измеряли оптическую плотность при 550 нм, используя планшетный спектрофотометр Infinite F200 (Tecan, Австрия) [13].

Проточная цитометрия. Для проведения анализа экспрессии TRAIL-рецепторов на поверхности клеток A-431 через 24 ч (пролиферирующая культура) и 96 ч (конфлюэнтная культура) после посева клетки открепляли от поверхности культурального пластика с помощью смеси трипсина-EDTA, отмывали в Cell Staining Buffer (Biolegend, США) центрифугированием при 300g в течение 5 мин. Окрашивание проводили с использованием моноклональных антител PE anti-human CD261 (TRAIL-R1, BD Bioscience, США), PE anti-human CD262 (TRAIL-R2, Biolegend), Alexa Fluor 647 Mouse anti-human CD263 (TRAIL-R3, BD Bioscience), PE CD264/TRAIL-R4 Mouse anti-human (Molecular Probes, США). Для определения неспецифического связывания антител клетки окрашивали антителами соответствующего изотипического контроля. Окрашивание проводили при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. После окрашивания клетки фиксировали 2% раствором параформальдегида. Анализ экспрессии проводили при помощи проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience) с программным обеспечением BD Accuri C6 Software.

Иммуноблоттинг. Клетки отмывали в холодном PBS центрифугированием при 350g в течение 5 мин. Клеточный осадок лизировали в RIPA буфере (Santa Cruz, США) с добавленными ингибиторами протеаз (Santa Cruz) в течение 5 мин на льду. Клеточный осадок дополнительно разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Sonicator Q500 (Misonix, США). Концентрацию белка измеряли методом Брэдфорд. Электрофорез в денатурирующих условиях проводили в камере Mini-protean tetra system (Bio-Rad, США) по методу Лэммли [14]. На каждую дорожку геля наносили по 20 мкг клеточного лизата. В качестве маркеров молекулярной массы использовали PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану 0.2 мкм (Bio-Rad) осу-

шествовали на Mini-protean transfer system (Bio-Rad). Для идентификации процессинга белков Bid, PARP и каспазы-3 использовали поликлональные кроличьи антитела BID Antibody (2002) (Cell Signaling Technology, США), поликлональные кроличьи антитела PARP Antibody (9542) (Cell Signaling Technology) и моноклональные мышиные антитела Anti-Human Caspase-3 (610322) (BD Biosciences). В качестве вторичных антител использовали Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate (1706515) и Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate (1706516) (Bio-Rad) в разведении 1 : 20000. Детекцию производили с помощью TMB kit (Vector Laboratories, США) согласно инструкции производителя.

Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в 5 повторях ($n \geq 5$). Статистическую значимость отличий определяли с использованием критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Снижение представленности TRAIL-рецепторов TRAILR1/DR4 и TRAILR2/DR5 на поверхности клеток А-431 при повышении их TRAIL-резистентности в конфлюэнтных культурах

Ранее нами было показано, что рекомбинантный белок izTRAIL эффективно вызывает гибель клеток линии А-431, полученной из эпидермоидной карциномы кожи человека, в пролиферирующей культуре низкой плотности (24 ч после посева), но через 96 ч после посева клетки образуют конфлюэнтную культуру и становятся резистентными к действию данного белка [8]. В связи с тем, что падение экспрессии TRAIL-рецепторов на клеточной поверхности может быть причиной повышения устойчивости клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу, было проведено исследование экспрессии про- и антиапоптотических TRAIL-рецепторов у клеток в пролиферирующих культурах низкой плотности (24 ч после посева) и в не пролиферирующих конфлюэнтных культурах (96 ч после посева). На рис. 1 представлена дозовая зависимость цитотоксического действия izTRAIL на клетки культур низкой плотности и конфлюэнтных культур, которые использовали в работе для анализа представленности TRAIL-рецепторов и TRAIL-сигнализации. Повышение TRAIL-резистентности в конфлюэнтных культурах и TRAIL-чувствительность клеток в культурах низкой плотности были такими же, как обнаружено ранее [8]. На клетках А-431 в культурах низкой плотности, как и в конфлюэнтных культурах, обнаружено отсутствие экспрессии антиапоптотических рецепторов TRAILR3/DcR1 и TRAILR4/DcR2 (рис. 2).

Анализ экспрессии проапоптотических рецепторов TRAILR1/DR4 и TRAILR2/DR5 показал

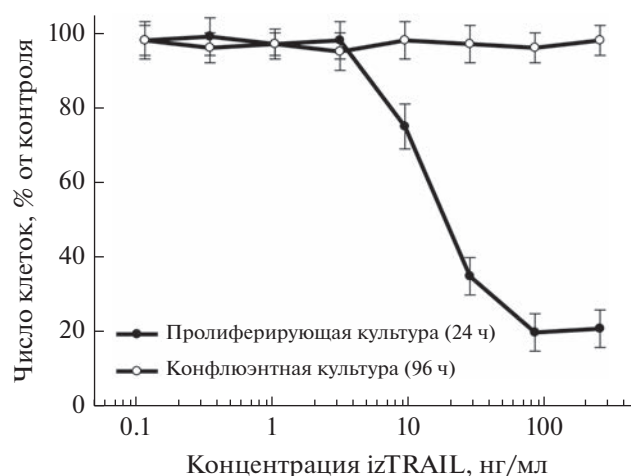


Рис. 1. Увеличение резистентности клеток А-431 к TRAIL-индуцированной гибели в конфлюэнтной не пролиферирующей культуре через 96 ч после посева.

снижение числа клеток, несущих TRAILR1/DR4 с $98 \pm 2\%$ в пролиферирующей культуре низкой плотности до $25 \pm 2\%$ в конфлюэнтной культуре (рис. 3а). При исследовании экспрессии TRAILR2/DR5 были получены сходные результаты. Число клеток, несущих TRAILR2/DR5, уменьшалось с $97 \pm 3\%$ в пролиферирующей низкоплотной культуре до $23 \pm 5\%$ в конфлюэнтной культуре (рис. 3б).

Таким образом, полученные данные показывают, что повышение устойчивости клеток А-431 к TRAIL-индуцированному апоптозу в конфлюэнтной культуре происходит на фоне снижения представленности проапоптотических рецепторов TRAILR1/DR4 и TRAILR2/DR5 на клеточной поверхности.

В конфлюэнтных культурах клеток А-431, в отличие от культур низкой плотности, белок izTRAIL не активирует процессинг проапоптотического белка Bid и каспазы-3

Нами было проведено исследование процессинга ключевых молекулярных участников TRAIL-индуцированного апоптоза, таких как Bid и каспаза-3, при добавлении izTRAIL до 1 мкг/мл в пролиферирующую и конфлюэнтную культуру клеток А-431.

На рис. 4 показано, что в пролиферирующей культуре клеток А-431 происходит процессирование (разрезание) Bid (22 кДа) с появлением усеченной формы данного белка — tBid (15 кДа), в то время как в конфлюэнтной культуре А-431 при добавлении белка izTRAIL образования tBid не происходило.

Поскольку tBid не процессируется, то активация TRAIL-индуцированного апоптоза в конфлюэнтной культуре клеток А-431 может проходить другим возможным путем, через активацию эф-

эффекторной каспазы-3 непосредственным воздействием рецепторной каспазы-8 [6]. Для этого мы исследовали возможность протеолитической активации эффекторной каспазы-3 при воздействии до 1 мкг/мл белка izTRAIL на клетки А-431 в конфлюэнтной культуре. На рис. 5 показано, что при добавлении izTRAIL в конфлюэнтной культуре нет активации эффекторной каспазы-3, а в пролиферирующей культуре наблюдается образование активных малых форм каспазы-3 — p17. Эти данные указывают на то, что при действии izTRAIL на клетки А-431 в конфлюэнтной культуре не происходит активации рецепторной каспазы-8.

Дополнительно мы показали, что в клетках А-431 в конфлюэнтной культуре, в отличие от пролиферирующих культур низкой плотности, при добавлении izTRAIL до 1 мкг/мл не происходит достоверного увеличения неактивной формы cPARP (p89), являющейся одним из основных маркеров апоптотической клеточной гибели (рис. 6). Это также указывает на отсутствие TRAIL-индуцированного апоптоза у клеток А-431 в конфлюэнтной культуре.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что в конфлюэнтной культуре клеток А-431 происходит ингибирование сигнального пути TRAIL-индуцированного апоптоза уже на начальных стадиях, в частности на этапе активации инициаторного белка Bid.

ОБСУЖДЕНИЕ

Механизм TRAIL-индуцированного апоптоза у опухолевых клеток начинается от связывания тримерного лиганда TRAIL с рецепторами клеточной гибели, в результате чего запускается каскад реакций, приводящий к протеолитическому разрушению внутриклеточных структур за счет активации эффекторных каспаз [6]. Известно, что связывание белка TRAIL со своими проапоптотическими рецепторами DR4 и/или DR5 приводит к тримеризации и кластеризации последних. Внутриклеточный DED-домен TRAIL-рецептора взаимодействует с адаптерным белком FADD, который в свою очередь взаимодействует с прокаспазами-8 и -10. Взаимодействие всех вышеперечисленных белков приводит к образованию мультисубъединичного комплекса известного как DISC, в котором происходит аутолитическая активация каспаз-8 и -10 [15]. Активные каспазы -8 и -10 в свою очередь активируют эффекторную каспазу-3, которая будучи активированной разрезает другие каспазы, и множество других регуляторных и структурных белков [6]. В конечном итоге это приводит к появлению признаков апоптоза, таких как фрагментация ДНК, формирование пузырей на клеточной поверхности (“блеbbing”) и так далее [16]. В качестве альтернативного пути, активированная инициаторная каспаза-8 также может процессировать белок Bid с образо-

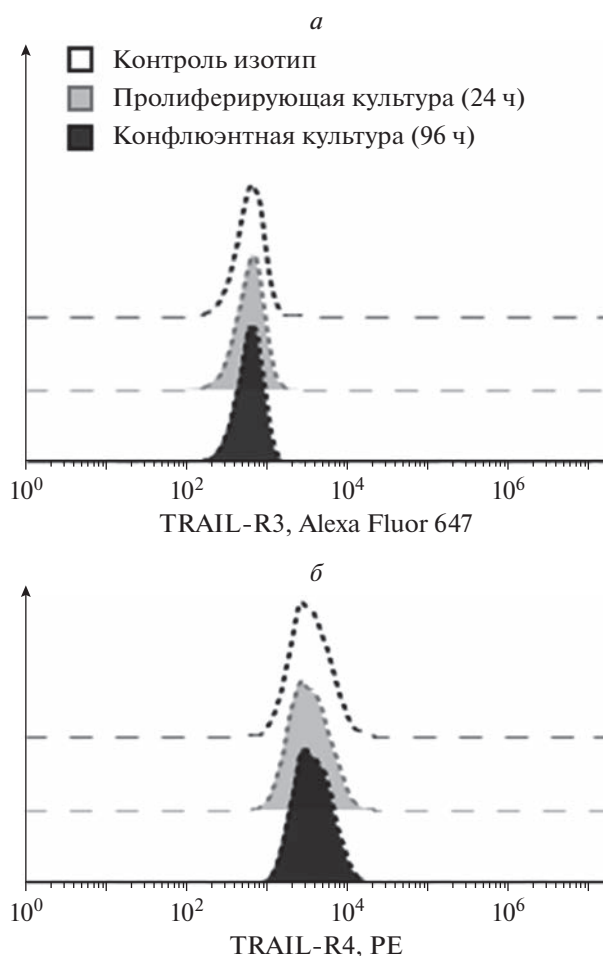


Рис. 2. Отсутствие экспрессии антиапоптотических рецепторов TRAILR3/DcR1 (а) и TRAILR4/DcR2 (б) на поверхности клеток А 431 в культурах низкой плотности и в конфлюэнтных культурах.

ванием активной формы tBid, проапоптотического белка семейства Bcl-2. Белок tBid связывается с белками BAX и BAK, принадлежащими семейству Bcl-2, что приводит к их конформационной реорганизации с последующей олигомеризацией и образованием проницаемой поры в наружной мембране митохондрий (MOMP) [17]. MOMP обеспечивает выход в цитозоль проапоптотических белков таких как цитохром с, Smac/DIABLO, которые обычно находятся в межмембранном пространстве. Цитохром с вместе с АТР и фактором APAF-1 образуют структуру, называемую апоптосомой, образование которой необходимо для активации каспазы-9. Активная каспаза-9 в свою очередь активирует эффекторные каспазы-3, -6 и -7 [18].

Возникновение резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу может осуществляться на любом из этих этапов передачи апоптотического сигнала. Для исследования механизма конфлюэнтной резистентности необходимо определить, на каком уровне происходит нарушение

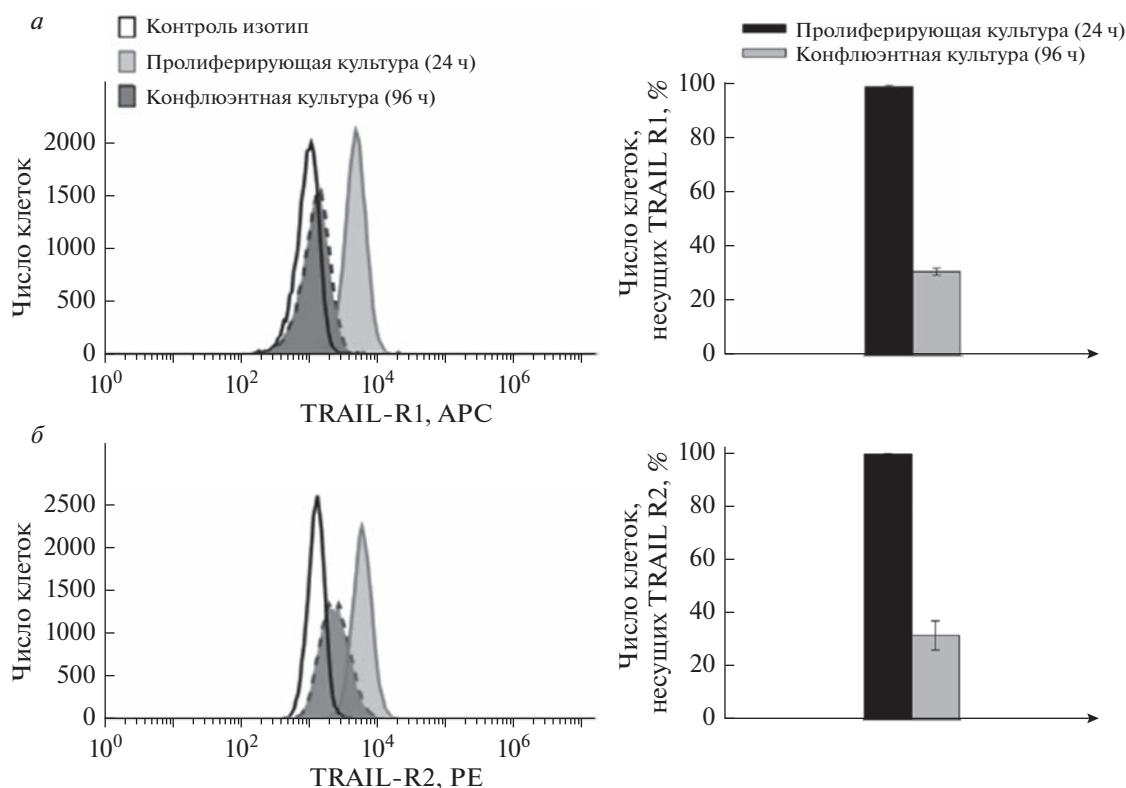


Рис. 3. Уменьшение процента клеток А-431, несущих проапоптотические рецепторы TRAILR1/DR4 (а) и TRAILR2/DR5 (б), в конфлюэнтной культуре в сравнении с пролиферирующей. Отличие процента клеток, несущих DR4 (а) и DR5 (б), в конфлюэнтных культурах в сравнении с контрольными пролиферирующими культурами статистически значимо при $*p < 0.05$.

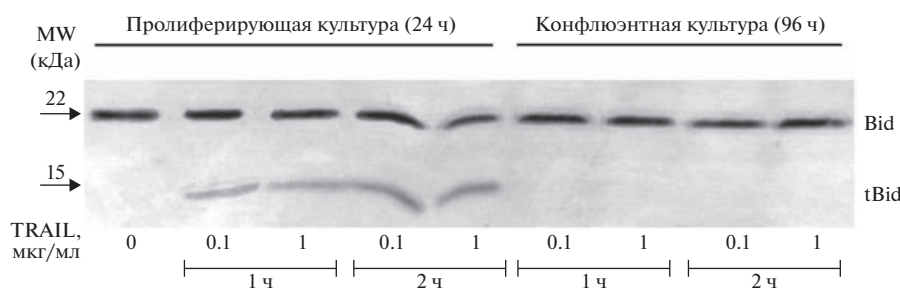


Рис. 4. Отсутствие процессинга Bid в конфлюэнтной культуре клеток А-431 при их инкубации с izTRAIL (до 1 мкг/мл) в течение 2 ч в отличие от контрольных пролиферирующих культур.

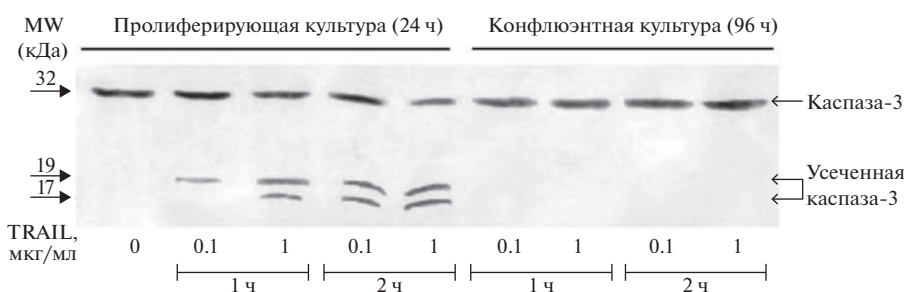


Рис. 5. Отсутствие активации каспазы-3 в конфлюэнтной культуре клеток А-431 при инкубации с izTRAIL (до 1 мкг/мл) в течение 2 ч в отличие от контрольных пролиферирующих культур.

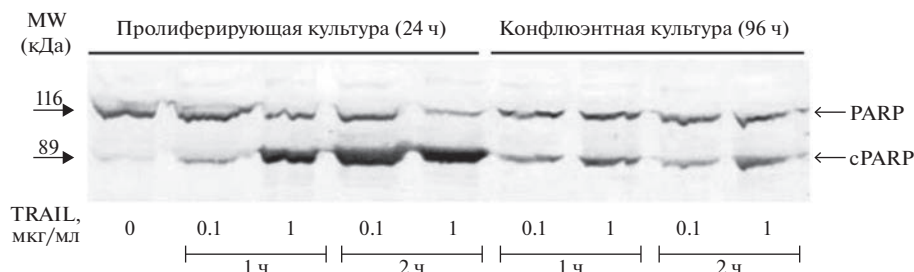


Рис. 6. Отсутствие увеличения неактивной формы cPARP в конфлюэнтной культуре клеток A-431 при инкубации с izTRAIL (до 1 мкг/мл) в отличие от контрольных пролиферирующих культур.

проведения апоптотического сигнала. Прежде всего, наиболее логичным подходом является разделение двух главных этапов передачи апоптотического сигнала, т.е. разделить возникновение резистентности на участке передачи сигнала с лиганд-рецепторного комплекса и резистентность на уровне митохондрии. Поскольку связующим звеном между двумя этими уровнями передачи сигнала является белок Bid, исследование активации именно этого белка можно считать наиболее определяющей в предполагаемых механизмах конфлюэнтной резистентности клеток A-431 к TRAIL-индуцированному апоптозу.

Мы показали, что в конфлюэнтной культуре клеток A-431 при добавлении TRAIL не происходило образование активной формы белка Bid — tBid. Параллельно с этим, у клеток A-431 в конфлюэнтной культуре отсутствовала непосредственная протеолитическая активация эффекторной каспазы-3 каспазой-8. То есть, мы можем предположить, что активация TRAIL-индуцированной каспазы-зависимой клеточной гибели не происходила. Это предположение подтверждается и тем, что у клеток A-431 в конфлюэнтной культуре при добавлении TRAIL не изменялось количество основного маркера апоптоза — неактивной формы cPARP (p89). Таким образом, в конфлюэнтной культуре клеток A-431 TRAIL-индуцированный апоптоз уже блокирован на участке до митохондриального триггера. В реализации такого рода устойчивости могут участвовать прежде всего повышение количества на поверхности клеток антиапоптотических мембранно-связанных «рецепторов-ловушек» для лиганда TRAIL, таких как TRAILR3/DcR1 и TRAILR4/DcR2 [19]. Однако нами было показано их полное отсутствие у клеток A-431 не только в конфлюэнтной TRAIL-резистентной культуре, но и даже в пролиферирующей неконфлюэнтной культуре, не обладающей резистентностью к TRAIL-индуцированному апоптозу. Таким образом, рецепторы TRAILR3/DcR1 и TRAILR4/DcR2 не принимают участие в повышении устойчивости клеток A-431 к TRAIL-индуцированному апоптозу в конфлюэнтной культуре.

В свою очередь, при исследовании проапоптотических рецепторов к TRAIL у клеток A-431,

таких как TRAILR1/DR4 и TRAILR2/DR5, нами было показано, что в конфлюэнтной культуре происходило выраженное снижение числа как DR4-позитивных, так и DR5-позитивных клеток, по сравнению с клетками в пролиферирующей неконфлюэнтной культуре, не обладающей устойчивостью к TRAIL-индуцированному апоптозу. То есть, в конфлюэнтной культуре снижено число клеток, у которых TRAIL потенциально способен индуцировать апоптоз путем связывания с проапоптотическими рецепторами.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что в основе повышения устойчивости клеток эпидермоидной карциномы кожи A-431 к TRAIL-индуцированному апоптозу в конфлюэнтной культуре лежит механизм, основанный на потере проапоптотических рецепторов TRAILR1/DR4 и TRAILR2/DR5, что, в свою очередь, предотвращает активацию проапоптотического белка Bid и эффекторной каспазы-3.

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

Финансовая и техническая поддержка. Работа выполнена при технической поддержке Центра коллективного пользования ИТЭБ РАН и при финансовой поддержке в рамках Госзадания № 075-01027-22-00.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chamuleau M.E., Ossenkoppele G.J., van Rhenen A., van Dreunen L., Jirka S.M., Zevenbergen A., Schuurhuis G.J., van de Loosdrecht A.A. 2011. High TRAIL-R3 expression on leukemic blasts is associated with poor outcome and induces apoptosis-resistance which can be overcome by targeting TRAIL-R2. *Leuk. Res.* **35**, 741–749.
2. Cheng J., Hylander B.L., Baer M.R., Chen X., Repasky E.A. 2006. Multiple mechanisms underlie resistance of leukemia cells to Apo2 Ligand/TRAIL. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1844–1853.
3. Riccioni R., Pasquini L., Mariani G., Saulle E., Rossini A., Diverio D., Pelosi E., Vitale A., Chierichini A., Cedrone M., Foa R., Coco F., Peschle C., Testa U.

2005. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica*. **90**, 612–624.
4. Buchsbaum D.J., Zhou T., Lobuglio A.F. 2006. TRAIL receptor-targeted therapy. *Future Oncol.* **2**, 493–508.
 5. Zhang L., Fang B. 2005. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Therapy*. **12**, 228–237.
 6. Grayson K.A., Jyotsana N., Ortiz-Otero N., King M.R. 2011. Overcoming TRAIL-resistance by sensitizing prostate cancer 3D spheroids with taxanes. *PLoS One*. **16** (3), e0246733.
 7. Chandrasekaran S., Marshall J.R., Messing J.A., Hsu J.W., King M.R. 2014. TRAIL-mediated apoptosis in breast cancer cells cultured as 3D spheroids. *PLoS One*. **9** (10), e111487.
 8. Фадеев Р.С., Чеканов А.В., Долгих Н.В., Акатов В.С. 2012. Повышение резистентности опухолевых клеток линии A431 к TRAIL-индуцированному апоптозу в конфлюэнтных культурах. *Биофизика*. **57** (4), 649–654.
 9. Долгих Н.В., Чеканов А.В., Фадеев Р.С., Акатов В.С. 2017. Различия в активации сигнальных путей опухолевых клеток A431 при конфлюэнт-зависимой и конфлюэнт-независимой TRAIL-резистентности. *Биол. мембраны*. **34** (6), 124–136.
 10. Kobayakova M., Lomovskaya Y., Senotov A., Lomovsky A., Minaychev V., Fadeeva I., Shtatnova D., Krasnov K., Zvyagina A., Odinkova I., Akatov V., Fadeev R. 2022. The increase in the drug resistance of acute myeloid leukemia THP-1 cells in high-density cell culture is associated with inflammatory-like activation and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 7881.
 11. Lomovskaya Y.V., Kobayakova M.I., Senotov A.S., Lomovsky A.I., Minaychev V.V., Fadeeva I.S., Shtatnova D.Y., Krasnov K.S., Zvyagina A.I., Akatov V.S., Fadeev R.S. 2022. Macrophage-like THP-1 cells derived from high-density cell culture are resistant to TRAIL-induced cell death via down-regulation of death-receptors DR4 and DR5. *Biomolecules*. **12**, 150.
 12. Suzuki K., Hiroaki H., Kohda D., Tanaka T. 1998. An isoleucine zipper peptide forms a native-like triple stranded coiled coil in solution. *Protein Eng.* **11**, 1051–1055.
 13. Fadeev R., Chekanov A., Solovieva M., Bezborodova O., Nemtsova E., Dolgikh N., Fadeeva I., Senotov A., Kobayakova M., Evstratova Y., Yakubovskaya R., Akatov V. 2019. Improved anticancer effect of recombinant protein izTRAIL combined with sorafenib and peptide iRGD. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 525.
 14. Lomovsky A., Baburina Y., Odinkova I., Kobayakova M., Evstratova Y., Sotnikova L., Krestinin R., Krestinina O. 2020. Melatonin can modulate the effect of navitoclax (ABT-737) in HL-60 cells. *Antioxidants*. **9**, 1143.
 15. Lavrik I.N., Krammer P.H. 2012. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* **19** (1), 36–41.
 16. Galluzzi L., Maiuri M., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G. 2007. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* **14** (7), 1237–1243.
 17. Waterhouse N., Sedelies K., Sutton V. Pinkoski M., Thia K., Johnstone R., Bird P., Green D., Trapani J. 2006. Functional dissociation of $\Delta\Psi_m$ and cytochrome c release defines the contribution of mitochondria upstream of caspase activation during granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **13**, 607–618.
 18. Zou H., Henzel W., Liu X., Lutschg A., Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. **90** (3), 405–413.
 19. Dida F., Li Y., Iwao A., Deguchi T., Azuma E., Komada Y. 2008. Resistance to TRAIL-induced apoptosis caused by constitutional phosphorylation of Akt and PTEN in acute lymphoblastic leukemia cells. *Exp. Hematology*. **36** (10), 1343–1353.

Reversible Increase in Resistance of A-431 Carcinoma Cells to TRAIL-Induced Apoptosis in Confluent Cultures Corresponds to a Decrease in Expression of DR4 and DR5 Receptors

R. S. Fadeev^{1,2,*}, N. V. Dolgikh¹, A. V. Chekanov¹, A. S. Senotov¹, K. S. Krasnov^{1,2}, M. I. Kobayakova¹,
Ya. V. Lomovskaya¹, I. S. Fadeeva^{1,2}, V. S. Akatov^{1,2}

¹Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

²Pushchino State Natural Science Institute, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: fadeevrs@gmail.com

TRAIL (TNF alpha Related Apoptosis Inducing Ligand) cytokine is of great interest for the development of targeted antitumor drugs. We have previously found a reversible increase in tumour cell resistance to TRAIL-induced apoptosis in confluent cultures. In this work we show that increase in resistance of A-431 cells to TRAIL-induced death in confluent culture is associated with reduced expression of pro-apoptotic receptors DR4 and DR5 with absence of anti-apoptotic receptors DcR1 and DcR2 on cell surface. Decreased representation of DR4 and DR5 receptors on the cell surface is accompanied by a lack of activation of the pro-apoptotic protein Bid, effector caspase 3 under the action of recombinant protein izTRAIL, which leads to an increase in TRAIL resistance. Our results indicate that reversible increase in resistance of human carcinoma A-431 cells to TRAIL-induced apoptosis in confluent cultures is caused by decrease in expression of DR4 and DR5 receptors on cell surface.

Keywords: human carcinoma cells, TRAIL-induced apoptosis, confluent culture, TRAIL resistance, TRAIL receptors

УДК 577.25

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБЪЯСНЕНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕРЕЗ РЕЦЕПТОР GPVI

© 2023 г. А. А. Мартыянов^{а, б}, М. Г. Степанян^а, А. Н. Свешникова^{а, б, с, *}

^аЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
Москва, 109029 Россия

^бНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, 117997 Россия

^сМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной физико-химической инженерии, Москва, 119991 Россия

*e-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 28.11.2022 г.

После доработки 09.12.2022 г.

Принята к публикации 11.12.2022 г.

Одним из ключевых рецепторов на поверхности тромбоцитов является гликопротеин VI (GPVI) — рецептор к белку межклеточного матрикса коллагену. GPVI запускает каскад тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах, инициируя кальциевую сигнализацию через фосфолипазу $Cy2$ (PLC $\gamma2$), а также активацию фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и генерацию PIP_3 . Ранее нашей группой было продемонстрировано, что среди здоровых доноров наблюдается более чем двукратная вариабельность по ответам тромбоцитов на активацию через рецептор GPVI. В представленной работе предлагается компьютерная модель активации тромбоцитов через рецептор GPVI для объяснения данного явления. Настоящая модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений, интегрируемых методом LSODA. Уравнения модели были выведены на основе ранее опубликованной модели активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2. С помощью разработанной модели была предсказана монотонная зависимость степени активации тромбоцита от количества рецепторов GPVI. Анализ чувствительности модели к ее параметрам показал, что ответ тромбоцита на активацию через GPVI лимитируется количеством рецепторов GPVI, а также каталитическими параметрами тирозинкиназ, при этом двукратного изменения количества рецепторов достаточно для объяснения наблюдаемого феномена. Таким образом, теоретически было предсказано, что вариабельность кальциевых ответов тромбоцитов на их стимуляцию через рецептор GPVI может определяться вариабельностью количества рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов здоровых доноров.

Ключевые слова: математическое моделирование, рецептор-гликопротеин, внутриклеточная сигнализация, тромбоциты

DOI: 10.31857/S0233475523020044, **EDN:** KZDAFN

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты — безъядерные клетки крови размером 2–4 мкм, производящиеся в костном мозге и циркулирующие в кровотоке в течение 7–10 дней до момента утилизации в селезенке или печени [1]. Основная задача тромбоцитов — предотвращение кровопотери при нарушении целостности кровеносной системы [2, 3]. Для выполнения данной задачи тромбоциты способны переходить в так называемое активированное состояние при контакте с повреждением [4, 5]. Активированный тромбоцит может адгезировать к стенкам сосуда и

агрегировать с другими клетками за счет активных интегринов, секретировать гранулы и молекулы-активаторы тромбоцитов, стимулировать свертывание плазмы крови [2, 6, 7].

При повреждении кровеносных сосудов происходит активация и гибель клеток сосудистого эндотелия, приводящая к появлению растворимых активаторов тромбоцитов — ADP и тромбина, а также обнажение белков межклеточного матрикса, одним из которых является коллаген [1]. Тромбоциты адгезируют к коллагену не напрямую, а через молекулы фактора фон Виллебранда (ФВ) — мультимерного белка плазмы крови, который также секретируется эндотелиоцитами при их активации — одним концом связывающи-

Сокращения: PRP — богатая тромбоцитами плазма, CRP — коллаген-подобный пептид.

еся с коллагеном, а другим — с тромбоцитами [8]. При этом тромбоциты оказываются в непосредственной близости от коллагена, который активирует тромбоцитарный рецептор гликопротеин VI (GPVI) [9, 10]. Активация тромбоцитов коллагеном значительно замедлена по сравнению с другими известными агонистами, такими как ADP и тромбин [11].

Связывание рецепторов GPVI с коллагеном инициирует кластеризацию этих рецепторов на поверхности тромбоцитов [9, 12, 13]. Ассоциированные с GPVI тирозинкиназы семейства Src (Fyn/Lyn) при этом оказываются в непосредственной близости от других рецепторов GPVI и потому могут фосфорилировать их цитоплазматические домены [14]. С фосфорилированными GPVI связываются неактивные Syk, что приводит к их активации [15]. Для активации одной Syk-киназы достаточно одной молекулы GPVI. Активные Syk запускают формирование “LAT-сигнасомы”, в основе которой лежит линкерный адаптерный Т-клеточный белок (LAT) [14]. В составе LAT-сигнасомы в результате ассоциации с фосфотирозином и фосфорилирования со стороны тирозинкиназ происходит активация фосфолипазы $\text{C}\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$). PLC $\gamma 2$ гидролизует фосфоинозитол-4,5-бисфосфат (PIP $_2$), находящийся в мембране тромбоцитов, производя растворимый инозитол-3,4,5-трифосфат (IP $_3$) — вторичный мессенджер, который активирует рецептор к IP $_3$ (IP $_3$ R) на поверхности производной эндоплазматического ретикулума плотной тубулярной системы (ЭР), являющейся хранилищем для ионов кальция в тромбоците [14]. Активация IP $_3$ R инициирует выход из ЭР в цитозоль свободных ионов кальция, что приводит к резкому повышению его концентрации и активации кальций-чувствительных белков в цитозоле тромбоцита [4, 16]. Повышение концентрации кальция в цитозоле приводит как к закрытию IP $_3$ R, так и к активации кальциевых АТФ-аз плазматической мембраны (plasma membrane calcium ATPase, PMCA) и мембраны ЭР (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA) [17], эффективно удаляющих кальций из цитозоля. Благодаря названным обратным связям происходит развитие кальциевых “осцилляций” в цитозоле активированных тромбоцитов [17, 18].

Кальциевая сигнализация определяет все функциональные ответы тромбоцитов на активацию: изменение формы, необходимое для увеличения площади поверхности закрытия повреждения, активацию мембранных интегринов $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, необходимых для формирования тромбоцитарных агрегатов, секрецию тромбоцитарных α -гранул и плотных гранул, необходимых для активации близлежащих клеток, прокоагулянтный ответ — митохондриально-зависимый некроз тромбоци-

тов, при котором происходит выставление фосфатидилсерина, основы для активации плазменного каскада свертывания крови [1, 17, 19]. Определение ключевых механизмов инициации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах является ключом для тонкой регуляции активации тромбоцитов через данный путь [20].

Ранее [10] нами было сделано наблюдение, что при активации тромбоцитов здоровых доноров коллаген-подобными пептидами (collagen-related peptide, CRP) — общепризнанными агонистами GPVI [21], наблюдается значительная вариабельность по максимально достижимым кальциевым ответам тромбоцитов, однако ни один из исследованных доноров не имел склонностей к кровотечениям или тромбозам. Одной из возможных причин подобного разброса может являться значительная вариабельность по экспрессии GPVI на поверхности тромбоцитов среди здоровых доноров. Так, в работе [22] было показано, что экспрессия GPVI у здоровых доноров может различаться более чем в 5 раз. С другой стороны, в той же работе не было обнаружено значительной разницы по агрегации тромбоцитов доноров в ответ на стимуляцию их конвульксином (экзогенный агонист GPVI), независимо от количества GPVI на поверхности [22]. Вариабельность по количествам GPVI среди здоровых доноров была показана и в другой работе, однако авторами был получен разброс только в полтора раза среди 102 здоровых доноров [23]. Авторы [23] также показали, что у пациентов с миелопролиферативными заболеваниями, такими как эссенциальная тромбоцитопатия (ЭТП) и истинная полицитемия (ИПМ), наблюдается значительное снижение экспрессии GPVI по сравнению со здоровыми донорами, а также наблюдается более чем двукратный разброс по экспрессии рецепторов на мембране тромбоцитов. Причинами столь значительного разброса по количеству рецепторов на тромбоцитах может являться как наследственность, так и потенциальные патологические факторы.

Таким образом, возникает закономерный вопрос о причинах и значимости наблюдаемой вариабельности ответа тромбоцитов на активацию рецептора GPVI. В настоящей работе мы используем компьютерное моделирование для описания кальциевой сигнализации, возникающей в тромбоцитах при активации через рецептор GPVI. В результате исследования разработанной модели мы делаем вывод, что двукратный разброс между донорами в уровне экспрессии рецепторов достаточен для объяснения наблюдаемой вариабельности ответа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разрабатываемая модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных урав-

нений (ОДУ), описывающих кинетику концентраций веществ, участвующих в реакциях в соответствующих компартментах. Каждое из ОДУ описывает скорости изменения концентраций веществ. Для описания реакций ассоциации—диссоциации соединений, а также для описания неферментативных реакций был использован закон действующих масс. Ферментативные реакции описывались с помощью кинетики Михаэлиса—Ментен. В некоторых случаях для описания реакций были использованы эмпирические законы, полученные исходя из механистических представлений о реакциях.

Численное интегрирование и анализ модели проводился в COPASI.org [24], интегрирование проводилось методом LSODA [25] с относительной чувствительностью 10^{-6} . Начальные условия для моделей были взяты из доступных данных по протеомному составу тромбоцитов [26]. Подбор параметров модели по экспериментальным данным проводился методом эволюционного программирования с размером популяции 200 [27].

Анализ чувствительности [28] модели к значениям параметров проводился в подходе OAT (“one-at-a-time”) с относительным отклонением 0.001, при этом в качестве выходного значения рассматривалась максимальная концентрация активных PLC γ 2 при стимуляции 10 мкг/мл CRP.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка компьютерной модели активации тромбоцита через рецептор GPVI

Модель активации тромбоцитов через рецептор GPVI была построена на основе ранее опубликованной [20, 29] модели активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2. Несмотря на общую схожесть CLEC-2- и GPVI-индуцированной сигнализации в тромбоцитах, на начальных стадиях иницируемой ими сигнализации присутствуют следующие значимые отличия [10] (рис. 1):

1. количество GPVI на тромбоцитах в среднем составляет 5000 молекул [30], в то время как молекул CLEC-2 только 2000 [31];
2. молекулы рецепторов GPVI через полипролиновый домен ассоциированы с тирозинкиназами SFK [32], что обеспечивает их большую доступность для более быстрого фосфорилирования, в то время как CLEC-2 в покоем состоянии клетки не ассоциированы ни с одними из киназ;
3. при активации тромбоцита цитоплазматический домен рецептора GPVI фосфорилируется тирозинкиназами SFK (в первую очередь Fyn и Lyn) [14], в то время как цитоплазматический домен рецептора CLEC-2 фосфорилируется только тирозинкиназами Syk [33], которых в тромбоцитах значительно меньше [34];

4. кластеризация рецепторов GPVI в области липидных рафтов может быть дополнительно ускорена благодаря их ассоциации с SFK-киназами, которые пальмитоилированы, и за счет этого имеют значительное сродство к мембранным микродоменам, обогащенным холестерином [32, 35];

5. в ассоциированной с GPVI Fc γ R-цепью находится ITAM-домен, содержащий две YxxL последовательности, которые могут быть фосфорилированы, в то время как в цитоплазматическом домене CLEC-2 находится домен hemITAM, содержащий одну YxxL последовательность, доступную для фосфорилирования соответствующими тирозинкиназами; таким образом, одна молекула GPVI может активировать одну тирозинкиназу Syk, в то время как CLEC-2 для этого необходимо сформировать димер.

Так как разные лиганды значительным образом могут влиять на динамику и паттерны кластеризации рецепторов GPVI тромбоцитов [9], в качестве основного исследуемого лиганда был выбран CRP [36]. Параметры модуля кластеризации были получены нами ранее [13] на основе экспериментальных данных по кластеризации рецепторов GPVI в ответ на появление лиганда [9]. В настоящей работе по данным активации тромбоцитов в суспензии в ответ на CRP [10, 30] проводился дополнительный подбор параметров: аффинность Syk к фосфорилированным рецепторам GPVI, константа реакции дефосфорилирования GPVI, а также константы аффинности тирозинкиназ SFK к рецептору GPVI (табл. 1). Результаты подбора параметров модели приведены на рис. 2. В результате был сделан вывод, что модель может качественно описывать получаемые экспериментальные данные.

Определение управляющих параметров модели

Анализ чувствительности разработанной модели показал, что в ответ на изменение следующих параметров модели максимум мобилизации кальция значительно меняется (относительная чувствительность более 1). Наиболее значимыми для сигнализации параметрами являются начальное количество рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов (относительная чувствительность — 1.2), параметры Syk-киназы — каталитическая константа (относительная чувствительность — 1.67), начальное количество (1.58) и константа Михаэлиса (относительная чувствительность — 1.19).

Гипотеза о вкладе вариабельности количества рецепторов GPVI на тромбоцитах в ответ на активацию подтверждается высокой, хоть и не максимальной, чувствительностью модели к их количеству. Следует иметь в виду, что нелинейная зависимость концентрации кальция от концентрации

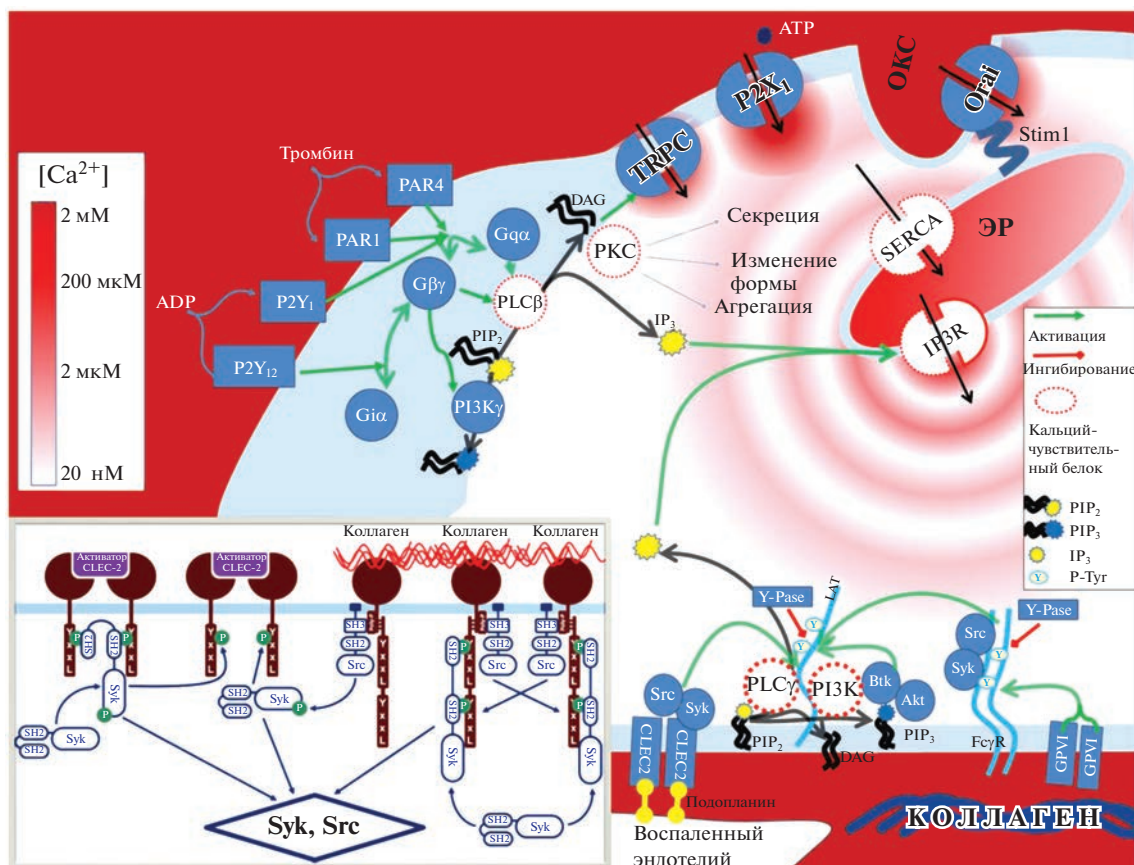


Рис. 1. Упрощенная схема кальциевой и фосфоинозитидной внутриклеточной сигнализации при активации тромбоцита. Активация тромбоцита управляется концентрациями вторичных мессенджеров — ионов кальция (концентрация обозначена оттенками фона) и молекул фосфоинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP_3). Концентрация ионов кальция в цитозоле появляется в результате активности фосфолипазы (PLC). PLC гидролизует фосфоинозитол-4,5-дифосфат (PIP_2) до диацилглицерола (DAG) и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3). IP_3 приводит к открытию каналов-рецепторов IP_3R в мембране ЭР тромбоцитов, что запускает кальциевую сигнализацию. Ионы кальция возвращаются в ЭР с помощью кальцевой АТФ-азы SERCA. Концентрация PIP_3 повышается в результате активности фосфоинозитид-3-киназы ($PI3K$), которая фосфорилирует мембранные фосфоинозитиды, в первую очередь PIP_2 до PIP_3 . Появление PIP_3 приводит к локализации в окрестности сигнасомы тирозинкиназы Btk, которая фосфорилирует ассоциированные с адаптером LAT $PLC\gamma_2$, переводя их в активное состояние. На вставке показано, как рецепторы CLEC-2 и $GPVI$ передают сигнал через одну и ту же сеть тирозинкиназ, однако внутриклеточные домены CLEC-2 фосфорилируются тирозинкиназами Syk, а внутриклеточные домены $GPVI$ тирозинкиназами SFK. Кроме того, фосфорилирование CLEC-2 замедленно по сравнению с фосфорилированием $GPVI$ из-за отсутствия ассоциации между Syk и CLEC-2 в покое тромбоцитах. Активные Syk-киназы фосфорилируют адаптеры LAT, к которым через фосфотирозины присоединяются $PI3K$ и $PLC\gamma_2$. $PI3K$ при этом переходят в активное состояние. Обозначения: G — субъединицы G-белка; PAR1, PAR4 — активируемые протеазы; $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ — пуриnergические рецепторы; TRPC, $P2X_1$, Orai1 — катионные каналы; PKC — протеинкиназа C; Y-Pase — тирозинфосфатаза; ОКС — открытая канальцевая система тромбоцита.

IP_3 [44] могла нивелировать влияние количества копий рецептора на кальциевые ответы. Для дополнительного исследования этого вопроса, мы рассчитали зависимость максимальной концентрации кальция в ответ на CRP от количества $GPVI$ на тромбоцитах (рис. 3). При расчете было получено, что изменение количества рецепторов $GPVI$ с 5000 до 3000 копий на тромбоцит может привести к двукратному уменьшению максимальной концентрации кальция в ответ на стимуляцию. Таким образом, можно сделать вывод, что при варьировании количеств рецепторов в физиологических пределах можно наблюдать кальцие-

вые ответы, получаемые в экспериментах [10, 23]. Важно подчеркнуть, что вариabельность по кальциевым ответам наблюдается только при активации насыщающими концентрациям CRP, что подразумевает задействование всех рецепторов $GPVI$. Это также косвенно подтверждает вывод о том, что одной из причин вариabельности ответов тромбоцитов на активацию их через $GPVI$ является вариabельность количества самих по себе рецепторов.

Важно также отметить, что в работе [30] теоретически была предсказана двукратная вариabельность активации тромбоцитов через $GPVI$ только

Таблица 1. Уравнения и параметры модели, специфичные для GPM

Реакция	Уравнение	Параметры	Источн.
$D \rightleftharpoons D^*$	$\frac{\tilde{\gamma}_{PM}^{Src} / 3 + \frac{F^P S_{PM}^{Src}}{V_{JM}} \frac{2k_{cat}^{Src}}{k_m^{Src} + \frac{DS_{PM}^{Src}}{V_{JM}}}}{k_m^{Src} + \frac{DS_{PM}^{Src}}{V_{JM}}} \left(D - S_{PM}^{CDI48} D^* \right)$	$k_{cat}^{Src} = 2.1 \text{ c}^{-1}$ $k_m^{Src} = 3 \text{ мкМ}$ $K_r^{CDI48} = 90.8 \text{ c}^{-1}$	[37, 38] [20]
$CS \rightleftharpoons CS^*$	$S_{PM} \left(\left(\frac{FS_{PM}^{Src} / 3 + \frac{F^P S_{PM}^{Src}}{V_{JM}} \frac{2k_{cat}^{Src}}{k_m^{Src} + \frac{CS S_{PM}^{Src}}{V_{JM}}}}{k_m^{Src} + \frac{CS S_{PM}^{Src}}{V_{JM}}} \right) CS - S_{PM}^{CDI48} CS^* \right)$	$k_{cat}^{Src} = 2.1 \text{ c}^{-1}$ $k_m^{Src} = 3 \text{ мкМ}$ $K_r^{Csk} = 1.0 \text{ c}^{-1}$	[37, 38] [20] [20]
$F_P \rightleftharpoons F$	$S_{PM} \left(\left(\frac{D^* S_{PM}^{CDI48}}{V_{JM}} \frac{k_{cat}^{Csk}}{k_m^{CDI48} + \frac{F_P S_{PM}^{Csk}}{V_{JM}}} \right) F_P - S_{PM} \left(\frac{CS^* S_{PM}^{Csk}}{V_{JM}} \frac{k_{cat}^{Csk}}{k_m^{Csk} + \frac{FS_{PM}^{Csk}}{V_{JM}}} \right) F \right)$	$k_{cat}^{CDI48} = 9.7 \text{ c}^{-1}$ $k_m^{CDI48} = 9.1 \text{ мМ}$ $k_{cat}^{Csk} = 1.9 \text{ c}^{-1}$ $k_m^{Csk} = 10 \text{ мкМ}$	[39] [40]
$F \rightleftharpoons F^P$	$S_{PM} \left(\left(\frac{FS_{PM}^{Src} / 3 + \frac{F^P S_{PM}^{Src}}{V_{JM}} \frac{2k_{cat}^{Src}}{k_m^{Src} + \frac{FS_{PM}^{Src}}{V_{JM}}}}{k_m^{Src} + \frac{FS_{PM}^{Src}}{V_{JM}}} \right) F - S_{PM} \left(\frac{D^* S_{PM}^{CDI48}}{V_{JM}} \frac{k_{cat}^{CDI48}}{k_m^{CDI48} + \frac{F^P S_{PM}^{CDI48}}{V_{JM}}} \right) F^P \right)$	$k_{cat}^{Src} = 2.1 \text{ c}^{-1}$ $k_m^{Src} = 3 \text{ мкМ}$ $k_{cat}^{CDI48} = 9.7 \text{ c}^{-1}$ $k_m^{CDI48} = 9.1 \text{ мМ}$	[37, 38] [39]

Таблица 1. Окончание

Реакция	Уравнение	Параметры	Источн.
$F^P \rightleftharpoons F^*$	$S_{PM} s k_{SF1}^{SH2} 2 R_P F^P - S_{PM} k D_{SFK}^{SH2} k_{SF1} F^*$	S – средний размер кластера рецепторов $GPVI$ $k_{SF1}^{SH2} = 0.6 \frac{\text{мкМ}^2}{\text{с}}$	[20]
$T \rightleftharpoons T^*$	$V_{Cyt} K_f^{TULA-2} S^* T - V_{Cyt} K_r^{TULA-2} T^*$	$K_f^{TULA2} = 0.1 \frac{1}{\text{с мкМ}}$ $K_r^{TULA2} = 0.007 \text{ с}^{-1}$	[20]
$R_C^* \rightleftharpoons R_P^*$	$S_{PM} \left(\frac{S^* k_{cat}^{Syk}}{K_m^{Syk} + \frac{R_C^* S_{PM}}{V_{JM}}} R_C^* - S_{PM} K_r^{Phosph} R_P^* \right)$	$k_{cat}^{Syk} = 11.85 \text{ с}^{-1}$ $K_m^{Syk} = 9.1 \text{ мкМ}$ $K_r^{Phosph} = 10^{-4} \text{ с}^{-1}$	[42] [20]
$S \rightleftharpoons S^*$	$V_{Cyt} \frac{s k_{S1}^{SH2} S_{PM} R_P^*}{V_{JM}} \left(\frac{s^* k_{cat}^{Syk}}{K_m^{Syk} + \frac{S S_{PM}}{V_{JM}}} S - V_{Cyt} (k D_{S1}^{SH2} k_{S1}^{Syk} + K_r^{Syk} + K_r^{TULA2} T^*) S \right)$	$k_{S1}^{SH2} = 0.026 \frac{1}{\text{с мкМ}}$ $k_{cat}^{Syk} = 11.85 \text{ с}^{-1}$ $K_m^{Syk} = 9.1 \text{ мкМ}$ $k D_{S1}^{SH2} = 0.176 \text{ мкМ}$	[20] [42] [43]
		$K_r^{Syk} = 10 \text{ с}^{-1}$ $K_r^{TULA2} = 3.05 \frac{1}{\text{с мкМ}}$	Подбор, [20]

Примечание. R_C – концентрация кластеров $GPVI$; R_P – концентрация фосфорилированных кластеров $GPVI$; F – неактивные, F^* – 1/3 активные, F^P – 2/3 активные, F^* – полностью активные; D – концентрация $CD148$; S – концентрация $CD148$; S^* – концентрация $TULA-2$; * означает активную форму фермента; S_{PM} – площадь мембраны, V_{Cyt} – объем цитозоля.

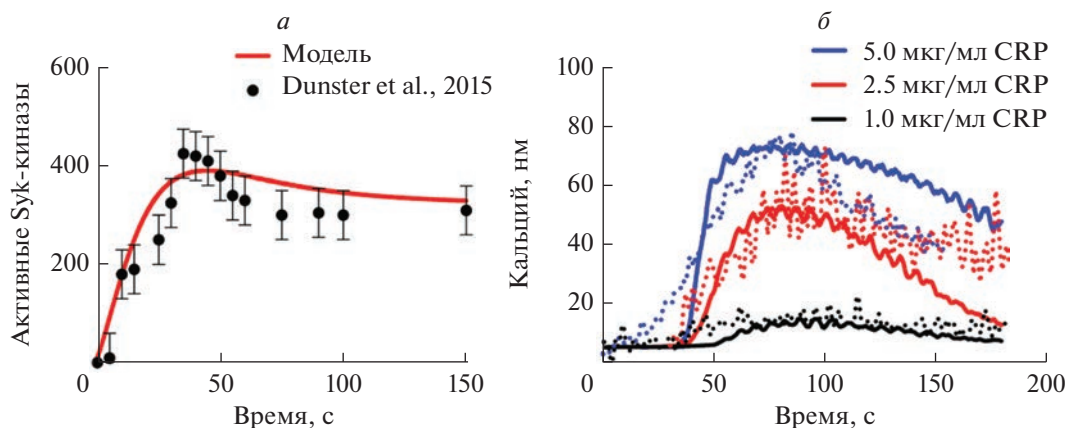


Рис. 2. Подбор неизвестных параметров компьютерной модели по экспериментальным данным. *а* — Данные о зависимости активности тирозинкиназ от времени. Красная кривая показывает зависимость от времени количества активированных Syk-киназ при стимуляции CRP в концентрации 10 мкг/мл. Кривая получена при следующих параметрах модели: $K_M(\text{Syk-GPVI}) = 0.176$ мкМ, $k_{-1}(\text{GPVI-P}) = 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, $K_D(\text{SFK-GPVI}) = 10$ мкМ. Черные точки показывают экспериментально определенное среднее количество активированных Syk-киназ в суспензии тромбоцитов при стимуляции CRP в концентрации 10 мкг/мл [26]. *б* — данные о зависимости мобилизации кальция от времени и концентрации активатора. Средняя концентрация кальция в тромбоцитах в ответ на активацию их 5 (синие кривые), 2.5 (красные кривые) и 1 (черные кривые) мкг/мл CRP: точки — эксперимент [10], кривые — теоретический расчет. Приведен результат для типичного взрослого здорового донора из $n = 5$ здоровых доноров.

при уменьшении количества рецепторов более чем в 4 раза. Одной из причин подобных различий между моделью из [30] и разработанной здесь моделью может быть отсутствие в модели из [30] полноценной стадии кластеризации рецепторов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Значимость рецептора GPVI для нормального функционирования тромбоцитов человека была многократно продемонстрирована. Показано, что у пациентов с наследственными дефицитами данного рецептора наблюдаются серьезные кровотечения. Также было продемонстрировано, что введение антител к рецептору GPVI приводит к нестабильности тромбов у мышей [45]. Таким образом, у полученной нами вариабельности активации тромбоцитов агонистами рецепторов GPVI может быть патологическая значимость, что подчеркивает необходимость исследования данного феномена.

Одной из интересных особенностей GPVI является то, что при активации тромбоцитов различными физиологическими лигандами происходит активация металлопротеина ADAM10, осуществляющего гидролиз GPVI на поверхности тромбоцитов [46, 47]. Показано, что даже при кратковременном приложении напряжения сдвига (в течение минуты) в плазме здоровых доноров происходит повышение концентрации растворимого эктодомена GPVI массой от 50 до 55 кДа, называемого sGPVI [48], что является одним из характерных признаков активности металлопротеиназ на тромбоцитах. Предположительно, подобные сдвиги

вые стрессы могут возникать в ранах [49] и при заборе крови. В то время как врожденный и/или приобретенный дефицит GPVI у людей встречается достаточно редко [46], снижение количества GPVI на тромбоцитах в результате активности металлопротеиназ может приводить к аналогичному фенотипу и кровоточивости [47]. Здесь важно отметить, что у пациентов со значительной



Рис. 3. Расчетная зависимость максимума мобилизации кальция в тромбоците от количества рецепторов GPVI. Предсказываемая моделью зависимость максимально достижимой концентрации кальция от начального количества рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов. Расчеты проводились при тех же параметрах модели, что и на рис. 2б для концентрации CRP 10 мкг/мл. Выделен диапазон количеств GPVI на поверхности тромбоцитов здоровых доноров, ранее полученный в эксперименте [22].

кровопотерей, произошедшей в результате травмы, наблюдается значительное снижение количества рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов и соответствующее повышение количества sGPVI в плазме крови [46].

Таким образом, полученные ранее в литературе данные о значительном разбросе по количеству рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов здоровых доноров может быть одной из причин значимых разбросов ответов тромбоцитов. С помощью теоретической модели нами было получено, что количество рецепторов на поверхности тромбоцитов является одним из наиболее влияющих на степень кальциевой активации тромбоцитов параметров. Более того, разброс по количеству рецепторов на поверхности тромбоцитов здоровых доноров находится в области наибольшей зависимости концентрации свободных ионов кальция от количества GPVI на тромбоцитах. Исходя из этого, можно предположить, что даже незначительное отклонение количества рецептора от нормы, например, из-за стресса у донора при взятии крови, может привести к значительному изменению ответа тромбоцита на активацию через GPVI.

Помимо инициации кальциевой сигнализации, GPVI индуцирует PI3K-Akt сигнализацию в тромбоцитах [14]. Исходя из этого, можно также предположить, что вариабельность кальциевых ответов может коррелировать с вариабельностью активности PI3K-Akt сигнализации в тромбоцитах. Однако, экспериментальное исследование изменений концентрации фосфоинозитидов в мембранах тромбоцитов является чрезвычайно сложным с экспериментальной точки зрения. Наравне с экспериментальным исследованием корреляции количества рецепторов GPVI и кальциевых ответов тромбоцитов в ответ на активацию их через GPVI, данные исследования должны быть проведены в дальнейшем.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Лондонского Королевского Общества (проект № 21-51-10005).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. 2014. Тромбоциты и гемостаз. *Онкогематология*. **9** (2), 65–73.
2. Sveshnikova A., Stepanyan M., Panteleev M., Sveshnikova A., Stepanyan M., Panteleev M. 2021. Platelet functional responses and signalling: the molecular relationship. Part 1: Responses. *Syst. Biol. Physiol. Reports*. **1** (1), 20.
3. Bergmeier W., Stefanini L. 2009. Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 187–190.
4. Martyanov A., Panteleev M. 2021. Platelet functional responses and signalling: The molecular relationship. Part 2: Receptors. *Syst. Biol. Physiol. Reports*. **1** (3), 13–30.
5. Gear A.R. 1994. Platelet adhesion, shape change, and aggregation: rapid initiation and signal transduction events. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72** (3), 285–294.
6. Канева В.Н., Мартыанов А.А., Морозова Д.С., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. 2019. Тромбоцитарные интегрин α IIb β 3. *Биол. мембраны*. **36** (1), 15–31.
7. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D.Yu., Obydenyi S.I., Kireev I.I., Gachet C., Ataullakhanov F.I., Mangin P.H., Panteleev M.A. 2016. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*. **128** (13), 1745–1755.
8. Bryckaert M., Rosa J.-P., Denis C.V., Lenting P.J. 2015. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell Mol. Life Sci.* **72** (2), 307–326.
9. Poulter N.S., Pollitt A.Y., Owen D.M., Gardiner E.E., Andrews R.K., Shimizu H., Ishikawa D., Bihan D., Farndale R.W., Moroi M., Watson S.P., Jung S.M. 2017. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* **15** (3), 549–564.
10. Степанян М.Г., Филькова А.А., Гарсон Дасгупта А.К., Мартыанов А.А., Свешникова А.Н. 2020. Активация тромбоцитов через рецептор GPVI: вариабельность ответа. *Биол. мембраны*. **37** (6), 442–452.
11. Johnson E.N., Brass L.F., Funk C.D. 1998. Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95** (6), 3100–3105.
12. Pollitt A.Y., Poulter N.S., Gitz E., Navarro-Nuñez L., Wang Y.-J., Hughes C.E., Thomas S.G., Nieswandt B., Douglas M.R., Owen D.M., Jackson D.G., Dustin M.L., Watson S.P. 2014. Syk and Src family kinases regulate C-type lectin receptor 2 (CLEC-2)-mediated clustering of podoplanin and platelet adhesion to lymphatic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **289** (52), 35695–35710.
13. Garzon Dasgupta A.K., Martyanov A.A., Filkova A.A., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. 2020. Development of a simple kinetic mathematical model of aggregation of particles or clustering of receptors. *Life*. **10** (6), 97.
14. Watson S.P., Herbert J.M.J., Pollitt A.Y. 2010. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J. Thromb. Haemost.* **8** (7), 1456–1467.
15. Rayes J., Watson S.P., Nieswandt B. 2019. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J. Clin. Invest.* **129** (1), 12–23.

16. Balabin F.A., Sveshnikova A.N. 2016. Computational biology analysis of platelet signaling reveals roles of feedbacks through phospholipase C and inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in controlling amplitude and duration of calcium oscillations. *Math Biosci.* **276**, 67–74.
17. Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., Pichugin A.V., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2016. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J. Thromb. Haemost.* **14** (10), 2045–2057.
18. Jackson S.P., Schoenwaelder S.M. 2010. Procoagulant platelets: Are they necrotic? *Blood.* **116** (12), 2011–2018.
19. Podoplelova N.A., Nechipurenko D.Y., Ignatova A.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. 2021. Procoagulant platelets: Mechanisms of generation and action. *Hämostaseologie.* **41** (02), 146–153.
20. Martyanov A.A., Balabin F.A., Dunster J.L., Panteleev M.A., Gibbins J.M., Sveshnikova A.N. 2020. Control of platelet CLEC-2-mediated activation by receptor clustering and tyrosine kinase signaling. *Biophys. J.* **118** (11), 2641–2655.
21. Moroi M., Jung S.M. 2004. Platelet glycoprotein VI: Its structure and function. *Thromb. Res.* **114** (4), 221–233.
22. Furihata K., Clemetson K.J., Deguchi H., Kunicki T.J. 2001. Variation in human platelet glycoprotein VI content modulates glycoprotein VI-specific prothrombinase activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21** (11), 1857–1863.
23. Best D., Senis Y.A., Jarvis G.E., Eagleton H.J., Roberts D.J., Saito T., Jung S.M., Moroi M., Harrison P., Green F.R., Watson S.P. 2003. GPVI levels in platelets: Relationship to platelet function at high shear. *Blood.* **102** (8), 2811–2818.
24. Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. 2006. COPASI – a Complex Pathway Simulator. *Bioinformatics.* **22** (24), 3067–3074.
25. Petzold L., Hindmarsh A. 1997. *LSODA (Livermore solver of ordinary differential equations)*. Computing and Mathematics Research Division, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA, **24**.
26. Burkhart J.M., Vaudel M., Gambaryan S., Radau S., Walter U., Martens L., Geiger J., Sickmann A., Zahedi R.P. 2012. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* **120** (15), e73–82.
27. Back T. 1996. *Evolutionary algorithms in theory and practice: Evolution strategies, evolutionary programming, genetic algorithms*. Oxford: Oxford university press.
28. Saltelli A., Ratto M., Tarantola S., Campolongo F. 2005. Sensitivity analysis for chemical models. *Chem. Rev.* **105** (7), 2811–2828.
29. Мартьянов А.А., Балабин Ф.А., Майоров А.С., Шамова Е.В., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. 2018. Компьютерное моделирование внутриклеточной сигнализации при активации тромбоцитов крови фукоиданом. *Биол. мембраны.* **35** (5), 364–375.
30. Dunster J.L., Mazet F., Fry M.J., Gibbins J.M., Tindall M.J. 2015. Regulation of early steps of GPVI signal transduction by phosphatases: A systems biology approach. *PLoS Comput. Biol.* **11** (11), e1004589.
31. Rayes J., Watson S.P., Nieswandt B. 2019. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J. Clin. Invest.* **129** (1), 12–23.
32. Senis Y.A., Mazharian A., Mori J. 2014. Src family kinases: At the forefront of platelet activation. *Blood.* **124** (13), 2013–2024.
33. Séverin S., Pollitt A.Y., Navarro-Núñez L., Nash C.A., Mourão-Sá D., Eble J.A., Senis Y.A., Watson S.P. 2011. Syk-dependent phosphorylation of CLEC-2. *J. Biol. Chem.* **286** (6), 4107–4116.
34. Burkhart J.M., Vaudel M., Gambaryan S., Radau S., Walter U., Martens L., Geiger J., Sickmann A., Zahedi R.P. 2012. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* **120** (15), e73–82.
35. Quinter P.G., Quinton T.M., Dangelmaier C.A., Kunapuli S.P., Daniel J.L. 2005. Role of lipid rafts in GPVI agonist-induced platelet signaling. *Blood.* **106** (11), 3576.
36. Miura Y., Takahashi T., Jung S.M., Moroi M. 2002. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J. Biol. Chem.* **277** (48), 46197–46204.
37. Kemble D.J., Wang Y.H., Sun G. 2006. Bacterial expression and characterization of catalytic loop mutants of Src protein tyrosine kinase. *Biochemistry.* **45** (49), 14749–14754.
38. Bradshaw J.M. 2010. The Src, Syk, and Tec family kinases: Distinct types of molecular switches. *Cell. Signal.* **22** (8), 1175–1184.
39. Ren L., Chen X., Luechapanichkul R., Selner N.G., Meyer T.M., Wavreille A.-S., Chan R., Iorio C., Zhou X., Neel B.G., Pei D. 2011. Substrate specificity of protein tyrosine phosphatases 1B, RPTPα, SHP-1, and SHP-2. *Biochemistry.* **50** (12), 2339–2356.
40. Lin X., Lee S., Sun G. 2003. Functions of the activation loop in Csk protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **278** (26), 24072–24077.
41. Park M.J., Sheng R., Silkov A., Jung D.J., Wang Z.G., Xin Y., Kim H., Thiagarajan-Rosenkranz P., Song S., Yoon Y., Nam W., Kim I., Kim E., Lee D.G., Chen Y., Singaram I., Wang L., Jang M.H., Hwang C.S., Honig B., Ryu S., Lorieau J., Kim Y.M., Cho W. 2016. SH2 domains serve as lipid-binding modules for pTyr-signaling proteins. *Mol. Cell.* **62** (1), 7–20.
42. Tsang E., Giannetti A.M., Shaw D., Dinh M., Tse J.K.Y., Gandhi S., Ho A., Wang S., Papp E., Bradshaw J.M. 2008. Molecular mechanism of the Syk activation switch. *J. Biol. Chem.* **283** (47), 32650–32659.
43. Hughes C.E., Sinha U., Pandey A., Eble J.A., O'Callaghan C.A., Watson S.P. 2013. Critical role for an acidic amino acid region in platelet signaling by the HemITAM (hemi-immunoreceptor tyrosine-based activa-

- tion motif) containing receptor CLEC-2 (C-type lectin receptor-2). *J. Biol. Chem.* **288** (7), 5127–5135.
44. Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., Pichugin A.V., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A. 2016. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J. Thromb. Haemost.* **14** (10), 2045–2057.
 45. Ahmed M.U., Kaneva V., Loyau S., Nechipurenko D., Receveur N., Le Bris M., Janus-Bell E., Didelot M., Rauch A., Susen S., Chakfé N., Lanza F., Gardiner E.E., Andrews R.K., Pantelev M., Gachet C., Jandrot-Perrus M., Mangin P.H. 2020. Pharmacological blockade of glycoprotein VI promotes thrombus disaggregation in the absence of thrombin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40** (9), 2127–2142.
 46. Montague S.J., Delierneux C., Lecut C., Layios N., Dinsdale R.J., Lee C.S.-M., Poulter N.S., Andrews R.K., Hampson P., Wearn C.M., Maes N., Bishop J., Bamford A., Gardiner C., Lee W.M., Iqbal T., Moimen N., Watson S.P., Oury C., Harrison P., Gardiner E.E. 2018. Soluble GPVI is elevated in injured patients: Shedding is mediated by fibrin activation of GPVI. *Blood Adv.* **2** (3), 240–251.
 47. Montague S.J., Andrews R.K., Gardiner E.E. 2018. Mechanisms of receptor shedding in platelets. *Blood.* **132** (24), 2535–2545.
 48. Al-Tamimi M., Tan C.W., Qiao J., Pennings G.J., Javadzadegan A., Yong A.S.C., Arthur J.F., Davis A.K., Jing J., Mu F.-T., Hamilton J.R., Jackson S.P., Ludwig A., Berndt M.C., Ward C.M., Kritharides L., Andrews R.K., Gardiner E.E. 2012. Pathologic shear triggers shedding of vascular receptors: a novel mechanism for down-regulation of platelet glycoprotein VI in stenosed coronary vessels. *Blood.* **119** (18), 4311–4320.
 49. Yakusheva A.A., Butov K.R., Bykov G.A., Závodszy G., Eckly A., Ataullakhanov F.I., Gachet C., Pantelev M.A., Mangin P.H. 2022. Traumatic vessel injuries initiating hemostasis generate high shear conditions. *Blood Adv.* **6** (16), 4834–4846.

Theoretical Explanation for the Variability in Platelet Activation through the GPVI Receptor

A. A. Martyanov^{1, 2}, M. G. Stepanyan¹, A. N. Sveshnikova^{1, 2, 3, *}

¹Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia

²Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 117997 Russia

³Moscow Lomonosov State University, Faculty of Basic Physico-Chemical Engineering, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

One of the key receptors on the surface of platelets, non-nuclear cells responsible for preventing blood loss when blood vessels are damaged, is the receptor for the extracellular matrix protein collagen, glycoprotein VI (GPVI). GPVI triggers tyrosine kinase signaling in platelets, simultaneously initiating calcium signaling via phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) and phosphoinositide signaling via phosphoinositide-3-kinase (PI3K). Previously, our group demonstrated that among healthy donors there is more than a twofold variability in calcium response to activation through the GPVI receptor. Here, a computer model of platelet activation through the GPVI receptor is proposed to explain this phenomenon. This model is a system of ordinary differential equations integrable by the LSODA method. The model equations were derived from a previously published model of platelet activation via the CLEC-2 receptor. Using the developed model, a monotonic dependence of the degree of platelet activation on the number of GPVI receptors was predicted. An analysis of the sensitivity of the model to its parameters showed that the platelet response to activation through GPVI is determined by the number of GPVI receptors, as well as the catalytic parameters of tyrosine kinases, while a twofold change in the number of receptors is sufficient to explain the observed phenomenon. Thus, it was theoretically predicted that the variability of calcium responses of platelets to their stimulation through the GPVI receptor could be determined by the variability in the number of GPVI receptors on the platelet surface of healthy donors.

Keywords: mathematical modeling, glycoprotein receptor, intracellular signaling, platelets

УДК 577.352.4

ПРИМЕНЕНИЕ N,N,N',N'-ТЕТРАМЕТИЛ-*n*-ФЕНИЛЕНДИАМИНА И α,ω -ГЕКСАДЕКАНДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТОВ H^+/O КОМПЛЕКСОВ III И IV ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ СВОБОДНОГО ДЫХАНИЯ

© 2023 г. В. Н. Самарцев^a, А. А. Семенова^a, К. Н. Белослудцев^{a, b}, М. В. Дубинин^{a, *}

^aМарийский государственный университет, Йошкар-Ола,
Республика Марий Эл, пл. Ленина, 1, 424000 Россия

^bИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, 142290 Россия

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

Поступила в редакцию 02.06.2022 г.

После доработки 15.11.2022 г.

Принята к публикации 20.11.2022 г.

Известно, что в отсутствие синтеза АТР и действия протонофорных разобщителей, то есть в состоянии 4, стимуляция дыхания митохондрий без изменения пассивной утечки протонов сопровождается снижением коэффициента H^+/O . В настоящей работе установлено, что при окислении сукцината митохондриями печени N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД) и α,ω -гексадекандикарбоновая кислота (ГДК) эффективно стимулируют дыхание в состоянии 4, и такое их действие, в отличие от протонофорного разобщителя 2,4-динитрофенола (ДНФ), не вызвано усилением протонной проводимости внутренней мембраны. При этих условиях ТМФД и ГДК не оказывают существенного влияния на эффективность окислительного синтеза АТР и на трансформацию энергии комплексом IV (цитохром *c*-оксидазой). Полученные данные рассматриваются как свидетельство того, что при окислении сукцината митохондриями печени ТМФД и ГДК избирательно отключают комплекс III электрон транспортной цепи от трансформации энергии. Теоретически обосновано, что при этих условиях коэффициент H^+/O может быть определен исходя из отношения скоростей дыхания в отсутствие и в присутствии ТМФД и ГДК. Основываясь на этой модели, рассмотрено изменение коэффициента H^+/O в зависимости от стимуляции ТМФД и ГДК дыхания митохондрий в состоянии 4. Установлено, что под влиянием ТМФД или ГДК значение коэффициента H^+/O уменьшается при окислении сукцината с 6 до предельных значений 2. Сделано заключение, что в митохондриях печени при свободном дыхании, в отличие от окислительного синтеза АТР, значения коэффициента H^+/O составляют 4 и 2 для комплексов III и IV соответственно.

Ключевые слова: митохондрии печени, коэффициент H^+/O , свободное дыхание, N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин, α,ω -гексадекандикарбоновая кислота

DOI: 10.31857/S0233475523020068, EDN: KWTSVK

ВВЕДЕНИЕ

Согласно хемиосмотической теории Митчелла [1, 2] в митохондриях транспорт электронов комплексами электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) сопряжен с векторным переносом H^+ из матрикса в межмембранное пространство. Это приводит к запасанию энергии в виде разности электрохимических потенциалов H^+ или выраженной в вольтах протон-движущей силы (Δp). Энергия Δp расходуется на синтез АТР H^+ -АТР-синтазой, а также на связанный с этим транспорт в матрикс ADP и P_i в обмен на АТР [1, 3–7]. Часть энергии Δp рассеивается вследствие пассивной утечки протонов [3, 4, 6, 8, 9]. В отсутствие синтеза АТР в ин-

тактных митохондриях пассивная утечка протонов рассматривается как один из основных механизмов потребления кислорода [3, 4, 6, 8, 9]. Наряду с окислительным синтезом АТР, это так называемое свободное дыхание (окисление) имеет важное физиологическое значение. Так, в качестве основных функций свободного дыхания в митохондриях рассматриваются: продукция тепла для поддержания температуры тела у теплокровных животных и ингибирование продукции активных форм кислорода [3, 4, 6, 8, 9].

Для характеристики эффективности генерации Δp комплексами дыхательной цепи Митчеллом предложен стехиометрический коэффициент

H^+/O , свидетельствующий о количестве протонов, перенесенных комплексами ЭТЦ через внутреннюю мембрану митохондрий при потреблении одного атома кислорода [2]. В том случае, если рассматривается перенос пары электронов каким-либо одним комплексом ЭТЦ, применяется также коэффициент $H^+/2e^-$ [3]. В последнее десятилетие достигнут консенсус в вопросе о значениях этих величин для различных комплексов ЭТЦ. Так, комплекс I (NADH-CoQ-редуктаза) при окислении NADH + H^+ транспортирует 2 электрона на кофермент Q (CoQ) сопряженно с векторным переносом 3–4 H^+ [3, 5, 10, 11]. Окисление $CoQH_2$ комплексом III (bc_1 -комплекс, $CoQH_2$ -цитохром c -редуктаза) сопровождается транспортом 2 электронов на цитохром c , что сопряжено с векторным переносом 2 H^+ , дополнительно к этому в межмембранное пространство освобождаются 2 H^+ [3, 5, 12–14]. В процессе переноса комплексом IV (цитохром c -оксидаза) 2 электронов от цитохрома c до молекулярного кислорода из матрикса захватывается 4 H^+ и в межмембранное пространство освобождается 2 H^+ с трансмембранным переносом 4 положительных зарядов [3, 5, 15]. Таким образом, при условии, что в расчет принимаются освобожденные в межмембранное пространство протоны, значения коэффициента H^+/O ($H^+/2e^-$) составляют 4, 4 и 2 для комплексов I, III и IV соответственно. Если же в расчет принимаются захваченные из матрикса протоны, значения коэффициента H^+/O ($H^+/2e^-$) составляют 4, 2 и 4 для комплексов I, III и IV соответственно. Эти значения коэффициентов соответствуют количеству перенесенных положительных зарядов из матрикса в межмембранное пространство [3, 5].

Методы определения коэффициента H^+/O ($H^+/2e^-$) для ЭТЦ изолированных митохондрий основаны на регистрации количества перенесенных через мембрану протонов в обмен на проникающий катион (K^+ в присутствии валиномицина или Ca^{2+}) [16–18]. В этом случае происходит падение мембранного потенциала ($\Delta\psi$) и увеличение ΔpH . Очевидно, что такое действие проникающих катионов делает невозможным непосредственное определение значений коэффициента H^+/O ($H^+/2e^-$) при различных функциональных состояниях митохондрий, в частности, при окислительном фосфорилировании и при вызванном пассивной утечкой протонов свободном дыхании.

Теоретически обосновано, что, исходя из молекулярной структуры и функции H^+ -АТФ-синтазы, для синтеза 1 молекулы АТФ в митохондриях млекопитающих необходимо 2.7–3 протона [3, 19]. Еще 1 протон необходим для электрогенного обмена ADP и P_i на АТФ [3, 7]. Экспериментально установлено, что значения коэффициента $ADP/2e^-$

для комплексов I, III и IV близки к 1, 0.5 и 1 соответственно [20–22]. Исходя из этих данных, значения коэффициента $H^+/2e^-$ при окислительном фосфорилировании определены как 4, 2, 4 для комплексов I, III и IV соответственно [3, 20]. Эти значения соответствуют количеству положительных зарядов, перенесенных комплексами дыхательной цепи, что свидетельствует об электрогенных процессах синтеза АТФ H^+ -АТФ-синтазой, а также обмена ADP и P_i на АТФ, связанных с совершением работы [3, 7, 19]. Выше уже отмечалось, что свободное дыхание митохондрий обусловлено пассивной утечкой протонов через внутреннюю мембрану [3, 4, 6, 8, 9]. Очевидно, что в этом случае, в отличие от окислительного фосфорилирования, протонами не совершается какой-либо работы. Недавно нами было предположено, что при свободном дыхании митохондрий значения коэффициента H^+/O составляют 4, 4 и 2 для комплексов I, III и IV соответственно [23]. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения этой гипотезы.

В митохондриях усиление пассивной утечки протонов с помощью протонофорных разобщителей, таких как 2,4-динитрофенол (ДНФ) и др., сопровождается стимуляцией дыхания и снижением Δp без изменения коэффициента H^+/O [24]. Вместе с тем, изначально сопряженная с трансформацией энергии дыхательная цепь может быть модифицирована таким образом, что электроны будут переноситься без формирования Δp [25–29]. В этом случае увеличение скорости дыхания митохондрий без изменения пассивной утечки протонов и Δp сопровождается уменьшением коэффициента H^+/O [25, 27]. Этот феномен определен как “декаплинг” (decoupling) или, говоря по-другому, “отключение” [25, 26, 28–30].

В качестве агентов, осуществляющих подобное отключение, наше внимание привлекли: N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД), способный шунтировать комплекс III ЭТЦ путем передачи электронов от $CoQH_2$ до цитохрома c [25, 31], и α,ω -гексадекандикарбоновая кислота (ГДК), переключающая комплекс III на холостой режим работы [29]. Представляет интерес методический подход, позволяющий вычислить значения коэффициента H^+/O ($H^+/2e^-$) для комплексов III и IV в случае свободного дыхания митохондрий при полном отключении одного из них. При окислении митохондриями сукцината в условиях свободного дыхания избирательное полное отключение комплекса III ЭТЦ должно приводить к снижению коэффициента H^+/O до значения, характерного для комплекса IV.

В настоящей работе установлено, что ТМФД и ГДК, в используемых концентрациях, стимулируя дыхание митохондрий: а) не оказывают существенного влияния на эффективность окислитель-

ного синтеза АТР, б) не усиливают пассивную утечку протонов и в) не влияют на трансформацию энергии комплексом IV ЭТЦ. Принимая во внимание эти данные, на основе экспериментальных исследований в условиях свободного дыхания митохондрий теоретически определены значения коэффициента H^+/O для комплексов III и IV ЭТЦ. Установлено, что в митохондриях печени, окисляющих сукцинат при отключении ТМФД и ГДК комплекса III ЭТЦ значение коэффициента H^+/O уменьшается с 6 до предельных значений 2. Полученные результаты рассматриваются как свидетельство того, что при свободном дыхании митохондрий значения коэффициента H^+/O составляют 4 и 2 для комплексов III и IV соответственно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Митохондрии из печени белых половозрелых крыс самцов (весом 210–250 г) выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА) фракции V в соответствии с описанной ранее методикой [28]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS (pH до 7.4 доводили трис). Концентрацию белка митохондрий определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали раствор БСА. Во время проведения эксперимента суспензию митохондрий (60–70 мг митохондриального белка в 1 мл) хранили на льду.

Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 37°C в термостатируемой ячейке объемом 1 мл с помощью кислородного электрода типа Кларк и установки Oxugraph Plus (Hansatech Instruments, Великобритания). Концентрация в ячейке белка митохондрий — 1.0 мг/мл. Калибровку осуществляли общепринятым методом, при этом концентрация кислорода в указанной среде инкубации, насыщенного воздухом при нормальном атмосферном давлении при 37°C, была принята как 406 мкМ O (203 мкМ O_2) [25]. Скорость дыхания митохондрий выражали как мкМ O /мин.

При исследовании сопряженного с синтезом АТР дыхания митохондрий (окислительного фосфорилирования) применяли метод пульса ADP, как подробно описано в работе [32]. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарную кислоту, 5 мМ KH_2PO_4 , 0.5 мМ EGTA, 2 мМ $MgCl_2$, 10 мМ MOPS (pH до 7.4 доводили трис). Применяли следующий порядок работы. Сразу после митохондрий в кислородную ячейку добавляли 2 мкМ ротенон и, если это необходимо, ТМФД или ГДК, или ДНФ.

В отсутствие указанных активаторов дыхания митохондрии потребляют кислород с низкой скоростью — нами рассматривается как состояние 4а (J_{4a}). Через 2 мин после внесения ротенона, ТМФД или ГДК, или ДНФ к митохондриям добавляли 200 мкМ ADP, это приводило к многократной стимуляции сопряженного с синтезом АТР дыхания — состояние 3 (J_3). После того как весь добавленный ADP был израсходован в процессе синтеза АТР, митохондрии вновь потребляли кислород с низкой скоростью — состояние 4б (J_{4b}). Еще через 2 мин после выхода митохондрий в состояние 4б добавляли 50 мкМ ДНФ для определения максимальной скорости транспорта электронов по дыхательной цепи (состояние разобщенное, J_u). В качестве меры эффективности окислительного синтеза АТР применяли, как в работе [32]: скорость синтеза АТР (J_p), коэффициент дыхательного контроля (R_c), стехиометрические коэффициенты ADP/O (P/O). Наряду с этим, для оценки эффективности окислительного фосфорилирования применяется также стехиометрический коэффициент ADP/ ΔO (P/ ΔO), где ΔO количество кислорода, потребляемого митохондриями в состоянии 3, за вычетом количества кислорода, потребленного в состоянии 4б за тот же промежуток времени [32]. Коэффициент R_c определяли как отношение величин J_3 и J_{4b} . Коэффициент ADP/O (P/O) определяли с учетом всего количества кислорода потребляемого митохондриями в состоянии 3, как подробно описано в работах [22, 32]. Скорость синтеза АТР (J_p) определяли как произведение величин J_3 и ADP/O. Коэффициент ADP/ ΔO определяли как отношение величин скорости синтеза АТР и разности между скоростями дыхания в состояниях 3 и 4б по уравнению: $ADP/\Delta O = J_p / (J_3 - J_{4b})$.

При исследовании несопряженного с синтезом АТР дыхания митохондрий (свободное дыхание, нами рассматривается как состояние 4) применяли среду инкубации следующего состава: 250 мМ сахароза, 5 мМ янтарная кислота, 0.5 мМ EGTA, 10 мМ MOPS (pH до 7.4 доводили трис). Концентрация в ячейке белка митохондрий — 1.0 мг/мл. При регистрации дыхания в полярографическую ячейку сразу после митохондрий добавляли ротенон (2 мкМ) и через 2 мин после этого ТМФД или ГДК в указанных в табл. 2 концентрациях.

Протонофорную активность исследуемых в работе соединений определяли двумя способами. Во-первых, путем индукции набухания деэнергизованных митохондрий печени крыс, инкубированных в изотоническом растворе ацетата калия в присутствии валиномицина, как в работах [33, 34]. Среда инкубации содержала 145 мМ ацетат калия, 0.2 мМ EGTA, 5 мМ цианид натрия, 5 мМ трис, pH 7.4. Во-вторых, путем индукции набухания

Таблица 1. Влияние ТМФД, ГДК и ДНФ на показатели дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени при окислении сукцината

А. Скорость дыхания в различных состояниях				
условия опыта	J_{4a}	J_3	J_{4b}	J_u
Без добавок	27.0 ± 1.58	116.6 ± 3.67	28.4 ± 0.89	157.9 ± 1.75
ДНФ 5.5 мкМ	$52.9 \pm 2.70^*$	$129.9 \pm 2.60^*$	$54.3 \pm 2.36^*$	161.2 ± 6.57
ТМФД 0.1 мМ	$51.1 \pm 3.01^*$	$134.1 \pm 5.01^*$	$52.9 \pm 2.48^*$	$199.7 \pm 5.52^{*/\diamond}$
ГДК 0.1 мМ	$50.2 \pm 3.56^*$	$103.3 \pm 4.19^{*/\diamond}$	$52.5 \pm 3.33^*$	$112.6 \pm 2.81^{*/\diamond}$
Б. Эффективность синтеза АТР				
условия опыта	J_p	R_c	ADP/O	ADP/ ΔO
Без добавок	200.1 ± 3.60	4.11 ± 0.059	1.70 ± 0.028	2.28 ± 0.027
ДНФ 5.5 мкМ	$175.8 \pm 3.33^*$	$2.43 \pm 0.053^*$	$1.35 \pm 0.022^*$	2.32 ± 0.019
ТМФД 0.1 мМ	$215.7 \pm 10.05^\diamond$	$2.53 \pm 0.096^*$	$1.61 \pm 0.040^\diamond$	$2.66 \pm 0.054^{*/\diamond}$
ГДК 0.1 мМ	$160.9 \pm 6.31^*$	$1.99 \pm 0.086^{*/\diamond}$	$1.56 \pm 0.049^\diamond$	$3.18 \pm 0.042^{*/\diamond}$

Примечание. Условия опыта, состав среды инкубации и символы описаны в разделе “Материалы и методы”. Размерность величин: J_{4a} , J_3 , J_{4b} и J_u – мкМ О/мин; J_p – мкМ ADP/мин; R_c , Р/О и Р/ ΔO – относительные единицы. Приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$).

* Различия между опытом (присутствие модулирующих агентов) и контролем (без добавок) статистически значимы, $p < 0.05$ (критерий Стьюдента).

$\diamond$ Различия между опытом (присутствие ТМФД или ГДК) и контролем (присутствие ДНФ) статистически значимы, $p < 0.05$ (критерий Стьюдента).

также дезэнергизованных митохондрий печени, инкубированных в изотоническом растворе нитрата аммония [35]. Среда инкубации содержала 135 мМ NH_4NO_3 , 0.1 мМ EGTA, 5 мМ цианид натрия, 10 мМ HEPES, pH 7.4. Набухание митохондрий определяли по уменьшению поглощения митохондриальной суспензии при 600 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, США).

В работе использовали MOPS, трис, ГДК, янтарную кислоту, ТМФД, FCCP, валиномицин, ацетат калия, NH_4NO_3 , очищенный от жирных кислот БСА фракции V (Sigma); ротенон, EGTA (Serva); ДНФ, сахарозу, KCl (Fluka); KH_2PO_4 , $MgCl_2$ (Merck).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ТМФД, ГДК и ДНФ на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени. Эффекты ТМФД и ГДК целесообразно сравнить с действием одного из классических протонофорных разобщителей ДНФ. Как следует из данных табл. 1, в отсутствие синтеза АТР (состояние 4а) ДНФ, ТМФД и ГДК в указанных концентрациях стимулируют дыхание митохондрий в 1.96, 1.89 и 1.86 раза соответственно, т.е. в равной степени. В состоянии 3 ДНФ и ТМФД стимулируют, а ГДК ингибирует дыхание митохондрий (табл. 1). Обращает на себя внимание то, что скорости дыхания митохондрий в состояниях 4а (J_{4a})

и 4б (J_{4b}) равны как в отсутствие, так и в присутствии изучаемых соединений (табл. 1). Следовательно, в состоянии 4б ТМФД и ГДК не индуцируют гидролиз АТР, образованный в процессе окислительного фосфорилирования. ТМФД стимулирует, а ГДК ингибирует разобщенное 50 мкМ ДНФ до максимального уровня дыхания митохондрий (табл. 1).

Известно, что стимуляция дыхания митохондрий протонофорными разобщителями, в частности ДНФ, сопровождается снижением показателей эффективности окислительного фосфорилирования: J_p , R_c и ADP/O [32, 36, 37], но без изменения коэффициента ADP/ ΔO [32]. В наших условиях аналогичные эффекты ДНФ наблюдаются уже при концентрации этого разобщителя 5.5 мкМ (табл. 1). ТМФД, также как ДНФ, снижает R_c , но в отличие от этого разобщителя не оказывает существенного влияния на скорость синтеза АТР (J_p) и коэффициент ADP/O, но увеличивает коэффициент ADP/ ΔO (табл. 1). ГДК, также как ТМФД, не оказывает существенного влияния на коэффициент ADP/O, увеличивает коэффициент ADP/ ΔO , но снижает скорость синтеза АТР (табл. 1).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ТМФД, стимулируя дыхание в состояниях 4а и 4б в равной степени, не оказывает существенного влияния на эффективность окислительного синтеза АТР. Как известно, дыхание митохондрий в состоянии 3

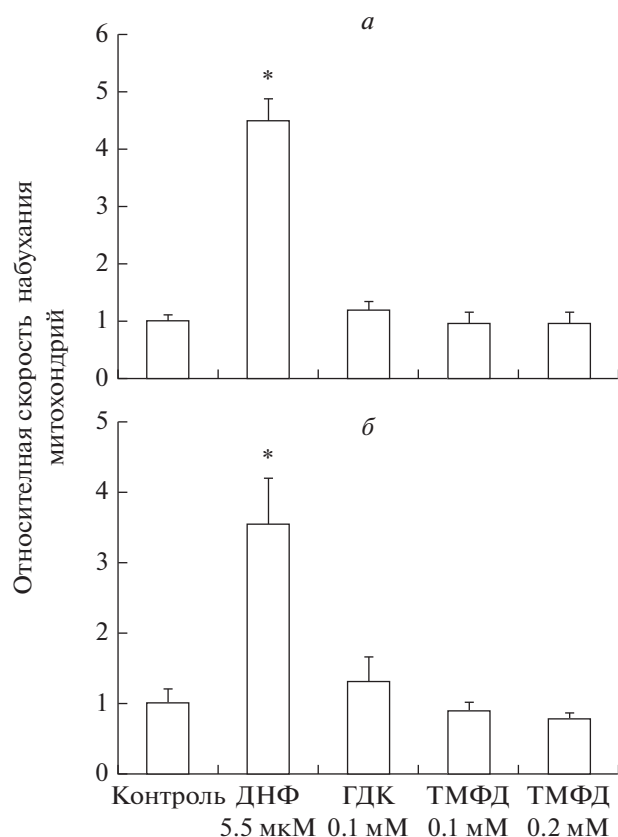


Рис. 1. Относительная скорость набухания дезэнергизованных митохондрий печени в среде с ацетатом калия (а) и нитратом аммония (б) в отсутствие добавок (контроль) и в присутствии ДНФ, ГДК и ТМФД в указанных концентрациях. Условия опыта и состав сред инкубации описаны в разделе “Материалы и методы”. В отсутствие добавок (контроль) абсолютные значения скорости набухания митохондрий составляют: в ацетате калия — $0.051 \pm 0.002 \Delta A_{600}/\text{мин}$ на 1 мг белка, в нитрате аммония — $0.022 \pm 0.002 \Delta A_{600}/\text{мин}$ на 1 мг белка. Приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 5$).

* Различия между скоростью дыхания в присутствии ДНФ и в отсутствие (контроль) статистически значимы, $p < 0.05$ (критерий Стьюдента).

состоит из двух составляющих: сопряженного с синтезом АТФ дыхания и свободного дыхания [22, 32]. Ранее нами было обосновано, что при каком-либо воздействии на митохондрии увеличение коэффициента $ADP/\Delta O$ без изменения коэффициента ADP/O свидетельствует о том, что при данных условиях скорость свободного дыхания как составляющая скорости дыхания в состоянии 3 меньше скорости дыхания в состоянии 4 [32]. Следовательно, в отличие от протонофорных разобщителей, ТМФД и ГДК в меньшей степени увеличивают скорость свободного дыхания как составляющую дыхания в состоянии 3, чем скорость дыхания в состоянии 4. Подробное выяснение молекулярных механизмов их действия — за-

дача последующих исследований. ГДК отличается от ТМФД только тем, что снижает скорость окислительного синтеза АТФ. Такое действие ГДК, по-видимому, обусловлено ингибированием транспорта электронов по дыхательной цепи. Во всех последующих экспериментах концентрация ГДК была не выше 0.1 мМ.

Влияние ТМФД, ГДК и ДНФ на пассивную утечку протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. При проведении исследований эффекты ТМФД и ГДК сравнивали с действием одного из классических протонофорных разобщителей ДНФ. Концентрации этих соединений, в которых они при окислении сукцината приблизительно в равной степени (в 2.0 раза) стимулируют свободное дыхание, приведены в табл. 1.

Одним из методов оценки способности различных соединений транспортировать протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану является регистрация набухания органелл в изотоническом растворе ацетата калия в присутствии валиномицина [33, 34]. С помощью этого метода определяется транспорт протонов из матрикса в межмембранное пространство, т.е. в направлении противоположном пассивной утечке протонов через внутреннюю мембрану энергизованных митохондрий [33, 34].

Другим методом оценки способности различных соединений транспортировать протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану является регистрация набухания органелл в изотоническом растворе нитрата аммония [35]. Индукция протонной проводимости при одновременном транспорте NH_3 и NO_3^- приводит к накоплению в матриксе осмотически активных ионов NH_4^+ , NO_3^- и вследствие этого набуханию митохондрий. Этот метод позволяет определить наличие транспорта протонов из межмембранного пространства в матрикс, как это характерно для пассивной утечки протонов через внутреннюю мембрану энергизованных митохондрий. Вместе с тем известно, что транспорт таких анионов как NO_3^- , SCN^- и др. через внутреннюю мембрану митохондрий осуществляется при участии анионного канала, который может блокироваться гидрофобными соединениями [38]. Сказанное в полной мере относится и к методу оценки способности ТМФД транспортировать протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану путем регистрации набухания органелл в изотоническом растворе роданида аммония [25]. В настоящей работе для оценки влияния ТМФД и ГДК на транспорт протонов были применены оба описанных выше метода.

Как видно из рис. 1а, ДНФ в концентрациях 5.5 мкМ эффективно индуцирует снижение оптической плотности суспензии дезэнергизованных

митохондрий, инкубируемых в изотонической среде ацетата калия, что свидетельствует об увеличении проницаемости внутренней митохондриальной мембраны для протонов. В отличие от этого разобщителя 0.1 мМ ГДК и ТМФД вплоть до концентрации 0.2 мМ не оказывают существенного влияния на снижение оптической плотности суспензии митохондрий (рис. 1а). Следовательно, ГДК и ТМФД не влияют на проницаемость внутренней мембраны митохондрий для протонов при условии их перемещения из матрикса в межмембранное пространство. Как показано на рис. 1б, ДНФ в той же концентрации также эффективно индуцирует снижение оптической плотности суспензии деэнергизованных митохондрий, инкубируемых в изотоническом растворе нитрата аммония. ГДК и ТМФД в указанных концентрациях не оказывают существенного влияния на снижение оптической плотности суспензии митохондрий (рис. 1б). Следовательно, ГДК и ТМФД также не усиливают проницаемость внутренней мембраны митохондрий для протонов при условии их перемещения из межмембранного пространства в матрикс.

Таким образом, результаты исследований, полученные двумя независимыми методами, свидетельствуют о том, что ТМФД и ГДК, в отличие от протонофорных разобщителей, стимулируют дыхание митохондрий без усиления пассивной утечки протонов. Эти данные подтверждают известные ранее, полученные другими методами результаты [25, 29].

Исследовано влияние ТМФД и ГДК на трансформацию энергии цитохром *c*-оксидазой. В качестве доноров электронов, передающих электроны непосредственно на цитохром *c*, используются ферроцианид с аскорбатом [22, 29]. В наших экспериментах, как и в предыдущей работе [29], использовали ферроцианид и аскорбат в концентрации 10 и 5 мМ соответственно. Установлено, что в этих условиях ДНФ стимулирует дыхание до максимального уровня уже в концентрации 30 мкМ. Увеличение концентраций и ферроцианида, и аскорбата не влияет на скорость дыхания как в отсутствие, так и в присутствии ДНФ (данные не приведены). При окислении ферроцианида с аскорбатом скорость дыхания в отсутствие и в присутствии 0.2 мМ ТМФД составляет 76.2 ± 5.81 и 82.0 ± 6.12 мкМ О/мин ($n = 4$) соответственно. 30 мкМ ДНФ стимулирует скорость дыхания в отсутствие и в присутствии 0.2 мМ ТМФД до 193.0 ± 14.73 и 209.6 ± 15.11 мкМ О/мин ($n = 4$) соответственно. Как показано нами ранее [29] и подтверждено в настоящей работе (данные не приведены), при окислении ферроцианида с аскорбатом ГДК не влияет на дыхание митохондрий в состоянии 4, но частично ингибирует разобщенное 30 мкМ ДНФ дыхание. Следовательно, ТМФД и ГДК не оказывают существенного влияния на трансфор-

мацию энергии цитохром *c*-оксидазой. Эти данные свидетельствуют о том, что при окислении митохондриями сукцината десопрягающее действие этих соединений заключается в избирательном отключении комплекса III ЭТЦ от генерации Δp .

Теоретическое обоснование и экспериментальное исследование применения ТМФД и ГДК как инструмента для определения значений коэффициента H^+/O комплексов III и IV. Свободное дыхание митохондрий в отсутствие синтеза АТР или действия разобщителей (дыхание в состоянии 4) определяется пассивной утечкой протонов по эндогенным путям [36, 39]. Скорость пассивной утечки протонов (v_{H^+}) в стационарном состоянии может быть определена как произведение скорости дыхания и коэффициента H^+/O [8, 27]. Как уже отмечалось во введении, увеличение скорости дыхания митохондрий без изменения v_{H^+} сопровождается уменьшением коэффициента H^+/O [25, 27]. Очевидно, что при этих условиях справедливо уравнение:

$$v_{H^+} = J_4(H^+/O)_4 = J_A(H^+/O)_A, \quad (1)$$

где, J_4 и J_A — скорости дыхания в состоянии 4 в отсутствие и в присутствии стимулирующих дыхание эффекторов (ТМФД или ГДК) соответственно, $(H^+/O)_4$ и $(H^+/O)_A$ — коэффициенты H^+/O в отсутствие и в присутствии этих стимулирующих дыхание эффекторов соответственно.

Исходя из уравнения (1), коэффициент $(H^+/O)_A$ может быть определен как:

$$(H^+/O)_A = (H^+/O)_4 \frac{J_4}{J_A}. \quad (2)$$

В том случае, если скорость дыхания при повышении концентрации активатора стремится к своему максимальному значению (J_{Amax}), коэффициент $(H^+/O)_A$ стремится к наименьшей величине $(H^+/O)_{Amin}$ согласно уравнению:

$$(H^+/O)_{Amin} = (H^+/O)_4 \frac{J_4}{J_{Amax}}. \quad (3)$$

При окислении сукцината митохондриями в состоянии 4 в генерации Δp принимают участие только III и IV комплексы дыхательной цепи. Хорошо установлено, что в этом случае значение коэффициента H^+/O равно 6 [3, 5, 20, 40]. Если при окислении сукцината и при условии постоянного значения Δp полностью и избирательно переключить комплекс III на холостой режим работы (транспорт электронов без генерации Δp), то ско-

Таблица 2. Влияние ТМФД в отсутствие и в присутствии ГДК (А), ГДК в отсутствие и в присутствии ТМФД (Б) на скорость дыхания митохондрий печени в состоянии 4 (J_A и ΔJ_A , мкМ О/мин) и коэффициент $(H^+/O)_A$ при окислении сукцината

А. Эффект ТМФД в отсутствие и в присутствии ГДК				
ТМФД, мМ	J_A		$(H^+/O)_A$	
	без ГДК	ГДК 0.07 мМ	Без ГДК	ГДК 0.07 мМ
0	27.2 ± 1.14	44.8 ± 2.11*	6.00	3.64 ± 0.233*
0.05	44.9 ± 2.78	57.4 ± 2.97*	3.63 ± 0.275	2.84 ± 0.191*
0.1	53.4 ± 2.64	63.6 ± 3.13*	3.06 ± 0.200	2.57 ± 0.169
0.15	59.4 ± 2.73	67.8 ± 3.23	2.75 ± 0.174	2.41 ± 0.154
0.2	63.0 ± 2.54	70.0 ± 3.41	2.59 ± 0.154	2.33 ± 0.151
0.3	67.7 ± 3.62	73.4 ± 4.03	2.41 ± 0.166	2.22 ± 0.155
+ ДНФ 50 мкМ	166.2 ± 11.06	124.4 ± 7.11*	—	—

Б. Эффект ГДК в отсутствие и в присутствии ТМФД				
ГДК, мМ	J_A		$(H^+/O)_A$	
	без ТМФД	ТМФД 0.1 мМ	Без ТМФД	ТМФД 0.1 мМ
0	28.8 ± 1.21	53.8 ± 1.82*	6.00	3.21 ± 0.176*
0.02	36.0 ± 1.23	57.9 ± 1.41*	4.80 ± 0.256	2.98 ± 0.146*
0.04	41.4 ± 2.13	61.3 ± 1.84*	4.17 ± 0.280	2.82 ± 0.149*
0.06	46.8 ± 1.19	64.0 ± 3.60*	3.69 ± 0.185	2.70 ± 0.191*
0.08	49.8 ± 2.11	65.8 ± 3.41*	3.47 ± 0.208	2.58 ± 0.173*
0.1	53.2 ± 2.66	67.7 ± 3.38*	3.25 ± 0.213	2.46 ± 0.161*
+ ДНФ 50 мкМ	105.4 ± 5.21	117.6 ± 7.31	—	—

Примечание. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе “Материалы и методы”. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 5$).

* Различия между скоростью дыхания в присутствии ГДК (А), ТМФД (Б) и в их отсутствие статистически значимы, $p < 0.05$ (критерий Стьюдента).

рость дыхания в состоянии 4 достигнет максимальной величины J_{Amax} . В этом случае в трансформации энергии принимает участие только комплекс IV, и, следовательно, по уравнению (3) можно определить значение коэффициента H^+/O для этого комплекса.

В табл. 2А приведены значения скорости свободного дыхания митохондрий и рассчитанные по уравнению (2) значения коэффициента $(H^+/O)_A$ при последовательно повышающихся концентрациях ТМФД вплоть до 0.3 мМ в отсутствие и в присутствии ГДК. Как видно из таблицы, при окислении сукцината ТМФД эффективно стимулирует дыхание митохондрий. Последующее внесение 50 мкМ ДНФ приводит к дальнейшей стимуляции дыхания (табл. 2А). Стимулирующее действие ТМФД сопровождается снижением коэффициента $(H^+/O)_A$ (табл. 2А). ГДК в концентрации 0.07 мМ стимулирует дыха-

ние митохондрий в отсутствие и в присутствии ТМФД в концентрациях 0.05 и 0.1 мМ и ингибирует в присутствии 50 мкМ ДНФ (табл. 2А). ГДК существенно снижает коэффициент $(H^+/O)_A$, но только при концентрации ТМФД не более 0.05 мМ (табл. 2А).

В табл. 2Б приведены значения скорости свободного дыхания митохондрий и рассчитанные по уравнению (2) значения коэффициента $(H^+/O)_A$ при последовательно повышающихся концентрациях ГДК в присутствии и в отсутствие ТМФД. Как видно из табл. 2, ГДК вплоть до концентрации 0.1 мМ стимулирует дыхание митохондрий, внесение ДНФ в указанной концентрации также приводит к дальнейшей стимуляции дыхания (табл. 2Б). Стимулирующее действие ГДК сопровождается снижением коэффициента $(H^+/O)_A$. ТМФД в концентрации 0.1 мМ стимулирует дыхание митохондрий в отсутствие и в присутствии

ГДК (табл. 2Б). ТМФД, стимулируя дыхание в отсутствие и в присутствии ГДК, существенно снижает коэффициент $(H^+/O)_A$ (табл. 2Б).

Полученные результаты можно было бы формально рассматривать как свидетельство аддитивного действия ТМФД и ГДК при стимуляции дыхания и снижении коэффициента $(H^+/O)_A$. Однако по мере увеличения концентрации ТМФД действие ГДК ослабляется так же, как по мере увеличения концентрации ГДК ослабляется действие ТМФД. Следовательно, такое аддитивное действие могло быть обусловлено тем, что ТМФД и ГДК в указанных концентрациях не достигают своего максимального эффекта.

Эффективность действия ТМФД и ГДК может быть выражена количественно как величина снижения коэффициента H^+/O ($\Delta(H^+/O)_A$) по уравнению:

$$\Delta(H^+/O)_A = (H^+/O)_4 - (H^+/O)_A. \quad (4)$$

Очевидно, что, если концентрации ТМФД и ГДК стремятся к бесконечно большим значениям, их эффект достигает максимальной величины ($\Delta(H^+/O)_{Amax}$). В этом случае справедливо уравнение:

$$\Delta(H^+/O)_{Amax} = (H^+/O)_4 - (H^+/O)_{Amin}. \quad (5)$$

Принимается, что зависимость коэффициента $\Delta(H^+/O)_A$ от концентрации ТМФД или ГДК может быть описана с помощью уравнения:

$$\Delta(H^+/O)_A = \frac{\Delta(H^+/O)_{Amax} [A]}{K_{0.5} + [A]}, \quad (6)$$

где $K_{0.5}$ — концентрации ТМФД и ГДК, при которых их эффект достигает 1/2 от максимальной величины.

Используя уравнения (4) и (5), уравнение (6) можно преобразовать как:

$$(H^+/O)_A = K_{0.5} \frac{\Delta(H^+/O)_A}{[A]} + (H^+/O)_{Amin}. \quad (7)$$

В соответствии с уравнением (7) исследовали при различных концентрациях ТМФД и ГДК зависимость $(H^+/O)_A$ от величины $\Delta(H^+/O)_A/[A]$. Эту величину можно рассматривать как удельные активности ТМФД и ГДК. Как видно из рис. 2а, зависимость значений коэффициента $(H^+/O)_A$ от удельных активностей ТМФД (1) и ГДК (2) линейна в соответствии с уравнением (9). Точка пересечения экспериментальной прямой с осью ординат определяет величину $(H^+/O)_{Amin}$. Значение этой величины составляет 2 как при максималь-

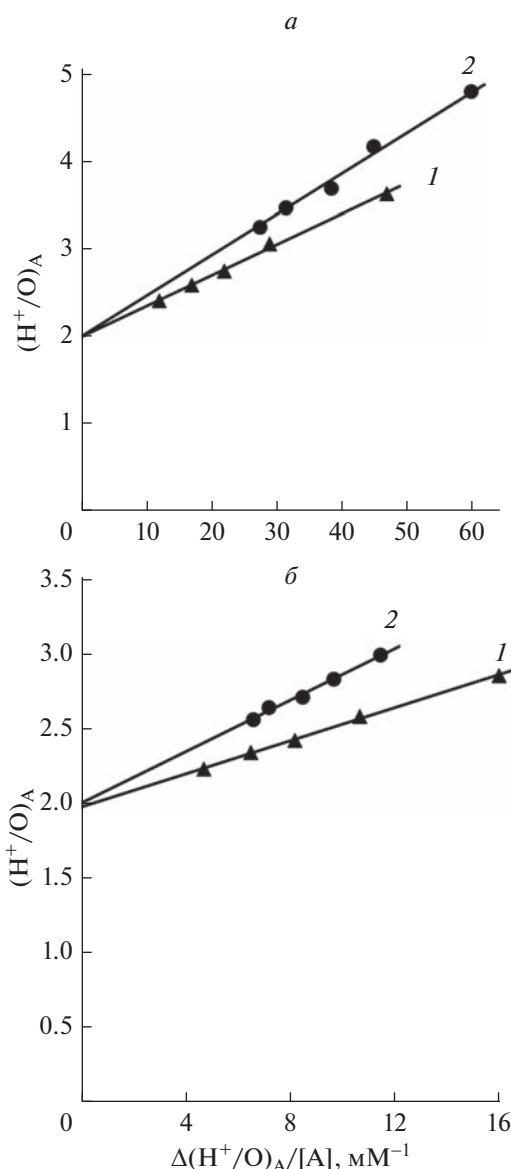


Рис. 2. Линейная зависимость коэффициента $(H^+/O)_A$ от удельной активности $\Delta(H^+/O)_A/[A]$. а — ТМФД (1) и ГДК (2); б — ТМФД в присутствии 0.07 мМ ГДК (1) и ГДК в присутствии 0.1 мМ ТМФД (2). Значения коэффициента $(H^+/O)_A$ представлены в табл. 2.

ном эффекте ТМФД, так и при максимальном эффекте ГДК (рис. 2а).

На рис. 2б зависимость коэффициента $(H^+/O)_A$ от удельных активностей ТМФД в присутствии ГДК (1) и ГДК в присутствии ТМФД (2). В этом случае точка пересечения экспериментальной прямой с осью ординат также определяет величину $(H^+/O)_{Amin}$. Значение этой величины также составляет 2 как при максимальном эффекте ТМФД в присутствии ГДК, так и при максимальном эффекте ГДК в присутствии ТМФД (рис. 2б).

При совместном действии ТМФД и ГДК коэффициент $(H^+/O)_{Amin}$ достигает такой же величины, как при действии этих агентов по отдельности. Следовательно, действие ТМФД и ГДК при достижении их максимальных эффектов неаддитивное. Как известно, ТМФД, будучи редокс-активным соединением, способен шунтировать комплекс III путем передачи электронов от $Co-QH_2$ до цитохрома *c* [25, 31]. В то время как ГДК, не обладая способностью транспортировать электроны, переключает комплекс III на холостой режим работы по другому механизму [29]. Вполне вероятно, что при совместном действии ТМФД и ГДК до максимального уровня происходит полное отключение комплекса III от генерации $\Delta\mu$. При этих условиях в генерации $\Delta\mu$ будет принимать участие только комплекс IV, и характеризующий работу этого комплекса коэффициент H^+/O равен 2.

Таким образом, при свободном дыхании митохондрий в отличие от окислительного фосфорилирования значения коэффициента H^+/O составляют 4 и 2 для комплексов III и IV соответственно. Как уже отмечалось во введении, электрогенные процессы синтеза АТР H^+ -АТР-синтазой, а также обмена ADP и P_i на АТР связаны с совершением работы [3, 7, 19]. Исходя из термодинамических расчетов, обосновано, что значения коэффициента $H^+/2e^-$ для комплексов I, III и IV составляют 4, 2 и 4 соответственно [3]. В отличие от окислительного синтеза АТР при свободном дыхании пассивная утечка протонов из межмембранного пространства в матрикс не сопровождается совершением работы. Как уже предполагалось нами ранее [41], в отсутствие синтеза АТР и разобщения (при свободном дыхании) возвращение протонов из межмембранного пространства в матрикс осуществляется путем простой диффузии протонов через какие-либо каналы внутренней мембраны митохондрий. Можно полагать, что скорость диффузии зависит от общего количества протонов, освобождаемых комплексами ЭТЦ в межмембранное пространство.

Суммируя полученные данные, можно сделать следующие выводы:

1. При окислении сукцината митохондриями печени ТМФД и ГДК эффективно стимулируют свободное дыхание (в состояниях 4а и 4б), и такое их действие, в отличие от протонофорного разобщителя ДНФ, не вызвано индукцией протонной проводимости внутренней мембраны. Эти соединения, стимулируя свободное дыхание и снижая коэффициент дыхательного контроля, в отличие от ДНФ не оказывают существенного влияния на коэффициент ADP/O, но увеличивают коэффициент ADP/ ΔO . В отличие от протонофорных разобщителей ТМФД и ГДК в меньшей степени

увеличивают скорость свободного дыхания как составляющей части скорости дыхания в состоянии 3, чем скорость дыхания в состоянии 4.

2. ТМФД и ГДК не оказывают влияния на трансформацию энергии цитохром *c*-оксидазой. Следовательно, десопрягающее действие этих соединений при окислении митохондриями сукцината заключается в избирательном отключении комплекса III ЭТЦ от генерации $\Delta\mu$.

3. Теоретически обосновано, что коэффициент H^+/O может быть определен исходя из отношения скоростей дыхания в отсутствие и в присутствии ТМФД и ГДК. Под влиянием ТМФД или ГДК значение коэффициента H^+/O уменьшается при окислении сукцината с 6 до предельных значений 2. Таким образом, в митохондриях печени при свободном дыхании в отличие от окислительного синтеза АТР значения коэффициента H^+/O составляют 4 и 2 для комплексов III и IV соответственно.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-015-00124).

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitchell P. 2011. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1807**, 1507–1538.
2. Mitchell P., Moyle J. 1967. Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **105**, 1147–1162.
3. Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinsky F.O. 2013. *Principles of bioenergetics*. Berlin: Springer-Verlag. 436 p.
4. Cadenas S. 2018. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* **1859**, 940–950.
5. Mazat J.P., Ransac S., Heiske M., Devin A., Rigoulet M. 2013. Mitochondrial energetic metabolism – some general principles. *IUBMB Life*. **65**, 171–179.
6. Zorova L.D., Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Babenko V.A., Zorov S.D., Balakireva A.V., Juhaszova M., Sollott S.J., Zorov D.B. 2018. Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* **552**, 50–59.
7. Klingenberg M. 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta*. **1778**, 1978–2021.

8. Porter R.K., Brand M.D. 1993. Body mass depends of H^+ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature*. **362**, 628–630.
9. Nicholls D.G. 2021. Mitochondrial proton leaks and uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* **1862**, 148428.
10. Vinogradov A.D., Grivennikova V.G. 2016. Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex I. *Biochim. Biophys. Acta*. **1857**, 863–871.
11. Hummer G., Wikström M. 2016. Molecular simulation and modeling of complex I. *Biochim Biophys Acta*. **1857**, 915–921.
12. Sarewicz M., Osyczka A. 2015. Electronic connection between the quinone and cytochrome *c* redox pools and its role in regulation of mitochondrial electron transport and redox signaling. *Physiol. Rev.* **95**, 219–243.
13. Fisher N., Meunier B., Biagini G.A. 2020. The cytochrome *bc*₁ complex as an antipathogenic target. *FEBS Lett.* **594**, 2935–2952.
14. Kao W.-C., Hunte C. 2022. Quinone binding sites of cyt *bc* complexes analysed by X-ray crystallography and cryogenic electron microscopy. *Biochem. Soc. Trans.* **50**, 877–893.
15. Wikström M., Krab K., Sharma V. 2018. Oxygen activation and energy conservation by cytochrome *c* oxidase. *Chem. Rev.* **118**, 2469–2490.
16. Brand M.D., Reynafarje B., Lehninger A.L. 1976. Re-evaluation of the H^+ /site ratio of mitochondrial electron transport with the oxygen pulse technique. *J. Biol. Chem.* **251**, 5670–5679.
17. Reynafarje B., Brand M.D., Lehninger A.L. 1976. Evaluation of the H^+ /site ratio of mitochondrial electron transport from rate measurements. *J. Biol. Chem.* **251**, 7442–7451.
18. Papa S., Guerrieri F., Lorusso M., Izzo G., Boffoli D., Capuano F., Capitanio N., Altamura N. 1980. The H^+/e^- stoichiometry of respiration-linked proton translocation in the cytochrome system of mitochondria. *Biochem. J.* **192**, 203–218.
19. Watt I.N., Montgomery M.G., Runswick M.J., Leslie A.G., Walker J.E. 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 16823–16827.
20. Hinkle P.C. 2005. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1706**, 1–11.
21. Stoner C.D. 1987 Determination of the P/2 e^- stoichiometries at the individual coupling sites in mitochondrial oxidative phosphorylation. Evidence for maximum values of 1.0, 0.5, and 1.0 at sites 1, 2, and 3. *J. Biol. Chem.* **262**, 10445–10453.
22. Hinkle P.C., Kumar M.A., Resetar A., Harris D.L. 1991. Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry*. **30**, 3576–3582.
23. Samartsev V.N., Semenova A.A., Ivanov A.N., Dubinin M.V. 2022. Comparative study of free respiration in liver mitochondria during oxidation of various electron donors and under conditions of shutdown of complex III of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **606**, 163–167.
24. Brown G.C. 1989. The relative proton stoichiometries of the mitochondrial proton pumps are independent of the proton motive force. *J. Biol. Chem.* **264**, 14704–14709.
25. Chien L.F., Brand M.D. 1996. The effect of chloroform on mitochondrial energy transduction. *Biochem. J.* **320**, 837–845.
26. Skulachev V.P. 1998. Uncoupling: New approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*. **1363**, 100–124.
27. Luvisetto S., Conti E., Buso M., Azzone G.F. 1991. Flux ratios and pump stoichiometries at sites II and III in liver mitochondria. Effect of slips and leaks. *J. Biol. Chem.* **266**, 1034–1042.
28. Маркова О.В., Бондаренко Д.И., Самарцев В.Н. 1999. Опосредованное анионными переносчиками разобщающее действие дикарбоновых жирных кислот зависит от расположения второй карбоксильной группы. *Биохимия*. **64**, 679–685.
29. Semenova A.A., Samartsev V.N., Dubinin M.V. 2021. The stimulation of succinate-fueled respiration of rat liver mitochondria in state 4 by α,ω -hexadecanedioic acid without induction of proton conductivity of the inner membrane. Intrinsic uncoupling of the *bc*₁ complex. *Biokhimiya*. **181**, 215–225.
30. Terada H., Shima O., Yoshida K., Shinohara Y. 1990. Effects of the local anesthetic bupivacaine on oxidative phosphorylation in mitochondria. Change from decoupling to uncoupling by formation of a leakage type ion pathway specific for H^+ in cooperation with hydrophobic anions. *J. Biol. Chem.* **265**, 7837–7842.
31. Alexandre A., Lehninger A.L. 1984. Bypasses of the antimycin A block of mitochondrial electron transport in relation to ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta*. **767**, 120–129.
32. Samartsev V.N., Semenova A.A., Dubinin M.V. 2020. A comparative study of the action of protonophore uncouplers and decoupling agents as inducers of free respiration in mitochondria in states 3 and 4: Theoretical and experimental approaches. *Cell Biochem. Biophys.* **78**, 203–216.
33. Garlid K.D., Nakashima R.A. 1983. Studies on the mechanism of uncoupling by amine local anesthetics. Evidence for mitochondrial proton transport mediated by lipophilic ion pairs. *J. Biol. Chem.* **258**, 7974–7980.
34. Popova L.B., Nosikova E.S., Kotova E.A., Tarasova E.O., Nazarov P.A., Khailova L.S., Balezina O.P., Antonenko Y.N. 2018. Protonophoric action of triclosan causes calcium efflux from mitochondria, plasma membrane depolarization and bursts of miniature end-plate potentials. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860**, 1000–1007.
35. Brierley G.P., Jurkowitz M., Scott K.M., Merola A.J. 1970. Ion transport by heart mitochondria. XX. Factors affecting passive osmotic swelling of isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **245**, 5404–5411.
36. Самарцев В.Н., Кожина О.В., Полищук Л.С. 2005. Соотношение между дыханием и синтезом АТФ в митохондриях при различной степени разобщения окислительного фосфорилирования. *Биофизика*. **50**, 660–667.
37. Terada H. 1981. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. **639**, 225–242.

38. Ponnalagu D., Singh H. 2017. Anion channels of mitochondria. *Handb. Exp. Pharmacol.* **240**, 71–101.
39. Groen A.K., Wanders R.J.A., Westerhoff H.V., Van der Meer R., Tager J.M. 1982. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* **257**, 2754–2757.
40. Mookerjee S.A., Gerencser A.A., Watson M.A., Brand M.D. 2021. Controlled power: How biology manages succinate-driven energy release. *Biochem. Soc. Trans.* **49**, 2929–2939.
41. Самарцев В.Н., Чезганова С.А., Полищук Л.С., Пайдыганов А.П., Видякина О.В., Зелди И.П. 2003. Температурная зависимость дыхания митохондрий печени крыс при разобщении окислительного фосфорилирования жирными кислотами. Влияние неорганического фосфата. *Биохимия*. **68**, 1137–1143.

Application of N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-Phenylenediamine and α,ω -Hexadecanedioic Acid for Determination of the H^+/O Ratios of Complexes III and IV of the Liver Mitochondrial Respiratory Chain under Free Respiration Conditions

V. N. Samartsev¹, A. A. Semenova¹, K. N. Belosludtsev^{1, 2}, M. V. Dubinin^{1, *}

¹Mari State University, Yoshkar-Ola, 424000 Russia

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

Stimulation of mitochondrial respiration in state 4 without changes in passive proton leakage is known to be accompanied by a decrease in the H^+/O ratio (Luvisetto et al., 1991. *J. Biol. Chem.* **266**, 1034–1042). In the present work, it was found that during the oxidation of succinate by liver mitochondria, N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) and α,ω -hexadecanedioic acid (HDA) effectively stimulate respiration in state 4, and their action, unlike the protonophore uncoupler DNP, is not caused by an increase in the proton conductivity of the inner membrane. Under these conditions, TMPD and HDA do not significantly affect the efficiency of oxidative ATP synthesis and energy transformation by complex IV (cytochrome *c* oxidase). The data obtained are considered as evidence that during the oxidation of succinate by liver mitochondria, TMPD and HDA selectively disable ETC complex III from energy transformation. It is theoretically substantiated that, under these conditions, the H^+/O ratio can be determined based on the ratio of respiratory rates in the absence and presence of TMPD and HDA. Based on this model, we considered the change in the H^+/O ratio depending on the stimulation of mitochondrial respiration in state 4 by TMPD and HDA. It has been established that under the influence of TMPD or HDA, the value of the H^+/O ratio decreases during the oxidation of succinate from 6 to the limiting values of 2. We conclude that in liver mitochondria during free respiration, in contrast to the oxidative ATP synthesis, the values of the H^+/O ratio are 4 and 2 for complexes III and IV, respectively.

Keywords: liver mitochondria, H^+/O ratio, free respiration, TMPD, α,ω -hexadecanedioic acid

УДК 577.112.345

КАТИОННЫЕ ЛИПОАМИНОКИСЛОТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ДИЭТАНОЛАМИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНО МЕМБРАНО-АКТИВНЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ

© 2023 г. М. К. Гусева^а, З. Г. Дениева^б, У. А. Буданова^{а, *}, Ю. Л. Себякин^а

^аМИРЭА — Российский технологический университет,

Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

^бИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,

Москва, 119071 Россия

*e-mail: c-221@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.09.2022 г.

После доработки 21.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Данная работа направлена на получение ряда катионных амфифилов на основе аминокислотных производных диэтанолamina как потенциально мембрано-активных антибактериальных агентов. Разработанные соединения содержат два остатка аминокислот в полярном блоке и различаются длиной алифатических цепей в гидрофобном домене. Амфифилы получены в препаративных количествах, достаточных для подтверждения их структур и проведения исследования антибактериальной активности. Синтезированные образцы на основе β -Ala (**4c**) и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) (**4d**) с алифатической цепью C12 в гидрофобном домене проявили перспективный для дальнейших исследований уровень антимикробной активности (МИК, 1 мкг/мл) в отношении грамположительных (*Bacillus subtilis*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*) бактерий. Амфифилы, содержащие ароматические аминокислоты *L*-Phe (**6a**) и *L*-Trp (**6b**) в полярной головной группе и углеводородную цепь C8, активны в отношении бактерий *B. subtilis* с МИК 1 мкг/мл. Полученные данные об антимикробной активности делают отобранные соединения привлекательными для дальнейшего детального изучения их механизма действия.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, пептидомиметики, катионные амфифилы, диэтанол-амин, производные аминокислот, резистентность бактерий

DOI: 10.31857/S0233475523020032, EDN: LANSBL

ВВЕДЕНИЕ

Быстрое распространение бактерий, устойчивых к существующим антибиотикам, ставит множество задач перед системой здравоохранения. Антибиотики, которые входят в состав стандартных протоколов лечения, со временем становятся неэффективными в отношении мультирезистентных бактерий, что провоцирует тяжелое течение инфекционных заболеваний. Поиском эффективных средств борьбы с патогенами, которые смогут пополнить антибактериальный терапевтический арсенал, занимается множество научных групп по всему миру.

Антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются как возможно новый тип противомикробных агентов природного происхождения [1]. Они сочетают в себе противомикробную, ангиогенную и противовоспалительную активность с иммуномодулирующим действием [2]. Однако дороговизна расходных материалов, недостаточная

изученность физико-химических и биологических свойств, нестабильность продукта или его токсичность для собственных клеток организма затрудняют широкое применение таких биологически активных структур [3].

Недостатки АМП стимулировали разработку новых мембрано-активных веществ — пептидомиметиков [4]. Это синтетические производные аминокислот и пептидов, предназначенные для имитации основных функций и свойств исходных фармакофоров. Выбор мембраны в качестве мишени обеспечивает преимущество пептидных агентов перед обычными антибиотиками, поскольку развитие устойчивости к ним происходит медленно или даже отсутствует. Такие молекулы сохраняют профиль активности и избирательность действия, при этом они обладают большей биодоступностью и стабильностью в физиологических условиях по сравнению с классическими АМП. За последнее десятилетие было синтезировано, выделено и изучено большое количество

подобных агентов [4]. Некоторые из них уже используются в клинике [5], а некоторые проходят клинические испытания [6, 7].

Одним из наиболее перспективных направлений является использование пептидомиметиков — катионных амфифилов, которые имеют простую конструкцию и высокую стабильность, но при этом показывают перспективные результаты антимикробного действия [8]. Особый интерес к данным соединениям основан на эффективности стратегий синтеза, который не требует высоких экономических и временных затрат [9]. Основные способы получения амфифилов предполагают классические методы пептидной и липидной химии, что позволяет легко заменять или внедрять альтернативные фрагменты, представляющие собой различные аналоги аминокислот или алифатические звенья [8].

Биологическая активность амфифилов во многом зависит от архитектуры синтезируемых молекул. Она не однообразна, в отличие от прототипов, состоящих исключительно из α -аминокислотных остатков, а предполагает варьирование структуры основных фрагментов. Кроме того, возможен синтез малых молекул, центральное звено которых не представлено амидным остовом [10, 11]. В общем виде структура амфифильных молекул представлена одной или двумя алифатическими цепями, аминокислотными участками в качестве гидрофильной головной группы и спейсером, соединяющим два этих домена. Варьирование структурных элементов амфифила может влиять на биодоступность молекулы и ее токсический эффект [12]. Исследования показывают, что существует связь между длиной гидрофобного блока амфифильного соединения и минимальной ингибирующей концентрацией (МИК), которая необходима для подавления роста микроорганизмов [13].

Важнейшую роль в положительной динамике антибактериального действия играет «настройка» амфифильности данных соединений, в частности, соотношение гидрофильной части к гидрофобной — гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) [14, 15]. Подбор оптимальной конструкции пептидомиметика способствует проявлению высокой антимикробной активности и снижению возможных токсических эффектов.

Целью данного исследования является разработка схемы получения и осуществление синтеза серии новых антимикробных пептидомиметиков, а также проведение предварительных биологических тестов антибактериальной активности. В качестве целевых соединений были выбраны катионные амфифилы на основе алифатических производных диэтаноламина, содержащие два остатка аминокислот в полярном блоке и различающиеся длиной алифатических цепей в гидрофобном домене. Структура синтезированных мо-

лекул предполагает их действие на мембраны бактериальных клеток, основываясь на литературных данных о подобных молекулах [8, 16, 17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Реактивы для синтеза коммерчески доступны и были использованы без предварительной очистки. Спектры ^1H -ЯМР снимали в дейтерированном растворителе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц. Внутренний стандарт — гексаметилдисилоксан. ИК-спектры веществ регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Bruker EQUINOX 55 (Германия). Масс-спектры регистрировали на времяпролетном масс-спектрометре VISION 2000 (Великобритания) методом MALDI, в качестве матрицы использовалась 2,4-дигидроксibenзойная кислота (DHB). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Сорбфил (Краснодар) и Silufol (Чехия), препаративную тонкослойную хроматографию — на силикагеле TLC standard grade (Sigma-Aldrich, Германия). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле 0.040–0.063 мм (Merck, Германия). Обнаружение пятен веществ при тонкослойной хроматографии (ТСХ) осуществляли нагреванием над пламенем спиртовки или парах йода. Вещества, содержащие аминогруппы, обнаруживали в 5%-ном растворе нингидрина с последующим нагреванием до 50°C. Ароматические соединения обнаруживали в ультрафиолете на пластинках Alugram Xtra SIL G/UV₂₅₄.

Методы. Синтез катионных амфифилов проводили стандартными методами пептидной и липидной химии.

N-Октилдиэтаноламин (2a). Смесь 1 г (9.51 ммоль) диэтаноламина, 1.65 г (8.56 ммоль) 1-бромоктана и 6.58 г (47.6 ммоль) карбоната калия в 20 мл ацетонитрила перемешивали при 80°C в течение 24 ч. После завершения реакции избыток карбоната калия отфильтровывали, растворитель удаляли под вакуумом. Полученную массу растворяли в 25 мл этилацетата, промывали дистиллированной водой (3 × 20 мл) и сушили над сульфатом натрия. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии в системе хлороформ:метанол 9 : 1. Получали 837 мг продукта **2a** (45%).

^1H -ЯМР-спектр (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 0.88 (т, 3H, CH_3), 1.27 (с, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.38 (п, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.43 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.51 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.40 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.33 (с, 2H, OH).

N-Додecilдиэтаноламин (2b). N-Додecilдиэтаноламин получали аналогичным образом. Из 1 г (9.51 ммоль) диэтаноламина и 2.13 г (8.56 ммоль) 1-бромдодекана получали 1.7 г продукта **2b** (74%).

^1H -ЯМР-спектр (DMSO-d_6 , δ , м.д.): 0.85 (т, 3H, CH_3), 1.24 (с, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.36 (п, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.43 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.51 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.40 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.37 (с, 2H, OH).

О,О'-ди-(N-(*трет*-бутоксикарбонил- β -аланил)октил)диэтанолламин (3a). К раствору 220 мг (1.15 ммоль) Вос-(β -Ala)-ОН в 5 мл безводного хлористого метилена при перемешивании добавляли 225 мг (1.84 ммоль) 4-диметиламинопиридина (DMAP) и раствор 380 мг (1.84 ммоль) дициклогексилкарбодиимида (DCC) в 5 мл хлористого метилена. Смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин. Добавляли раствор 100 мг (0.461 ммоль) продукта **2a** в 5 мл хлористого метилена. Смесь выдерживали при интенсивном перемешивании в течение 24 ч. После завершения реакции отфильтровывали выпавший осадок дициклогексилмочевины, реакцию массу растворяли в 50 мл этилацетата и промывали дистиллированной водой (3 $\times$ 50 мл) и сушили над Na_2SO_4 . После удаления растворителя на вакууме продукт выделяли колоночной хроматографией в системе толуол:этилацетат – 2 : 1. Выход продукта **3a** составил 102 мг (40%).

^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.89 (т, 3H, CH_3), 1.28 (с, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.46 (с, 18H, CCH_3), 1.94 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.53 (т, 4H, β -Ala: $^\alpha\text{CH}_2$), 2.64 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.78 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.41 (к, 4H, β -Ala: $^\beta\text{CH}_2$), 4.18 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 5.25 (с, 2H, NH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3415 (N–H); 2949, 2894 (C–H); 1743 (C=O эфир), 1720 (C=O, I амидная полоса); 1527 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(*трет*-бутоксикарбонил-ГАМК)октил) диэтанолламин (3b). Реакцию проводили аналогичным образом. Из 234 мг (1.15 ммоль) Вос-(ГАМК)-ОН и 0.1 г (0.461 ммоль) соединения **2a** получали 112 мг продукта **3b** (41%).

^1H -ЯМР спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.89 (т, 3H, CH_3), 1.28 (с, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.46 (с, 18H, CCH_3), 1.82 (п, 4H, ГАМК: $^\beta\text{CH}_2$), 1.95 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.37 (т, 4H, ГАМК: $^\alpha\text{CH}_2$), 2.52 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.78 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.17 (м, 4H, ГАМК: $^\gamma\text{CH}_2$), 4.15 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.79 (с, 2H, NH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3386 (N–H); 2927, 2856 cm^{-1} (C–H); 1737 (C=O эфир); 1677 (C=O, I амидная полоса); 1521 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(*трет*-бутоксикарбонил- β -Ala)додецил)диэтанолламин (3c). Соединение **3c** получали аналогичным образом. Из 0.34 г (1.8 ммоль) Вос-(β -Ala)-ОН и 0.2 г (0.73 ммоль) соединения **2b** получали 277 мг продукта **3c** (62%).

^1H -ЯМР спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.86 (т, 3H, CH_3), 1.28 (с, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.46

(с, 18H, CCH_3), 1.63 (п, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.53 (т, 4H, β -Ala: $^\alpha\text{CH}_2$), 2.59 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.83 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.37 (м, 4H, β -Ala: $^\beta\text{CH}_2$), 4.21 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 5.22 (с, 2H, NH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3311 (N–H); 2958, 2902 (C–H); 1739 (C=O эфир); 1715 (C=O, I амидная полоса); 1519 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(*трет*-бутоксикарбонил-ГАМК)додецил)диэтанолламин (3d). Соединение **3d** получали аналогичным образом. Из 0.37 г (1.8 ммоль) Вос-(ГАМК)-ОН и 0.2 г (0.73 ммоль) соединения **2b** получали 280 мг продукта **3d** (60%).

^1H -ЯМР спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.87 (т, 3H, CH_3), 1.24 (с, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.46 (с, 18H, CCH_3), 1.63 (п, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.80 (м, 4H, ГАМК: $^\beta\text{CH}_2$), 2.36 (т, 4H, ГАМК: $^\alpha\text{CH}_2$), 2.49 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.73 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.14 (м, 4H, ГАМК: $^\gamma\text{CH}_2$), 4.11 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.75 (с, 2H, NH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3340 (N–H); 2914, 2855 cm^{-1} (C–H); 1735 (C=O эфир); 1625 (C=O эфир, I амидная полоса); 1521 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(β -аланилоктил)диэтанолламин бистрифторацетат (4a). К раствору 11 мг (0.02 ммоль) вещества **3a** в 5 мл безводного хлористого метилена добавляли 33 мг (0.3 ммоль) трифторуксусной кислоты. Перемешивали 2 ч при 0°C. По завершению реакции растворитель и избыток трифторуксусной кислоты отгоняли на ротаторном испарителе. Конечный маслянистый продукт **4a** получали с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 382.18 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 398.20 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

О,О'-ди-(ГАМК-октил)диэтанолламин бистрифторацетат (4b). Соединение **4b** получали аналогичным образом. Из 14 мг (0.024 ммоль) соединения **3b** и 41 мг (0.36 ммоль) трифторуксусной кислоты получали продукт **4b** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 410.12 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 426.18 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

О,О'-ди-(β -аланил-додецил)диэтанолламин бистрифторацетат (4c). Соединение **4c** получали аналогичным образом. Из 12 мг (0.02 ммоль) соединения **3c** и 41 мг (0.36 ммоль) трифторуксусной кислоты получали продукт **4c** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 438.213 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 454.209 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

О,О'-ди-(ГАМК-додецил)диэтанолламин бистрифторацетат (4d). Соединение **4d** получали аналогичным образом. Из 10 мг (0.016 ммоль) соединения **3d** и 27 мг (0.23 ммоль) трифторуксусной кис-

лоты получали продукт **4d** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 466.29 $[M + Na]^+$; 485.31 $[M + K]^+$.

О,О'-ди-(N-(трет-бутоксикарбонил-L-Phe)октил)диэтаноламин (5a). Реакцию получения **5a** проводили аналогично соединению **3a**. Из 0.1 г (0.46 ммоль) **2a** и 0.427 г (1.6 ммоль) Вос-(Phe)-ОН получали 0.24 г продукта **5a** (72%).

1H -ЯМР-спектр ($CDCl_3$, δ , м.д.): 0.88 (т, 3H, CH_3), 1.27 (с, 10H, $CH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$), 1.41 (с, 18H, CCl_3), 1.54 (м, 2H, $CH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$), 2.46 (т, 2H, $CH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$), 2.67 (т, 4H, CH_2CH_2NH), 3.10 (м, 4H, $NHCHCH_2C_6H_5$), 4.12 (т, 4H, CH_2CH_2NH), 4.56 (м, 2H, $NHCHCH_2C_6H_5$), 5.02 (с, 2H, NH), 7.14–7.32 (м, 10H, C_6H_5).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3443 (N–H); 3070, 3057, 750, 709 ($^{ar}C-H$); 2982, 2851 cm^{-1} (C–H); 1751 (C=O); 1678 (C=O эфир, I амидная полоса); 1516 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(трет-бутоксикарбонил-L-Trp)октил)диэтаноламин (5b). Реакцию получения **5b** проводили аналогично соединению **3a**. Из 0.1 г (0.4 ммоль) **2a** и 0.490 г (1.6 ммоль) Вос-(Trp)-ОН получали 0.2 г продукта **5b** (56%).

1H -ЯМР спектр ($CDCl_3$, δ , м.д.): 0.90 (т, 3H, CH_3), 1.25 (с, 10H, $CH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$), 1.48 (с, 18H, CCl_3), 1.57 (м, 2H, $CH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$), 2.24 (т, 2H, $CH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$), 2.35 (т, 4H, CH_2CH_2NH), 3.28 (м, 4H, $NHCHCH_2C_8H_5NH$), 3.94 (т, 4H, CH_2CH_2NH), 4.62 (м, 2H, $NHCHCH_2C_8H_5NH$), 5.21 (с, 2H, NH), 7.00–7.58 (м, 12H, C_8H_5NH), 8.68 (м, 2H, C_8H_5NH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3361 (N–H); 3063, 3030, 749, 701 ($^{ar}C-H$); 2928, 2855 cm^{-1} (C–H); 1721 (C=O эфир); 1715 (C=O эфир, I амидная полоса); 1500 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(трет-бутоксикарбонил-L-Tyr)октил)диэтаноламин (5c). Реакцию получения **5c** проводили аналогичным образом. Из 0.1 г (0.4 ммоль) **2a** и 0.405 г (1.4 ммоль) Вос-(Tyr)-ОН получали 96 мг продукта **5c** (28%).

1H -ЯМР-спектр ($CDCl_3$, δ , м.д.): 0.88 (т, 3H, CH_3), 1.26 (с, 10H, $CH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$), 1.43 (с, 18H, CCl_3), 1.58 (м, 2H, $CH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$), 2.34 (т, 2H, $CH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$), 2.73 (т, 4H, CH_2CH_2NH), 2.94 (м, 4H, $NHCHCH_2C_6H_4$), 3.65 (т, 4H, CH_2CH_2NH), 4.53 (м, 2H, $NHCHCH_2C_6H_4$), 4.99 (с, 2H, NH), 6.75–7.04 (м, 10H, C_6H_5), 7.25 (с, 2H, OH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3474 (N–H); 3072, 3061 ($^{ar}C-H$); 2934, 2854 cm^{-1} (C–H); 1692 (C=O); 1643 (C=O эфир, I амидная полоса); 1514 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(L-Phe-октил)диэтаноламин бистрифторацетат (6a). К раствору 12 мг (0.017 ммоль) вещества **5a** в 7 мл безводного CH_2Cl_2 добавляли 29 мг (0.25 ммоль) трифторуксусной кислоты. Перемешивали 3 ч при 0°C. По завершению реакции растворитель и избыток трифторуксусной кислоты отгоняли на ротаторном испарителе. Конечный маслянистый продукт **6a** получали с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 534.24 $[M + Na]^+$; 550.22 $[M + K]^+$.

О,О'-ди-(L-Trp-октил)диэтаноламин бистрифторацетат (6b). Соединение **6b** получали аналогичным образом. Из 12 мг (0.013 ммоль) соединения **5b** и 20 мг (0.20 ммоль) трифторуксусной кислоты получали продукт **6b** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 612.16 $[M + Na]^+$; 628.22 $[M + K]^+$.

О,О'-ди-(L-Tyr-октил)диэтаноламин бистрифторацетат (6c). Соединение **6c** получали аналогичным образом. Из 12 мг (0.016 ммоль) соединения **5b** и 28 мг (0.24 ммоль) трифторуксусной кислоты получали продукт **6c** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 566.40 $[M + Na]^+$; 581.37 $[M + K]^+$.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) методом диффузии в агар. Исследование антибактериальной активности полученных амфифилов проводили совместно с сотрудниками базовой кафедры ФГБОУ “Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе”. В качестве тест-микроорганизмов использовали подготовленные суспензии *Bacillus subtilis* 534 и *Escherichia coli* M17 с концентрацией 1.5×10^8 КОЕ/мл и оптической плотностью 0.5 ед. по Мак-Фарланду. На чашки Петри наносили по 100 мкл суспензии и заливали 10 мл теплого питательного агара, перемешивали, оставляли до застывания. Потом на поверхность агара в чашках с культурами помещали стерильные диски из плотной фильтровальной бумаги (6 штук) равного размера и массы, с внутренним диаметром (6.0 $\pm$ 0.1 мм) на одинаковом расстоянии друг от друга. На диски наносили аликвоты исследуемых и контрольных образцов: по 1, 10 и 100 мкл, что соответствует 1, 10 и 100 мкг/мл вещества. После чего чашки выдерживали при комнатной температуре в течение 1–2 ч с последующим инкубированием при температуре $36 \pm 1^\circ C$ в течение 16–18 ч. По завершении эксперимента определяли диаметр зон подавления роста тест-микроорганизма с точностью до 1 мм. Эксперимент проводили 3 раза. В качестве препаратов сравнения использовались растворы ампициллина (Sigma-Aldrich) и ванкомицина (Acros Organics), к которым чувствительны используемые микроорганизмы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе была предложена и реализована схема синтеза новых катионных амфифилов на основе природных аминокислот и диэтаноламина (схема 1). Основным критерием выбора синтезируемых структур амфифилов стали результаты расчета гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ). Значения ГЛБ коррелируют с возможностью взаимодействий терапевтических молекул с компонентами клеточной стенки бактерий и проявлением антимикробной активности. Согласно литературным данным, оптимальный показатель ГЛБ соединений, проявляющих высокую антибактериальную активность, соответствует интервалу от 5 до 7 [17]. Теоретический расчет ГЛБ был проведен с использованием программы "ACD/Labs, LogP". Была разработана библиотека химических структур на основе аминокислот и аминоспиртов и отобраны молекулы, значения ГЛБ которых лежат в диапазоне вероятной антибактериальной активности и варьируются от 3.14 до 6.49 (табл. 1). Для расчета ГЛБ в редакторе химических соединений "ChemDraw"

создавали структуры получаемых соединений, которые затем загружались в программу "LogP" для автоматического расчета ГЛБ по заданным параметрам программы. Расчет значений для молекул из литературных источников [12, 17] со схожей структурой и с известным антибактериальным механизмом показал аналогичный результат. Полученные данные стали основой для разработки схем получения и синтеза соединений **4 (a–d)** и **6 (a–c)**.

Все синтезируемые соединения имеют общий принцип строения и состоят из следующих структурных блоков: две полярные головные группы, спейсер, линкер и гидрофобный алкильный фрагмент. Гидрофильный блок представлен двумя остатками β -Ala, ГАМК, *L*-Phe, *L*-Tyr или *L*-Trp. В качестве спейсерного участка использовали диэтаноламин. Коммерчески доступный диэтаноламин часто входит в состав косметических и лекарственных средств из-за двух реакционноспособных функциональных групп, позволяющих синтезировать препараты с широким спектром действия [18].

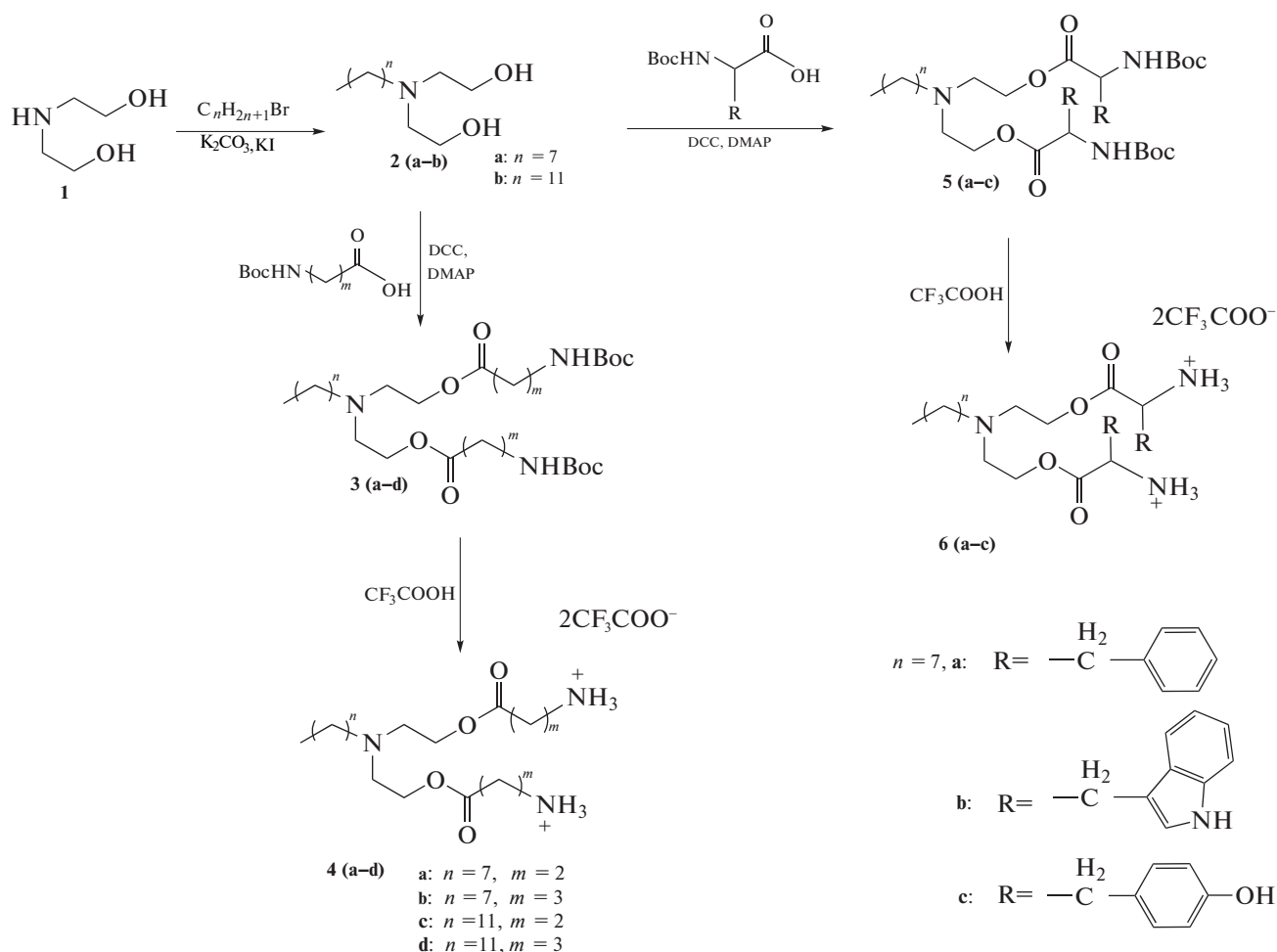


Схема 1

Таблица 1. Значения ГЛБ для синтезированных соединений

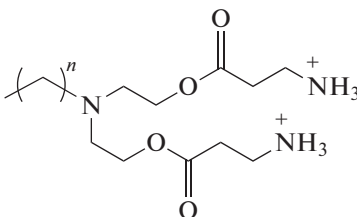
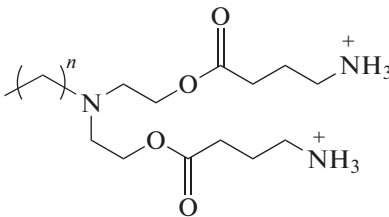
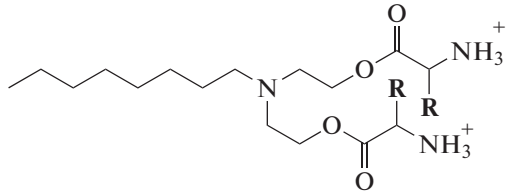
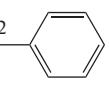
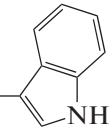
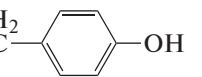
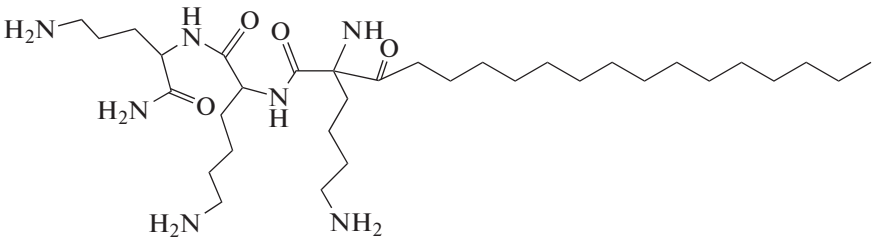
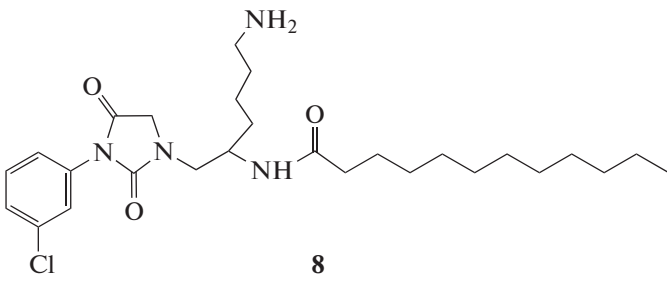
Соединение	Структурная формула	ГЛБ
4a ($n = 7$)		3.14 ± 0.40
4c ($n = 11$)		5.30 ± 0.40
4b ($n = 7$)		3.61 ± 0.36
4d ($n = 11$)		5.73 ± 0.36
		
6a	$R = \text{---C(=O)---}$ 	6.49 ± 0.45
6b	$R = \text{---C(=O)---}$ 	6.34 ± 0.48
6c	$R = \text{---C(=O)---}$ 	5.02 ± 0.46
7 [17]	 7	4.15 ± 0.59
8 [12]	 8	5.7 ± 0.69

Таблица 2. Размер зоны подавления роста бактерий, мм

Вещество	Концентрация, мкг/мл	<i>E. coli</i> (–)			<i>B. subtilis</i> (+)		
		1	2	3	1	2	3
4a	1	—*	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—
	100	13 × 12	14 × 12	13 × 11	14 × 10	14 × 13	13 × 14
4b	1	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—
	100	15	16	21	20	18 × 21	20
4c	1	5	6	5	8	6	7
	10	10	9 × 8	8 × 9	13 × 14	12	12 × 10
	100	15 × 14	16 × 18	15	20 × 11	21 × 13	16 × 12
4d	1	6	7	6	7	7	8
	10	15 × 12	14 × 11	14 × 13	16 × 12	12 × 18	16
	100	27 × 25	23 × 29	26 × 22	27 × 25	24 × 33	30 × 22
6a	1	—	—	—	4	4	5
	10	—	—	—	13	12 × 15	14
	100	18	16	15	20 × 18	22	16 × 19
6b	1	—	—	—	4	5	5
	10	—	—	—	13 × 14	12	12 × 10
	100	27 × 25	23	22 × 25	22 × 25	15	20
6c	1	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	15 × 12	13	16
	100	20	25	21 × 24	28 × 22	26	19 × 23
Ванкомицин	1	Не изучалось			6	7	7
	10				12 × 9	15 × 12	13
	100				22	23 × 24	26
Ампициллин	1	—	—	—	Не изучалось		
	10	12	13 × 11	14			
	100	20 × 17	21 × 13	20			

*Здесь и далее в таблице знак “—” означает, что зона подавления роста бактерий отсутствует.

Для формирования гидрофобного блока соединений **4 (a–d)** и **6 (a–c)** в данной работе предложено использовать 1-бромоктан и 1-бромдекан. Липофильный компонент **2 (a, b)** получали реакцией N-алкилирования диэтанолamina в присутствии K_2CO_3 в среде CH_3CN . Выходы продуктов **2 (a, b)** составили 45 и 74% соответственно.

Соединения **3 (a–d)**, содержащие Вос-защищенные алифатические аминокислоты, получали по карбодиимидному методу с использованием DCC и DMAP [19]. Выходы веществ **3 (a–d)** составили 40, 41, 62 и 60% соответственно. Структуры полученных продуктов подтверждали данными 1H -ЯМР- и ИК-спектроскопии.

Соединения **5 (a–c)**, содержащие Вос-защищенные ароматические аминокислоты, получали

согласно вышеописанному методу. Выходы веществ **5 (a–c)** составили 72, 56, 28% соответственно. Низкий выход соединения **5c**, содержащего тирозин, объясняется тем, что присутствие реакционноспособной гидроксильной группы приводит к образованию трудноразделимой сложной смеси. Наличие большого количества побочных продуктов затрудняет выделение целевого соединения с незащищенной OH-группой. Решением подобной проблемы может стать использование коммерческих общедоступных производных с защищенной гидроксильной группой, например, *трет*-бутильной защитой.

Конечные катионные амфифилы **4 (a–d)** и **6 (a–c)** получали удалением Вос-защитных групп действием трифторуксусной кислоты в среде без-

Таблица 3. Антибактериальная активность образцов

Шифр соединения	МИК, мкг/мл	
	<i>E. coli</i> (–)	<i>B. subtilis</i> (+)
4a	100	100
4b	100	100
4c	1	1
4d	1	1
6a	100	1
6b	100	1
6c	100	10
7	1.56 [20]	–
8	1 [12]	–
Ванкомицин	–	1
Ампициллин	10	–

водного хлористого метилена (1 : 1 v/v). За ходом реакции следили по данным ТСХ. Структуры полученных солей подтверждали данными масс-спектрометрии.

Предварительную оценку антибактериального действия синтезированных соединений проводили на линии грамположительных *B. subtilis* 534 и грамотрицательных *E. coli* M17 бактерий методом диффузии бактерий в агар (табл. 2, 3). Соединения, которые в полярной группе содержат алифатические аминокислоты β-Ala (**4c**) и ГАМК (**4d**) с гидрофобной цепью C12, проявляют антибактериальную активность в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий с МИК равной 1 мкг/мл. Амфифилы с ароматическими аминокислотами *L*-Phe (**6a**) и *L*-Trp (**6b**) в полярной головной группе и гидрофобной цепью C8 активны в отношении бактерий *B. subtilis* с МИК 1 мкг/мл. Таким образом, можно проследить следующую зависимость структуры и активности: для проявления высокой активности в отношении грамположительных бактерий *B. subtilis* необходимо проявление выраженной гидрофобности, что достигается или за счет увеличения длины углеводородной цепи до C12 при наличии алифатических аминокислот β-Ala и ГАМК, как в случае соединений **4c** и **4d**, или за счет введения гидрофобных ароматических кислот *L*-Phe и *L*-Trp при сохранении длины углеводородного радикала C8, как в случае **6a** и **6b**. При этом, в отношении грамотрицательных бактерий *E. coli* данная зависимость соблюдается только для алифатических аминокислот с длинным гидрофобным фрагментом **4c** и **4d**, так как введение ароматических аминокислот не показало эффективности.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда

фундаментальных исследований (проект № 20-04-00672). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА, получившего поддержку Минобрнауки РФ (соглашение от 01.09.2021 № 075-15-2021-689).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yount N.Y., Yeaman M.R. 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101** (19), 7363. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101>
- Мусин Х.Г. 2018. Антимикробные пептиды — потенциальная замена традиционным антибиотикам. *Инфекция и иммунитет*. **8** (3), 295.
- Rima M., Rima M., Fajloun Z., Sabatier J.-M., Bechinger B., Naas T. 2021. Antimicrobial peptides: A potent alternative to antibiotics. *Antibiotics*. **10** (9), 1095. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091095>
- Molchanova N., Hansen P.R., Franzyk H. 2017. Advances in development of antimicrobial peptidomimetics as potential drugs. *Molecules*. **22** (9), 1430. <https://doi.org/10.3390/molecules22091430>
- Pirri G., Giuliani A., Nicoletto S.F., Pizzuto L., Rinaldi A.C. 2009. Lipopeptides as anti-infectives: A practical perspective. *Cent. Eur. J. Biol.* **4**(3), 258–273. <https://doi.org/10.2478/s11535-009-0031-3>
- Fjell C.D., Hiss J.A., Hancock R.E. W., Schneider G. 2012. Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nat. Rev. Drug Discovery*. **11**, 37–51.
- Faber C., Stallmann H., Lyaruu D., Joosten U., Von Eiff C., van Nieuw Amerongen A., Wuisman P.I. 2005. Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (6), 2438–

2444.
https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2438-2444.2005
8. Lin L., Chi J., Yan Y., Luo R., Feng X., Zheng Y., Xian D., Li X., Quan G., Liu D., Wu C., Lu C., Pan X. 2021. Membrane-disruptive peptides/peptidomimetics-based therapeutics: Promising systems to combat bacteria and cancer in the drug-resistant era. *Acta Pharm. Sin. B.* **11** (9), 2609.
https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.07.014
 9. Tague A.J., Putsathit P., Hammer K.A., Wales S.M., Knight D.R., Riley T.V., Keller P.A., Pyne S.G. 2019. Cationic biaryl 1,2,3-triazolyl peptidomimetic amphiphiles: Synthesis, antibacterial evaluation and preliminary mechanism of action studies. *Eur. J. Med. Chem.* **168**, 386.
https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.013
 10. Mojsoska B., Jenssen H. 2015. Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. *Pharmaceuticals (Basel)*. **8**(3), 366–415.
https://doi.org/10.3390/ph8030366
 11. Zhang E., Bai P.-Y., Cui D.-Y., Chu W.-C., Hua Y.-G., Liu Q., Yin H.-Y., Zhang Y.-J., Qin S., Liu H.-M. 2018. Synthesis and bioactivities study of new antibacterial peptide mimics: The dialkyl cationic amphiphiles. *Europ. J. Med. Chem.* **143**, 1489–1509.
https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.044
 12. Su M., Xia D., Teng P., Nimmagadda A., Zhang C., Odom T., Cao A., Hu Y., Cai J. 2017. Membrane-active hydantoin derivatives as antibiotic agents. *J. Med. Chem.* **60** (20), 8456.
https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00847
 13. Konai M.M., Ghosh C., Yarlagadda V. 2014. Membrane active phenylalanine conjugated lipophilic nor-spermidine derivatives with selective antibacterial activity. *J. Med. Chem.* **57**, 9409–9423.
https://doi.org/10.1021/jm5013566
 14. Ghosh C., Sarkar P., Samaddar S., Uppua D., Haldar J. 2017. L-Lysine based lipidated biphenyls as agents with anti-biofilm and anti-inflammatory properties that also inhibit intracellular bacteria. *Chem. Commun.*, **53**, 8427–8430.
https://doi.org/10.1039/C7CC04206J
 15. Lohan S., Kalanta A., Sonkusre P., Cameotra S.S., Bisht G.S. 2014. Development of novel membrane active lipidated peptidomimetics active against drug resistant clinical isolates. *Bioorg. & Med. Chem.*, **22**, 4544–4552.
https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.041
 16. Schnaider L., Brahmachari S., Schmidt N.W., Mensa B., Shaham-Niv S., Bychenko D., Adler-Abramovich L., Shimon L.J.W., Kolusheva S., DeGrado W.F., Gazit E. 2017. Self-assembling dipeptide antibacterial nanostructures with membrane disrupting activity. *Nat. Commun.* **8** (1), 1365.
https://doi.org/10.1038/s41467-017-01447-x
 17. Shahane G., Ding W., Palaiokostas M., Azevedo H.S., Orsi M. 2019. Interaction of antimicrobial lipopeptides with bacterial lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **252** (4–5), 317.
https://doi.org/10.1007/s00232-019-00068-3
 18. Yar M., Mushtaq N., Afzal S. 2013. Synthesis, reactions, applications, and biological activity of diethanolamine and its derivatives. *Russ. J. Org. Chem.* **49** (7), 949–967.
https://doi.org/10.1134/S1070428013070014
 19. Denieva Z.G., Romanova N.A., Bodrova T.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. 2019. Synthesis of amphiphilic peptidomimetics based on the aliphatic derivatives of natural amino acids. *Moscow Univ. Chem. Bull.* **74** (6), 300–305.
https://doi.org/10.3103/S0027131419060087
 20. Makovitzki A., Baram J., Shai Y. 2008. Antimicrobial lipopolyptides composed of palmitoyl di- and tri-cationic peptides: in vitro and in vivo activities, self-assembly to nanostructures, and a plausible mode of action. *Biochemistry*. **47** (40), 10630.
https://doi.org/10.1021/bi8011675

Cationic Lip amino acid Derivatives of Diethanolamine as Potentially Membrane-Active Antibacterial Agents

M. K. Guseva¹, Z. G. Denieva², U. A. Budanova¹*, Yu. L. Sebyakin¹

¹MIREA, Russian Technology University, Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow, 119571 Russia

²Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: c-221@yandex.ru

This work is aimed to develop a number of cationic amphiphiles based on amino acid derivatives of diethanolamine as potentially membrane-active antibacterial agents. The developed compounds contain two amino acid residues in the polar block and various length of aliphatic chains in the hydrophobic domain. Amphiphiles were obtained in preparative amounts sufficient to confirm their structures and perform a study of antibacterial activity. The synthesized samples based on β -Ala (**4c**) and GABA (**4d**) with an aliphatic C12 chain in the hydrophobic domain showed a promising level of antimicrobial activity (minimal inhibitory concentration, MIC, 1 μ g/mL) against gram-positive (*B. subtilis*) and gram-negative (*E. coli*) bacteria. Amphiphiles containing aromatic amino acids *L*-Phe (**6a**) and *L*-Trp (**6b**) in the polar head group and C8 hydrocarbon chain are active against *B. subtilis* with a MIC of 1 μ g/mL. The obtained data on antimicrobial activity make the selected compounds attractive for further detailed study of their mechanism of action.

Keywords: antimicrobial peptides, peptidomimetics, cationic amphiphiles, diethanolamine, amino acid derivatives, bacterial resistance

УДК 577.352.465

МОНОКЛОНАЛЬНАЯ ЛИНИЯ КЛЕТОК, КОЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ СЕНСОРЫ cAMP И Ca^{2+}

© 2023 г. П. Д. Котова^a, *, О. А. Рогачевская^a, С. С. Колесников^a

^aИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино,
Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: p.d.kotova@gmail.com

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 29.09.2022 г.

Принята к публикации 01.10.2022 г.

Множественные поверхностные рецепторы и внутриклеточные сигнальные системы вовлечены в межклеточные коммуникации и паракринные/аутокринные регуляции клеточных функций. Семейство гептаспиральных рецепторов (G-protein coupled receptor, GPCR) является самым многочисленным и участвует в регуляции практически всех физиологических процессов за счет сопряжения со множеством внутриклеточных сигнальных каскадов. Среди них ключевыми являются аденилатциклазный каскад, контролирующий внутриклеточный уровень cAMP, и фосфоинозитидный каскад, определяющий многие аспекты внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализации. Ряд фактов свидетельствует о том, что аденилатциклазный и фосфоинозитидный каскады могут взаимно регулировать друг друга. Поэтому агонисты GPCR-рецепторов, сопряженных с аденилатциклазой, могут также влиять на внутриклеточный Ca^{2+} , и наоборот, Ca^{2+} -мобилизующие лиганды могут инициировать изменения уровня cAMP. Представляется, что одновременный мониторинг cAMP и Ca^{2+} в цитоплазме клеток может существенно детализировать представления о сигнальных процессах, инициируемых агонистами GPCR-рецепторов. Мониторинг внутриклеточного cAMP в режиме реального времени на сегодняшний день возможен только с помощью генетически кодируемых сенсоров, такие сенсоры разработаны и для анализа внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов. В данной работе нами была получена моноклональная линия клеток HEK-293, коэкспрессирующих флуоресцентные сенсоры cAMP (Pink Flamindo) и Ca^{2+} (GEM-GECO1). Как показали физиологические тесты, полученная клеточная линия обеспечивает возможность проведения одновременного мониторинга cAMP и Ca^{2+} с достаточной чувствительностью. Такой инструмент существенно расширяет возможности исследования агонист-зависимых внутриклеточных процессов и, в частности, анализа интерференции cAMP- и Ca^{2+} -сигнальных систем.

Ключевые слова: внутриклеточная Ca^{2+} -сигнализация, cAMP, генетически кодируемые сенсоры, моноклональная линия клеток

DOI: 10.31857/S0233475523010048, EDN: CNTGDU

Для восприятия внешних стимулов клетки экспрессируют на плазматической мембране различные рецепторы, связывание которых с первичными медиаторами, такими как экстраклеточные гормоны, нейротрансмиттеры, цитокины или факторы роста, приводит к выработке внутри клетки вторичных посредников. Вторичные медиаторы представляют собой небольшие молекулы, которые передают сигналы к эффекторным молекулам, запуская многочисленные биохимические процессы, результатом которых являются специфические клеточные ответы на внеклеточные стимулы. Универсальными вторичными медиаторами являются молекулы циклического аденозинмонофосфата (cAMP) и ионы кальция (Ca^{2+}).

Первой молекулой, идентифицированной как вторичный медиатор, был cAMP, который регулирует множественные внутриклеточные процессы. Активация гептаспиральных (G-protein coupled receptor, GPCR) рецепторов, сопряженных с Gs- или Gi/o-белком, приводит к стимуляции или ингибированию аденилатциклазы соответственно, в результате чего уровень внутриклеточного cAMP изменяется. Действие cAMP опосредовано работой первичных эффекторных молекул, а именно протеинкиназы A (РКА), фактора обмена гуанин-нуклеотидов (Ерас) и циклонуклеотид-зависимых ионных каналов. Активация РКА приводит к фосфорилированию множества белков-мишеней, в том числе различных факторов, усиливающих транскрипцию определенных

генов. Работа циклонуклеотид-зависимых каналов играет ключевую роль в фоторецепции, обонянии и сердечной сократимости. Ерас стимулирует активность GTP-азы Rap1, что приводит к активации фосфолипазы C ϵ и стимуляции внутриклеточных и ядерных Ca²⁺-сигналов. Передача cAMP-сигналов завершается посредством действия фосфодиэстераз, деградирующих cAMP, и фосфатаз, противодействующих PKA-опосредованному фосфорилированию [1, 2].

Ионы Ca²⁺ являются универсальным вторичным медиатором, контролирующим множество важнейших физиологических процессов, от передачи нервного импульса и сокращения мышечных волокон до пролиферации, дифференцировки и программируемой клеточной гибели. В связи с этим уровень внутриклеточного Ca²⁺ жестко контролируется при участии соответствующих каналов, насосов и Ca²⁺-связывающих белков. В ответ на различные внешние сигналы уровень цитоплазматического Ca²⁺ может значительно повышаться за счет входа Ca²⁺ снаружи или его высвобождения из внутриклеточных депо. Например, активация GPCR-рецепторов, сопряженных с Gq-белком, приводит к активации фосфолипазы C β и последующему расщеплению фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP₂) и продукции инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP₃) и диацилглицерина (DAG). Связывание IP₃-рецепторов с IP₃ и Ca²⁺ приводит к высвобождению Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума и усилению этих Ca²⁺-сигналов преимущественно при помощи механизма Ca²⁺-индуцированного выброса Ca²⁺ из внутриклеточных депо (Ca²⁺-induced Ca²⁺ release). Частичное опустошение ретикулума приводит к взаимодействию белков его мембраны STIM с Ca²⁺-каналами плазматической мембраны Orai, входу наружного Ca²⁺ в цитозоль (store-operated calcium entry) и его загрузке в ретикулум посредством Ca²⁺-АТФ-азы [1, 2].

Функционируя в ткани, клетки в норме могут подвергаться одновременному воздействию многих стимулов, активирующих различные сигнальные пути. В этих условиях Ca²⁺- и cAMP-сигнальные системы активны одновременно и могут оказывать влияние друг на друга. Так, Ca²⁺ модулирует активность аденилатциклаз, стимулируя AC1, AC8 и AC3, ингибируя AC5 и AC6, а также Ca²⁺-чувствительных фосфодиэстераз. При этом механизмы генерации Ca²⁺-сигналов регулируются при участии cAMP/PKA-пути на всех уровнях. Например, активация cAMP/PKA-пути приводит к фосфорилированию Gq-белков и фосфолипазы C β , что подавляет выработку IP₃, контролируя таким образом начальные стадии трансдукции Ca²⁺-сигнала. На уровне высвобож-

дения Ca²⁺ из внутриклеточных депо cAMP напрямую или посредством PKA может повышать вероятность открытия IP₃-рецепторов, причем риаудиновые рецепторы также являются субстратом для PKA. Активация PKA также регулирует вход Ca²⁺ через STIM/Orai. В кардиомиоцитах активация PKA посредством воздействия на фосфоламбан потенцирует работу Ca²⁺-АТФ-азы саркоплазматического ретикулума, способствуя выбросу депонированного Ca²⁺. Заключительная стадия Ca²⁺-сигнала контролируется PKA посредством активации IP₃-киназы, преобразующей IP₃ в IP₄, а также с помощью активации Ca²⁺-АТФ-азы плазматической мембраны [1, 2].

Методы исследования внутриклеточных сигнальных путей, в частности, основаны на мониторинге соответствующих вторичных медиаторов. Мониторинг внутриклеточного Ca²⁺ традиционно осуществляется методом микрофотометрии (Ca²⁺-imaging) с помощью синтетических флуоресцентных Ca²⁺-зондов. Способность таких зондов проникать через плазматическую мембрану и аккумулироваться внутри живой клетки дает возможность изучать Ca²⁺-процессы в динамике и на уровне одиночных клеток. Синтетических флуоресцентных зондов для cAMP не разработано, в связи с этим мониторинг cAMP внутри живой клетки стал возможен только с появлением генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. Работа большинства таких сенсоров основана на Фёрстеровском переносе энергии (FRET), однако методика измерения FRET крайне сложна и требует специализированного оборудования для регистрации эмиссии флуоресценции на двух длинах волн. Недавно были разработаны одноволновые флуоресцентные генетически кодируемые сенсоры cAMP, что сделало мониторинг этой молекулы более доступным технически [3, 4]. Для мониторинга внутриклеточного Ca²⁺ также созданы генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры, обладающие различными спектральными характеристиками [5]. Таким образом, последние разработки в области генетически кодируемых сенсоров делают возможным проведение мониторинга внутриклеточных cAMP и Ca²⁺ одновременно, что позволяет исследовать взаимодействие этих сигнальных путей. Данная работа была направлена на получение клеток, коэкспрессирующих генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры cAMP и Ca²⁺. Представляется, что для повышения эффективности работы такого инструмента необходимо, чтобы базовые клетки эндогенно экспрессировали множество рецепторных и сигнальных белков. Таким свойством обладают клетки НЕК-293, в связи с чем именно эта линия была выбрана в качестве материнской [6].

Для проведения одновременного мониторинга флуоресценции нескольких сенсоров необходимо, чтобы не пересекались либо спектры возбуждения их флуоресценции (λ_{ex}), либо спектры эмиссии флуоресценции (λ_{em}) всех используемых сенсоров. Для мониторинга внутриклеточного cAMP на сегодняшний день разработано несколько одноволновых флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров, одними из лучших характеристик среди них обладает Pink Flamindo, флуоресцирующий в оранжевой области спектра ($\lambda_{ex} = 567$ нм, $\lambda_{em} = 590$ нм) [4]. Имеющиеся в настоящий момент генетически кодируемые сенсоры Ca^{2+} характеризуются разнообразными спектральными характеристиками, и для работы в комбинации с Pink Flamindo нами был выбран GEM-GECO1, флуоресцирующий в синей и зеленой областях спектра ($\lambda_{ex} = 390$ нм, $\lambda_{em1} = 455$ нм, $\lambda_{em2} = 511$ нм) [5]. Ни спектры возбуждения, ни спектры эмиссии Pink Flamindo и GEM-GECO1 не пересекаются, что позволяет проводить одновременный и независимый мониторинг внутриклеточных cAMP и Ca^{2+} . Таким образом, для получения заявленной клеточной линии НЕК-293 трансфицировали плазмидными векторами, обеспечивающими гетерологичную экспрессию сенсоров Pink Flamindo и GEM-GECO1.

Следует отметить, что в результате липофекции клеток НЕК-293 плазмидным вектором доля клеток, экспрессирующих целевой белок, редко достигает половины даже после селекции в присутствии антибиотика, при этом уровень экспрессии белка интереса значительно варьируется от клетки к клетке и быстро падает с течением времени. Между тем, в качестве эффективного инструмента для исследования физиологических процессов желательно, чтобы большая доля модельных клеток экспрессировала генетически кодируемые сенсоры постоянно и на высоком уровне. Такого результата можно достичь, получив моноклональную клеточную линию.

В данной работе клетки НЕК-293 культивировали в среде DMEM (Gibco), содержащей 4.5 г/л глюкозы, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамина (Sigma) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в воздухе при 37°C. С целью индукции экспрессии Pink Flamindo и GEM-GECO1 клетки трансфицировали плазмидными векторами Pink Flamindo (#102356 Addgene) и CMV-GEM-GECO1 (#32442 Addgene) одновременно. Для трансфекции использовали набор для липофекции Lipofectamine 3000 (Invitrogen) по оптимизированному согласно рекомендациям производителя протоколу. Затем клетки в течение 2 недель культивировали в присутствии 700 мкг/мл селективного антибиотика G418 (Invitrogen), устойчивость к которому несет плазмидный вектор Pink

Flamindo. В результате селекции на чашке оставались колонии клеток, обладающие различным уровнем флуоресценции, обусловленным различиями в уровне экспрессии встроенных сенсоров. С помощью клеточного сортера FACS Aria SORP (BD Biosciences) отбирали субпопуляцию клеток, обладающих наибольшей интенсивностью флуоресценции как GEM-GECO1 ($\lambda_{ex} = 407$ нм, $\lambda_{em} = 525 \pm 10$ нм), так и Pink Flamindo ($\lambda_{ex} = 561$ нм, $\lambda_{em} = 582 \pm 7.5$ нм) (рис. 1а–1е). Затем отобранные клетки рассаживали по одной в лунку 96-луночного планшета, содержащую ростовую среду с повышенным до 15% содержанием сыворотки. Одиночные клетки порождали колонии клеток, которые наращивали до количества, достаточно для проведения физиологических тестов.

Клетки всех полученных моноклональных линий тестировали в физиологических экспериментах, а именно с помощью микрофотометрии оценивали характеристики сигналов, генерируемых клетками в ответ на стимуляцию активатором аденилатциклазы форсколином (10–50 мкМ) и активатором фосфолипазы C m-3M3FBS (100 мкМ). Для этого клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning) и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 110, KCl – 5.5, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 0.8, HEPES – 10, глюкозу – 10. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию клеток возбуждали при 572 ± 17.5 и 380 ± 5.5 нм, эмиссию регистрировали в областях 634 ± 34 и 523 ± 23 нм для Pink Flamindo и GEM-GECO1 соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon). По результатам физиологического тестирования была отобрана моноклональная линия НЕК-PF/GG, клетки которой демонстрировали обратимые и максимальные ответы на стимуляцию форсколином и m-3M3FBS (рис. 1г). Клетки полученной линии НЕК-PF/GG также генерировали быстроразвивающиеся cAMP- и Ca^{2+} -ответы на стимуляцию норадреналином (1 мкМ) (рис. 1д). Известно, что этот агонист стимулирует аденилатциклязный и фосфолипазный сигнальные пути, взаимодействуя с адренергическими рецепторами разных типов [7]. Тот факт, что нам удалось детектировать cAMP- и Ca^{2+} -ответы клеток НЕК-PF/GG на стимуляцию норадреналином в физиологических концентрациях, говорит о возможности их использования для исследования сигналов, вызываемых и другими природными агонистами GPCR-рецепторов.

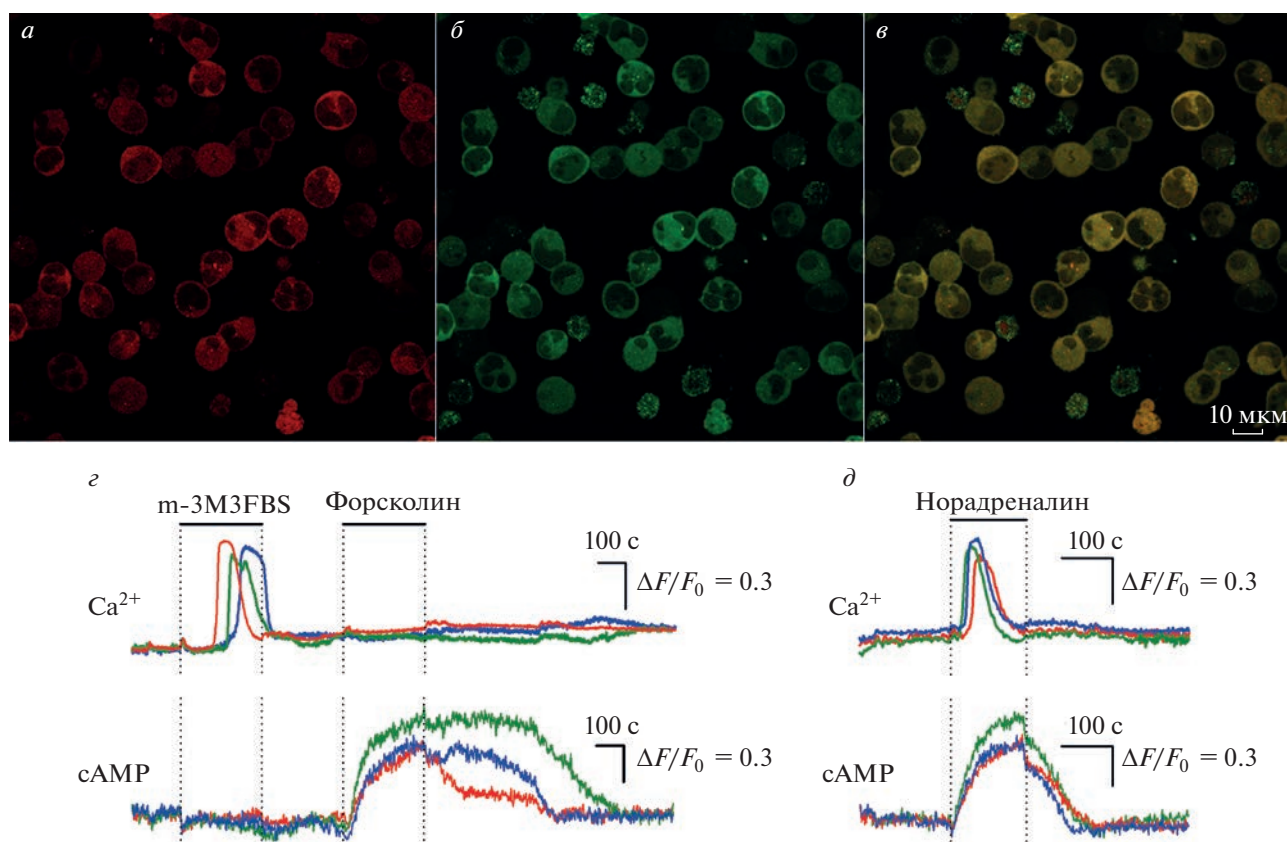


Рис. 1. Характеристики клеток линии HEK-PF/GG.

a, б – Конфокальные изображения клеток линии HEK-PF/GG при возбуждении флуоресценции Pink Flamindo (*a*) и GEM-GECO1 (*б*). *в* – Суперпозиция флуоресцентных изображений, представленных в *a* и *б*. Изображения *a – в* были получены с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE (Leica), оборудованного объективом с масляной иммерсией Plan Apochromat HCX PL APO Lambda Blue 63× 1.4 Oil UV (Leica), и программы Leica Application Suite Advanced Fluorescence. Флуоресценцию возбуждали при 543 и 405 нм, эмиссию регистрировали в областях 580–640 и 440–530 нм для Pink Flamindo и GEM-GECO1 соответственно.

з, д – Репрезентативные регистрации Ca^{2+} - и cAMP-ответов клеток линии HEK-PF/GG на стимуляцию активатором фосфолипазы C m-3M3FBS (100 мкМ) и активатором аденилатциклазы Forskolin (35 мкМ) (*з*) и норадреналином (1 мкМ) (*д*). Моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальных кривых. Изменение внутриклеточного Ca^{2+} и cAMP характеризовали относительной флуоресценцией GEM-GECO1 и Pink Flamindo соответственно, используя параметр $\Delta F/F_0$. Для GEM-GECO1 $\Delta F = F_0 - F$, для Pink Flamindo $\Delta F = F - F_0$, где F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии индикатора и его эмиссии в начале регистрации соответственно.

Полученная в результате описанной работы моноклональная линия, клетки которой позволяют проводить одновременный мониторинг цитозольных cAMP и Ca^{2+} в режиме реального времени, является без преувеличения долгожданным инструментом для исследования соответствующих внутриклеточных сигнальных систем и их взаимодействия.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ на клеточном сортере FACSaria SORP в рамках Программы развития МГУ и А.Б. Никифорову за помощь в проведении работ на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов

интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-75-10068.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arige V., Yule D.I. 2022. Spatial and temporal crosstalk between the cAMP and Ca^{2+} signaling systems. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **1869** (9), 119293.

2. Hofer A.M. 2012. Interactions between calcium and cAMP signaling. *Curr. Med. Chem.* **19** (34), 5768–5773.
3. Massengill C.I., Day-Cooney J., Mao T., Zhong H. 2021. Genetically encoded sensors towards imaging cAMP and PKA activity in vivo. *J. Neurosci. Methods.* **362**, 109298.
4. Harada K., Ito M., Wang X., Tanaka M., Wongso D., Konno A., Hirai H., Hirase H., Tsuboi T., Kitaguchi T. 2017. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Sci. Rep.* **7** (1), 7351.
5. Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.F., Nakano M., Abdelfattah A.S., Fujiwara M., Ishihara T., Nagai T., Campbell R.E. 2011. An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science*. **333** (6051), 1888–1891.
6. Atwood B.K., Lopez J., Wager-Miller J., Mackie K., Straiker A. 2011. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics*. **12**, 14.
7. Zink-Lorenz A., Komitowska J., Raue F. 1996. Norepinephrine induced calcitonin secretion in rat medullary thyroid carcinoma 6-23 cells: Interaction between intracellular calcium and cAMP. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. **104** (1), 43–49.

Monoclonal Line of Cells Co-Expressing Genetically Encoded Sensors of cAMP and Ca^{2+}

P. D. Kotova^{1, *}, O. A. Rogachevskaja¹, S. S. Kolesnikov¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

^{*}*e-mail: p.d.kotova@gmail.com*

A variety of surface receptors and intracellular signaling systems are involved in cell-to-cell communication and paracrine/autocrine regulation of cellular functions. Being most numerous, the family of G-protein coupled receptors (GPCRs) is involved in the regulation of almost all physiological processes due to coupling to multiple and diverse intracellular signaling cascades. Among them, the ubiquitous players are the adenylate cyclase cascade, which controls the intracellular cAMP level, and the phosphoinositide cascade, which determines many aspects of intracellular Ca^{2+} signaling. Certain facts suggest that the adenylate cyclase and phosphoinositide cascades can be cross regulated. It therefore can be expected that agonists of adenylate cyclase-coupled GPCR receptors also might affect intracellular Ca^{2+} , and in turn, Ca^{2+} -mobilizing ligands might initiate a change in the cAMP level. Thus, simultaneous monitoring of cAMP and Ca^{2+} in the cell cytosol appears to be rational, as it can significantly refine the understanding of signaling processes initiated by agonists. The on-line monitoring of intracellular cAMP is currently possible only with the use of genetically encoded sensors; such sensors have also been developed for the analysis of intracellular Ca^{2+} signals. Here we generated a monoclonal line HEK-293 co-expressing molecular fluorescent sensors for cAMP (Pink Flamingo) and Ca^{2+} (GEM-GECO1). Physiological tests showed that this cell line provides the possibility of simultaneous monitoring of cAMP and Ca^{2+} with sufficient sensitivity. Such a tool can increase the efficacy of studying agonist-induced intracellular processes and, in particular, the analysis of crosstalk between the cAMP and Ca^{2+} signaling systems.

Keywords: intracellular Ca^{2+} signaling, cAMP, genetically encoded sensors, monoclonal cell line

УДК 577.352:577.115

СРАВНЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В СОДЕРЖАНИИ СТЕРИНОВ ПЛАЗМАЛЕММЫ И ТОНОПЛАСТА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ И ОСМОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ

© 2023 г. Н. В. Озолина^а, *, В. В. Гурина^а, И. С. Капустина^а,
Е. В. Спиридонова^а, В. Н. Нурминский^а

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

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

Поступила в редакцию 17.10.2022 г.

После доработки 09.11.2022 г.

Принята к публикации 11.11.2022 г.

Сравнивали изменения в содержании стеринах плазмалеммы и тонопласта, выделенных из хранящихся корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) при окислительном и осмотических стрессах. Наиболее существенные различия между мембранами были отмечены при изменении содержания холестерина при всех изучаемых стрессовых воздействиях: оно уменьшалось в плазмалемме, но в 4–6 раз возрастало в тонопласте. То же самое происходило и с другими стеринами, но при разных стрессах по-разному. Особенно заметные различия были отмечены при гиперосмотическом стрессе. Выявленное намного более заметное увеличение содержания важных для стабилизации мембраны стеринах в вакуолярной мембране по сравнению с плазмалеммой позволяет сделать вывод о более значительной роли тонопласта по сравнению с плазмалеммой в защите растительной клетки от стресса.

Ключевые слова: тонопласт, плазмалемма, стерины, стресс

DOI: 10.31857/S0233475523020056, **EDN:** KYQKKS

Одна из задач физиологии растений – выявление эндогенных механизмов защиты растительных клеток при стрессе. Действие экстремальных факторов, вызывающих состояние стресса, приводит к перестройке метаболизма клетки. Пограничные мембраны являются важными защитными барьерами и при действии стрессоров претерпевают изменения, способствующие преодолению негативных воздействий. В растительной клетке присутствуют две пограничные мембраны. Плазматическая мембрана ограничивает содержимое клетки от окружающей среды. Ее главная функция – поддержание целостности клетки и осуществление взаимосвязи с внешней средой. Плазматическая мембрана регулирует избирательный транспорт веществ в клетку, обеспечивает специфику межклеточных контактов, выполняет структурную, барьерную, информационную и защитную функции. Вакуолярная мембрана, как внутренняя мембрана тонопласта, ограничивает вакуоль растительной клетки, обладает избирательной проницаемостью, активно участвует в процессах транспорта метаболитов, во многом определяет способность клетки к осморегуляции, к регуляции pH и ионного гомеостаза цитозоля,

трансдукции сигналов различной природы и так же, как плазмалемма, принимает участие в защите клетки от абиотического стресса. Значительная часть этих функций связана с липидами пограничных мембран. Известно, что мембранные липиды принимают участие в защите растительной клетки от стрессовых воздействий [1]. Среди мембранных липидов именно стерины определяют такие свойства мембраны, как текучесть и проницаемость. Их роль в защите клетки от стресса в настоящее время не вызывает сомнений [2]. Доказана стабилизирующая роль стеринах – при увеличении их содержания происходит упорядочивание липидного бислоя мембраны. Они регулируют микровязкость, пластичность, ригидность мембран и участвуют в защите от стрессовых воздействий [3]. Цель настоящего исследования состояла в анализе качественного и количественного состава стеринах плазмалеммы и тонопласта при окислительном, гиперосмотическом и гипоосмотическом стрессовых воздействиях.

В качестве объекта исследования использовали плазматические и вакуолярные мембраны клеток корнеплодов столовой свеклы *Beta vulgaris* L.,

находящиеся на стадии покоя. Вакуолярные и плазматические мембраны получали описанными ранее методами [4, 5]. Чистоту мембранных фракций оценивали при помощи специфических ингибиторов H^+ -АТФ-аз. Азид натрия (NaN_3), ванадат натрия (Na_3VO_4) и бафиломицин являются ингибиторами F-, P- и V-типа H^+ -АТФ-аз, соответственно. В экспериментах по определению чистоты полученных фракций тонопласта азид натрия и ванадат натрия практически не влияли на активность H^+ -АТФ-аз изолированных везикул, в то время как бафиломицин подавлял активность на 95%. В экспериментах с фракцией плазмалеммы было установлено, что ванадат подавлял активность H^+ -АТФ-азы изолированных везикул на 97%, тогда как бафиломицин и азид ингибирующего влияния почти не оказывали. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что мембранные фракции являются достаточно чистыми и могут быть использованы в экспериментах.

Методика создания и оценка эффективности окислительного и осмотического стрессов подробно описана в работе, опубликованной ранее [6]. Для создания гиперосмотического стресса корнеплоды в течение 3 суток выдерживали (подсушивали) на открытом воздухе при комнатной температуре, что приводило к снижению массы корнеплодов и увеличению осмоляльности клеточного сока (общая концентрация растворенных частиц в 1 кг воды). Для создания гипоосмотического стресса корнеплоды выдерживали в течение суток в дистиллированной воде при комнатной температуре, в результате чего уменьшалась осмоляльность клеточного сока. Осмоляльность оценивали на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Россия). Осмотика в контрольных корнеплодах составляла 645 ± 35 мОсм kg^{-1} H_2O , после гиперосмотического стресса — 749.4 ± 42.3 , а после гипоосмотического — 568.3 ± 7.6 мОсм kg^{-1} H_2O . Для создания окислительного стресса кусочки ткани корнеплода размером $1 \times 1 \times 1$ см инкубировали в растворе 100 мМ H_2O_2 в течение суток также при комнатной температуре. В контрольном варианте использовали корнеплоды, не подвергнутые стрессам. Для характеристики стрессового воздействия на корнеплоды использовали кондуктометрический метод [7]. Также определяли содержание диеновых конъюгатов по методу [8]. Влияние стрессов на барьерные свойства мембран (стабильность мембран) изучали с использованием цейтраферной видеосъемки [9].

Из плазмалеммы и тонопласта, которые были выделены из контрольных и подвергнутых окислительному и осмотическим стрессам корнеплодов, экстрагировали липиды по методу [10]. Количество стерина определяли методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (GC-MS

7000/7890A Triple Quad chromatography-mass spectrometer, Agilent Technologies (США)). Идентификацию стерина проводили путем сравнения их времен удержания со стандартами, а также использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7. Количественный анализ был проведен с использованием калибровочной кривой по холестерину, кампестерину, стигмастерину и β -ситостерину с учетом отклика внутреннего стандарта, в качестве которого использовали эргостерин.

Сравнивая контрольные варианты двух пограничных мембран, мы видим, что в плазмалемме сумма стерина существенно выше, чем в тонопласте. В данном исследовании нас интересовали изменения как в суммарном содержании, так и в содержании отдельных классов стерина при окислительном и осмотическом стрессе. Результаты экспериментов показали, что в плазмалемме при осмотических стрессах идет двукратное снижение содержания стерина, тогда как при окислительном стрессе наоборот их количество в 2 раза увеличивается (табл. 1). В тонопласте также отмечено увеличение содержания стерина при окислительном стрессе, но заметно более существенное (в 3 раза). При осмотических стрессах изменения в суммарном содержании стерина в тонопласте по сравнению с плазмалеммой отличаются еще более заметно. Так, при гиперосмотическом стрессе в тонопласте происходило такое же увеличение суммарного содержания стерина, как и при окислительном стрессе, хотя в плазмалемме происходило существенное снижение общего содержания стерина. При гипоосмотическом стрессе достоверных изменений в содержании общих стерина в тонопласте не происходило, но не отмечено и снижение их содержания, которое мы видим у плазмалеммы. Увеличение содержания стерина является важным защитным механизмом, поскольку хорошо известно, что стерин стабилизируют мембрану и способствуют упорядочению структурных компонентов мембраны [2].

В табл. 1 приведены результаты измерений содержания отдельных классов стерина в плазмалемме и тонопласте при изучаемых стрессах. Видно, что все виды стресса вызывали изменения содержания всех классов стерина. Так, содержание холестерина в плазмалемме уменьшалось и при окислительном, и при осмотических стрессах, тогда как в тонопласте оно, наоборот, возрастало в 4–6 раз. Известно, что хотя содержание холестерина в растительных мембранах сравнительно низкое, он играет заметную роль в регуляции биофизических характеристик мембран. Ранее было показано, что холестерин экранирует отрицательные заряды и тем самым снижает поверхностный заряд мембраны [11]. Это способствует более плотной упаковке углеводородных цепей в

Таблица 1. Количественное содержание основных классов стерина плазмалеммы и тонопласта из контрольных корнеплодов и корнеплодов, подвергнутых окислительному и осмотическим стрессам

Стерин	Содержание стерина (мкг/мг общих липидов) при стрессе			
	контроль	гиперосмотическом	гипоосмотическом	окислительном
Плазмалемма				
Холестерин	0.9 ± 0.3	0.3 ± 0.1*	Следы	0.6 ± 0.1
Кампестерин	1.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1*	0.3 ± 0.1*	1.2 ± 0.1
Стигмастерин	4.9 ± 0.5	1.1 ± 0.1*	0.9 ± 0.1*	7.5 ± 0.3*
β-Ситостерин	9.3 ± 2.9	5.2 ± 1.6*	7.1 ± 0.6	21.0 ± 1.4*
Σ	16.4 ± 2.8	7.0 ± 1.7*	8.3 ± 0.6*	30.3 ± 1.2*
Тонопласт				
Холестерин	0.2 ± 0.01	1.0 ± 0.2*	1.34 ± 0.1*	0.8 ± 0.1*
Кампестерин	0.4 ± 0.02	1.2 ± 0.1*	0.4 ± 0.1	1.7 ± 0.2*
Стигмастерин	3.3 ± 0.3	5.0 ± 0.9*	1.0 ± 0.3*	6.9 ± 0.7*
β-Ситостерин	5.6 ± 0.9	19.3 ± 1.4*	8.3 ± 2.0	18.1 ± 3.0*
Σ	9.4 ± 1.2	26.5 ± 1.3*	11.0 ± 2.0	27.4 ± 3.1*

Примечание. Данные получены методом ГХ-МС. * — достоверно при $p \leq 0.01$. Жирным шрифтом отмечены варианты увеличения содержания липидов по сравнению с контролем, курсивом — снижение.

фазе геля, что играет важную роль в обеспечении барьерной функции клеточных мембран.

Содержание других классов стерина в плазмалемме при гиперосмотическом стрессе снижалось в 3–4 раза, тогда как в тонопласте вновь отмечено заметное увеличение. При гипоосмотическом стрессе в плазмалемме содержание всех классов липидов заметно уменьшалось, за исключением β-ситостерина. В тонопласте при этом виде стресса снижалось только содержание стигмастерина, тогда как количество других стерина не менялось, за исключением холестерина, содержание которого существенно возрастало.

Наиболее интересные изменения в содержании стерина, на наш взгляд, отмечены после окислительного стресса. В этом случае происходило существенное увеличение содержания не только суммы стерина тонопласта, но и всех отдельных классов стерина. В плазмалемме отмечены похожие изменения, но не увеличивалось содержание кампестерина, и снижалось содержание холестерина. При гиперосмотическом стрессе существенно увеличивалось только суммарное содержание стерина в тонопласте, тогда как в плазмалемме оно снижалось. Наименее заметные изменения в сторону увеличения содержания стерина отмечены при гипоосмотическом стрессе.

Таким образом, при окислительном и осмотических видах стрессового воздействия изменения в содержании стерина, связанные с выполнением защитных функций от стресса, были значительно более выражены на вакуолярной мембране. Полученные результаты позволяют выдвинуть пред-

положение о существенной роли тонопласта в защите растительной клетки от стресса.

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

Источники финансирования. Работа выполнена с частичным использованием средств гранта РФФИ № 19-04-00013 на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Okazaki Y., Saito K. 2014. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *Plant J.* **79**, 584–596.
- Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А., Минибаева Ф.В. 2016. Растительные стерин: многообразие, биосинтез, физиологические функции. *Биохимия*. **18**, 1050–1068.
- Orvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* **23** (6), 785–794.
- Салеев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. 1981. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений. *Физиология растений*. **28**, 1295–1305.

5. Larsson C., Widell S., Kjellbon P. 1987. Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods in Enzymology*. **148**, 558–568.
6. Ozolina, N.V., Gurina V.V., Nesterkina, I.S. Nurminsky V.N. 2020. Variations in the content of tonoplast lipids under abiotic stress. *Planta*. **251**, 107.
7. Ristic Z., Ashworth E.N. 1993. Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation. *Protoplasma*. **172**, 111–123.
8. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. 1972. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М.: Наука. 252 с.
9. Nurminsky V.N., Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Korzun A.M., Chernyshov M.Yu., Tikhonov N.V., Tarkov M.S., Salyaev R.K. 2011. Stability of plant vacuolar membranes under the conditions of osmotic stress and influence of redox agents. *Biochemistry (Moscow). Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. **5** (2), 185–190.
10. Bligh E., Dyer W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37** (8), 911–917.
11. Болдырев А.А. 1985. *Биологические мембраны и транспорт ионов*. М.: МГУ. 208 с.

Comparison of Changes in the Content of Plasma Membrane and Tonoplast Sterols under Oxidative and Osmotic Stress

N. V. Ozolina¹, *, V. V. Gurina¹, I. S. Kapustina¹, E. V. Spiridonova¹, V. N. Nurminsky¹

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

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

Changes in the content of plasma membrane and tonoplast sterols isolated from stored beet root crops (*Beta vulgaris* L.) under oxidative and osmotic stress were compared. The most significant differences between the membranes were noted when the cholesterol content changed under all the studied stress effects: it decreased in the plasmalemma but increased 4–6 times in the tonoplast. Similar changes occurred with other sterols, but in different ways under different stresses. Particularly noticeable differences were noted in hyperosmotic stress. The increase in the content of sterols was much more pronounced in the vacuolar membrane compared to the plasmalemma. This observation allows us to conclude that the tonoplast plays a more significant role in protecting the plant cell from stress than the plasmalemma.

Keywords: tonoplast, plasmalemma, sterols, stress

ПАМЯТИ ВЛАДИМИРА ПЕТРОВИЧА СКУЛАЧЕВА (21.02.1935–05.02.2023)

DOI: 10.31857/S0233475523090013, EDN: FTNZIA

5 февраля 2023 года ушел из жизни академик В.П. Скулачев — крупнейший российский биохимик, вся деятельность которого связана с Московским университетом.

Длительный и плодотворный путь Владимира Петровича от студента МГУ до директора НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ сопровождался многочисленными научными достижениями, которые без тени сомнения можно отнести к научным открытиям. Еще будучи студентом на кафедре биохимии животных, руководимой С.Е. Севериным, он увлекся проблемами совсем молодой науки, которую потом стали называть биэнергетикой и которой он был предан всю свою жизнь. Первым, очень значимым личным его достижением было предположение о так называемом терморегуляторном разобщении окислительного фосфорилирования у адаптированных к холоду животных. Это было в ту пору, когда в биоэнергетике превалировал химический механизм синтеза АТФ в результате работы цепи переноса электронов. Позже, в начале 60-х годов XX века, когда впервые были сформулированы принципы хемиосмотической концепции П. Митчелла, Владимир Петрович примкнул к тогда еще небольшому стану ученых, поддерживающих эту идею, и не просто пассивно примкнул, а стал апологетом и активным защитником этой концепции и ее автора. Самое значимое открытие, сделанное на этом пути, было создание вместе с Е.А. Либерманом химических структур с дelokализованным зарядом, положительным или отрицательным. В соответствии с предсказаниями, первые накапливались в митохондриях, а вторые — в субмитохондриальных частицах, что подтверждало наличие направленного электрического поля на сопрягающей мембране митохондрий. Сейчас не вызывает сомнений, что без этой работы Нобелевская премия, присужденная в 1978 году П. Митчеллу, могла и не состояться. Интересно, что намного позже эти положительно заряженные молекулы, которые с легкой руки Д. Грина были названы Скулачев-ионы, стали использоваться в качестве инструмента доставки в митохондрии веществ, необходимых для репарации нежелательных процессов и изменений, вызванных болезнями и старением. В более поздних работах проникающие ионы стали основой для разработки митохондриально адресованных антиоксидантов семейства SkQ, которые нашли применение в лечении болезней, вызванных окислительным стрессом. Глазные капли “визомитин”

успешно используются для лечения одной из патологий глаз.

Открытое Владимиром Петровичем новое явление транспорта жирных кислот в митохондрии совместно с проникающими “жирными катионами” семейства SkQ и C(12)TPP (SkQ без пластохинона) дало представление о возможности тонкой подстройки разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования жирными кислотами, не допуская гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны и связанной с этим гиперпродукции активных форм кислорода (АФК), вызывающих окислительный стресс. По мнению Владимира Петровича, именно АФК, генерируемые в избытке в митохондриях, являются первопричиной многих патологических процессов в организме. Он активно обосновывал патологическую роль активных форм кислорода и на основе этой концепции разрабатывал перспективные подходы для борьбы со старением, раком и другими болезнями, связанными с окислительным стрессом.

Помимо этого, среди ярких открытий В.П. Скулачева и его школы был анализ работы широкого ряда генераторов электрического тока в сопрягающих мембранах, будь то тилакоиды или хроματοфоры. При работе с бактериородопсином, проходившей при личном участии Владимира Петровича, одним из талантливых физиков его группы Л.А. Драчевым был предложен принципиально новый метод анализа электрогенеза, основанный на прямой регистрации мембранного потенциала между отсеками камеры, разделенными мембраной, к одной стороне которой приклеивались липосомы с предварительно встроенным исследуемым белком-генератором. Прямой электрометрический метод, обеспечивающий высокое временное разрешение, до сих пор незаменим при изучении стадий электрогенного переноса заряда внутри белковых комплексов и широко используется исследователями как в России, так и за рубежом. Метод способствовал расшифровке механизма работы реакционных центров и хроματοфоров бактерий, фотосистем I и II высших растений, терминальных оксидаз дыхательной цепи митохондрий и бактерий, бактериородопсинов. Владимиром Петровичем был открыт межмембранный перенос электронов, предложена структура молекулярного электромотора бактерий, обоснован механизм “дыхательной защиты” — способа, используемого клеткой, чтобы избежать токсического действия кислорода. Мировое значение имело постулирование, а впоследствии и доказа-

тельство существования у протяженных митохондриальных структур кабельных свойств, обеспечивающих внутриклеточный транспорт электричества. В последние годы Владимир Петрович увлекся изучением проблемы старения организма и стал родоначальником теории программируемой гибели организма, фенотоза. Он сформулировал новый принцип, предполагающий существование специальных механизмов самоликвидации сложных биологических систем (от органелл до организма), включающихся, когда функционирование этих систем отклоняется от заданной генетической программы. В целом, невозможно перечислить все научные направления, в которые Владимир Петрович внес неоценимый вклад.

В.П. Скулачев опубликовал более 500 работ в ведущих российских и международных журналах (в частности, в *Nature*) и 5 монографиях, изданных у нас и за рубежом. В.П. Скулачев до очень недавнего времени был самым цитируемым российским ученым. В 1967 году он стал лауреатом премии Ленинского комсомола, а в 1975 — Госпремии СССР. В 1974 г. он был избран членом-корреспондентом, в 1990 г. — академиком АН СССР, в 1991 г. стал членом очень престижной Европейской Академии и в 1993 г. — членом Президиума этой Академии. С 1992 г. по недавнее время он был президентом Всероссийского биохимического общества, а в течение последних 22 лет — главным редактором журнала «Биохимия». За это время импакт-фактор журнала вырос в 5 раз, в результате чего он стал самым цитируемым российским биологическим журналом. С 2011 по 2016 г. В.П. Скулачев входил в состав редколлегии одного из ведущих международных журналов «*Physiological Reviews*» (импакт-фактор более 30).

Владимир Петрович стоял у истоков образования НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. В 37 лет почти сразу после защиты докторской диссертации он возглавил тогда еще Межфакультетскую проблемную лабораторию молекулярной биологии и биоорганической химии сразу после смерти А.Н. Белозерского и был одним из самых молодых руководителей такого ранга в МГУ, продолжая демократические традиции управления наукой, заложенные А.Н. Белозерским. Достаточно упомянуть, что все вопросы в Лаборатории открыто обсуждались на научно-техническом Совете. Был организован отдел информации, значительно облегчавший сотрудникам знакомство с мировой литературой. В Лаборатории успешно работал целый ряд научных семинаров, на которых выдвигались и обсуждались самые передовые научные идеи и достижения: семинар И.М. Гельфанда, семинар по биоэнергетике, который Владимир Петрович продолжал вести до самого конца своей жизни, семинар по клеточной биологии под руководством Ю.М. Васильева и др. В.П. Скулачеву удалось превратить возглавляемый им коллектив в один из самых эффективных научных подразделений, получивших в 1991 г. закономерное название НИИ физико-химической биоло-

гии имени А.Н. Белозерского МГУ, директором которого стал В.П. Скулачев и оставался им до конца своих дней. Следует сказать и о научно-организационной деятельности В.П. Скулачева. Он — один из инициаторов организации, а с февраля 2002 г. — декан нового факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ. Многие годы В.П. Скулачев читал один из лучших учебных курсов МГУ — «Энергетика клетки». Выпущено два учебника для студентов. Последний учебник «Мембранная биоэнергетика» издан в 2010 г., а в 2013 г. вышла его английская версия («*Principles of Bioenergetics*»). В 2013 и 2014 гг. В.П. Скулачев опубликовал популярное иллюстрированное издание под названием «Жизнь без старости», рассчитанное на широкий круг читателей.

В.П. Скулачеву принадлежит мысль о создании Программы научных школ РФ. Он организатор клуба российских членов Европейской Академии, присуждающего ежегодно премии нашим молодым ученым. В.П. Скулачевым было предложено воссоздать в МГУ общедоступный лекторий, ставший воистину жемчужиной Московского университета. Надо не забывать, что в период «перестройки» он был среди очень немногочисленных организаторов материальной помощи от мощного финансового спонсора, тем самым серьезно помогая выживать нашим ученым, хотя бы частично спасая их от неминуемого отъезда за рубеж. Без всякого сомнения, его имя стало известным не только среди ученых разного профиля, но и вообще среди большинства жителей нашей страны.

Уход Владимира Петровича Скулачева — неоправимая утрата для его семьи, коллег, МГУ, секции физико-химической биологии Отделения биологических наук РАН и в целом для всей отечественной и мировой науки. Однако не утрачена созданная им школа советской и российской биоэнергетики, ученики которой, рассеянные по научным подразделениям России и за рубежом, остаются бесконечно благодарными этому человеку — Учителю и Ученому.

Т.В. Выгодина, Д.Б. Зоров

*Институт физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского МГУ*

От редколлегии журнала

Академик В.П. Скулачев многие годы был членом редакционного Совета журнала «Биологические мембраны». Высокие стандарты, которые были заданы Владимиром Петровичем на посту главного редактора журнала «Биохимия», всегда служили ориентиром и в деятельности нашего журнала. Трудно переоценить вклад В.П. Скулачева в развитие биоэнергетики и биологических исследований в целом, широту видения проблем, организационный и педагогический талант. Уход Владимира Петровича — это большая утрата для всех нас, его коллег, друзей и соратников. Приносим глубокие соболезнования его семье, родным и близким.