

СОДЕРЖАНИЕ

Том 38, номер 2, 2021

ОБЗОРЫ

Структура и функции щелевых контактов и составляющих их коннексинов в ЦНС млекопитающих

Е. Ю. Кириченко, С. Н. Скачков, А. М. Ермаков

83

Взаимодействие пептидов, содержащих CRAC-мотивы, с липидами в мембранах различного состава

П. Е. Волынский, Т. Р. Галимзянов, С. А. Акимов

98

Граничный потенциал и энергия сжатия липидных монослоев в жидкокристаллическом состоянии

Ю. А. Ермаков

109

Стириловые красители di-4-ANEPPS и RH-421 как датчики протонов на поверхности липидных мембран

А. Н. Константинова, Ю. В. Харитонова, В. Ю. Ташкин, В. С. Соколов

123

Влияние метилтриклозана на функционирование изолированных митохондрий печени крыс и проницаемость мембраны липосом

К. С. Теньков, М. В. Дубинин, А. А. Семенова, К. Н. Белослудцев

129

Влияние глюкокортикоида дефлазакорта на дыхание и кальций-зависимую проницаемость митохондрий печени крыс

М. В. Дубинин, А. А. Семенова, Е. И. Хорошавина, К. Н. Белослудцев

139

Влияние оксимов дициклогексилкарбамимидоила на свойства модельных липидных мембран

С. С. Ефимова, Д. Н. Чернышова, З. М. Саркисян, П. Бремонд, О. С. Остроумова

152

Contents

Vol. 38, No. 2, 2021

REVIEWS

Structure and Functions of Gap Junctions and Their Constituent Connexins
in the Mammalians CNS

E. Yu. Kirichenko, S. N. Skatchkov, A. M. Ermakov

83

Interaction of Peptides Containing CRAC Motifs with Lipids in Membranes
of Various Composition

P. E. Volynsky, T. R. Galimzyanov, S. A. Akimov

98

Boundary Potential and the Energy of Lipid Monolayer Compression
at the Liquid Expanded State

Yu. A. Ermakov

109

Styryl Dyes di-4-ANEPPS and RH-421 As Sensors of the Protons
on the Surface of Lipid Membranes

A. N. Konstantinova, Yu. V. Kharitonova, V. Yu. Tashkin, V. S. Sokolov

123

Effect of Methyltriclosan on the Functioning of Isolated Rat Liver Mitochondria
and Permeability of Liposomal Membranes

K. S. Tenkov, M. V. Dubinin, A. A. Semenova, K. N. Belosludtsev

129

Effect of Glucocorticoid Deflazacort on Respiration and Calcium-Dependent
Permeability of Rat Liver Mitochondria

M. V. Dubinin, A. A. Semenova, E. I. Khoroshavina, K. N. Belosludtsev

139

Effects of Dicyclohexylcarbamidoyl Oximes on the Properties
of Model Lipid Membranes

*S. S. Efimova, D. A. Chernyshova, Z. M. Sarkisyan,
P. Brémond, O. S. Ostroumova*

152

УДК 576.523

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ И СОСТАВЛЯЮЩИХ ИХ КОННЕКСИНОВ В ЦНС МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2021 г. Е. Ю. Кириченко^{а, *}, С. Н. Скачков^{б, с, **}, А. М. Ермаков^{д, ***}

^аАкадемия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, 344090 Россия

^бДепартамент биохимии, Медицинская Школа, П.О. Бокс 60327, Центральный Карибский Университет, Байамон, Пуэрто-Рико, PR-00960-6032 США

^сДепартамент физиологии, Медицинская Школа, П.О. Бокс 60327, Центральный Карибский Университет, Байамон, Пуэрто-Рико, PR-00960-6032 США

^дДонской государственный технический университет, факультет “Биоинженерия и ветеринарная медицина”, г. Ростов-на-Дону, 344003 Россия

*e-mail: kiriche.evgeniya@yandex.ru

**e-mail: sergei.skatchkov@uccaribe.edu

***e-mail: amermakov@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.08.2020 г.

После доработки 19.10.2020 г.

Принята к публикации 21.10.2020 г.

Многочисленные данные последних 30 лет свидетельствуют о том, что все отделы центральной и периферической нервных систем (ЦНС и ПНС) от головного мозга, глазной сетчатки и обонятельной луковицы до спинного мозга, ганглиев и энтероглии содержат клетки, соединенные щелевыми контактами (ЩК). Единичные субъединицы ЩК (белки коннексины) собраны, как правило, в гексамерные комплексы или мембранные полуканалы (коннексоны). При этом, когда две контактирующие клетки соединяются посредством коннексонов в ЩК, разнообразие представленных в них субъединиц белков коннексинов способствует специфичности и множественности функций в нейронах, астроцитах, в сателлитной и энтеральной глии. Коннексины и ЩК нейронов, объединяя определенные типы тормозных гиппокампальных и неокортикальных нейронных ансамблей, обеспечивают синхронизацию локальной импульсной и ритмической активности, таламокортикальное проведение, контроль возбуждающих связей, что отражает их важную роль в процессах восприятия, концентрации внимания и консолидации памяти как на клеточном, так и на системном уровнях. Коннексины макроглиальных клеток повсеместно экспрессируются в головном мозге, а образуемые ими ЩК обеспечивают метаболическую кооперацию и играют определенную роль в процессах миграции нейронов при развитии мозга, миелинизации, а также в гомеостазе тканей и апоптозе. Мутации в генах глиальных коннексинов, а также дефицит этих белков ассоциированы с такими заболеваниями, как врожденные нейропатии, потеря слуха, кожные заболевания, опухоли мозга, аутизм. В обзоре обобщены данные многочисленных молекулярных, электрофизиологических, фармакологических и морфологических исследований, направленных на прогресс в изучении физиологического и патофизиологического значения глиальных и нейрональных коннексинов и ЩК для ЦНС.

Ключевые слова: щелевые контакты, виды коннексинов, астроциты, нейроны

DOI: 10.31857/S0233475521020067

ВВЕДЕНИЕ

Щелевые контакты, или нексусы (gap junctions, nexus), относятся к проводящему типу межклеточных контактов и обеспечивают непосредственный переход из цитоплазмы одной клетки в цитоплазму другой небольших водорастворимых молекул с молекулярной массой не более 1.5 кДа (неорганические ионы, сахара, аминокислоты, нуклеотиды, витамины и т.д.). Впервые их суще-

ствование было отмечено при изучении ультраструктуры нейронов нервной цепочки речного рака в 1953 году [1]. Чуть позже эти структуры были описаны как одиночные пятислойные пластинки, тесно связывающие мембраны клеток и, предположительно, участвующие в электрической проводимости кардиомиоцитов [2]. Первые свидетельства существования ЩК в ЦНС млекопитающих относятся к 1960–1970 годам [3–6].

Затем последовало интенсивное изучение их функциональной значимости с помощью электрофизиологической регистрации токов от пар соседних нейронов, инъекции флуоресцентных красителей и оценки их межклеточного распространения, а также ультраструктурные исследования их локализации в различных отделах ЦНС. Многочисленные данные последних 30 лет свидетельствуют о том, что все отделы центральной и периферической нервных систем от головного мозга, глазной сетчатки и обонятельной луковицы до спинного мозга, ганглиев и энтероглии содержат клетки, соединенные ЩК [7–9]. Субъединицы ЩК (белки коннексины) собраны, как правило, в гексамерные комплексы, или мембранные полуканалы (коннексоны). Пронизывая билипидные слои мембран двух контактирующих клеток, коннексоны формируют гексагональную пору диаметром 1.5 нм. Когда две контактирующие клетки соединяются посредством коннексонов в ЩК, разнообразие представленных в них субъединиц-коннексинов обеспечивает специфичность и множественность функций в нейронах [10], в астроцитах [11–13], в сателлитной и энтеральной глии [14, 15]. Коннексоны соединены так, что смежные мембраны разделены щелью шириной 2–4 нм (отсюда термин “щелевой контакт”). Электронная микроскопия позволяет визуализировать коннексоны ЩК на репликах в виде сотен плотно сгруппированных округлых скрученных розеток, формирующих своеобразные “бляшки” (plaques) [16, 17].

Клетки ЦНС, соединенные ЩК, могут быть как глиальными, так и нейрональными. Глиальные ЩК формируются в основном между клетками макроглии, способными накапливать полиамины, и обеспечивают метаболическое сопряжение клеток [18, 19]. ЩК нейронов обеспечивают электротоническую кооперацию клеток и функционируют как электрические синапсы [20, 21]. Пока не существует четкого морфологического подтверждения существования ЩК между нейронами и глиальными клетками. Параллельно с описанными выше исследованиями проводилось изучение структуры ЩК, их каналов, белков, составляющих эти каналы, цитоплазматических и внеклеточных доменов, а также их деградации для определения возможных механизмов регулирования их функционального состояния и межклеточного проведения. Целью настоящего обзора является описание существующих знаний об особенностях молекулярной структуры ЩК, составляющих их белков коннексинов, а также их функций в ЦНС в результате анализа данных мировой литературы.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ КОННЕКСИНОВ И ИХ ДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ

Согласно современной номенклатуре, размещенной в Глобальной поисковой системе полных геномов “Entrez Gene”, гены коннексинов разделяются на 5 групп: альфа, бета, гамма, дельта и эпсилон. В каждой группе нумерация новым генам присваивалась по мере их описания; например, *GJA1* является первым описанным коннексином альфа-группы у человека. Этот ген кодирует коннексин с молекулярной массой 43 кДа (Cx43). На сегодняшний день в семействе коннексинов насчитывается около 20 индивидуальных белков, отличающихся друг от друга по молекулярной массе и по спектру тканевой экспрессии [22, 23]. В ЦНС млекопитающих обнаруживаются коннексин 36 (Cx36), коннексин 45 (Cx45), коннексин 43 (Cx43), коннексин 30 (Cx30), коннексин 26 (Cx26), коннексин 32 (Cx32) и др. (табл. 1).

Традиционно коннексин имеет краткое обозначение для животных “Cx”, а для человека “CX”, при этом, гены коннексинов животных обозначаются “*Gj*”, гены коннексинов людей – “*GJ*”. Первоначальные представления о доменной структуре всех генов, кодирующих коннексины, были довольно простые. Они состояли из одного экзона с расположенным на нем 5'-нетранслируемым регионом и второго экзона с основной кодирующей частью и 3'-нетранслируемым концом [24]. Дальнейшее детальное изучение структуры этих генов показало, что их кодирующие участки могут прерываться некодирующими интронами, например, у гена *Gjd2*, кодирующего Cx36 [25], *Gjd4*, кодирующего Cx39 [26], *Gja10*, кодирующего Cx57 [27].

Последующие молекулярные исследования продемонстрировали существование у одного гена коннексина нескольких сплайс-изоформ транскриптов. К примеру, для гена коннексина 32 у крысы и человека было обнаружено два разных сплайс-варианта транскриптов [28, 29], а у коровы и мыши – три [30, 31]. При этом было показано, что большинство этих изоформ появлялись за счет 5'-регионов и альтернативного использования промоторных участков; кодирующая же часть гена в мРНК оставалась неизменной. Экспрессия таких изоформ транскриптов является специфичной для различных тканей и органов. Так, в гепатоцитах и секреторных ацинарных клетках поджелудочной железы транскрипция мРНК Cx32 начинается с промотора, лежащего выше первого экзона, а в Шванновских клетках ЦНС – с так называемого нервно-специфического промотора, лежащего между первым и вторым кодирующим экзоном [32]. Существование таких различных вариантов тканеспецифичных транскриптов у млекопитающих было пока-

Таблица 1. Основные коннексины ЦНС млекопитающих, кодирующие гены и их локализация

Тип коннексина	Ген	Млекопитающее	Хромосома	Клетки центральной нервной системы
Коннексин 36, Cx36	<i>Gjd2</i> , Группа Дельта 2	<i>Mus musculus</i> (мышь)	Хромосома 2	Нейроны центральной нервной системы
Коннексин 43, Cx43	<i>GJA1</i> , Группа Альфа 1	<i>Homo sapiens</i> (человек)	Хромосома 6	Астроциты, глиальные опухоли ЦНС
Коннексин 43, Cx43	<i>Gja1</i> , Группа Альфа 1	<i>Mus musculus</i> (мышь)	Хромосома 10	Астроциты
Коннексин 30, Cx30	<i>GJB6</i> , Группа Бета 6	<i>Homo sapiens</i> (человек)	Хромосома 13	»
Коннексин 30, Cx30	<i>Gjb6</i> , Группа Бета 6	<i>Mus musculus</i> (мышь)	Хромосома 14	»
Коннексин 26, Cx26	<i>GJB2</i> , Группа Бета 2	<i>Homo sapiens</i> (человек)	Хромосома 13	Олигодендроциты
Коннексин 62, Cx62	<i>GJA10</i> , Группа Альфа 10	»	Хромосома 6	Горизонтальные клетки сетчатки В-типа
Коннексин 32, Cx32	<i>GJB1</i> , Группа Бета 1	»	Хромосома 10	Миелинизированные Шванновские клетки
Коннексин 47, Cx47	<i>GJC2</i> , Группа Гамма 2	»	Хромосома 1	Олигодендроциты
Коннексин 31, Cx31	<i>GJB3</i> , Группа Бета 3	»	Хромосома 1	Дофаминэргические нейроны

зано для многих коннексинов (Cx40, Cx43, Cx45, Cx30 и др.), что связывают с особенностью семейства этих генов. В классическом представлении экспрессия коннексинов во многом регулируется на уровне транскрипции с вовлечением различных транскрипционных факторов и эпигенетических модификаций, таких как гистонные преобразования или метилирование ДНК [33]. Однако в литературе отмечены также факторы регуляции экспрессии на трансляционном уровне, например, элементы IRES (internal ribosome entry site – внутренний сайт для входа в рибосому) или uORFs (upstream open reading frames – открытые рамки считывания) в генах коннексина [32].

2. СИНТЕЗ КОННЕКСИНА И ЕГО МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА

Синтез коннексинов является постоянным динамическим процессом в связи с коротким периодом их полураспада и необходимостью постоянного замещения. Подобно другим мембранным белкам, коннексины синтезируются на мембране эндоплазматического ретикула (ЭР) с последующей олигомеризацией, транспортировкой через аппарат Гольджи и встраиванием в мембрану клетки [34]. Каждая молекула коннексина в виде нестабильного мономера состоит из четырех гидрофобных трансмембранных спиральных доменов (M1–4), двух экстраклеточных петель (extracellular loop 1 (EL1) и extracellular loop 2 (EL2)), одной цитоплазматической петли (cytoplasmic loop (CL)) и N-, C-свободных концевых доменов молекулы, которые также обозначаются NT и CT (T – tail) (рис. 1а).

Олигомеризация, или сборка коннексинов в гексамерные комплексы, происходит по-разному, в зависимости от вида коннексина. Исходя из структурной гомологии, коннексины могут быть разделены на две отдельные группы по процессу олигомеризации. Коннексины, кодируемые генами *Gjb1–Gjb7* (так называемые β-коннексины, включая Cx26 и Cx32), следуют более традиционному пути, где полная олигомеризация в гексамерные полуканалы необходима перед транспортировкой из ЭР в аппарат цис-Гольджи [35]. Другие коннексины (не-β-коннексины Cx43, Cx40, Cx46) стабилизируются с помощью специфического для коннексина мономера и транспортируются в сеть транс-Гольджи для олигомеризации на поздних стадиях секреторного пути [36]. После олигомеризации коннексины приобретают свою оригинальную структуру в виде комплекса белков из 6 молекул коннексина – коннексона и доставляются к плазматической мембране для встраивания и сборки в бляшки ЩК [37]. Кристаллографическое исследование полуканала показало, что коннексоны имеют положительно заряженный цитоплазматический вход, воронку, отрицательно заряженный трансмембранный участок и внеклеточную полость. В воронке отмечено сужение, образованное шестью N-концевыми спиралями, выстилающими стенку канала. Такая структура канала ограничивает размер проходящей через него молекулы [38].

Цитоплазматические и внеклеточные домены молекулы коннексина, встроенного в мембрану, выполняют различные функции. Например, внеклеточные петли молекулы участвуют в обеспечении соединений с коннексинами соседних кле-

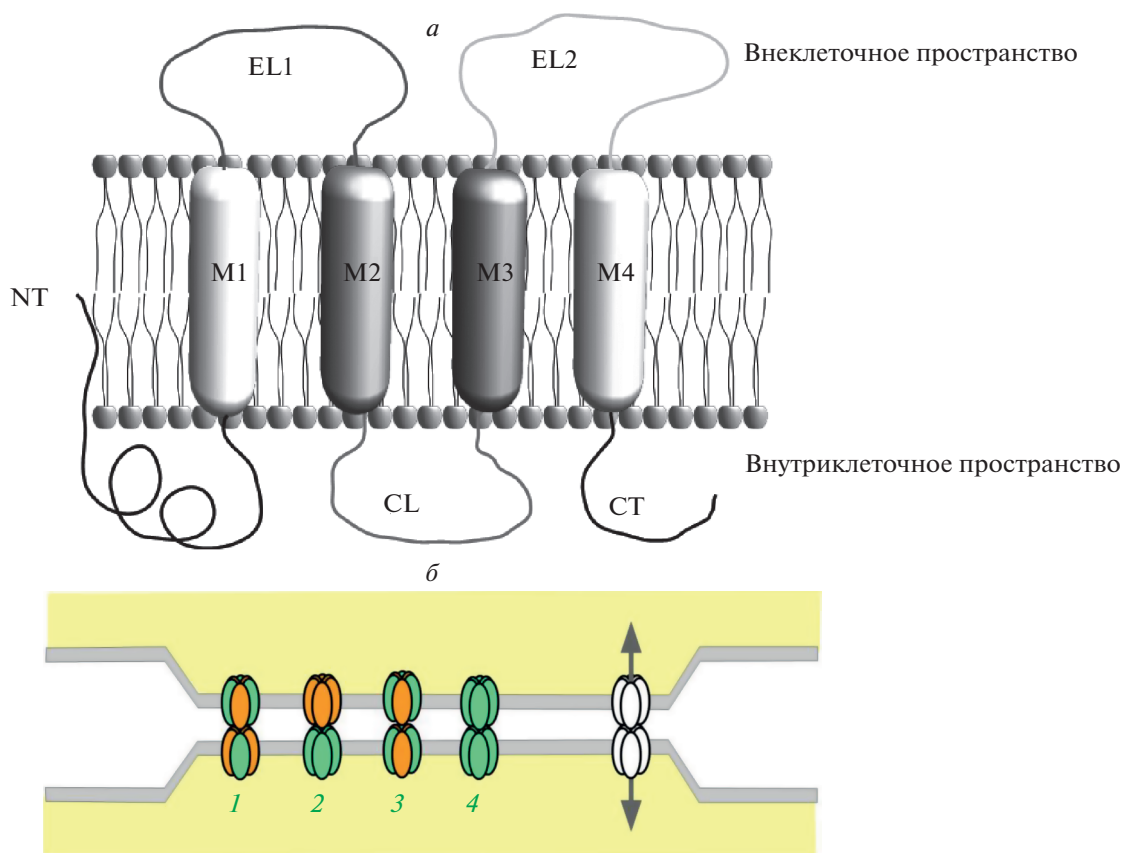


Рис. 1. Схематичное изображение молекулы коннексина и щелевого контакта. *а* – Доменная структура одной молекулы коннексина, встроенной в билипидный слой мембраны. Обозначения: M1–M4 – трансмембранные домены, EL1–EL2 – внеклеточные петли, CL – внутриклеточная петля, NT – N-конец молекулы, CT – С-конец. *б* – Агрегация индивидуальных каналов от 10 до несколько тысяч формирует кластер или бляшку щелевых контактов. Расстояние между бляшками порядка 2–3 нм. Каждый коннексоном составлен из шести молекул (субъединиц) коннексина. Типы коннексонов щелевых контактов: 1 – гетеромерный гетеротипический, 2 – гомомерный гетеротипический, 3 – гетеромерный гомотипический, 4 – гомомерный гомотипический.

ток, в то время как NT- и CT-концы молекулы ответственны за селективность канала для малых молекул [37]. Длина цитоплазматических петель, так же как и длина С-доменов, варьирует от коннексина к коннексину. Кроме того, на С-конце существуют так называемые сайты фосфорилирования [39]. Фосфорилирование этих С-концевых участков коннексинов посредством киназ является одним из способов посттрансляционного изменения этих белков. Посттрансляционная модификация коннексинов регулирует, в свою очередь, многие важные аспекты их жизненного цикла, включая синтез, транспортировку, строение каналов и межбелковые взаимодействия [40]. Современные данные позволяют предположить, что перспективным механизмом влияния на ЩК и полуканалы может быть именно воздействие на определенные киназы, что позволит управлять продолжительностью жизни коннексинов, их миграцией к плазматической мембране, собиранием бляшек полуканалов, формированием ЩК и проницаемостью поры [41].

Кроме того, взаимодействие С-конца с целым рядом киназ определяет его взаимодействие с другими белками и таким образом модулирует его сигнальную функцию.

3. ДЕГРАДАЦИЯ КОННЕКСИНОВ И ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ

Период полураспада коннексинов составляет около 1.5 ч, причем причины такого короткого периода жизни белка до сих пор не объяснены [42]. Полуканалы ЩК подвергаются как протеасомной, так и лизосомной деградации с предшествующей интернализацией посредством комбинированного эндо/экзоцитозного процесса [43]. Этот процесс происходит путем инвагинации бляшек ЩК в цитоплазму клетки, отделения от плазматической мембраны и образования двухмембранного кольцевого соединения, или “коннексомы”, подвергающегося последующей деградации [44]. При этом одна из контактирующих посредством ЩК клеток является донором кон-

нексосомы, которая поглощается другой клеткой. Ультраструктурные исследования процесса деградации коннексосом свидетельствуют о том, что этот процесс, вероятно, происходит посредством лизосом или аутолизосом, поскольку отмечено, что внутри этих органелл пятислойная структура ЩК “размывается” в некоторых местах [45]. Существует по меньшей мере два вида таких цитоплазматических везикул, участвующих в интернализации ЩК: большие и медленно разрушающиеся везикулы (диаметром порядка 0.5–5 мкм) и более мелкие, разрушающиеся в течение нескольких секунд (диаметром 0.18–0.27 мкм) [46]. Поглощенные таким образом коннексыны подвергаются рециркуляции и транспортируются либо обратно в плазматическую мембрану, либо в аппарат Гольджи [47].

4. ТИПЫ КОННЕКСОНОВ И ИХ СТЫКОВКИ

В процессе олигомеризации коннексоны могут быть составлены из коннексинов одного вида (гомомерные коннексоны) или из коннексинов разных видов (гетеромерные коннексоны). Соответственно, составленные гомомерными или гетеромерными коннексами ЩК могут быть гомотипическими либо гетеротипическими, что зависит от состава коннексонов. В литературе описаны различные сочетания коннексонов и типы ЩК: гомомерный гомотипический, гетеромерный гомотипический, гомомерный гетеротипический, гетеромерный гетеротипический (рис. 1б). Функциональные свойства (проницаемость и селективность для различных молекул и ионов) у гетеротипических каналов, образованных двумя различными коннексами, могут отличаться от соответствующих свойств гомотипических каналов [48]. Например, гетеротипические ЩК и их функциональное отличие от гомотипических ЩК обсуждается в статье Lin с соавт. [49], в которой было показано, что ЩК желудочков сердца содержат только Cx43, а ЩК предсердий сердца состоят из Cx40 и Cx43. Коэкспрессия этих коннексинов является основной причиной большинства динамических стробирующих свойств ЩК предсердий по сравнению с ЩК желудочков. Эти различия в свойствах ЩК предсердий и желудочков могут играть определенную роль в генезе медленной проводимости миокарда и аритмий [49].

Механизмы совместимости коннексинов в составе гетеротипических контактов на настоящий момент не вполне выяснены/изучены. Теоретически при совмещении двух коннексинов можно сформировать до 196 вариантов различных каналов. Однако было установлено, что стыковка двух полуканалов с образованием одного функционального канала ЩК возможна только между совместимыми коннексами; молекулярный

механизм этого процесса неясен. Предполагается, что в основе механизма стыковки полуканалов в единую пору ЩК лежат водородные связи, нарушение которых является причиной каналопатий [50]. Наиболее важным элементом молекулы коннексина для селективной стыковки и формирования функциональных каналов считают внеклеточный домен E2, а не E1 [51]. Вместе с тем стыковка полуканалов конкретной пары коннексонов зависит от предполагаемого числа водородных связей на каждом стыковочном интерфейсе E2–E2. Изучение кристаллической структуры канала ЩК показало образование в общей сложности около 36 водородных связей на шести состыкованных внеклеточных доменах E2–E2 [38, 52]. При этом аминокислотные остатки, формирующиеся после стыковки доменов E1–E1 и E2–E2, могут содержать различные мутации, связанные с наследственными заболеваниями человека, такими как нейропатия Шарко–Мари–Тута [53], дисплазии, сердечные аритмии, врожденные катаракты, глухота и др. [54–57].

ХАРАКТЕРИСТИКА И ФУНКЦИИ КОННЕКСИНОВ В ЦНС

Характеристика экспрессии различных коннексинов в нервной ткани необходима для понимания функциональной значимости создаваемых ими полуканалов и ЩК. В ЦНС функции и свойства ЩК определены тем, соединяют ли они нервные или глиальные клетки.

Коннексыны нейронов

Коннексин 36 (Cx36). Экспрессия гена Cx36 (как и экспрессия других коннексинов), как правило, определяется исследователями с помощью метода гибридизации *in situ* с РНК-зондами, репортерного гена *lacZ* и анализа синтезируемого белка методами вестерн-блот, иммуногистохимии и электронной иммуногистохимии. Функции коннексина 36 исследуют в основном электрофизиологическими методами на нокаутных и трансгенных животных. ЩК, состоящие из Cx36, образуются только гомомерными коннексами [58], при этом формируемая ими пора функционирует с очень низкой проводимостью порядка 10–15 пСм [59]. В качестве основной функции ЩК, содержащих коннексин 36, исследователи определяют электрическое сопряжение и синхронизацию межклеточной импульсной активности нейронов.

В раннем постнатальном развитии различные типы уже дифференцированных нейронов соединяются посредством ЩК. Эта связь не только позволяет создать сеть клеток с координированным метаболизмом, но и обеспечивает передачу нервных импульсов в условиях, когда химические

синапсы еще не функционируют. Обнаруженные временные электрические связи между нейронами обеспечиваются по большей части электрическими синапсами, образованными Сх36 [60]. Количество ЩК между нейронами резко сокращается к 18-му дню постнатального развития, в то время как развитие химических синапсов приближается к взрослым показателям [61]. Во взрослом мозге млекопитающих Сх36 является нейрональным коннексином, специфичным для ЩК между тормозными ГАМКергическими нейронами [62], реже между возбуждающими нейронами [9, 61]. При этом наибольшее количество таких ЩК соединяют дендриты ГАМКергических нейронов, экспрессирующих кальций-связывающие белки и нейропептиды, например парвальбумин. Морфологические свидетельства существования таких связей были продемонстрированы в исследованиях в гиппокампе и четвертом слое неокортекса (баррельной коре) [63, 64]. Авторы этих работ разработали классификацию парвальбумин-содержащих быстроспайковых нейронов по дистальному и проксимальному расположению ЩК на дендритах этих клеток. Кроме того, такие типы парвальбумин-содержащих нейронов содержали в цитоплазме сомы и проксимальных дендритах таламический везикулярный глутаматный транспортер 2, что указывает на их участие в прямых таламокортикальных связях. Существование подобных сетей может свидетельствовать в пользу того факта, что ЩК, содержащие Сх36, участвуют в контроле возбуждающих связей, обеспечивают регулирование таламокортикального взаимодействия, обеспечивают синхронизацию как локальной импульсной активности, так и ритмической активности крупных и малых нейронных ансамблей в гиппокампе и неокортексе при альфа-, тета-, гамма- и высокочастотных колебаниях [65, 66]. Предполагается, что некоторые из этих ритмических колебаний участвуют в процессах восприятия, концентрации внимания и памяти как на клеточном, так и на системном уровне. Однако такие нейронные сети, объединенные ЩК, остаются мало исследованными не только для большинства областей мозга, но даже не описаны для всех слоев кортикальной колонки неокортекса, что, безусловно, должно являться целью будущих нейрофизиологических и нейроморфологических исследований.

Коннексин 45 (Сх45). Исследования экспрессии Сх45 и содержащих этот белок ЩК немногочисленны. Так же как и Сх36, Сх45 относится к группе белков ЩК нейронов ЦНС, поскольку не экспрессируется ни в олигодендроцитах, ни в астроцитах [67]. Высокий уровень экспрессии гена Сх45 отмечается уже во время эмбриогенеза и в течение первых двух недель постнатального развития во всех областях мозга. После этого его экспрессия ограничивается таламическими структу-

рами, областью СА3 гиппокампа и мозжечком [67]. Значительное совпадение уровня экспрессии обоих коннексинов развивающихся нейронов (Сх36 и Сх45) в раннем постнатальном развитии позволяет предположить, что в этот период они играют схожую роль и могут способствовать функциональной специализации определенных подтипов развивающихся нейронов.

Во взрослом мозге Сх45 был обнаружен в пирамидных клетках, которые, как известно, формируют электрические связи, но не экспрессируют Сх36. Такие клетки были идентифицированы в неокортексе, гиппокампе (регионы СА1–СА4) и таламусе [67, 68]. Кроме того, Сх45 экспрессируется в нейронах обонятельной луковицы [69] и в субпопуляциях нейронов оливодеребеллярной системы [70]. По аналогии с Сх36, белок Сх45 образует ЩК с довольно низкой проводимостью, которые чувствительны к изменениям мембранного потенциала и закрываются при гиперполяризации мембраны [71]. При этом существования гетеротипических ЩК Сх36/Сх45 до настоящего момента продемонстрировано не было. Предполагается, что одной из основных функций ЩК, содержащих Сх45, является синхронизация осцилляторной активности нейронов в диапазонах гамма-частот [72].

Коннексины глиальных клеток

Межглиальные ЩК наиболее характерны не для клеток-представителей иммунной системы, возникающих из мезенхимы – микроглии (макрофагов в ЦНС и ПНС), а для клеток макроглии (астроцитов, олигодендроцитов, питуцитов, таницитов, Мюллеровских и Бергманновских клеток). Первичная макроглия возникает из эктодермы и общего с нервными клетками стволового предшественника – радиальной глии, которая в процессе онтогенеза дает как разновидности астроцитов и другой глии, так и нейроны. Во взрослом организме радиальная глия ЦНС представлена Мюллеровскими клетками в сетчатке глаза и глией Бергмана в мозжечке, при этом в других структурах ЦНС она практически редуцирована. Тем не менее, все клетки, имеющие происхождение из радиальной глии, объединяет уникальная способность накапливать полиамины и осуществлять межклеточный обмен небольшими молекулами посредством ЩК, содержащих различные виды коннексинов [18]. Коннексины глиальных клеток повсеместно экспрессируются в ЦНС и ПНС, обеспечивая метаболическую, синцитиальную и сигнальную кооперацию, и играют определенную роль в процессах миграции как самих астроцитов, так и нейронов. Мутации в генах глиальных коннексинов и их дефицит связаны с множеством заболеваний [73], одним из которых является аутизм [74].

Коннексин 43 (Cx43). В развивающемся мозге эмбриональные клетки-предшественники нейронов связаны между собой ЩК, содержащими Cx43 [75]. Кроме того, Cx43 экспрессируется радиальными клетками глии, по которым мигрируют молодые нейроны из вентрикулярной зоны в слой неокортекса [76]. Считается, что Cx43 не образует ЩК, а способствует обеспечению адгезии нейронов в процессе миграции [77]. Более того, ключевую и критическую роль в этом процессе играет цитоплазматический С-концевой домен Cx43 [75]. Коннексоны, содержащие Cx43, образуют каналы с умеренной проводимостью, при этом ЩК, состоящие из Cx43, являются низкочувствительными к изменениям мембранного потенциала и закрываются в ответ на деполяризацию мембраны [71]. Во взрослом мозге Cx43 является основным белком, составляющим ЩК астроцитов [78], распространенных повсеместно, включая кору, подкорковые структуры, гиппокамп и другие структуры.

Следует отметить, что при схожих морфологических характеристиках нейрональные ЩК, содержащие Cx36, и макроглиальные ЩК, содержащие Cx43, имеют различное функциональное назначение. ЩК между нейронами являются редкостью и служат для лавинообразной синхронизации электрических сигналов в небольших клеточных ансамблях, в то время как ЩК эктодермальной глии масштабны и необходимы для организации синцития. Астроцитарный синцитий — это трехмерный глиальный каркас в структурах мозга, выполняющий ряд важных функций, таких как контроль концентраций внеклеточных ионов и нейротрансмиттеров, а также осуществление метаболических процессов [79]. Для поддержания этих функций в синцитии необходимым условием является открытие ЩК, что связано с наличием полиаминов [80]. При этом во взрослом мозге накопление полиаминов (спермина, спермидина, путресцина, агматина) является отличительной особенностью именно астроцитов, но не нейронов [81–84]. Уникальная способность Cx43 поддерживать в открытом состоянии ЩК в синцитии была показана при сравнении Cx43 и Cx40 и демонстрации явления блокады полиаминами аминокислотной последовательности (сайта связывания) в N-конце Cx40 [85]. Такие специфические сайты связывания для полиамина спермина не были обнаружены в Cx43 [86]. Более того, в дальнейших исследованиях было отмечено, что Cx43 чувствителен к полиаминам, которые открывают каналы ЩК, а также, что наиболее важно для физиологии клеток, полиамины устраняют блокаду этих каналов катионами водорода [87] и кальция [88]. Устранение катионного блока полиаминами является критически важным фактором для функционирования ЩК в глии, поскольку именно подкисление

цитоплазмы и последующее высвобождение кальция (так называемые кальциевые волны в астроцитах) является отличительным свойством астроцитарного синцития, но не нейронных ансамблей.

Накопление полиаминов в глиальных клетках необходимо не только для поддержания ЩК открытыми [89], но и для регуляции калиевых токов в калиевых каналах глии [90]. Известная способность астроцитов шунтировать друг друга и объединять единичные клетки в общий синцитий посредством ЩК позволяет осуществлять недавно открытое свойство “астроцитарной изопотенциальности” [91]. Суть этого свойства астроцитов состоит в том, что мембранный потенциал каждой клетки зафиксирован (стабилизирован) вследствие контакта с соседними клетками, что позволяет удерживать коллективный мембранный потенциал глиального синцития на уровне -90 мВ, что на $20-30$ мВ ниже нейронального и создает условия для входа ионов калия в клетки против концентрационного градиента. Необходимость такого захвата ионов калия из внеклеточной среды продиктована накоплением избыточного калия в межклеточном пространстве при генерации спайков нейронами. Транспортировка калия в цитоплазму глии из пространства вокруг нейронов осуществляется с помощью калиевых каналов Kir4.1 (KCNJ10) астроцитов. Следует отметить, что калиевые каналы Kir4.1 (KCNJ10) являются преобладающими каналами клеток глии и локализованы исключительно в их мембранах [92]; более того, многие заболевания ЦНС и ПНС связывают с нарушением работы именно этих каналов [73, 93]. В то же время деполяризация такого синцития при повышении концентрации ионов калия при эпилепсии, нейротравме или ишемии [94] ведет к потере астроцитами способности устранять избыток калия из межклеточного пространства, что приводит к инактивации нейрональной активности и коме.

Помимо вышеописанного механизма, динамическая регуляция сетей астроцитов, объединенных ЩК из Cx43, осуществляется путем фосфорилирования Cx43 протеинкиназами, в том числе протеинкиназой С (PKC) и тирозинкиназой [95]. Фосфорилирование Cx43 снижает проницаемость межклеточных каналов и подавляет межклеточное сообщение посредством ЩК. При дефиците белка Cx43 в астроцитах снижается количество ЩК и распространение кальциевых волн нарушается [96], что напрямую отражается на активности нейронов.

Cx43, помимо астроцитов, также был обнаружен в большинстве изученных астроцитом человека и в астроглиальном компоненте нейроглиальных опухолей. В то время как в глиомах низких степеней злокачественности (в более чем 60%

от всех случаев) после проведения иммуногистохимии проявлялось сильное мембранное окрашивание, в большинстве астроцитов высоких степеней злокачественности отмечено снижение типичной мембранной и цитоплазматической локализации этого белка. Иммуноблоттинг продемонстрировал наличие нескольких изоформ Cx43 как в контрольных образцах коры, так и в глиомах низких степеней злокачественности. При этом в большинстве злокачественных глиом присутствует только одна единственная изоформа Cx43, соответствующая нефосфорилированной форме. Повышенное по сравнению с контрольной группой содержание белка Cx43 было выявлено в реактивных астроцитах перифокальной зоны эпипептического очага, а также в перифокальных зонах глиом низких степеней злокачественности. Возможно, это указывает на существование некоего регуляторного пути с участием Cx43 и астроглиального синцития в регионах, подверженных опухолевому росту. В связи с этим существует предположение о том, что высокая экспрессия генов коннексинов в глиомах низких степеней злокачественности, как и в перитуморальных зонах, может способствовать возникновению опухолевых зависимых эпилептиформных ритмов [39].

Коннексин 30 (Cx30). Помимо Cx43, к коннекسينам астроцитов относятся Cx30 и Cx26 [97]. Уже в первых работах было установлено, что Cx30 появляется в мозге в индивидуальном развитии значительно позже, чем Cx43 [98]. Первое проявление экспрессии гена Cx30 отмечается в астроцитах серого вещества с различными региональными закономерностями в развивающемся мозге ближе к взрослому возрасту. Отличительной чертой Cx30 оказалось почти его полное отсутствие в белом веществе. В подкорковых структурах мозга содержание этого белка выше, чем в неокортексе [99]. Наблюдаемые различия в экспрессии Cx30 вполне могут быть связаны с функционированием нейронных сетей, в работу которых вовлечены те или иные локальные популяции астроцитов, экспрессирующих данный белок. Как показали проведенные нами ранее исследования в коре мозга и обонятельной луковице, Cx30 в основном концентрируется в тонких веточках астроцитов вокруг микрокапилляров и сосудов. В некоторых ЦК, типичных по ультраструктуре, продукты иммуногистохимической реакции с антителами к Cx30 локализованы только в одном из контактирующих отростков. Вероятно, такие ассиметричные контакты вокруг сосудов образованы двумя различными коннексинами астроцитов [100].

В экспериментах с нейротоксическим воздействием было выявлено сильное и специфичное изменение уровней экспрессии мРНК Cx30 в реактивных астроцитах, находящихся в окружении нейронов, подвергшихся клеточной гибели. Это указывало на прямое или косвенное вовлечение

этого типа коннексина в апоптотический процесс нейронов [19, 97]. Также было показано, что мутации в Cx30 могут вызывать сенсорную потерю слуха и различные кожные заболевания [39]. Мыши с дефицитом Cx30 проявляли патологию внутреннего уха, связанную с увеличением апоптоза клеток кохлеарного сенсорного эпителия, что приводило к отсутствию эндокохлеарного потенциала и прогрессированию потери слуха [101].

Коннексин 26 (Cx26). Cx26 является третьим (наравне с Cx30 и Cx43) представителем коннексинов глиальных клеток. В раннем нейrogenезе ген Cx26 экспрессируется в ЦНС в клетках лептоменингеальной оболочки, а также в астроцитах и нейронах развивающегося головного и спинного мозга [19]. Хотя было высказано предположение о существовании ЦК, содержащих Cx26, связывающих нейроны и астроциты, морфологических подтверждений этому найдено не было [102, 103]. В настоящее время существует стойкое мнение о том, что Cx26 входит в состав гетеротипических ЦК между астроцитами и олигодендроцитами, поскольку часто отмечается его колокализация с Cx43, Cx30 и Cx32 [19]. Существование таких контактов поднимает вопросы о гетерогенности глиальных клеток по экспрессии коннексинов, о более сложном уровне стыковки коннексонов из гетеротипических комбинаций коннексина, нацеленной на взаимодействие нейронов и панглиальных сетей.

Врожденные мутации в гене *GJB2* коннексина 26 являются основой калечащих синдромов неросенсорной тугоухости, потери слуха и гиперкератоза с аутосомно-рецессивным (DFNB1) и аутосомно-доминантным типами наследования (DFNA3) [104, 105]. Эти мутации описаны как миссенс-мутации, которые приводят к неконсервативной аминокислотной замене, нарушению функции внеклеточной петли EL1 молекулы Cx26 и неспособности белка образовывать коннексоны и ЦК. Более того, в литературе все чаще встречаются случаи сочетания описанного синдрома с пороком развития Дэнди Уокера [106], в связи с чем роль гена *GJB2* предполагается и в других, подобных этому пороку, врожденных заболеваниях известной и неизвестной этиологии.

Коннексин 32 (Cx32). Ген белка Cx32 экспрессируется в Шванновских клетках (леммоцитах), располагающихся вдоль аксонов периферических нервных волокон. Cx32 связывает тело клетки Шванна с миелиновой оболочкой и играет критическую роль в процессе миелинизации. Кроме того, Cx32 обнаруживается в олигодендроцитах и участвует в функциональных процессах, связанных с этими клетками [107, 108]. ЦК олигодендроцитов, содержащие Cx32, в основном составлены из гетеротипических коннексонов и обнаружены между олигодендроцитами, между

олигодендроцитом и астроцитом, а также между последовательными слоями миелина [19]. Одним из наиболее известных заболеваний, связанных с мутацией в гене *Sx32*, является болезнь Шарко–Мари–Тута, или наследственная моторно-сенсорная нейропатия [53], проявляющаяся гиперплазией Шванновских клеток и миелинопатией: сегментарной димиелинизацией или ремиелинизацией. Одним из перспективных направлений терапии данного наследственного заболевания может являться доставка вектора с “правильным” геном *GJB1* для последующего встраивания в геном клеток человека.

Иннексины и паннексины. Коннексины являются не единственными каналобразующими белками ЩК. Существует, например, семейство белков, называемых иннексины (коннексины беспозвоночных). Гены иннексинов кодируют белки в ЩК *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, а также видов *Mollusca*, *Annelida* и *Platyhelminthes* [109]. При этом белки иннексины образуют функциональные ЩК [110]. Белки паннексины (*Panx1*, *Panx2* и *Panx3*) были открыты Панчиным в эмбрионе актинии *Nematostella vectensis* [111]. Эти белки были признаны гомологичными белкам ЩК беспозвоночных [112, 113]. Молекулы иннексинов имеют мало сходства с коннексинами, за исключением двух консервативных остатков цистеина в их внеклеточных петлях. Однако некоторые субъединицы коннексина и паннексина удивительно похожи [114]. Функция паннексинов в ЦНС млекопитающих на настоящий момент остается неясной. Известно, что существует четкая экспрессия мРНК *Panx1* и *Panx2* в определенных нейронах, включая пирамидные клетки и интернейроны гиппокампа [113]. Однако сложно ответить на вопрос, существуют ли электрические синапсы нейронов позвоночных, составленные из паннексинов. На настоящий момент известно, что паннексины играют важную биологическую роль в качестве составляющих полуканалов, способствующих высвобождению АТФ и модулирующих межклеточную передачу кальциевых волн [115].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интерес к изучению структуры, функций, жизненного цикла ЩК и составляющих их белков в клетках живых организмов в норме и при развитии патологий отмечен в течение последних 50 лет, и количество этих исследований продолжает возрастать и в настоящее время. Актуальность исследований этих структур в ЦНС обуславливается представлением о том, что объединенные ЩК клетки могут быть морфологической основой регуляторных механизмов в мозге, чрезвычайно важной для правильной работы неокор-

текса, гиппокампа, таламических ядер и других структур мозга.

Известно, что среди существующих индивидуальных коннексинов, специфичными и наиболее важными для ЦНС являются коннексины *Sx36*, *Sx45*, *Sx43*, *Sx30*, *Sx26* и *Sx32*. Доменная структура генов коннексинов состоит из двух экзонов, кодирующие участки которых могут прерываться некодирующими интронами. Для многих коннексинов, в том числе для коннексинов ЦНС, характерно наличие сплайс-изоформ транскриптов, экспрессия которых является специфичной для различных тканей и органов. Экспрессия коннексинов может регулироваться как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях и является постоянным активным динамическим процессом клетки из-за короткого периода жизни как самого белка, так и ЩК. Причины короткого периода полураспада коннексинов и ЩК в клетке до сих пор неизвестны. Вновь синтезированная молекула каждого коннексина имеет характерную структуру с внутриклеточными, внеклеточными и мембранными доменами, каждый из которых выполняет свои специфические функции. В процессе миграции к плазматической мембране коннексины претерпевают олигомеризацию, или сборку молекул в гексагональную структуру, — коннексон. При состыковке коннексонов могут образовываться различные типы щелевых контактов, в том числе в ЦНС: гетеромерные гетеротипические, гомомерные гетеротипические, гетеромерные гомотипические, гомомерные гомотипические. Однако механизм стыковки и принцип совместимости этих полуканалов до конца не изучен. Гомотипические и гетеротипические ЩК могут обладать разными стролирующими свойствами. Деградация коннексинов в составе ЩК происходит с помощью эндо/экзоцитозного процесса и образования коннексосом с последующим разрушением этих структур в лизосомах или аутолизосомах.

Исследования ЩК ЦНС условно можно разделить на два типа: изучение нейро-нейрональных ЩК, составленных из *Sx36* и/или *Sx45*, а также изучение глия-глиальных ЩК, содержащих основные коннексины макроглии (*Sx43*, *Sx30*, *Sx32*, *Sx26* и др.). Помимо коннексинов, для ЦНС известно существование и альтернативных каналобразующих белков ЩК — паннексинов, функция которых на настоящий момент является недостаточно ясной. При схожих морфологических характеристиках нейрональные ЩК, содержащие *Sx36*, и макроглиальные ЩК, содержащие *Sx43*, имеют различное функциональное назначение. Существование ЩК между нервными клетками связывают с обеспечением процессов синхронизации как локальной импульсной активности, так и ритмической активности целых групп нейронов определенного типа развиваю-

щегося и взрослого мозга, объединенных этими контактами. Ансамбли тормозных нейронов, объединенных электрическими синапсами, были обнаружены в неокортексе и гиппокампе, однако остаются неизученными во многих других областях мозга. Подобные сети нейронов могут играть важную роль в формировании и консолидации памяти, обработке пространственно-временной, сенсорной, внутриорганной информации, механизмах восприятия, концентрации внимания и других когнитивных процессах. Глиа-глиальные ЩК и коннексины еще при развитии мозга способствуют адгезии во время миграции нейронов по тяжам радиальной глии. Во взрослом мозге такие контакты способствуют образованию глиальных синцитиев, выполняющих ряд важных функций, например контроль концентрации внеклеточных ионов и нейротрансмиттеров, а также осуществлению метаболических процессов и поддержанию внутриклеточного и внеклеточного гомеостаза. Кроме того, обеспечивая распространение калиевых и кальциевых волн в глиальном синцитии, ЩК и полуканалы напрямую способны контролировать активность как отдельных нейронов, так и нейронных сетей. Для осуществления этих функций в синцитии необходимым условием является открытие ЩК, что связано с наличием полиаминов (спермина, спермидина, путресцина, агматина). Во взрослом мозге накопление полиаминов является уникальной отличительной особенностью именно астроцитов, но не нейронов.

ЩК и коннексины являются объектом исследований при изучении патогенеза различных заболеваний, в том числе распространенных заболеваний ЦНС. Существуют врожденные мутации генов коннексинов, приводящие к наследственным заболеваниям, таким как потеря слуха, кожные заболевания, нейропатии, ассоциированные с демиелинизацией, ремиелинизацией и дисплазией клеток, аутизм и др. Дальнейший анализ особенностей молекулярной структуры, физиологических и поведенческих функций ЩК и коннексинов может способствовать развитию таргетной терапии коннексин-ассоциированных заболеваний, в том числе с помощью генной инженерии. Терапевтическое средство должно быть направлено на исправление поврежденных генов коннексинов, а также на стимуляцию восстановления новых белков и ЩК, и обеспечивать персонализированное лечение наследственных заболеваний человека.

Следует отметить большое значение исследований экспрессии коннексинов и формирования ЩК в контексте нейроканцерогенеза. Это исследовательское направление находится в самом начале своего развития. Однако уже первые работы в этой области позволяют говорить о формировании нового взгляда на индивидуальную предрас-

положенность к опухолям головного мозга, а также о перспективе новых возможностей в диагностике и лечении неоплазм ЦНС. Различные сплайс-изоформы коннексинов, потенциальные регуляторные участки их генов и транскриптов, домены молекулы коннексина, управление функциональным состоянием ЩК могут послужить инструментами для поиска и создания новых терапевтических стратегий, основанных на регуляции экспрессии коннексинов и активности щелевых контактов и полуканалов в опухолях головного мозга человека.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ № БАЗ 0110/20-5-14АБ, а также грантом Национальных Институтов Здоровья США-NIH-NINDS № 1R15-NS-116478-01.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robertson J.D. 1953. Ultrastructure of two invertebrate synapses. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **82** (2), 219–223.
2. Sjostrand F.S., Andersson-Cedergren E., Dewey M.M. 1958. The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *J. Ultrastruct. Res.* **1** (3), 271–287.
3. Hinrichsen C.F., Larramendi L.M. 1968. Synapses and cluster formation of the mouse mesencephalic fifth nucleus. *Brain Res.* **7** (2), 296–299.
4. Korn H., Sotelo C., Crepel F. 1973. Electrotonic coupling between neurons in the rat lateral vestibular nucleus. *Exp. Brain Res.* **16**, 255–275.
5. Baker R., Llinás R. 1971. Electrotonic coupling between neurons in the rat mesencephalic nucleus. *J. Physiol.* **212**, 45–63.
6. Sloper J.J., Powell T.P.S. 1978. Gap junctions between dendrites and somata of neurons in the primate sensorimotor cortex. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **203**, 39–47.
7. Nagy J.I., Dudek F.E., Rash J.E. 2004. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res. Rev.* **47**, 191–215.
8. Rash J.E., Yasumura T., Davidson K.G., Furman C.S., Dudek F.E., Nagy J.I. 2001. Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell Commun. Adhes.* **8** (4–6), 315–320.
9. Connors B.W., Long M.A. 2004. Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 393–418.
10. Nagy J. I., Pereda A. E., Rash J. E. 2018. Electrical synapses in mammalian CNS: Past eras, present focus and future directions. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860** (1), 102–123.
11. Eugenin E.A., Basilio D., Sáez J.C., Orellana J.A., Raine C.S., Bukauskas F., Bennett M.V., Berman J.W.

2012. The role of gap junction channels during physiological and pathologic conditions of the human central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **7** (3), 499–518.
12. Giaume C.B., Naus C.C., Saez J.C., Leybaert L. 2020. Glial connexins and pannexins in the healthy and diseased brain. *Physiol. Rev.* <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2018>
13. Gutiérrez Y., García-Marques J., Liu X., Fortes-Marco L., Sánchez-González R., Giaume C., López-Mascaraque L. 2019. Sibling astrocytes share preferential coupling via gap junctions. *Glia.* **67** (10), 1852–1858.
14. Hanani M., Spray D. C. 2020. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* **21** (9), 485–498.
15. Grubišić V., Parpura V. 2017. Two modes of enteric gliotransmission differentially affect gut physiology. *Glia.* **65** (5), 699–711.
16. Caspar D.L.D., Goodenough D.A., Makowski L., Phillips W.C. 1977. Gap junction structures. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J. Cell Biol.* **74**, 605–628.
17. Staehelin L.A., Hull B.E. 1978. Junctions between living cells. *Sci. Am.* **238** (5), 141–152.
18. Skatchkov S.N., Woodbury-Fariña M.A., Eaton M. 2014. The role of glia in stress. *Psychiatr. Clin. North Am.* **37**, 653–678.
19. Nagy J., Rash J.E. 2000. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res. Rev.* **32**, 29–44.
20. Gibson J.R., Beierlein M., Connors B.W. 2005. Functional properties of electrical synapses between inhibitory interneurons of neocortical layer 4. *J. Neurophysiol.* **93**, 467–480.
21. Zhang X.L., Zhang L., Carlen P.L. 2004. Electrotonic coupling between stratum oriens interneurons in the intact *in vitro* mouse juvenile hippocampus. *J. Physiol.* **558**, 825–839.
22. Willecke K., Elberger J., Degen J., Eckardt D., Romualdi A., Güldenagel M., Deutsch U., Söhl G. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* **383**, 725–737.
23. Sohl G., Willecke K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* **62**, 228–232.
24. Oyamada M., Oyamada Y., Takamatsu T. 2005. Regulation of connexin expression (Review). *Biochim. Biophys. Acta.* **1719** (1–2), 6–23.
25. Cicirata F., Parenti R., Spinella F., Giglio S., Tuorto F., Zuffardi O., Gulisano M., 2000. Genomic organization and chromosomal localization of the mouse Connexin36 (mCx36) gene. *Gene.* **251** (2), 123–130.
26. Maltzahn J., Euwens C., Willecke K., Sohl G. 2004. The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers. *J. Cell Sci.* **117**, 5381–5392.
27. Hombach S., Janssen-Bienhold U., Sohl G., Schubert T., Bussow H., Ott T., Weiler R., Willecke K. 2004. Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2633–2640.
28. Sohl G., Gillen C., Bosse F., Gleichmann M., Müller H.W., Willecke K. 1996. A second alternative transcript of the gap junction gene connexin32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve. *Eur. J. Cell Biol.* **69**, 267–275.
29. Neuhaus I.M., Bone L., Wang S., Ionasescu V., Werner R. 1996. The human connexin32 gene is transcribed from two tissue-specific promoters. *Biosci. Rep.* **16**, 239–248.
30. Duga S., Asselta R., Del Giacco L., Malcovati M., Ronchi S., Tenchini M.L., Simonic T. 1999. A new exon in the 5' untranslated region of the connexin32 gene. *Eur. J. Biochem.* **259**, 188–196.
31. Sohl G., Theis M., Hallas G., Brambach S., Dahl E., Kidder G., Willecke K. 2001. A new alternatively spliced transcript of the mouse connexin32 gene is expressed in embryonic stem cells, oocytes, and liver. *Exp. Cell Res.* **266**, 177–186.
32. Oyamada M., Takebe K., Oyamada Y. 2013. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1828** (1), 118–133.
33. Bedner P., Steinhauser C., Theis M. 2012. Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? *Biochim. Biophys. Acta.* **1818** (8), 1971–1984.
34. Bennett M.V., Zukin R.S. 2004. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron.* **41** (4), 495–511.
35. Das S., Smith T.D., Sarma J.D., Ritzenthaler J.D., Maza J., Kaplan B.E., Cunningham L.A., Suaud L., Hubbard M.J., Rubenstein R.C., Koval M. 2009. ERp29 restricts Connexin43 oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* **20** (10), 2593–2604.
36. Maza J., Das Sarma J., Koval M. 2005. Defining a minimal motif required to prevent connexin oligomerization in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **280** (22), 21115–21121.
37. Thévenin A.F., Kowal T.J., Fong J. T., Kells R.M., Fisher C.G., Falk M.M. 2013. Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiology (Bethesda).* **28** (2), 93–116.
38. Maeda S., Nakagawa S., Suga M., Yamashita E., Oshima A., Fujiyoshi Y., Tsukihara T. 2009. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature.* **458**, 597–602.
39. Hamdan R., Maissa Y., Rabihi S. Talhouk, Marwan E. El-Sabban. 2013. Pathophysiology of gap junctions. in the brain. In: *Gap Junctions in the Brain, Physiological and Pathological Roles.* Ekrem Dere. USA: Acad. Press, p. 60–95.
40. Aasen T., Johnstone S., Vidal-Brime L., Lynn K.S., Koval M. 2018. Connexins: Synthesis, post-translational modifications, and trafficking in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (5), 1296.

41. Solan J.L., Lampe P.D. 2018. Spatio-temporal regulation of connexin43 phosphorylation and gap junction dynamics. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860** (1), 83–90.
42. Gaietta G., Deerinck T.J., Adams S.R., Bouwer J., Tour O., Laird D.W., Sosinsky G.E., Tsien R.Y., Ellisman M.H. 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science*. **296**, 503–507.
43. Kopanic J.L., Schlingmann B., Koval M., Lau A.F., Sorgen P.L., Vivian F. Su. 2015. Degradation of gap junction connexins is regulated by the interaction with Cx43-interacting protein of 75 kDa (CIP75). *Biochem. J.* **466** (3), 571–585.
44. Laird D. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1711**, 172–182.
45. Lichtenstein A., Minogue P.J., Beyer E.C., Berthoud V.M. 2011. Autophagy: a pathway that contributes to connexin degradation. *J. Cell Sci.* **124**, 910–920.
46. Falk M.M., Kells R.M., Berthoud V.M. 2014. Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Lett.* **588** (8), 1221–1229.
47. Scita G., Di Fiore P.P. 2010. The endocytic matrix. *Nature*. **463**, 464–473.
48. Ayad W.A., Locke D., Koreen I.V., Harris A.L. 2006. Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates. *J. Biol. Chem.* **281** (24), 16727–16739.
49. Lin X., Gemel J., Glass A., Zemlin C.W., Beyer E.C., Veenstra R.D. 2010. Connexin40 and connexin43 determine gating properties of atrial gap junction channels. *J. Mol. Cell Cardiol.* **48**, 238–245.
50. Gong X.-Q., Nakagawa S., Tsukihara T., Bai D. 2013. A mechanism of gap junction docking revealed by functional rescue of a human-disease-linked connexin mutant. *J. Cell Sci.* **126** (Pt 14), 3113–3120.
51. White T.W., Bruzzone R., Wolfram S., Paul D.L. 1994. Goodenough D.A. Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: The second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J. Cell Biol.* **125**, 879–892.
52. Suga M., Maeda S., Nakagawa S., Yamashita E., Tsukihara T. 2009. A description of the structural determination procedures of a gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **65**, 758–766.
53. Kleopa K.A., Abrams C.K., Scherer S.S. 2012. How do mutations in GJB1 cause X-linked Charcot-Marie-Tooth disease? *Brain Res.* **1487**, 198–205.
54. Paznekas W.A., Karczeski B., Vermeer S., Lowry R.B., Delatycki M., Laurence F., Koivisto P.A., Van Maldergem L., Boyadjev S.A., Bodurtha J.N., Jabs E.W. 2009. GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. *Hum. Mutat.* **30**, 724–733.
55. Scherer S.S., Wrabetz L. 2008. Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. *Glia*. **56**, 1578–1589.
56. Bai D. 2014. Atrial fibrillation-linked GJA5/connexin40 mutants impaired gap junctions via different mechanisms. *FEBS Lett.* **588**, 1238–1243.
57. Beyer E.C., Ebihara L., Berthoud V.M. 2013. Connexin mutants and cataracts. *Front. Pharmacol.* **4**, 43.
58. Teubner B., Degen J., Söhl G., Güldenagel M., Bukauskas F.F., Trexler E.B., Verselis V.K., De Zeeuw C.I., Lee C.G., Kozak C.A., Petrasch-Parwez E., Dermietzel R., Willecke K. 2000. Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J. Membr. Biol.* **176**, 249–262.
59. Srinivas M., Rozental R., Kojima T., Dermietzel R., Mehler M., Condorelli D.F., Kessler J.A., Spray D.C. 1999. Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36. *J. Neurosci.* **19**, 9848–9855.
60. Venance L., Rozov A., Bлатow M., Burnashev N., Feldmeyer D., Monyer H. 2000. Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 10260–10265.
61. Peinado A. 2001. Immature neocortical neurons exist as extensive syncytial networks linked by dendrodendritic electrical connections. *J. Neurophysiol.* **85** (2), 620–629.
62. Condorelli D.F., Belluardo N., Trovato-Salinaro A., Mudò G. 2000. Expression of Cx36 in mammalian neurons. *Brain Res. Rev.* **32**, 72–85.
63. Fukuda T., Kosaka T., Singer W., Galuske R.A. 2006. Gap junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense and widespread intercolumnar network. *J. Neurosci.* **26** (13), 3434–3443.
64. Shigematsu N., Nishi A., Fukuda T. 2019. Gap junctions interconnect different subtypes of parvalbumin-positive interneurons in barrels and septa with connectivity unique to each subtype. *Cerebral Cortex*. **29**, 1414–1429.
65. Hormuzdi S.G., Pais I., LeBeau F.E., Towers S.K., Rozov A., Buhl E.H., Whittington M.A., Monyer H. 2001. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin-36 deficient mice. *Neuron*. **31**, 487–496.
66. Deans M.R., Gibson J.R., Sellitto C., Connors B.W., Paul D.L. 2001. Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron*. **31**, 477–485.
67. Maxeiner S., Krüger O., Schilling K., Traub O., Urschel S., Willecke K. 2003. Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience*. **119**, 689–700.
68. Krüger O., Plum A., Kim J.S., Winterhager E., Maxeiner S., Hallas G., Kirchhoff S., Traub O., Lamers W.H., Willecke K. 2000. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development*. **127**, 4179–4193.

69. Zhang C., Restrepo D. 2002. Expression of connexin 45 in the olfactory system. *Brain Res.* **929**, 37–47.
70. Van der Giessen R.S., Maxeiner S., French P.J., Willetke K., De Zeeuw C.I. 2006. Spatiotemporal distribution of Connexin45 in the olivocerebellar system. *J. Comp. Neurol.* **495**, 173–184.
71. González D., Gómez-Hernández J.M., Barrio L.C. 2007. Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94**, 66–106.
72. Dere E., Zlomuzica A. 2012. The role of gap junctions in the brain in health and disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**, 206–217.
73. Olsen M. L., Khakh B. S., Skatchkov S. N., Zhou M., Lee C.J., Rouach N. 2015. New insights on astrocyte ion channels: Critical for homeostasis and neuron-glia signaling. *J. Neurosci.* **35** (41), 13827–13835.
74. Grubišić V., Parpura V. 2015. The second brain in autism spectrum disorder: could connexin 43 expressed in enteric glial cells play a role? *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 242.
75. Bruzzone R., Dermietzel R. 2006. Structure and function of gap junctions in the developing brain. *Cell Tissue Res.* **326**, 239–248.
76. Cina C., Bechberger J.F., Ozog M.A., Naus C.C.G. 2007. Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development. *J. Comp. Neurol.* **504**, 298–313.
77. Elias L.A., Wang D.D., Kriegstein A.R. 2007. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature.* **448**, 901–907.
78. Yamamoto T., Vukelic J., Hertzberg E.L., Nagy J.I. 1992. Differential anatomical and cellular patterns of connexin43 expression during postnatal development of rat brain. *Brain Res. Dev.* **66**, 165–180.
79. Kirichenko E.Y., Churyumova G.A., Logvinov A.K. 2016. Ultrastructural study of glial gap junctions in the thalamic nuclei of rat. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* **10**, (3), 207–217.
80. Benedikt J., Inyushin M., Kucheryavkh Y. V., Rivera Y., Kucheryavkh L.Y., Nichols C.G., Eaton M.J., Skatchkov S.N. 2012. Intracellular polyamines enhance astrocytic coupling. *Neuroreport.* **23** (17), 1021–1025.
81. Laube G., Bernstein H.-G. 2017. Agmatine: multifunctional arginine metabolite and magic bullet in clinical neuroscience? *Biochem. J.* **474**, 2619–2640.
82. Laube G., Veh R.W. 1997. Astrocytes, not neurons, show most prominent staining for spermidine/spermine-like immunoreactivity in adult rat brain. *Glia.* **19**, 171–179.
83. Hamon L., Savarin P., Pastré D. 2016. Polyamine signal through gap junctions: A key regulator of proliferation and gap-junction organization in mammalian tissues? *Bioessays.* **38** (6), 498–507.
84. Skatchkov S.N., Antonov S.M., Eaton M.J. 2016. Glia and glial polyamines. Role in brain function in health and disease. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* **10**, 73–98.
85. Musa H., Fenn E., Crye M., Gemel J., Beyer E.C., Veenstra R.D. 2004. Amino terminal glutamate residues confer spermine sensitivity and affect voltage gating and channel conductance of rat connexin40 gap junctions. *J. Physiol.* **557**, 863–878.
86. Gemel J., Lin X., Veenstra R.D., Beyer E.C. 2006. N-terminal residues in Cx43 and Cx40 determine physiological properties of gap junction channels, but do not influence heteromeric assembly with each other or with Cx26. *J. Cell Sci.* **119**, 2258–2268.
87. Skatchkov S.N., Bukauskas F.F., Benedikt J., Inyushin M., Kucheryavkh Y.V. 2015. Intracellular spermine prevents acid-induced uncoupling of Cx43 gap junction channels. *Neuroreport.* **26**, 528–532.
88. Kucheryavkh L.Y., Benedikt J., Cubano L.A., Skatchkov S.N., Bukauskas F.F., Kucheryavkh Y.V. 2017. Polyamines reserve connexin 43-mediated gap junctional communication during intracellular hypercalcemia and acidosis. *Neuroreport.* **28** (4), 208–213.
89. Zayas-Santiago A., Agte S., Rivera Y., Benedikt J., Ulbricht E., Karl A., Dávila J., Savvinov A., Kucheryavkh Y., Inyushin M., Cubano L.A., Pannicke T., Veh R.W., Francke M., Verkhatsky A., Eaton M.J., Reichenbach A., Skatchkov S.N. 2014. Unidirectional photoreceptor-to-Müller glia coupling and unique K⁺ channel expression in Caiman retina. *PLoS One.* **9** (5), e97155.
90. Biedermann B., Skatchkov S.N., Brunk I., Bringmann A., Pannicke T., Bernstein H.G., Faude F., Germer A., Veh R., Reichenbach A. 1998. Spermine/spermidine is expressed by retinal glial (Müller) cells and controls distinct K⁺ channels of their membrane. *Glia.* **23**, 209–220.
91. Ma B., Buckalew R., Du Y., Kiyoshi C.M., Alford C.C., Wang W., McTigue D.M., Enyeart J.J., Terman D., Zhou M. 2016. Gap junction coupling confers isopotentiality on astrocyte syncytium. *Glia.* **64** (2), 214–226.
92. Poopalasundaram S., Knott C., Shamotienko O.G., Foran P.G., Dolly J.O., Ghiani C.A., Gallo V., Wilkin G.P. 2000. Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K-channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia.* **30**, 362–372.
93. Sala-Rabanal M., Kucheryavkh L.Y., Skatchkov S.N., Eaton M.J., Nichols C.G. (2010) Molecular mechanisms of EAST/SeSAME syndrome mutations in Kir4.1 (KCNJ10). *J. Biol. Chem.* **285**, 36040–36048.
94. Wang Q., Wang W., Aten S., Kiyoshi C.M., Du Y., Zhou M. 2020. Epileptiform neuronal discharges impair astrocyte syncytial isopotentiality in acute hippocampal slices. *Brain Sci.* **10** (4), 208.
95. Loo L.W., Berestecky J.M., Kanemitsu M.Y., Lau A.F. 1995. pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 12751–12761.
96. Scemes E., Dermietzel R., Spray D.C. 1998. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia.* **24**, 65–73.

97. Koulakoff A., Ezan P., Giaume C. 2008. Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia*. **56**, 1299–1311.
98. Kunzelmann P., Schroder W., Traub O., Steinhäuser C., Dermietzel R., Willecke K. 1999. Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia*. **25**, 111–119.
99. Nagy J.I., Patel D., Ochalski P.A., Stelmack G.L. 1999. Connexin30 in rodent, cat and human brain: Selective expression in gray matter astrocytes, colocalization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience*. **88** (2), 447–468.
100. Kirichenko E.Yu., Povilaitite P.E., Logvinov A.K., Kirichenko Yu.G., Filippova S.Yu. 2018. Gap junctions in the composition of neuroglial vascular ensembles in rat cortical barrel columns. *Cell and Tissue Biology*. **12** (6), 477–483.
101. Teubner B., Michel V., Pesch J., et al. 2003. Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 13–21.
102. Filippov M.A., Hormuzdi S.G., Fuchs E.C., Monyer H. 2003. A reporter allele for investigating connexin 26 gene expression in the mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 3183–3192.
103. Rash J.E., Olson C.O., Davidson K.G., Yasumura T., Kamasawa N., Nagy J.I. 2007. Identification of connexin36 in gap junctions between neurons in rodent locus coeruleus. *Neuroscience*. **147**, 938–956.
104. Richard G., White T.W., Smith L.E., Bailey R.A., Compton J.G., Paul D.L., Bale S.J. 1998. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum. Genet.* **103**, 393–399.
105. Heathcote K., Syrris P., Carter N.D., Patton M.A. 2000. A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350). *J. Med. Genet.* **37** (1), 50–51.
106. Todt I., Mazereeuw-Hautier J., Binder B., Willems P.J. 2009. Dandy–Walker malformation in patients with KID syndrome associated with a heterozygote mutation (p.Asp50Asn) in the GJB2 gene encoding connexin 26. *Clin. Genet.* **76**, 404–408.
107. Scherer S.S., Deschênes S.M., Xu Y.T., Grinspan J.B., Fischbeck K.H., Paul D.L. 1995. Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J. Neurosci.* **15**, 8281–8294.
108. Scherer S.S., Xu Y.T., Nelles E., Fischbeck K., Willecke K., Bone L.J. 1998. Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia*. **24**, 8–20.
109. Phelan P., Starich T.A. 2001. Innexins get into the gap. *Bioessays*. **23**, 388–396.
110. Landesman Y., White T.W., Starich T.A., Shaw J.E., Goodenough D.A., Paul D.L. 1995. Innexin-3 forms connexin-like intercellular channels. *J. Cell Sci.* **112**, 2391–2396.
111. Panchin Y., Kelmanson I., Matz M., Lukyanov K., Usman N., Lukyanov S. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol.* **10** (13), R473–474.
112. Baranova A., Ivanov D., Petrash N., et al. 2004. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*. **83**, 706–716.
113. Bruzzone R., Hormuzdi S.G., Barbe M.T., Herb A., Monyer H. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 13644–13649.
114. Hua V.B., Chang A.B., Tchieu J.H., Nielsen P.A., Saier Jr.M.H. 2003. Sequence and phylogenetic analyses of 4 TMS junctional proteins of animals: Connexins, innexins, claudins and occludins. *J. Mem. Biol.* **194**, 59–76.
115. Scemes E., Suadicani S.O., Dahl G., Spray D.C. 2007. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol.* **3**, 199–208.

Structure and Functions of Gap Junctions and Their Constituent Connexins in the Mammalians CNS

E. Yu. Kirichenko^{1,*}, S. N. Skatchkov^{2,3,}, A. M. Ermakov^{4,***}**

¹*Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

²*Department of Biochemistry, School of Medicine, P.O. Box 60327, Universidad Central del Caribe, Bayamón, PR, 00960-6032 USA*

³*Department of Physiology, School of Medicine, P.O. Box 60327, Universidad Central del Caribe, Bayamón, PR, 00960-6032 USA*

⁴*Faculty of Bioengineering and Veterinary Medicine, Don State Technical University, Rostov-on-Don, 344003 Russia*

*e-mail: kiriche.evgeniya@yandex.ru

**e-mail: sergei.skatchkov@uccaribe.edu

***e-mail: amermakov@yandex.ru

Numerous data from the last 20 years indicate that all parts of the mature central nervous system, from the retina and olfactory bulb to the spinal cord and brain, contain cells connected by gap junctions (GJ). The

morphological basis of the GJs is a group of joined membrane hemichannels called connexons, the subunit of each connexon is the protein connexin. In the central nervous system, connexins show specificity and certain types of them are expressed either in neurons or in glial cells. Connexins and GJ of neurons, combining certain types of inhibitory hippocampal and neocortical neuronal ensembles, provide synchronization of local impulse and rhythmic activity, thalamocortical conduction, control of excitatory connections, which reflects their important role in the processes of perception, concentration of attention and consolidation of memory, both on the cellular and at the system level. Connexins of glial cells are ubiquitously expressed in the brain, and the GJs formed by them provide molecular signaling and metabolic cooperation and play a certain role in the processes of neuronal migration during brain development, myelination, tissue homeostasis, and apoptosis. At the same time, mutations in the genes of glial connexins, as well as a deficiency of these proteins, are associated with such diseases as congenital neuropathies, hearing loss, skin diseases, and brain tumors. This review summarizes the existing data of numerous molecular, electrophysiological, pharmacological and morphological studies aimed at progress in the study of the physiological and pathophysiological significance of glial and neuronal connexins and GJs for the central nervous system.

Keywords: gap junctions, connexins, astrocytes, neurons

УДК 577.352

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ CRAC-МОТИВЫ, С ЛИПИДАМИ В МЕМБРАНАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

© 2021 г. П. Е. Вольтинский^а, Т. Р. Галимзянов^б, С. А. Акимов^{б, *}

^аИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

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

*e-mail: akimov_sergey@mail.ru

Поступила в редакцию 17.09.2020 г.

После доработки 21.09.2020 г.

Принята к публикации 22.09.2020 г.

Латеральное распределение интегральных и периферических белков, а также липидов в плазматических мембранах клеток млекопитающих крайне неоднородно. Считается, что в мембранах формируются различные липид-белковые домены. Домены, обогащенные сфингомиелином и холестерином, называют рафтами. Предполагается, что распределение белков в рафты в большой степени связано с наличием в их первичной последовательности специфического участка аминокислот, называемого CRAC-мотивом, отвечающего за связывание холестерина. В настоящей работе взаимодействие двух пептидов, содержащих в своей структуре CRAC-мотивы, с мембранами различного состава исследовалось методом молекулярной динамики. Показано, что среднее число контактирующих с каждым пептидом липидных молекул пропорционально мольной доле липида в мембране. Не обнаружено преимущественное взаимодействие с холестерином как пептидов в целом, так и их отдельных аминокислот или аминокислотных последовательностей. Мы предполагаем, что в ряде случаев преимущественное латеральное распределение в рафты пептидов и белков, содержащих CRAC-мотивы, может быть обусловлено амфипатическими свойствами CRAC-мотива, а не специфическим сильным связыванием холестерина.

Ключевые слова: липидная мембрана, упорядоченный домен, CRAC-мотив, молекулярная динамика, амфипатический пептид

DOI: 10.31857/S0233475521010072

ВВЕДЕНИЕ

Латеральное распределение интегральных и периферических белков в плазматической мембране крайне неоднородно [1, 2]. Показано, что различные белки формируют кластеры размером 10–200 нм [1]. Имеется как минимум два пересекающихся типа таких кластеров, различающихся по составу белков, формирующих их [3]. Иными словами, часть мембранных белков всегда располагается в кластерах первого типа, а другая часть — всегда в кластерах второго типа, и белки, формирующие первый тип кластеров, практически никогда не оказываются колокализированы с белками, формирующими второй тип кластеров. При обработке клеточных мембран мягким неионным детергентом в низкой концентрации при низкой температуре (~4°C) и последующем центрифугировании мембранные белки разделяются на две фракции, соответствующие двум типам кластеров [4]. Помимо различия по белковому составу, фракции различаются также содержанием

липидов: сфингомиелин практически полностью распределяется во фракцию низкой плотности, в то время как фракция высокой плотности обогащена ненасыщенными липидами [3, 4]. Холестерин, по разным данным, распределяется либо практически равномерно между фракциями [3, 5], либо имеет некоторое предпочтение к фракции низкой плотности [4]. Предполагается, что белковые кластеры в плазматических мембранах в действительности представляют собой липид-белковые домены, составы которых приблизительно совпадают с составами фракций, получающимися при центрифугировании; при этом домены, обогащенные сфингомиелином и холестерином, называются рафтами [6]. Большой интерес к исследованию рафтов связан с тем, что они оказываются вовлечены в процессы, катализируемые находящимися в них мембранными белками, причем наличие рафтового окружения критично для функционирования белков [2, 7, 8].

Малый размер доменов существенно затрудняет их исследование в клеточных мембранах. В модельных чисто липидных мембранах, состав которых близок к составу наружного монослоя плазматических мембран, при понижении температуры происходит фазовое разделение, в результате которого образуются домены микронных размеров, которые могут изучаться различными экспериментальными методами, в том числе оптическими [3, 5, 9–12]. Такие домены также относительно устойчивы к действию детергента и обогащены сфингомиелином и холестерином; они используются в качестве модели клеточных рафтов [5, 13]. В модельных мембранах было обнаружено, что липид в доменах находится в жидкоупорядоченном (L_o) состоянии, в то время как окружающая мембрана — жидко-неупорядоченная (L_d) [10–12]. Вследствие различия упорядоченности толщина бислоя доменов больше толщины окружающей мембраны [13]. Домены характеризуются относительно высокими модулями упругости [14], и в них понижен коэффициент диффузии [10].

Кластеризация различных белков и липидов в ограниченной области плазматической мембраны необходима для нормального протекания жизненно важных клеточных процессов, в частности слияния и деления мембран [15, 16], передачи клеточных сигналов [17, 18] и т.д. Помимо нормальных физиологических процессов, такая организация липид-белковых платформ является ключевой стадией процессов патологических — сборки новых вирусных частиц на мембранах клетки, инфицированной оболочечными вирусами. Экспериментально было показано, что липидный состав мембраны вирусов гриппа и иммунодефицита практически совпадает с липидным составом рафтовой фазы клеточной мембраны [19]. Предполагается, что сборка новых вирионов происходит на доменах жидко-упорядоченной фазы, в которые должны преимущественно распределяться вирусные мембранные белки. Таким образом, эти белки должны обладать к рафтам выраженным сродством.

В ряде работ высказывалось предположение о том, что сродство различных белков к обогащенным холестерином доменам плазматических мембран может обеспечиваться наличием в их структуре специфических последовательностей аминокислотных остатков, предположительно “узнающих” и связывающих холестерин [20], называемых “CRAC” — cholesterol recognition amino acid consensus [21]. CRAC-мотивы описываются общей формулой $-L/V-(X)(1-5)-Y/W-(X)(1-5)-R/K-$, где $(X)(1-5)$ обозначает от одного до пяти остатков любых аминокислот, символ “/” обозначает “или”. Такие последовательности были обнаружены в первичной структуре различных

белков, распределяющихся в рафтовую фазу клеточных мембран, в том числе кавеолина, мембранных рецепторов [20, 22], а также белка слияния (гемагглютинина) [23] и матриксного белка (M1) вируса гриппа [24]. В работе [25] было показано, что синтетические CRAC-содержащие пептиды, соответствующие 3, 6 и 13-й α -спиралям M1-белка, в разной степени модулируют холестерин-зависимое взаимодействие культивируемых макрофагов IC-21 с 2-мкм частицами. В аналогичных экспериментах было обнаружено, что пептид RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR-NH₂, содержащий два CRAC-мотива из 3-й и 6-й α -спиралей M1-белка, значительно и сложным образом влияет на активность макрофагов IC-21 [26].

В работе [20] было высказано предположение, что наряду с посттрансляционным липидированием белков наличие в их структуре аминокислотных последовательностей, связывающих определенные липидные компоненты, может обуславливать распределение белков в мембранные домены, обогащенные такими компонентами. В качестве такой аминокислотной последовательности рассмотрен CRAC-мотив на примере кавеолина-1 и кавеолина-2, относительно которых было показано, что пальмитирование не является необходимым условием их распределения в кавеолы, мембрана которых находится в рафтовом состоянии [2]. При этом кавеолин-3 не содержит CRAC-мотивов, однако, тем не менее, распределяется в рафты, по-видимому, за счет пост-трансляционного пальмитирования [20]. На основании полученных экспериментальных данных в работе [23] была высказана гипотеза о существенной роли CRAC-мотива в распределении в жидко-упорядоченную фазу мембраны гемагглютинина — белка слияния вируса гриппа. Однако наблюдаемая в экспериментах “контрастность” распределения холестерина по плазматической мембране, как правило, значительно ниже, чем белков, ассоциированных с рафтами [3, 27]. В то же время клеточные домены жидко-упорядоченной фазы значительно обогащены сфингомиелином. Это позволяет предполагать, что CRAC-мотивы могут взаимодействовать также и со сфингомиелином, либо специфическое взаимодействие CRAC-мотивов с холестерином может зависеть от наличия сфингомиелина или других липидов. Насколько нам известно, эти предположения систематически не проверялись.

В настоящей работе методами молекулярной динамики (МД) исследовалось взаимодействие пептидов, содержащих в своей структуре CRAC-мотивы, с липидными молекулами в мембранах различного состава. Проведенное моделирование не позволило выявить у исследуемых пептидов повышенного сродства к холестерину вне зависимости от наличия в системе сфингомиелина. Во всех случаях с пептидами взаимодействует 1–

2 молекулы холестерина, что соответствует средней концентрации этого липида в системе. Аналогичные результаты были получены и для взаимодействия пептидов со сфингомиелином. Исследование локализации взаимодействующего с пептидом холестерина также не позволило выявить устойчивых мест связывания — холестерин взаимодействует с остатками, ориентированными внутрь мембраны, и не образует долгоживущих комплексов с пептидом. Полученные результаты позволяют заключить, что наличие в структуре пептида CRAC-мотива само по себе не является универсальным критерием сильного специфического связывания этим пептидом холестерина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве тестовых пептидов использовались участки третьей и шестой амфипатических спиралей матричного белка M1 вируса гриппа: пептид p_1 = LEVLMEWLKTR, пептид p_2 = NNMDKAVKLYRKLKR (жирным шрифтом выделены аминокислоты, образующие CRAC-мотив), впервые описанные в работе [25] как пептиды, содержащие CRAC-мотивы и охарактеризованные по их влиянию на холестерин-зависимое связывание частиц макрофагами IC-21. Для каждого из этих пептидов проводились МД-симуляции длиной 10 мкс в присутствии липидных бислоев следующих составов: 1) диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), 200 липидов, обозначение системы — DOPC; 2) DOPC/холестерин (Chol), 180 молекул DOPC, 20 молекул холестерина, обозначение системы — DOPC/Chol; 3) DOPC/дипальмитоилсфингомиелин (DPSM), 180 молекул DOPC, 20 молекул дипальмитоилсфингомиелина, обозначение системы — DOPC/DPSM; 4) DOPC/DPSM/Chol, 160 молекул DOPC, 20 молекул DPSM, 20 молекул Chol, обозначение системы — DOPC/DPSM/Chol.

Сродство пептидов к различным липидам исследовалось методом молекулярной динамики в крупнозернистом приближении. Расчеты проводились с использованием программы gromacs 2016.3 в силовом поле martini2.2P для расчетов с поляризованной водой [28]. Для расчетов применялись видеокарты NVidia GeForce GTX 1080 (AsusTek Computer Inc., Тайвань), позволяющие рассчитывать приблизительно 0.5 мкс траектории в сутки. Для системы каждого состава рассчитывалась одна траектория длиной 10 мкс. Молекулярные топологии липидов (DOPC, DPSM, Chol) брались из имеющейся базы данных липидов [29]. МД-симуляции производили при постоянной температуре (295 K), поддерживаемой с использованием термостата Нозе—Гувера [30, 31]. В процессе расчета поддерживали давление (полуизотропная схема подстройки) с использованием

баростата Паринелло—Рамана [32, 33]. Шаг интегрирования в процессе МД составлял 10 фс. При учете дальнедействующих взаимодействий использовали параметры, рекомендованные для выбранного силового поля: ван-дер-ваальсовы взаимодействия — схема shift с радиусами 0.9/1.2 нм, электростатические взаимодействия — схема shift с радиусами 0.0/1.2 нм. Длительность расчетных траекторий составила 10 мкс. Электростатические взаимодействия рассчитывались с использованием диэлектрической проницаемости среды мембраны $\epsilon = 2.5$. Исследуемые системы состояли из 200 молекул липидов и приблизительно 20000 молекул воды. На первом этапе проведены расчеты равновесных состояний бислоев. В стартовой конфигурации каждого монослоя липиды распределялись случайным образом на двумерной сетке с шагом 0.8 нм. Два собранных монослоя комбинировались в бислой таким образом, чтобы расстояние между модельными частицами, включающими атомы фосфора, различных монослоев вдоль нормали к бислою составляло 3.4 нм. В полученную систему добавлялась вода. Модельная система уравнивалась 100 нс. На втором этапе в водную часть системы добавлялся пептид. После стартового уравнивания системы, при котором минимизировалась энергия в течение 100 нс при постоянном давлении (полуизотропная схема подстройки) с использованием баростата Берендсена [34], запускался основной расчет МД.

Взаимодействие пептидов с липидами оценивалось путем регистрации контактов пептид—липид. Предполагалось, что липид взаимодействует с пептидом в случае, если расстояние между зернами пептида и липида не превышает заданной отсечки 0.6 нм. Такие контакты анализировали для каждого состояния, полученного в ходе МД с шагом в 0.1 нс. Полученные данные отображали в двух вариантах. В первом случае отображалось общее число молекул липида каждого типа, взаимодействующих с пептидом. Во втором случае строили карты интенсивности контактов аминокислотных остатков пептида с холестерином. При наличии сайтов связывания с холестерином на этих картах должны наблюдаться области, с которыми холестерин взаимодействует на протяжении длительных периодов времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показана зависимость количества контактирующих с пептидом p_1 молекул DOPC (рис. 1а—1г), DPSM (рис. 1в, 1г) и холестерина (рис. 1б, 1г) от времени МД. Из рисунка видно, что среднее количество контактирующих молекул стабилизируется уже после приблизительно 1 мкс динамики (рис. 1в) и остается практически неизменным до конца расчетной траектории. Скачок

числа контактов пептида с липидами при $t \approx 1$ мкс на рис. 1в связан с тем, что исходно пептид помещался в воду вблизи мембраны; при встраивании пептида в мембрану в момент времени $t \approx 1$ мкс количество контактов пептид–липид резко возрастает. Все липидные молекулы были распределены по мембране практически равномерно и не образовывали между собой долгоживущих кластеров (данные не показаны). Среднее количество молекул DPSM и Chol, контактирующих с пептидом, приблизительно соответствует концентрации (мольной доле) этих липидов в мембране. Действительно, в однокомпонентной мембране из чистого DOPC с пептидом контактирует в среднем 10 молекул (рис. 1а). В мембранах состава DOPC/DPSM и DOPC/Chol мольная доля DPSM и Chol составляет $100\% \times 20/(180 + 20) = 10\%$. В этих системах с пептидом контактирует в среднем также десять молекул, из которых девять молекул DOPC и одна молекула DPSM (рис. 1б) или Chol (рис. 1б), в соответствии с мольными долями этих липидов. В мембране состава DOPC/DPSM/Chol 160/20/20 мольная доля DPSM и Chol составляет 10% каждого, а мольная доля DOPC — 80%. В соответствии с этим, в данной системе с пептидом p_1 находится в контакте в среднем всего десять молекул, из которых восемь молекул — DOPC, одна молекула — DPSM и одна молекула — Chol (рис. 1з). Из полученных данных можно заключить, что все смоделированные системы (DOPC; DOPC/Chol; DOPC/DPSM; DOPC/DPSM/Chol) являются идеальными в том смысле, что пептид p_1 не имеет как предпочтительных (притяжение), так и нежелательных (отталкивание) взаимодействий ни с одним из липидов. Все контакты пептида с липидами являются случайными, и их вероятность пропорциональна мольной доле липида. Если бы пептид в какой-либо мере связывал холестерин, то среднее число контактов пептида с холестерином должно было бы превышать число контактов, пропорциональное мольной доле холестерина в мембране при условии приблизительно равномерного латерального распределения всех липидов. Например, в предельном случае очень сильной долгоживущей связи пептида с одной молекулой холестерина число контактов в среднем должно быть приблизительно на единицу большим, чем в случае идеальной системы.

На рис. 2 для пептида p_2 показана аналогичная зависимость от времени количества контактирующих липидных молекул: DOPC (рис. 2а–2г), DPSM (рис. 2в, 2е), Chol (рис. 2б, 2г) в мембранах различного состава. Скачок числа контактов пептида с липидами при $t \approx 0.5$ мкс на рис. 2а и $t \approx 3$ мкс на рис. 2в связан с тем, что исходно пептид помещался в воду вблизи мембраны; встраивание пептида в мембрану произошло в моменты времени $t \approx 0.5$ мкс и $t \approx 3$ мкс соответственно, при

этом количество контактов пептид–липид с основным липидом (DOPC) резко возросло. Пептид p_2 больше (состоит из большего количества аминокислотных остатков), чем пептид p_1 ; соответственно, в мембране из чистого DOPC с пептидом p_2 находится в контакте в среднем приблизительно 12 молекул DOPC (ср. рис. 2а и 1а). Так же как и в случае пептида p_1 , моделированные системы “мембрана + пептид p_2 ” являются идеальными в том смысле, что среднее число контактирующих с пептидом молекул липидов пропорционально их мольной доле. Действительно, в мембране состава DOPC/Chol 180/20 мольная доля холестерина составляет 10%; в такой мембране пептид p_2 в среднем контактирует приблизительно с 11 молекулами DOPC и одной молекулой холестерина (рис. 2б). В мембране состава DOPC/DPSM 180/20 мольная доля DPSM также составляет 10%, и пептид p_2 находится в контакте в среднем с приблизительно 11 молекулами DOPC и одной молекулой DPSM (рис. 2в).

В мембране состава DOPC/DPSM/Chol 160/20/20 мольные доли компонентов составляют 80, 10 и 10% для DOPC, DPSM, Chol соответственно. При этом в контакте с пептидом p_2 в среднем находятся приблизительно 10 молекул DOPC, одна молекула DPSM и одна молекула холестерина, пропорционально мольной доле каждого липидного компонента в мембране (рис. 2г). Таким образом, пептид p_2 не имеет как предпочтительных (притяжение), так и нежелательных (отталкивание) взаимодействий ни с одним из липидов.

На рис. 3 показаны диаграммы зависимости от времени контактов холестерина с аминокислотными остатками пептидов p_1 (рис. 3а, 3б) и p_2 (рис. 3в, 3г) в мембранах состава DOPC/Chol (рис. 3а, 3в) и DOPC/DPSM/Chol (рис. 3б, 3г). Контакт какого-либо аминокислотного остатка с холестерином в данный момент времени обозначен на диаграммах вертикальной серой полосой, отсутствие контакта — вертикальной белой полосой.

Из рисунка видно, что холестерин взаимодействует преимущественно с гидрофобными аминокислотными остатками, ориентированными внутрь мембраны. При этом ни один из пептидов не имеет устойчивых мест связывания холестерина и не образует с холестерином долгоживущих комплексов. Из того, что характерное время непрерывного нахождения молекулы холестерина вблизи конкретных аминокислотных остатков пептидов относительно мало (< 0.4 мкс, см. рис. 3), а среднее число контактирующих с пептидами молекул холестерина пропорционально мольной доле холестерина, можно сделать вывод о случайности взаимодействий пептид–холестерин. Из полученных результатов МД следует, что наличие в структуре пептида CRAC-мотива не является

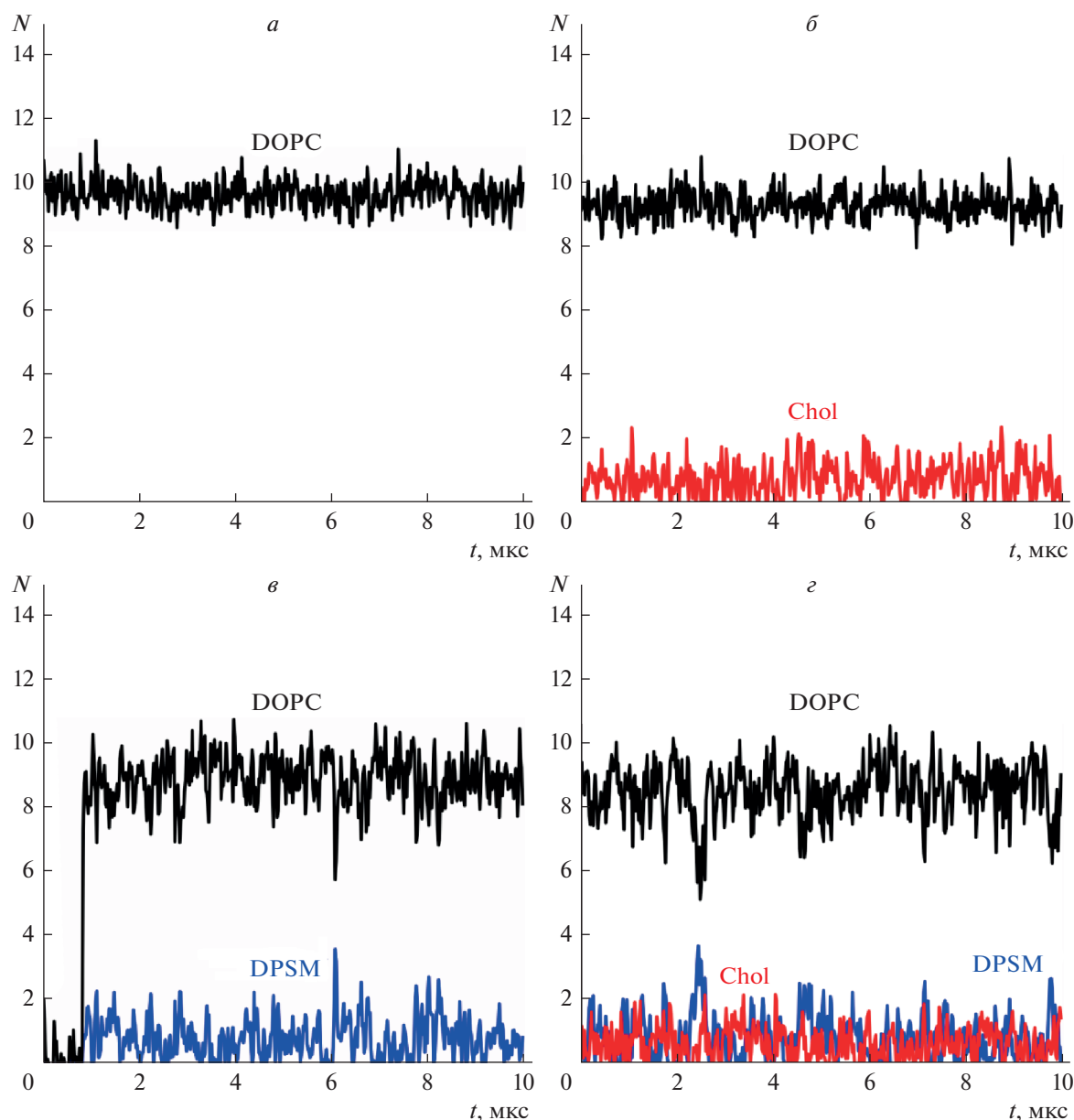


Рис. 1. Зависимость количества липидов, контактирующих с пептидом p_1 , от времени в мембранах состава: *а* – DOPC; *б* – DOPC/Chol; *в* – DOPC/DPSM; *г* – DOPC/DPSM/Chol. Зависимость количества контактирующих с пептидом молекул DOPC показана черным цветом; Chol – красным цветом; DPSM – синим цветом.

достаточным условием его преимущественного взаимодействия с холестерином.

Каким образом происходит сортировка мембранных белков между L_o - и L_d -фазами мембраны в настоящее время полностью не выяснено. В ряде работ [35–40] систематически исследовалось латеральное распределение трансмембранного белка LAT (Linker for Activation of T-cells) и его различных производных и мутантов. Было обнаружено [39], что предпочтение трансмембранными белками упорядоченной или неупорядоченной фазы определяется тремя особенностями

их химической структуры: 1) пост-трансляционная модификация белков (присоединение остатков пальмитиновой или миристиновой кислоты) повышает коэффициент распределения в L_o -фазу; 2) так называемая доступная площадь поверхности трансмембранного домена (ТМД) белка, которая определяется объемом составляющих его аминокислот и коррелирует с диаметром ТМД (меньший диаметр способствует распределению в L_o -фазу); 3) длина ТМД – увеличение длины на одну аминокислоту относительно повышает коэффициент распределения в L_o -фазу приближи-

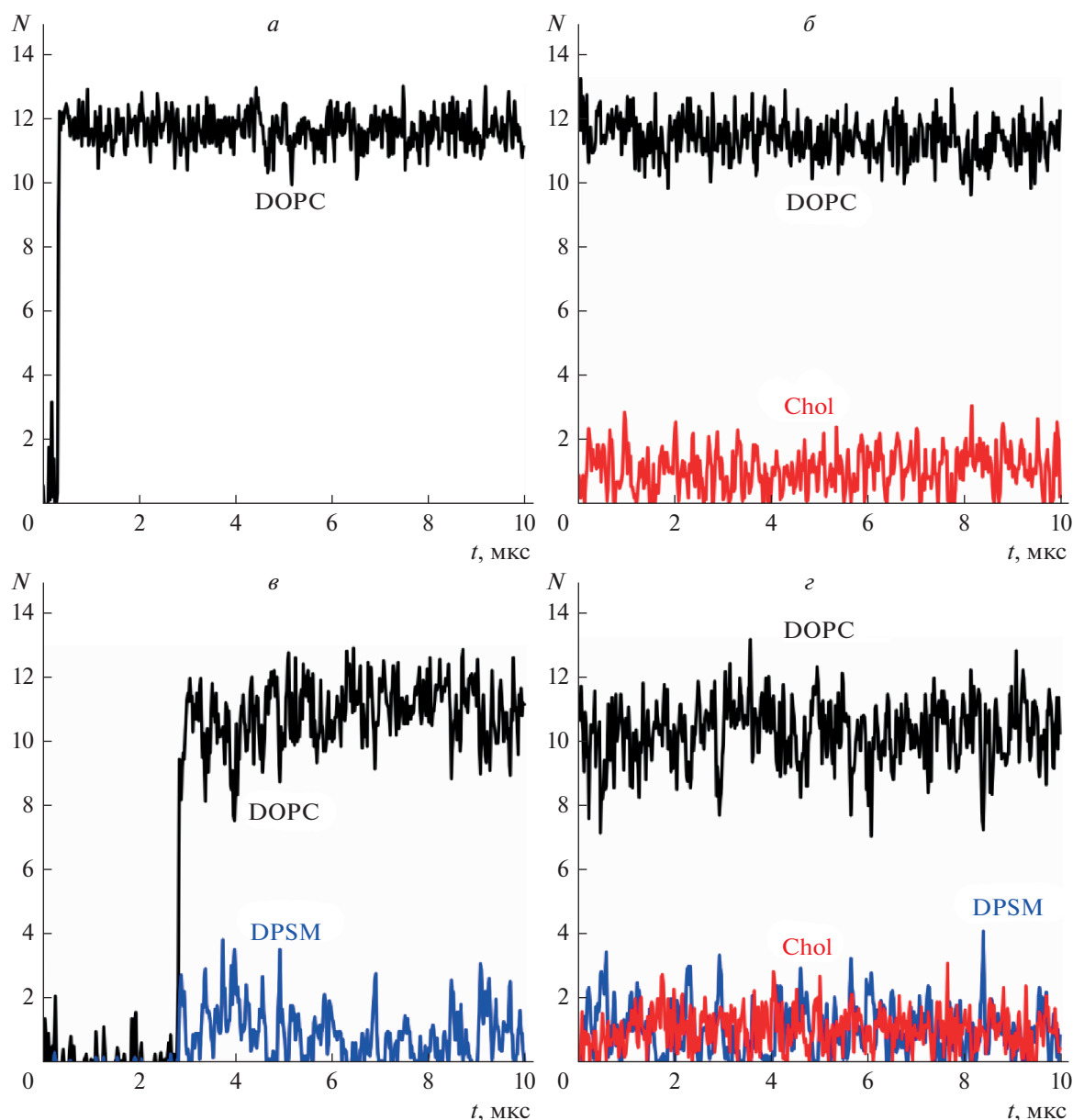


Рис. 2. Зависимость количества липидов, контактирующих с пептидом p_2 , от времени в мембранах состава: *а* – DOPC; *б* – DOPC/Chol; *в* – DOPC/DPSM; *г* – DOPC/DPSM/Chol. Зависимость количества контактирующих с пептидом молекул DOPC показана черным цветом; Chol – красным цветом; DPSM – синим цветом.

тельно на 5% [40]. Показано, что такие изменения структуры ТМД белка приводят к приблизительно аддитивным изменениям коэффициента распределения белков между фазами мембраны. Методами молекулярной динамики было показано, что LAT имеет сильное предпочтение к межфазной L_o/L_d -границе [38]. Рассчитанные зависимости энергии (потенциал средней силы) от положения трансмембранного белка относительно межфазной границы хорошо согласуются с аналогичными зависимостями энергии, получаемыми методами континуальной теории упругости

[41, 42]. Однако данные работ [35–40] не позволяют объяснить распределение периферических белков между фазами мембраны.

Химическая структура CRAC-мотивов определяется общей формулой: $-L/V-(X)(1-5)-Y/W-(X)(1-5)-R/K-$, где $(X)(1-5)$ обозначает от одного до пяти остатков любых аминокислот, символ “/” обозначает “или”. Таким образом, CRAC-мотив является амфипатическим, поскольку содержит одновременно заряженные (R/K), ароматические (Y/W) и гидрофобные (L/V) аминокислотные остатки. Ранее в работах [41, 42] теоретически ис-

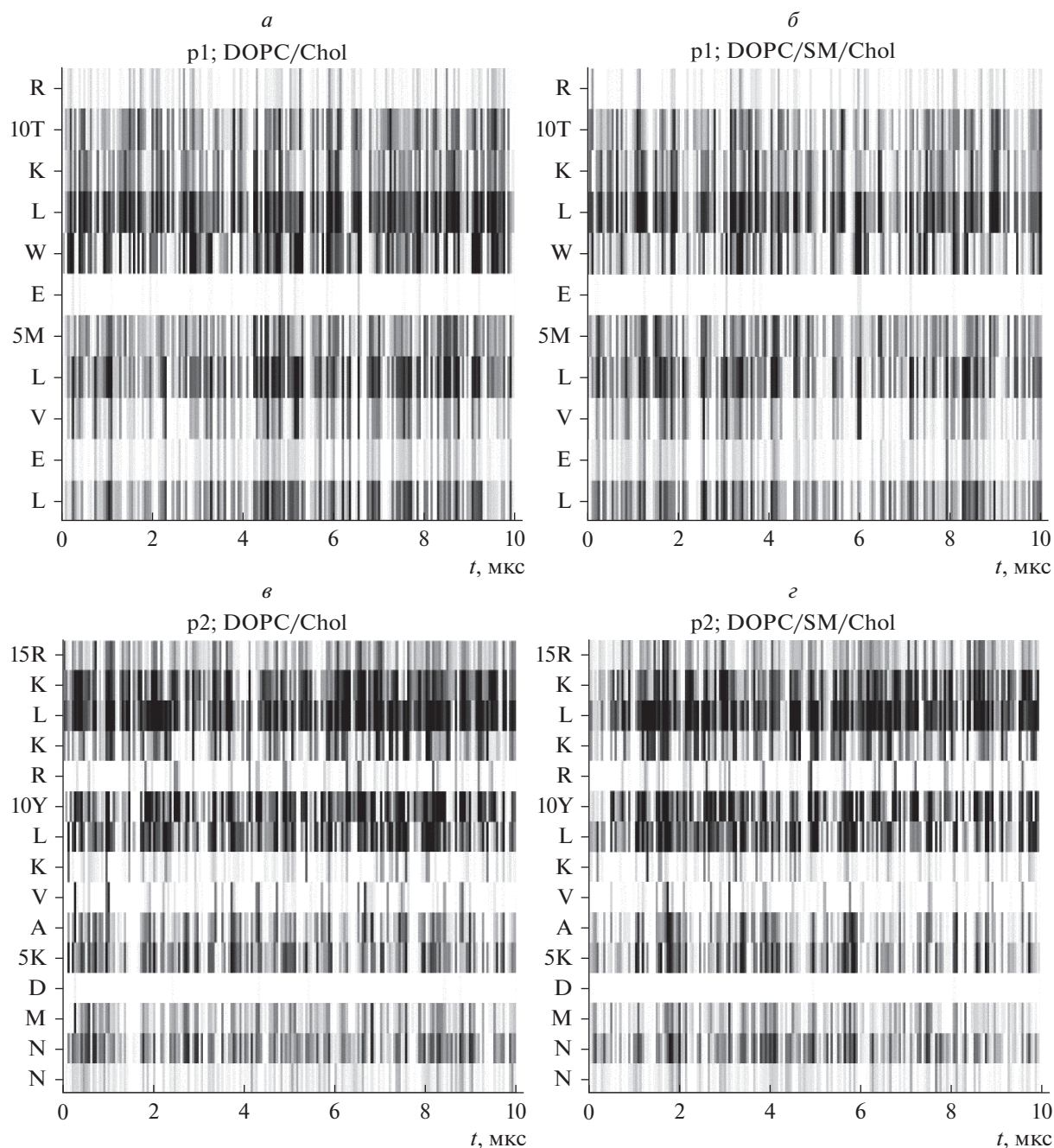


Рис. 3. Диаграммы зависимости от времени контактов холестерина с аминокислотными остатками пептидов p_1 (*a*, *б*) и p_2 (*в*, *г*) в мембранах состава DOPC/Chol (*a*, *в*) и DOPC/DPSM/Chol (*б*, *г*). Контакт аминокислотного остатка с холестерином в данный момент времени обозначен на диаграммах вертикальной серой полосой, отсутствие контакта — вертикальной белой полосой.

следовалось преимущественное распределение различных мембранных включений между объемными L_o - и L_d -фазами и межфазной границей. Было показано, что преимущественное распределение в область межфазной L_o/L_d -границы характерно для: 1) всех липидных включений, монослой из которых обладает ненулевой спонтанной кривизной; 2) всех периферических мембранных

включений, как амфипатических, так и преимущественно гидрофобных; 3) трансмембранных включений, имеющих нецилиндрическую форму, например “песочных часов” или “бочонка”. Распределение таких мембранных включений на границу домена всегда приводило к понижению граничной энергии. Не имели предпочтения к межфазной границе лишь липидные включения,

монослои которых имеют приблизительно нулевую спонтанную кривизну. Кроме того, в объемную L_o - или L_d -фазу предпочитали распределяться цилиндрические трансмембранные включения, длина которых приблизительно совпадала с толщиной липидного бислоя соответствующей фазы [41]. Таким образом, исходя из результатов работ [41, 42], любой периферический пептид, включающий амфипатической CRAC-мотив, должен иметь сильное предпочтение к межфазной L_o/L_d -границе. Для этого пептиду не нужно связываться с холестерином, поскольку движущей силой латерального перераспределения являются взаимодействие индуцируемых пептидом деформаций мембраны, обусловленных амфипатической природой пептида, и деформаций мембраны, возникающих на межфазной L_o/L_d -границе [42, 43]. В трансмембранном пептиде, по-видимому, должна проявляться тенденция к расположению CRAC-мотива вблизи внешних (полярных) границ мембраны, поскольку в мотив входят положительно заряженные аминокислоты (R/K). Характеристические аминокислоты CRAC-мотивов достаточно объемные. Наличие объемных аминокислот в составе трансмембранного участка вблизи поверхностей мембраны может обеспечивать эффективную форму трансмембранного пептида в виде “песочных часов”: большой объем вблизи гидрофильных поверхностей мембраны и малый — в области межмонослойной поверхности. Согласно результатам работы [41], оптимальное положение трансмембранного пептида, имеющего эффективную форму “песочных часов”, — вблизи границы L_o - и L_d -фаз.

Следует отметить, что все рафтозависимые процессы автоматически являются холестерин-зависимыми, однако обратное не верно. Согласно теоретическим результатам работ [41, 42], амфипатические пептиды должны преимущественно распределяться на границу рафтов, изменять их граничную энергию и влиять на свойства ансамбля рафтов. Однако амфипатическая природа пептида не является достаточным условием его влияния на холестерин-зависимые процессы. В работе [26] было показано, что пептид, получающийся объединением пептидов p_1 и p_2 , сильно и сложным образом влияет на холестерин-зависимую активность клеток. При замене ароматических аминокислот в двух CRAC-мотивах на серин влияние пептида практически исчезает [44], хотя замена ароматических аминокислот на серин не изменяет амфипатических свойств пептида.

Ранее в работе [45] исследовалось взаимодействие с мембранами различного состава двух пептидов, содержащих CRAC-мотивы, являющихся частями лейкотоксина LtxA. Исследование проводилось методами полноатомной молекулярной

динамики. Был проведен сравнительный анализ связывания пептидов и изменений их вторичной структуры с мембранами, состоящими из чистого димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) и смеси DMPC/Chol 60 : 40. Показано, что в мембраны состава DMPC/Chol 60 : 40 оба пептида встраиваются глубже, чем в мембраны из чистого DMPC. При встраивании изменяется вторичная структура пептидов, и эти изменения также выражены сильнее в мембранах состава DMPC/Chol 60 : 40. Однако в данной работе связывание (число контактов) CRAC-мотивов с холестерином напрямую не анализировалось. В принципе, по крайней мере, частично наблюдаемые эффекты могут быть объяснены не специфическим взаимодействием CRAC-мотивов с холестерином, а изменением интегральных свойств мембраны при добавлении холестерина. Встраивание амфипатического пептида в мембрану неизбежно приводит к ее деформации. Энергия возникающих деформаций, в свою очередь, должна влиять на эффективность встраивания и, возможно, итоговую конформацию пептида. Например, в предельном случае очень жесткой мембраны энергия деформаций может быть настолько велика, что пептид вообще не сможет встроиться в мембрану. Известно, что холестерин влияет на толщину и изгибную жесткость мембраны, а также на спонтанную кривизну ее монослоев [13, 14, 46–48]. Эти параметры определяют энергию деформаций, возникающих вблизи встроеного в мембрану амфипатического пептида, и, таким образом, могут влиять на глубину встраивания. В этом случае взаимодействие CRAC-содержащего пептида с мембраной может определяться ее интегральными свойствами, а не эффективностью или специфичностью связывания пептида с холестерином; надежно различить эти два механизма представляется нетривиальной задачей.

В работе [49] методами МД крупнозернистого приближения анализировались сайты преимущественного взаимодействия с холестерином серотонинового рецептора, в структуре которого имеется семь трансмембранных участков и три CRAC-мотива. Было обнаружено, что холестерин в сравнимой степени взаимодействует со всеми трансмембранными спиралями рецептора, причем даже выявленные сайты преимущественного взаимодействия контактируют с молекулами холестерина время, сравнимое со временем занятости других участков трансмембранных спиралей. При этом холестерин многократно связывается (приходит в контакт) с такими сайтами и диссоциирует от них в течение расчетной траектории МД. Повышенное время контакта с холестерином было обнаружено только у одного из трех CRAC-мотивов, причем это время не было максимальным среди выявленных сайтов преимущественного взаимодействия с холестерином. Харак-

терное время взаимодействия трансмембранных спиралей с пальмитоилолеоилфосфатидилхолином (ПОС) в мембране состава ПОС/Chol 50 : 50 оказалось сравнимым со временем взаимодействия с холестерином, причем связывание конкретного сайта с ПОС не исключало его одновременного связывания с холестерином. Таким образом, показано, что селективность выявленных сайтов преимущественного взаимодействия с холестерином невысока.

В работе [50] методами МД крупнозернистого приближения моделировалось взаимодействие с мембранами того же серотонинового рецептора. Был обнаружен всего 41 сайт преимущественных контактов с холестерином, из которых лишь два входили в состав CRAC-мотивов. Количество контактов каждого сайта с холестерином коррелировало с его стерической доступностью для холестерина, т.е. со степенью погружения сайта в гидрофобную часть мембраны и его ориентацией. Для одного из двух сайтов, входящих в состав CRAC-мотива, селективность по отношению к связыванию холестерина оказалась чрезвычайно низкой.

Таким образом, из результатов наших расчетов и имеющихся литературных данных можно заключить, что наличие в составе белка или пептида CRAC-мотива не является универсальным критерием его преимущественного взаимодействия или связывания с холестерином: CRAC-содержащие пептиды или участки белков могут как связывать, так и не связывать холестерин; кроме того, холестерин может связываться и с не содержащими CRAC-мотивы пептидами или участками белков [45, 49, 50]. Преимущественное распределение белков, содержащих в своей структуре CRAC-мотивы, в жидко-упорядоченную фазу мембраны или на ее границу может определяться амфипатической природой этой аминокислотной последовательности, которая обеспечивает определенную молекулярную геометрию пептидов [35–40]. Сильное взаимодействие пептидов, содержащих CRAC-мотивы, с мембранами, в состав которых входит холестерин, помимо специфического взаимодействия CRAC-мотива с холестерином, может также объясняться сильным влиянием холестерина на интегральные физико-химические свойства мембраны, от которых, в свою очередь, зависит характер взаимодействия пептида с мембраной [41, 42, 51].

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-04-01363, 20-54-00041), а также при частичной финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-3119.2019.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lillemeier B.F., Pfeiffer J.R., Surviladze Z., Wilson B.S., Davis M.M. 2006. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 18992–18997.
2. Simons K., Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387**, 569–572.
3. Ayuyan A.G., Cohen F.S. 2008. Raft composition at physiological temperature and pH in the absence of detergents. *Biophys. J.* **94**, 2654–2666.
4. Edidin M. 2001. Shrinking patches and slippery rafts: Scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.* **11**, 492–496.
5. Veatch S.L., Polozov I.V., Gawrisch K., Keller S.L. 2004. Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **86**, 2910–2922.
6. Pike L.J. 2006. Rafts defined: A report on the Keystone Symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lip. Res.* **47**, 1597–1598.
7. Yang S.T., Kiessling V., Simmons J.A., White J.M., Tamm L.K. 2015. HIV gp41-mediated membrane fusion occurs at edges of cholesterol-rich lipid domains. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 424–431.
8. Allen J.A., Halverson-Tamboli R.A., Rasenick M.M. 2007. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 128–140.
9. Staneva G., Osipenko D.S., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Akimov S.A. 2016. Metabolic precursor of cholesterol causes formation of chained aggregates of liquid-ordered domains. *Langmuir*. **32**, 1591–1600.
10. Saitov A., Akimov S.A., Galimzyanov T.R., Glasnov T., Pohl P. 2020. Ordered lipid domains assemble via concerted recruitment of constituents from both membrane leaflets. *Phys. Rev. Lett.* **124**, 108102.
11. Baumgart T., Hess S.T., Webb W.W. 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*. **425**, 821–824.
12. Samsonov A.V., Mihalyov I., Cohen F.S. 2001. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys. J.* **81**, 1486–1500.
13. Rinia H.A., Snel M.M., van der Eerden J.P., de Kruijff B. 2001. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **501**, 92–96.
14. Baumgart T., Das S., Webb W.W., Jenkins J.T. 2005. Membrane elasticity in giant vesicles with fluid phase coexistence. *Biophys. J.* **89**, 1067–1080.
15. Akimov S.A., Molotkovsky R.J., Kuzmin P.I., Galimzyanov T.R., Batishchev O.V. 2020. Continuum models of membrane fusion: Evolution of the theory. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3875.
16. Espadas J., Pendin D., Bocanegra R., Escalada A., Misticoni G., Trevisan T., del Olmo A.V., Montagna A., Bova S., Ibarra B., Kuzmin P.I., Bashkurov P.V., Shnyrova A.V., Frolov V.A., Daga A. 2019. Dynamic constriction and fission of endoplasmic reticulum membranes by reticulon. *Nat. Comm.* **10**, 5327.
17. Bocharov E.V., Mineev K.S., Pavlov K.V., Akimov S.A., Kuznetsov A.S., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2017.

- Helix-helix interactions in membrane domains of biotopic proteins: Specificity and role of lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta.* **1859**, 561–576.
18. Doronin I.I., Vishnyakova P.A., Kholodenko I.V., Ponomarev E.D., Ryazantsev D.Y., Molotkovskaya I.M., Kholodenko R.V. 2014. Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer.* **14**, 295.
 19. Polozov I.V., Bezrukov L., Gawrisch K., Zimmerberg J. 2008. Progressive ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 248–255.
 20. Epand R.M. 2008. Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**, 1576–1582.
 21. Li H., Papadopoulos V. 1998. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology.* **139**, 4991–4997.
 22. Epand R.M., Sayer B.G., Epand R.F. 2005. Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes. *J. Mol. Biol.* **345**, 339–350.
 23. de Vries M., Herrmann A., Veit M. 2015. A cholesterol consensus motif is required for efficient intracellular transport and raft association of a group 2 HA from influenza virus. *Biochem. J.* **465**, 305–314.
 24. Tsfasman T., Kost V., Markushin S., Lotte V., Koptiaeva I., Bogacheva E., Baratova L., Radyukhin V. 2015. Amphipathic alpha-helices and putative cholesterol binding domains of the influenza virus matrix M1 protein are crucial for virion structure organization. *Virus Res.* **210**, 114–118.
 25. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Головкин А.О., Арутюнян А.М., Баратова Л.А., Батищев О.В., Радюхин В.А. 2018. Амфипатические CRAC-содержащие пептиды-фрагменты белка М1 вируса гриппа модулируют холестерин-зависимую активность макрофагов IC-21. *Биохимия.* **83**, 1236–1247.
 26. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Баратова Л.А., Радюхин В.А. 2019. Модуляция холестерин-зависимой активности макрофагов IC-21 пептидом, содержащим два CRAC-мотива из белка М1 вируса гриппа. *Биол. мембраны.* **36**, 271–280.
 27. Frisz J.F., Klitzing H.A., Lou K., Hutcheon I.D., Weber P.K., Zimmerberg J., Kraft M.L. 2013. Sphingolipid domains in the plasma membranes of fibroblasts are not enriched with cholesterol. *J. Biol. Chem.* **288**, 16855–16861.
 28. de Jong D.H., Singh G., Drew Bennett W.F., Arnarez C., Wassenaar T.A., Schäfer L.V., Periolo X., Tieleman D.P., Marrink S.J. 2013. Improved parameters for the MARTINI coarse-grained protein force field. *J. Chem. Theor. Comp.* **9**, 687–697.
 29. Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S., Tieleman D.P., de Vries A.H. 2007. The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* **111**, 7812–7824.
 30. Nosé S. 1984. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* **52**, 255–268.
 31. Hoover W.G. 1985. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A.* **31**, 1695–1697.
 32. Parrinello M., Rahman A. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190.
 33. Nosé S., Klein M.L. 1983. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol. Phys.* **50**, 1055–1076.
 34. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., DiNola A., Haak J.R. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690.
 35. Levental I., Lingwood D., Grzybek M., Coskun U., Simons K. 2010. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 22050–22054.
 36. Lorent J.H., Levental I. 2015. Structural determinants of protein partitioning into ordered membrane domains and lipid rafts. *Chem. Phys. Lipids.* **192**, 23–32.
 37. Levental I., Grzybek M., Simons K. 2010. Greasing their way: Lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry.* **49**, 6305–6316.
 38. Lin X., Gorge A.A., Levental I. 2018. Protein partitioning into ordered membrane domains: Insights from simulations. *Biophys. J.* **114**, 1936–1944.
 39. Lorent J.H., Diaz-Rohrer B., Lin X., Spring K., Gorge A.A., Levental K.R., Levental I. 2017. Structural determinants and functional consequences of protein affinity for membrane rafts. *Nat. Commun.* **8**, 1219.
 40. Diaz-Rohrer B.B., Levental K.R., Simons K., Levental I. 2014. Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 8500–8505.
 41. Pinigin K.V., Kondrashov O.V., Jiménez-Munigua I., Alexandrova V.V., Batiщев O.V., Galimzyanov T.R., Akimov S.A. 2020. Elastic deformations mediate interaction of the raft boundary with membrane inclusions leading to their effective lateral sorting. *Sci. Rep.* **10**, 4087.
 42. Пинигин К.В., Воловик М.В., Батищев О.В., Акимов С.А. 2020. Взаимодействие границ упорядоченных липидных доменов и амфипатических пептидов регулирует вероятность образования пор в мембранах. *Биол. мембраны.* **37**, 337–349.
 43. Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И., Акимов С.А. 2011. Стабилизация бислойной структуры рафтов за счет упругих деформаций мембраны. *Биол. мембраны.* **28**, 307–314.
 44. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С. 2020. Модуляция холестерин-зависимой активности макрофагов IC-21 CRAC-содержащими пептидами с заменами мотивообразующих аминокислот. *Биол. мембраны.* **37**, 381–395.
 45. Miller C.M., Brown A.C., Mittal J. 2014. Disorder in cholesterol-binding functionality of CRAC peptides: A molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. B.* **118**, 13169–13174.
 46. Evans E., Rawicz W. 1990. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2094.
 47. Gandhavadi M., Allende D., Vidal A., Simon S.A., McIntosh T.J. 2002. Structure, composition, and pep-

- tide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys. J.* **82**, 1469–1482.
48. Kollmitzer B., Heftberger P., Rappolt M., Pabst G. 2013. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft Matter*. **9**, 10877–10884.
 49. Sengupta D., Chattopadhyay A. 2012. Identification of cholesterol binding sites in the serotonin_{1A} receptor. *J. Phys. Chem. B.* **116**, 12991–12996.
 50. Ferraro M., Masetti M., Recanatini M., Cavalli A., Bottegoni G. 2016. Mapping cholesterol interaction sites on serotonin transporter through coarse-grained molecular dynamics. *PloS One*. **11**, e0166196.
 51. Карпунин Д.В., Акимов С.А., Фролов В.А. 2005. Формирование пор в плоских липидных мембранах, содержащих лизолипиды и холестерин. *Биол. мембраны*. **22**, 429–432.

Interaction of Peptides Containing CRAC Motifs with Lipids in Membranes of Various Composition

P. E. Volynsky¹, T. R. Galimzyanov², S. A. Akimov^{2,*}

¹*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

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

*e-mail: akimov_sergey@mail.ru

The lateral distribution of integral and peripheral proteins, as well as lipids in the plasma membranes of mammalian cells is extremely heterogeneous. It is believed that various lipid-protein domains are formed in membranes. Domains enriched in sphingomyelin and cholesterol are called rafts. It is assumed that the distribution of proteins into rafts is largely related to the presence in their primary sequence of a specific amino acid region called the CRAC-motif, which is responsible for cholesterol binding. In this work, the interaction of two peptides containing CRAC-motifs in their structure with membranes of different compositions was studied by means of molecular dynamics. It has been shown that the average number of lipid molecules in contact with each peptide is proportional to the mole fraction of lipid in the membrane. The predominant interaction of peptides with cholesterol was not observed. In addition, cholesterol did not form long-lived contacts with any amino acid or amino acid sequence. We suppose that in some cases the predominant lateral distribution of peptides and proteins containing CRAC-motifs into rafts may be due to amphipathicity of the CRAC-motif rather than due to specific strong binding of cholesterol.

Keywords: lipid membrane, ordered domains, CRAC-motif, molecular dynamics, amphipathic peptide

УДК 577.352.26

ГРАНИЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И ЭНЕРГИЯ СЖАТИЯ ЛИПИДНЫХ МОНОСЛОЕВ В ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

© 2021 г. Ю. А. Ермаков*

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

**e-mail: yury.a.ermakov@gmail.com*

Поступила в редакцию 02.11.2020 г.

После доработки 21.11.2020 г.

Принята к публикации 25.11.2020 г.

Диаграммы сжатия измерены и проанализированы для монослоев, состоящих из DOPC, POPC, DMPC, DPPC, DPhPC и DMPS на поверхности растворов ионов (KCl, CaCl₂, BeCl₂), а также в присутствии полилизина (PLL) или хлорпромазина (CPZ). Упругие свойства монослоев характеризуются площадью молекул липидов, представленной двумя областями, несжимаемой и покрытой мягкой оболочкой, размер которой зависит от латерального давления и коэффициента упругости. Это предположение хорошо описывает форму диаграмм сжатия липидов, включая липиды с насыщенными углеводородными цепями (DPPC и DMPS) в области, где они проявляют свойства жидких кристаллов (жидкое расширенное состояние, LE). В этой области все липиды демонстрируют линейную связь изменений межфазного Вольта-потенциала с эффективным значением работы сжатия монослоя. Выбрав за нулевое значение потенциала его величину в точке с латеральным давлением около 1 мН/м, оценили наклон линейного участка этой зависимости. Ее наклон позволяет идентифицировать различные типы мембраноактивных соединений, влияющих на упругие и электростатические характеристики монослоя. Оказывается, он практически не зависит от pH и ионного состава водной субфазы, но уменьшается при адсорбции полипептидов PLL на поверхности монослоя DMPS. Адсорбция небольших положительно заряженных молекул CPZ на таком монослое приводит к нелинейной зависимости потенциала от работы. Количественное описание этого отклонения хорошо согласуется с предположением, что молекулы CPZ встраиваются в монослой. Их вклад в изменение энергии монослоя и Вольта-потенциала определяется количеством внедренных в него молекул CPZ, которое связано с латеральным давлением зависимостью, аналогичной соотношению Больцмана.

Ключевые слова: липидные монослои, диаграммы сжатия, граничный (Вольта) потенциал, работа сжатия, фазовый переход

DOI: 10.31857/S0233475521020055

ВВЕДЕНИЕ

Среди различных экспериментальных подходов к изучению структурных изменений клеточных мембран, инициированных фармакологически активными соединениями, особое место занимает применение липидных моделей различного типа — липосом, бислойных липидных мембран (БЛМ), липидных структур на твердых подложках и монослоев липидов на поверхности водных растворов. Последние десятилетия накоплен огромный экспериментальный материал, в котором доказана эффективность и практическая ценность таких моделей как для исследовательских целей, так и для широкого спектра практических медико-биологически приложений. В частности, многие лекарственные и антибактериальные препараты существенным образом влияют на прони-

цаемость клеточных мембран, опосредованную структурными изменениями липидного матрикса клеточных стенок, и во многих случаях приводят к их разрушению. Поэтому в центре внимания большинства экспериментальных физико-химических исследований является взаимодействие таких препаратов с фосфолипидами, которые ответственны за изоляцию внутреннего объема клетки от внешней среды и появление локальных мембранных структур. Физико-химические условия образования таких структур, а также связанные с ними многообразные медико-биологические приложения являются предметом большого числа оригинальных и обзорных публикаций (см., например, [1–8]). Не претендуя на подробное рассмотрение биотехнологических задач, отметим опубликованный недавно обзор [9], в котором

с достаточной полнотой цитированы оригинальные исследования молекулярных механизмов, вовлеченных в гидрофобные и электростатические взаимодействия на поверхности липидных и клеточных мембран, наиболее выраженные при адсорбции крупных полипептидов.

С точки зрения физической химии липидные модели предоставляют уникальную возможность использовать широкий спектр экспериментальных методов и теоретических моделей для изучения межфазной границы, образованной гидрофобными участками фосфолипидов и их полярными группами, экспонированными в водный раствор и участвующими в образовании электрического двойного слоя. Именно в этом слое происходят основные события, обусловленные адсорбцией ионов и заряженных молекул, в том числе достаточно крупных, чтобы существенно повлиять на латеральное взаимодействие фосфолипидов в мембране и их фазовое состояние. Значительные изменения в распределении электрического поля на межфазной границе липид–вода обнаруживаются экспериментально с применением техники плоских бислойных липидных мембран в сочетании с электрокинетическими измерениями в суспензии липосом. Этими методами удается зарегистрировать изменение дипольной компоненты граничного потенциала, которая определяется как разность электрокинетического (дзета) потенциала и скачка потенциала между углеводородной частью мембраны и объемом внешнего водного раствора. Изменение дипольного потенциала происходит, например, при латеральной конденсации липидов, вызванной многовалентными катионами и макромолекулами различной структуры [10, 11]. Дипольный потенциал проявляет себя как хороший индикатор, указывающий на возможность изменений в структуре липидного матрикса биомембран. Многие факты, полученные в последние годы, показывают, что эти изменения существенным образом влияют на конформационную подвижность мембранных белков и выполнение ими важных биохимических функций [12, 13].

Одна из типичных задач в этой области связана с количественной оценкой констант адсорбции неорганических ионов и амфифильных молекул разного типа на поверхности мембран, особенно способных встраиваться в липидный матрикс. К ним относятся катионы с высокой афинностью к липидам, которые организуют микрокластеры анионных липидов [14–17] и тем самым повышают жесткость липидных мембран, а также ряд анестетиков, психотропные свойства которых обычно связывают с некоторым “разжижением” клеточных мембран [18–21]. В частности, использование техники монослоев Ленгмю-

ра позволило авторам работ [22, 23] доказать встраивание молекул хлорпромазина в монослой фосфолипидов с разной длиной углеводородных участков молекул. Однако использованные ими фосфолипиды при нормальных условиях существуют в конденсированном состоянии, тогда как внедрение посторонних молекул в жидкокристаллическом состоянии может быть намного эффективнее. Кроме того, поскольку молекулы CPZ в этих условиях приносят в монослой положительный заряд, электростатические эффекты могут существенно упростить анализ экспериментальных данных. Тем не менее приведенные в этих работах данные электрофоретических измерений выглядят недостаточно убедительными в этом отношении.

Особый интерес в этой связи представляют инициированные мембранотропными агентами изменения в латеральной упаковке липидов, наиболее заметные вблизи фазового перехода из жидкоупорядоченного (liquid expanded, LE) в конденсированное (condensed, LC) состояние липидных мембран. Как оказалось, в любом состоянии сохраняется связь между приращениями упругих и электростатических характеристик липидного монослоя, например, состоящего из молекул димиристоилпроизводного фосфатидилсерина (DMPS) [24]. Недавно нам удалось оценить распределение электрического заряда по нормали к границе вода–воздух в присутствии этого липида в LE- и LC-состояниях по результатам рентгеновской рефлектометрии в скользящей геометрии [25]. Полученные при этом экспериментальные оценки были подтверждены численным анализом молекулярно-динамических симуляций монослоя этого липида. Хорошее согласие экспериментальных и расчетных зависимостей распределения заряда на межфазной границе от латерального давления в монослое позволило установить молекулярную природу дипольной компоненты граничного потенциала и интерпретировать диаграммы сжатия этого липида и падения потенциала на межфазной границе как следствие частичной дегидратации полярных групп фосфолипида. Данная работа нацелена на уточнение механохимических и электростатических характеристик подобных межфазных границ вода–воздух в присутствии монослоя ряда анионных и нейтральных фосфолипидов в присутствии некоторых биологически значимых ионов и молекул. Основное внимание уделяется эмпирическому и количественному анализу монослоев в жидкокристаллическом состоянии как наиболее общему для фосфолипидов, присутствующих в натуральных мембранах. В качестве объектов исследования выбран ряд фосфолипидов, различающихся структурой углеводородных цепей, которые во

многим определяют механохимические характеристики монослоя, а также наиболее изученные в литературе и наших предыдущих работах насыщенные липиды DPPC и DMPS, которые демонстрируют фазовый переход из LE- в LC-состояние в диапазоне температур близком к комнатной. Это обстоятельство заметно упрощает проведение экспериментов и позволяет оценить возможное влияние электростатических взаимодействий в полярной области монослоя на адсорбцию неорганических ионов и заряженных молекул разной природы. Такие взаимодействия проявляются и в присутствии на его поверхности заряженного полипептида полилизина, который находит применение во многих медико-биологических приложениях. Предлагается количественная обработка экспериментальных диаграмм сжатия и скачка потенциала (Вольта-потенциала) на межфазной границе, которая позволяет идентифицировать основные типы влияния мембранотропных агентов на поверхность липидного монослоя — изменение состояния ионизации и гидратации полярных групп, а также количественно описать удаление амфифильных молекул, встроенных в полярную область монослоя, при повышении латерального давления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы результаты, полученные при регистрации диаграмм сжатия фосфолипидов разного типа с применением техники монослоев Ленгмюра. Измерения поверхностного давления и Вольта-потенциала проводились при комнатной температуре (18–22°C) при контроле pH вблизи нейтральных значений на коммерческом оборудовании компании Kibron Inc. (Finland). В ряде случаев использовались результаты, полученные ранее при измерении на лабораторном оборудовании, созданном В.Л.Шаповаловым и описанном в предыдущих публикациях [26, 27]. Перед каждым опытом проводилось сближение барьеров до минимального расстояния между ними для удаления возможных посторонних поверхностно-активных соединений. Их отсутствие контролировалось перемещением барьеров во всем доступном диапазоне, при котором натяжение (поверхностное давление) фонового раствора и потенциал не превышали 0.2 мН/м и 10 мВ, соответственно. После нанесения монослоя липида и удаления растворителя устанавливались нулевые значения поверхностного давления, которые отличались от фонового значения не более чем на 0.5 мН/м. Значение потенциала заметно зависит от расстояния вибрирующего электрода от поверхности и случайного положения “доменов” липида разных размеров, существующих на поверхности до появления сплошного монослоя.

По этой причине установка начального нулевого значения потенциала не гарантирует совпадения потенциалов в различных опытах, поэтому изменение потенциала в дальнейшем оценивалось только после появления заметных изменений поверхностного давления в монослое на уровне 1 мН/м. Для формирования монослоя использовались фосфолипиды компании Avanti Polar Lipids (USA): 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (POPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*L*-choline (DMPC) и 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*L*-serine (DMPS) — в большинстве случаев в виде растворов в хлороформе в исходной концентрации 10 мг/мл. Растворы насыщенных липидов DMPS и DPPC готовились из сухих препаратов, что давало возможность контролировать количество липида и использовать смесь (5/1, v/v) хлороформ—метанол (Merck, Germany), которая делает растворы более однородными при температурах ниже фазового перехода. Все фосфолипиды в концентрации 0.5 мг/мл наносились с применением шприца Hamilton на поверхность водного раствора (обычно 10 mM KCl, если не указано иное) в тefлоновой ванне MicroTrough XS (около 12000 мм²). После испарения растворителя в течение 20 мин осуществлялось сжатие монослоя со скоростью 10 мм²/мин двумя барьерами из полиоксиметилена с одновременной регистрацией латерального давления металлической иглой и Вольта-потенциала с помощью вибрирующего электрода (метод Кельвина). Фоновые растворы солей, хлорпромазина и полилизина (poly-*L*-lysine hydrobromide, PLL) с молекулярной массой 2500 готовились из реактивов компании Sigma—Aldrich (USA) в концентрациях, указанных в тексте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Диаграммы сжатия давление—площадь монослоя ряда фосфолипидов приведены на рис. 1а. Во всех экспериментах латеральное давление плавно возрастало по мере сближения барьеров, а монослои из DPPC и DMPS демонстрируют небольшое “плечо” из-за наличия фазового перехода из жидкого (LE) в конденсированное (LC) состояние. Форма кривых искажается вблизи максимальных значений давления, где происходит коллапс монослоя, связанный с нарушением мениска и краевого угла смачивания на границах тefлоновой ванны. Как показывает опыт, положение кривых в шкале площадей, но не их форма зависит от условий измерения — материала ванны и барьеров, качества растворителя липида и спосо-

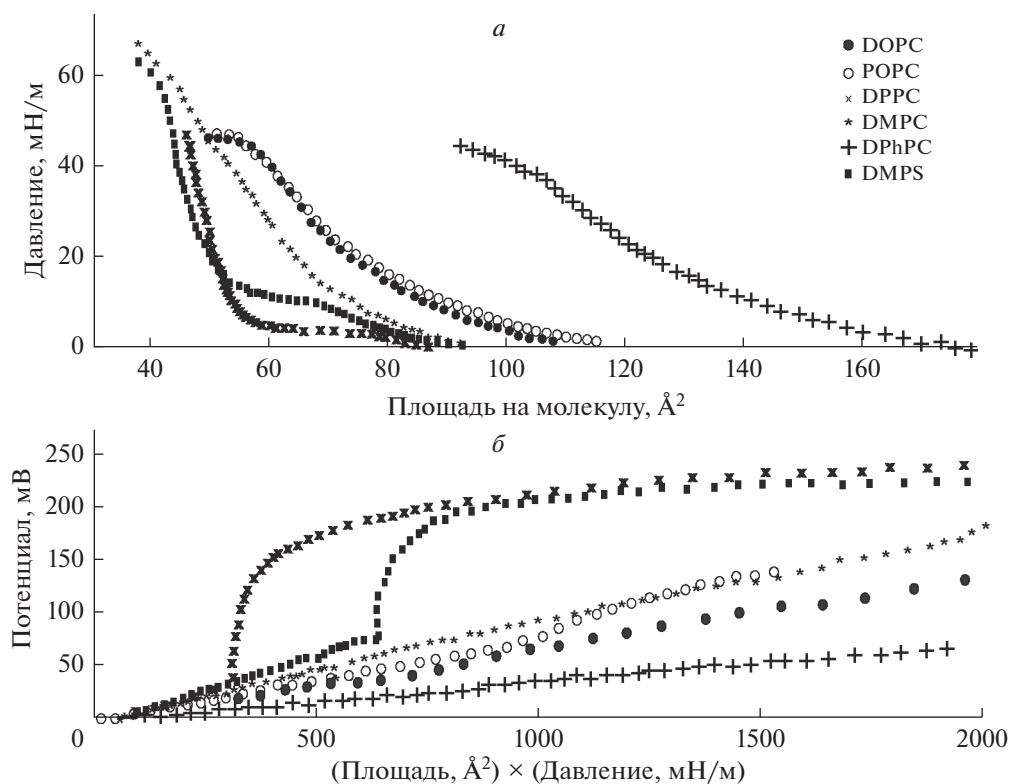


Рис. 1. Диаграммы сжатия монослоя некоторых фосфолипидов на поверхности водного раствора 10 мМ KCl (*a*) и результаты измерения Вольта-потенциала в тех же опытах (*б*). Ось абсцисс — работа по сжатию монослоя.

ба его введения в монослой, способа регистрации натяжения и т.п. По этой причине количественный анализ диаграмм сжатия может содержать плохо контролируемые ошибки. В этом отношении намного надежнее оказываются относительные изменения давления и Вольта-потенциала, которые регистрируются независимыми инструментами, но синхронно, как это предусматривает современная техника. Более того, физически более оправданным оказывается оценка изменения потенциала по отношению к энергетическим затратам на сжатие монослоя, которые представлены на рис. 1б и далее двумерным аналогом механической работы, W , как произведение измеренных в каждом опыте значений давления (мН/м) и площади (Å²). На всех экспериментальных кривых, приведенных на рис. 1б, имеется начальный линейный участок, который в случае DPPC и DMPS соответствует LE-состоянию этих монослоев. Этот участок отражает свойства именно жидкокристаллического состояния всех монослоев. Его линейность указывает, что по крайней мере некоторая часть работы, затраченной на сжатие монослоя, расходуется на зарядение межфазной границы и изменение граничного потенциала. Этот факт позволяет количественно связать механохимические и электростатические ха-

рактеристики монослоя примерно так, как это было сделано нами ранее в работах [24, 28].

Эмпирический анализ диаграмм удобно провести, опираясь на предположение о линейной связи относительного приращении площади A и латерального давления в монослое [29]. Сжатие монослоя в области давлений, которой на диаграммах давление—площадь соответствует “жидкий” LE-участок, можно представить как уменьшение избыточной площади молекул, пропорциональное приращению давления в монослое, P :

$$\frac{dA}{A - A_0} = -\frac{dP}{K_P}, \quad (1)$$

где K_P — модуль изотермического латерального сжатия. A_0 — минимальная несжимаемая площадь липидных молекул. В общем случае интегрирование уравнения (1) с граничным условием в пределе высоких давлений $A \rightarrow A_0$ приводит к экспоненциальной зависимости площади от давления.

$$A = A_0 + A_e \exp\left(-\frac{P}{K_P}\right). \quad (2)$$

Параметрами в уравнении (2) являются минимальная площадь молекулы A_0 , которая не зависит от приложенного давления как некоторое жесткое “ядро”, окруженное мягкой “оболочкой”

Таблица 1. Параметры аппроксимации диаграмм сжатия согласно уравнению (2) для кривых на рис. 1а

Липид	$A_0, \text{\AA}^2$	$A_e, \text{\AA}^2$	$P_0, \text{мН/м}$	$K_p, \text{м/мН}$	$q = E/W, \text{мВ}/(\text{\AA}^2 \text{мН/м})$
DOPC	50.4	53.9	0.49	16.8	0.070
POPC	51.1	59.1	0.29	15.9	0.068
DMPC	49	36	0.77	13.4	0.094
DPhPC	97.5	74.5	0.28	15.6	0.038
DPPC (LE)	67.5	17.8	0.26	3.8	0.14
DMPS (LE)	51.8	42.8	1.38	11.37	0.12

с площадью, равной A_e при нулевом давлении. Результаты аппроксимации диаграмм сжатия, представленных на рис. 1а, приведены в табл. 1, где параметры для DPPC и DMPS относятся к начальному участку диаграмм до области фазового перехода. В последней колонке таблицы приведен наклон линейных участков для этих липидов, который определяет коэффициент пропорциональности $q = E/W$ между изменением потенциала E и двумерным аналогом работы по сжатию монослоя W . Параметр P_0 отражает значение давления вблизи начала координат и его небольшие значения характеризуют достаточно высокое качество аппроксимации.

Опираясь на отмеченный выше факт линейной связи Вольта-потенциала и работы по сжатию монослоя, полезно сопоставить его с наличием в субфазе веществ, способных повлиять на механические и электрические характеристики монослоев в той области, где поведение липидов соответствует жидкокристаллическому состоянию. На рис. 2 и 3 приведены результаты измерений для монослоев DPPC и DMPS, полученные при разном ионном составе водной среды. При построении обоих рисунков изменения потенциала оценивались как разность его значений и величины потенциала, измеренной в начале формирования монослоя, условно отнесенному к давлению 1 мН/м. Конечно, во всех опытах полное изменение потенциала по мере сжатия монослоя зависело от типа ионов и концентрации фонового электролита. В случае монослоев из DMPS это хорошо заметно в серии экспериментальных кривых, опубликованных нами ранее [26]. В известной степени зависимость полного потенциала от концентрации ионов и pH отражает их влияние на степень ионизации и поверхностный заряд монослоя DMPS. Примерно так же в опытах с DPPC граничный потенциал зависел от типа катионов, присутствующих в растворе электролита. Однако в данном контексте нас интересует, в какой мере заряд межфазной границы мо-

нослоя на поверхности электролита отражает работу, затраченную на его сжатие.

$$W = A_0 P + A_e P \exp\left(-\frac{P}{K_p}\right). \quad (3)$$

Поскольку все кривые сведены на рисунке к начальной точке, в которой значение потенциала принято равным нулю, то при построении данных на рисунках игнорировалось различие ионной силы, pH и тип электролита в субфазе.

Как можно видеть из данных, представленных на рис. 2 и 3, линейная связь изменений потенциала и работы по сжатию монослоя присутствует во всех опытах. Этот результат представляется несколько неожиданным, поскольку катионы сильно различаются по эффективности взаимодействия с полярными группами фосфолипидов, а величина pH влияет на состояние их ионизации. Более того, хорошо известно, что адсорбция неорганических катионов, присутствующих в субфазе, отражается на абсолютной величине граничного потенциала, включая его диффузную и дипольную компоненты [12, 17]. Однако при параллельном смещении кривых к нулевому начальному значению становится заметно, что коэффициент пропорциональности (наклон линейного участка) практически не зависит от состава электролита.

Существенно иной результат был получен в присутствии крупных положительно заряженных органических молекул, полипептидов на основе лизина. На рис. 4 приведены данные, полученные при регистрации изотерм сжатия и потенциала монослоев DMPS при наличии поликатионов PLL в разной концентрации. На рисунке представлены результаты для значений потенциала, отнесенных к условному нулевому значению в тех же координатах, как и на предыдущих. Хорошо виден линейный участок, наклон которого уменьшается с увеличением концентрации PLL в субфазе почти вдвое вплоть до предельно малой

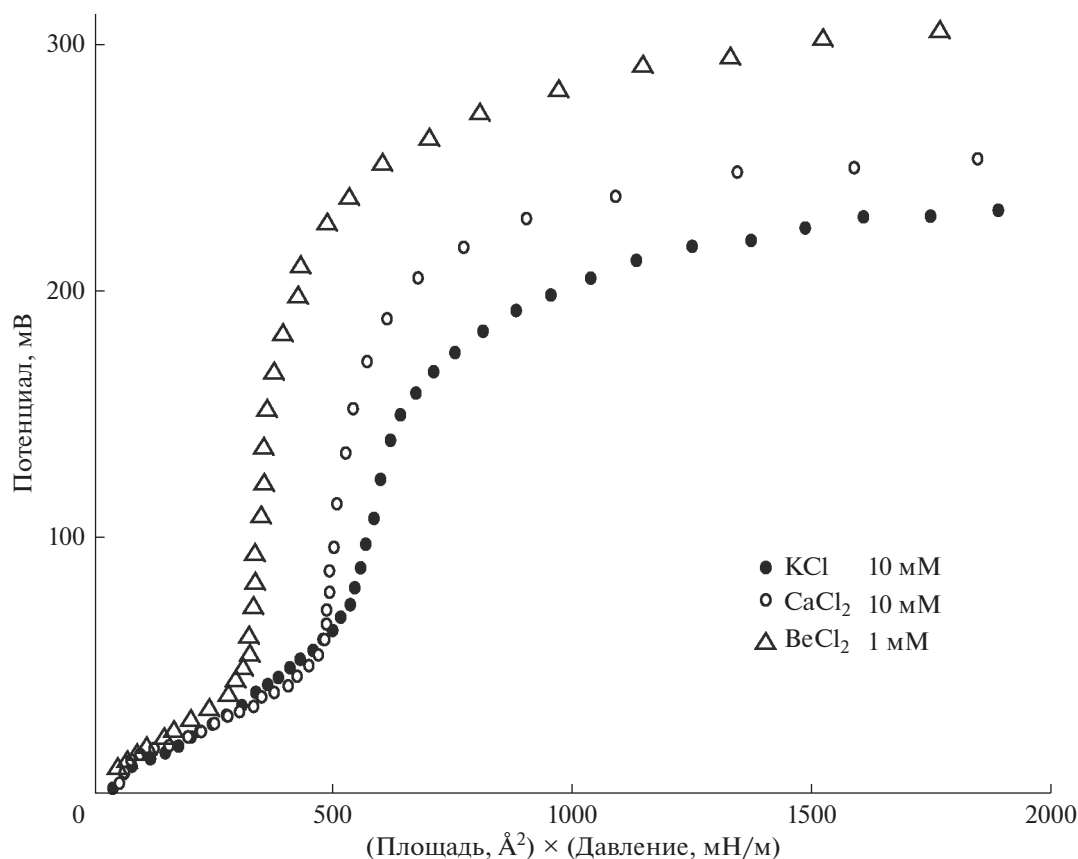


Рис. 2. Вольт-потенциал монослоев DPPC на поверхности водных растворов указанных электролитов при сжатии монослоя. Ось абсцисс — работа по сжатию монослоя. Количество экспериментальных точек здесь и далее уменьшено для ясности изображения.

величины, равной $0.06 \text{ мВ}/(\text{Å}^2 \text{ мН/м})$. Это значение соответствует, по-видимому, полному заполнению, характерному для адсорбции полилизина на поверхности липидных мембран из анионных фосфолипидов, включая фосфатидилсерин. Судя по известным данным электрокинетических измерений в суспензии липосом из отрицательно заряженных фосфолипидов, отрицательный дзета-потенциал таких липосом в присутствии поликатионов резко уменьшается, меняет знак и достигает плато при количестве полилизина, соизмеримым с количеством липида, присутствующем в суспензии [30–32]. В экспериментах, результат которых представлен на рис. 4, изменение наклона линейного участка не может быть отнесено только к изменению поверхностного заряда, которое, судя по данным рис. 3, практически не влияет на этот наклон. Уменьшение наклона линейного участка в данном случае отражает понижение вклада механохимической работы в заряде межфазной границы. Это, возможно, означает, что присутствие полимерного слоя удерживает молекулы воды в полярной области липида, тем самым понижая их влияние на изме-

нение граничного потенциала. Это предположение основано на результатах молекулярно-динамического анализа изотерм сжатия монослоя DMPS, проведенного нами ранее в работе [25]. Как следует из этого анализа, основной вклад в изменение граничного потенциала в области LE вносят дипольные моменты молекул воды, ассоциированных с полярными группами, ориентация и количество которых уменьшается в полярной области монослоя по мере увеличения латерального давления. Естественно предположить, что присутствие полилизина на поверхности монослоя определяется в основном взаимодействием с липидом лизинового основания полимера. Например, вызванным ими нарушениями в сети водородных связей между водой и фосфатными группами молекул липида, как это происходит при адсорбции отдельных молекул лизина [33]. Это предположение не противоречит данным, полученным ранее с применением рентгеновской рефлектометрии в присутствии высокомолекулярных форм полилизина [34–36]. Однако исследования, проводимые в настоящее время в этом направлении, еще не завершены, и получен-

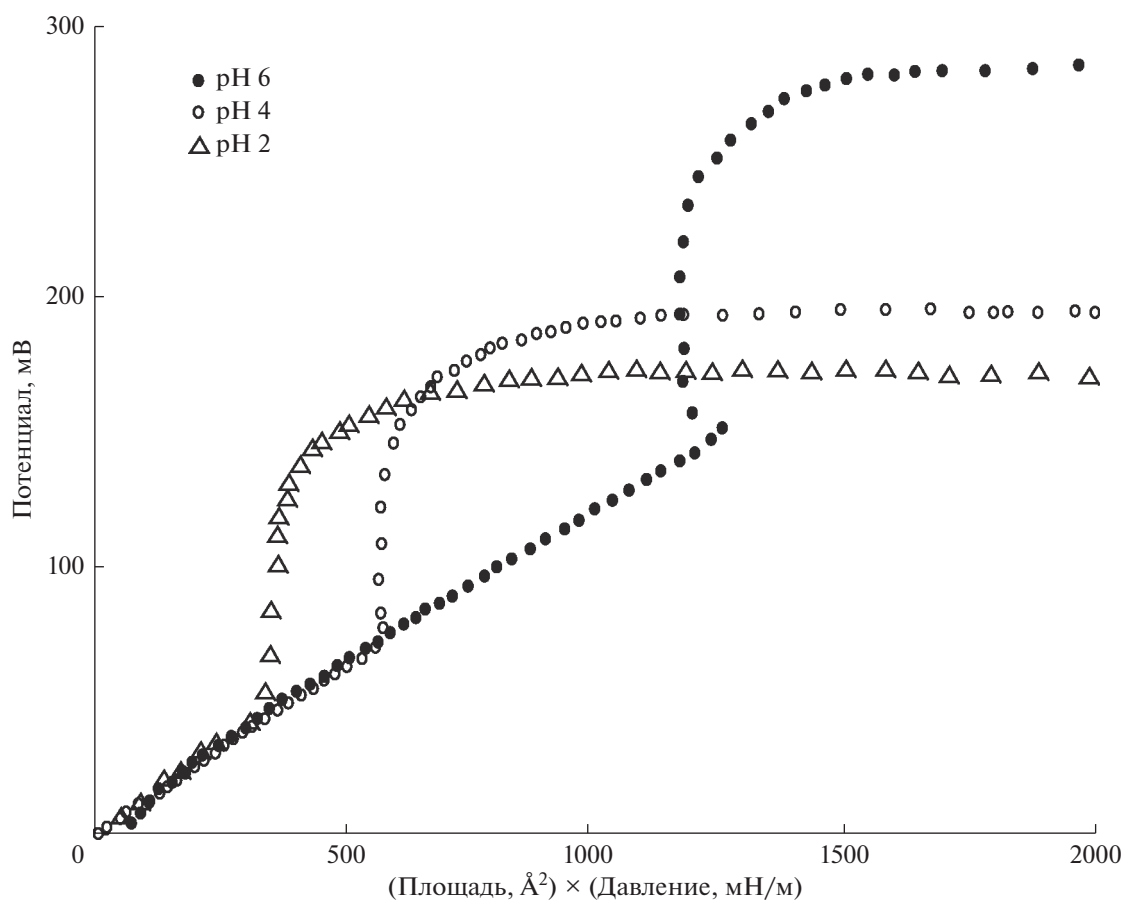


Рис. 3. Вольта-потенциал монослоев DMPS на поверхности водного раствора 10 мМ KCl при указанных значения pH по данным работы [26]. Ось абсцисс — работа по сжатию монослоя.

ных результатов еще недостаточно для подтверждения такой интерпретации.

Особый интерес представляют измерения диаграмм сжатия в тех случаях, когда присутствующие в субфазе заряженные молекулы способны встраиваться в монослой. В литературе описаны исследования с применением монослойной техники некоторых анестетиков, среди которых наиболее изучен хлорпромазин и родственные ему соединения [37]. Количественное описание процесса встраивания молекул CPZ в монослой из фосфатидилхолинов проведено в работе [22] на основании смещения диаграмм сжатия в шкале площадей. Присутствие неорганических катио-

нов заметно влияет на этот процесс, поскольку молекулы CPZ также несут положительный заряд в нормальных условиях [23]. Однако ожидаемые в этом случае электростатические эффекты оставались малоизученными. Предлагаемый выше подход, основанный на прямой регистрации Вольта-потенциала монослоев из отрицательно заряженного липида DMPS позволяет получить важные дополнительные сведения о молекулярном механизме встраивания CPZ.

На рис. 5 приведены экспериментальные зависимости латерального давления в монослое DMPS от площади на молекулу фосфолипида, измеренные при нескольких концентрациях CPZ в фоно-

Таблица 2. Параметры, используемые для аппроксимации данных рис. 4 с применением соотношения (2)

Концентрация CPZ, мкМ	$A_0, \text{\AA}^2$	$A_e, \text{\AA}^2$	$P_0, \text{мН/м}$	$K_p, \text{м/мН}$
0	51.6	35.1	0.55	10.0
1	61.8	42.9	0.86	18.4
10	60.9	58.6	1.44	24.3
100	72.1	49.4	3.97	21.4

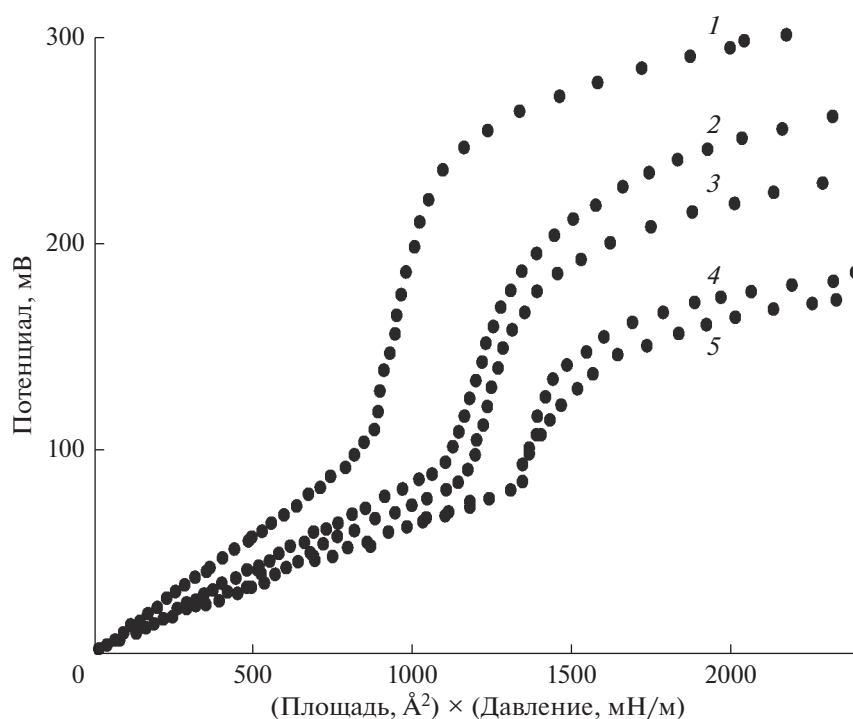


Рис. 4. Вольт-потенциал монослоев DMPS, измеренный в присутствии полилизина PLL-12 в субфазе с 10 мМ KCl в концентрации, равной 0, 0.27, 0.66, 3.32 и 26.6 мкг/мл для кривых 1, 2, 3, 4 и 5 соответственно. Ось абсцисс — работа по сжатию монослоя.

вом электролите. Теоретические кривые построены по формуле (2) с параметрами, найденными при аппроксимации экспериментальных данных и приведенными в табл. 2. Следует отметить, что аппроксимация этих данных проведена без дополнительных условий. Например, не фиксируя минимальный размер площади “жесткого ядра” молекул липида A_0 . В данном случае этот размер может оставаться неизменным, если полагать, что посторонние молекулы CPZ включаются только в “мягкое” окружение липида. Однако такое допущение потребует дополнительных сведений о структуре комплексов липид–CPZ. Тем не менее можно заключить, что встраивание молекул CPZ приводит не только к увеличению эффективного размера молекул липида, но и существенно повышает механическую жесткость монослоя, а значит, и работу по его сжатию. Обращает на себя внимание участок кривых, отражающий фазовые изменения в монослое, который перемещается в область высоких значений давления. Этот факт заставляет предположить, что присутствие молекул CPZ в монослое препятствует сближению молекул фосфолипида и образованию конденсированной LC-фазы. По мере увеличения давления эти молекулы удаляются из монослоя, и LC-фаза реализуется.

В контексте приведенных выше результатов требуется оценить взаимосвязь электростатических и механохимических характеристик липида в присутствии заряженных молекул CPZ. При этом следует учесть, что молекулы CPZ имеют $pK = 8.6$ [38], т.е. в нормальных условиях они протонированы и несут единичный положительный заряд, тогда как полярные группы фосфатидилсерина ионизованы полностью и имеют суммарный единичный отрицательный заряд с pK около 3.0 (см., например, [39] и результаты электрокинетических измерений в суспензии липосом [10]). Эти факты известны в литературе [18, 40] и подтверждены нами измерением дзета-потенциала липосом из фосфатидилсерина в присутствии хлорпромазина (рис. 6). Электрокинетические данные доказывают, что в области нейтральных pH адсорбция молекул CPZ меняет среднюю плотность поверхностного заряда липидных мембран и может даже менять ее знак. Измерение дзета-потенциала позволяет оценить величину поверхностного потенциала коллоидных частиц (липосом), а затем связать его с плотностью заряда поверхности, учитывая распределение CPZ между поверхностью и объемом раствора. Подробное описание теоретической модели электрического двойного слоя, используемой для анализа электрокинетических данных, приведено в обзоре [41]. Здесь ограничимся лишь основными

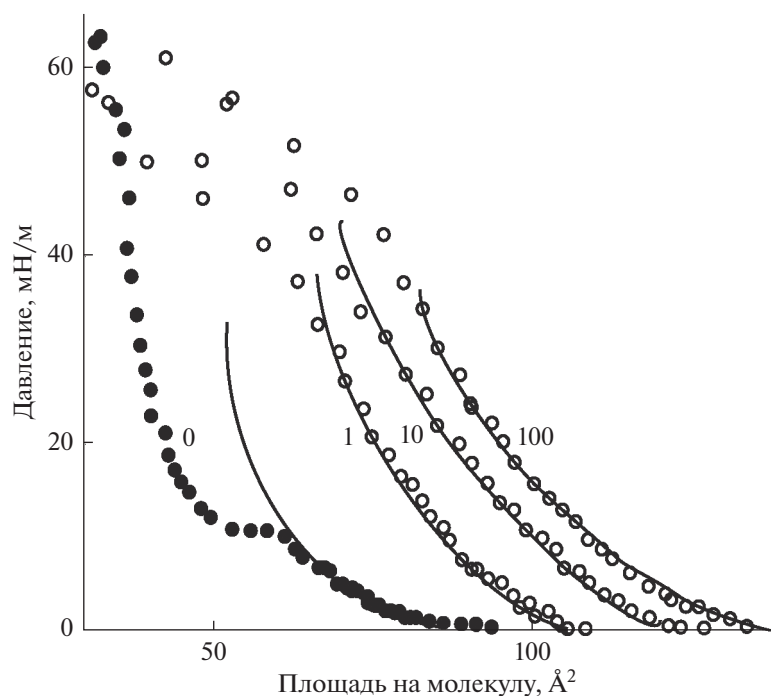


Рис. 5. Диаграммы сжатия монослоя DMPS (черные точки) и в присутствии хлорпромазина (светлые точки) в субфазе 10 мМ KCl в концентрации, указанной около кривых в мкМ. Сплошные теоретические кривые построены по уравнению (2) с параметрами, указанными в табл. 2.

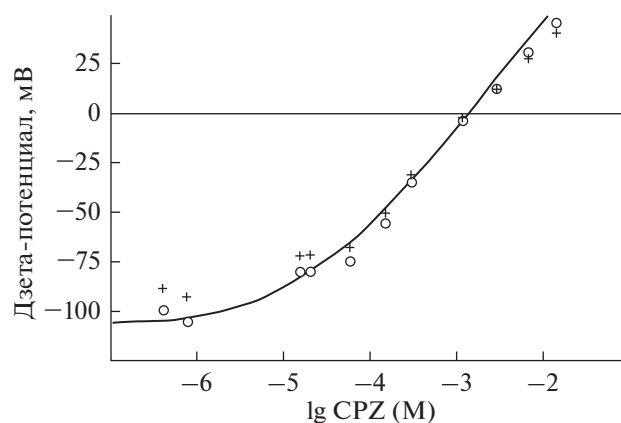


Рис. 6. Зависимость электрокинетического дзета-потенциала липосом из фосфатидилсерина в растворе 10 мМ KCl, измеренная при увеличении концентрации CPZ в суспензии. Сплошная кривая построена в рамках модели Гуи–Чемпмена–Штерна с учетом количества адсорбированных на поверхности молекул CPZ, пропорционального их приповерхностной концентрации.

результатами, полученными при количественном анализе результатов, представленных на рис. 5–7, и необходимыми для решения поставленных в данной работе задач.

Для описания процесса заряжения межфазной границы работу по сжатию монослоя W прежде всего следует дополнить оценкой энергии, затраченной на встраивание в него заряженных молекул. Концентрация заряженных молекул хлор-

промазина вблизи поверхности C_s связана с их объемной концентрацией в субфазе C_0 соотношением Больцмана:

$$C_s = C_0 \exp \frac{e\phi}{kT}. \quad (4)$$

Поверхностный потенциал ϕ в этом соотношении представляет собой падение потенциала вблизи поверхности в диффузной части граничного по-

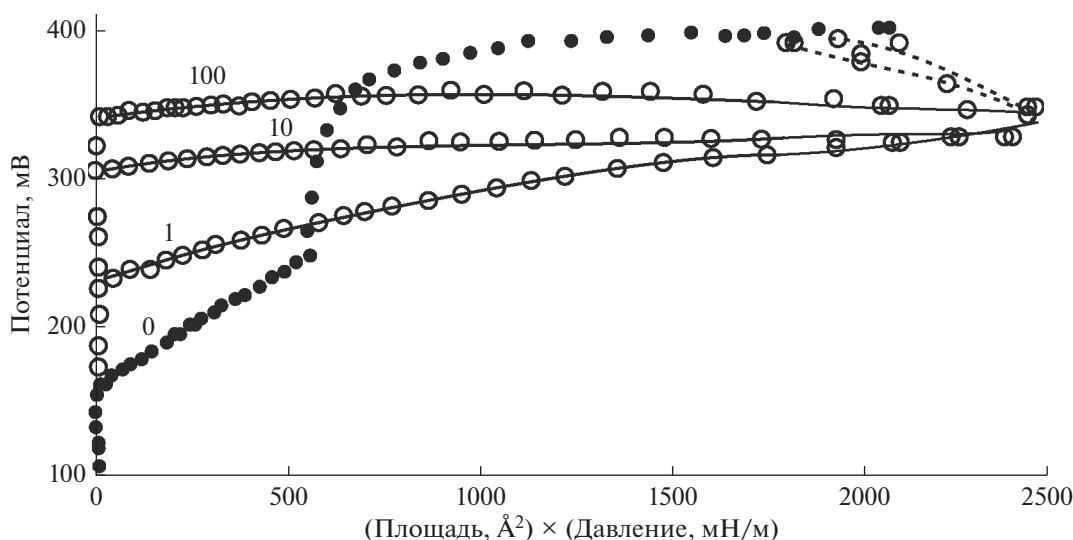


Рис. 7. Вольта-потенциал монослоя DMPS, измеренный в присутствии CPZ в субфазе 10 мМ KCl в концентрации, указанной около кривых в мкМ. Ось абсцисс — работа по сжатию монослоя. Сплошные теоретические кривые построены по уравнению (8) с параметрами, указанными в табл. 2 и 3, пунктиром показана область перехода от LE- к LC-состоянию монослоя после удаления из него молекул CPZ.

тенциала, который влияет на электрофоретическую подвижность липосом. Его величина зависит от ионного состава среды и в рамках модели Гуи—Чепмена—Штерна дает возможность оценить вклад адсорбированных ионов в изменение поверхностного заряда. При распределении молекул между липидом и водным раствором поверхностная плотность встроенных в бислой молекул пропорциональна их приповерхностной концентрации $C_L = K_d C_s$, где, согласно электрокинетическим измерениям, $K_d = 0.5 \text{ М}^{-1}$. С другой стороны, встраиванию молекул в монослой препятствует поверхностное давление, а приращение площади, приходящейся на каждую молекулу фосфолипида, экспоненциально связано с давлением в монослое (2). Встраивание новых молекул в монослой требует затрат энергии и сопровождается увеличением давления в монослое. Эта дополнительная энергия может быть учтена выражением, аналогичным соотношению Больцмана (4), в котором концентрация встроенных молекул CPZ связана с давлением в монослое выражением

$$C_L = K_{Ld} \exp\left(-\frac{P}{K_p}\right). \quad (5)$$

Используя соотношения (4) и (5), нетрудно получить линейную зависимость диффузной компоненты потенциала ϕ от давления в монослое:

$$\frac{e\phi}{kT} = -\frac{P}{K_p} + \text{const}, \text{ где } \text{const} = \ln\left(\frac{K_{Ld}}{K_d C_0}\right). \quad (6)$$

Это означает, что величина потенциала при встраивании положительно заряженных молекул в монослой с увеличением давления должна смещаться в отрицательном направлении, приближаясь к его значению для исходного монослоя отрицательно заряженных молекул DMPS. В конечном итоге работа по сжатию монослоя W описывается выражением:

$$W = AP + \frac{kT}{e} \left[-\frac{P}{K_p} + \text{const} \right]. \quad (7)$$

Предполагая, как и прежде, что заряд межфазной границы пропорционально работе, затраченной на сжатие монослоя, экспериментальные зависимости рис. 7 были аппроксимированы выражением (8)

$$\Delta E = N \left[A_0 P + A_e P \exp\left(-\frac{P}{K_p}\right) \right] + D \left[-\frac{P}{K_p} + \text{const} \right] + \phi_0, \quad (8)$$

где помимо параметров, определенных ранее и указанных в табл. 2, использованы дополнительные параметры N , D , const и ϕ_0 , численные значения которых найдены при аппроксимации данных и приведены в табл. 3. Изменение концентрации CPZ приводит к смещению кривых на величину, определяемую значением ϕ_0 . Поскольку значение потенциала в начале каждого опыта

Таблица 3. Параметры, используемые для аппроксимации данных рис. 7 с применением соотношения (8), дополняющие данные табл. 2

Концентрация CPZ, мкМ	N	D	const	ϕ_0 , мВ
0	55	0	0	–165
1	32	50	14	460
10	14	50	14	390
100	12	50	14	360

определяется во многом случайными причинами, то более информативным параметром оказывается соотношение двух других слагаемых в выражении (9). Значения N и D определяют, соответственно, вклад в потенциал упругих характеристик монослоя и процесса “выдавливания” из него заряженных молекул CPZ. Теоретические зависимости на рис. 7 построены без приведения значений потенциала к началу координат. Они достаточно хорошо описывают полученную экспериментально взаимосвязь Вольта-потенциала и энергию монослоя при встраивании в него заряженных молекул в той области, где начальный наклон кривых несколько уменьшается по мере сжатия монослоя. Однако затем значения потенциала снова возрастают и приближаются к максимальным значениям, характерным для исходного монослоя DMPS. Эта особенность кривых вблизи точки фазового перехода заметна также у некоторых кривых рис. 3, где работа по сжатию монослоя частично убывает при почти неизменной величине потенциала. Этот факт отражает повышенную “податливость” монослоя к сжатию, поскольку более конденсированное его состояние оказывается энергетически выгоднее. А значит, кооперативный процесс фазового перехода и возвращение монослоя в конденсированное состояние происходит только после удаления посторонних молекул. Конечно, посторонними можно считать даже молекулы воды в гидратной оболочке фосфолипида, которые в какой-то степени препятствуют сближению молекул фосфолипида. Однако в случае заряженных молекул CPZ этот эффект становится более заметным. Судя по оценкам, сделанным на основании приведенной выше модели, участие этих молекул в повышении упругих свойств монослоя и их вклад в механическую работу его сжатия (параметр D в табл. 3) остается одинаковым, а доля энергии латерального взаимодействия молекул липидов (параметр N) убывает по мере увеличения концентрации CPZ в субфазе, поскольку уменьшается область контакта между молекулами фосфолипидов. Конечно, такая интерпретация остается во многом умозрительной пока не получит незави-

симого экспериментального подтверждения и подробного анализа подобных систем, смоделированных методами молекулярной динамики.

Резюмируя приведенные выше факты, можно утверждать, что взаимосвязь Вольта-потенциала с механохимическими характеристиками монослоя отражается на его зависимости от работы по латеральному сжатию липидов, которая может существенно различаться в LE- и LC-состояниях. В данной работе основное внимание уделяется жидкокристаллическому состоянию липидов, характерному для большинства фосфолипидов в биологических мембранах. Как видно из приведенных данных, в тех областях площадей и давлений, где состояние липидов остается жидкокристаллическим, наблюдается линейная связь граничного потенциала и работы по сжатию монослоев. В тех случаях, когда присутствующие в водном окружении ионы влияют только на ионизацию полярных групп и величину поверхностной плотности заряда, эта работа расходуется на зарядение монослоя одинаковым образом для всех типов ионов. Адсорбция крупных полипептидов на основе лизина уменьшает вклад механохимических изменений в монослое в зарядение границы раздела липид–вода, хотя такие пептиды не погружаются в монослой и формируют полимерный слой в области диффузной части электрического двойного слоя. Заряженные органические молекулы, способные встраиваться в липидные мембраны и монослои, приводят к тому, что их вклад в механохимические изменения в монослое убывает по мере его сжатия. В этом случае нарушается линейная зависимость граничного потенциала от работы по сжатию монослоя, поскольку существенный вклад в эту работу вносит процесс удаления заряженных молекул. Выше использовано одно из возможных количественных описаний таких зависимостей в предположении, что энергия проникновения молекул в липидный монослой описывается зависимостью от латерального давления, аналогичной по форме соотношению Больцмана. Однако простая экспериментальная корреляция изменений Воль-

та-потенциала и работы сжатия монослоя позволяет различать качественно разные варианты взаимодействия ионов и молекул с поверхностью мембран, даже не обращаясь к конкретным молекулярным моделям.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Laroche G., Carrier D., Pezolet M. 1988. Study of the effect of poly-L-lysine on phosphatidic acid and phosphatidylcholine/phosphatidic acid bilayers by Raman spectroscopy. *Biochemistry*. **27**, 6220–6228.
- Kim J., Mosior M., Chung L.A., Wu H., McLaughlin S. 1991. Binding of peptides with basic residues to membranes containing acidic phospholipids. *Biophys. J.* **60** (1), 135–148.
- Rink T., Bartel H., Jung G., Bannwarth W., Boheim G. 1994. Effects of polycations on ion channels formed by neutral and negatively charged alamethicins. *Eur. Biophys. J.* **23** (3), 155–165.
- Arbuzova A., Wang L., Wang J., Hangyas-Mihalyne G., Murray D., Honig B., McLaughlin S. 2000. Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry*. **39**, 10330–10339.
- Harries D., May S., Ben Shaul A. 2002. Adsorption of charged macromolecules on mixed fluid membranes. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. **208** (1–3), 41–50.
- Wu Z., Cui Q., Yethira A. 2013. Why do arginine and lysine organize lipids differently? Insights from coarse-grained and atomistic simulations. *J. Phys. Chem. B*. **117**, 12145–12156.
- Vorobyov I., Allen T.W. 2011. On the role of anionic lipids in charged protein interactions with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1808**, 1673–1683.
- Doltchinkova V., Vitkova V. 2020. Polylysine effect on thylakoid membranes. *Biophys. Chem.* **266**, 106440.
- Alvares D.S., Cabrera M.P.S., Neto J.R. 2016. Strategies for exploring electrostatic and nonelectrostatic contributions to the interaction of helical antimicrobial peptides with model membranes. In: *Advances in biomembranes and lipid self-assembly*. London, UK: Elsevier Inc., p. 43–73.
- Ермаков Ю.А., Авербах А.З., Арбузова А.Б., Сухарев С.И. 1998. Липидные и клеточные мембраны в присутствии гадолиния и других ионов с высоким сродством к липидам. 2 Дипольная компонента градиентного потенциала мембран с разным поверхностным зарядом. *Биол. мембраны*. **15** (3), 330–341.
- Ермаков Ю.А. 2005. Биоэлектрохимия липидных мембран. *Рос. хим. журн.* **49** (5), 114–121.
- Ermakov Y.A., Averbakh A.Z., Yusipovich A.I., Sukharev S. 2001. Dipole potentials indicate restructuring of the membrane interface induced by gadolinium and beryllium ions. *Biophys. J.* **80** (4), 1851–1862.
- Ermakov Yu., Kamaraju K., Dunina-Barkovskaya A., Vishnyakova K., Egorov Y., Anishkin A., Sukharev S. 2017. High-affinity interactions of beryllium (2+) with phosphatidylserine result in a cross-linking effect reducing surface recognition of the lipid. *Biochemistry*. **56**, 5457–5470.
- Hammoudah M.M., Nir S., Isac T., Kornhouser R., Stewart T.P., Hui S.W., Vaz W.L.C. 1979. Interaction of La^{3+} with phosphatidylserine vesicles: Binding, phase transition, leakage and fusion. *Biochim. Biophys. Acta*. **558**, 338–343.
- Han K.-H., Tong Y., Huang W., Wang E. 2002. Study of the interaction between lanthanide ions and a supported bilayer lipid membrane by cyclic voltammetry and ac impedance. *J. Electroanal. Chem.* **523**, 136–141.
- Li X., Zhang Y., Ni J., Chen J., Hwang F. 1994. Effect of lanthanide ions on the phase behaviour of dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar liposomes. *J. Inorg. Biochem.* **53**, 139–149.
- Ermakov Y.A., Makhmudova S.S., Averbakh A.Z. 1998. Two components of boundary potentials at the lipid membrane surface: electrokinetic and complementary methods studies. *Coll. Surf. A – Physicochem. Eng. Aspects*. **140** (1–3), 13–22.
- Barthel D., Zschoernig O., Lange K., Lenk R., Arnold K. 1988. Interaction of electrically charged drug molecules with phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **945**(2), 361–366.
- Jutila A., Soderlund T., Pakkanen A.L., Huttunen M., Kinnunen P.K. 2001. Comparison of the effects of clozapine, chlorpromazine, and haloperidol on membrane lateral heterogeneity. *Chem. Phys. Lipids*. **112**(2), 151–163.
- Nussio M.R., Sykes M.J., Miners J.O., Shapter J.G. 2009. Kinetics membrane disruption due to drug interactions of chlorpromazine hydrochloride. *Langmuir*. **25** (2), 1086–1090.
- Steinkopf S., Simeunovic A., Bustad H.J., Ngo T.H., Sveaass H., Gjerde A.U., Holmsen H. 2010. pH-dependent interaction of psychotropic drug with glycerophospholipid monolayers studied by the Langmuir technique. *Biophys. Chem.* **152** (1–3), 65–73.
- Agasosler A.V., Holmsen H. 2001. Chlorpromazine associates with phosphatidylserines to cause an increase in the lipid's own interfacial molecular area role of the fatty acyl composition. *Biophys. Chem.* **19**, 37–47.
- Agasosler A.V., Tungodden L.M., Cejka D., Bakstad E., Sydnes L.K., Holmsen H. 2001. Chlorpromazine-induced increase in dipalmitoylphosphatidylserine surface area in monolayers at room temperature. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 817–825.
- Ермаков Ю.А. 2011. Взаимосвязь механических и электростатических характеристик монослоя димристоилфосфатидилсерина. *Биол. мембраны*. **28** (5), 408–414.

25. Ermakov Yu.A., Asadchikov V.E., Roshchin B.S., Volkov Yu.O., Khomich D.A., Nesterenko A.M., Tikhonov A.M. 2019. Comprehensive study of the LE–LC phase transition in DMPS monolayers: Surface pressure, Volta potential, X-ray reflectivity and MD modeling. *Langmuir*. **35**, 12326–12338.
26. Ermakov Y.A., Kamaraju K., Sengupta K., Sukharev S. 2010. Gadolinium ions block mechanosensitive channels by altering the packing and lateral pressure of anionic lipids. *Biophys. J.* **98** (6), 1018–1027.
27. Shapovalov V.L. 1998. Interaction of DPPC monolayer at air–water interface with hydrophobic ions. *Thin Solid Films*. **327–329**, 599–602.
28. Молотковский Р.Ю., Ермаков Ю.А. 2014. Два возможных подхода к количественному анализу диаграмм сжатия липидного монослоя. *Биол. мембраны*. **31** (6), 410–415.
29. Cevc G., Marsh D. 1987. *Cell biology: A series of monographs*. New York: Willey-Interscience Publ. **V. 5**. 1442 p.
30. Marukovich N., McMurray M., Finogenova O., Nesterenko A., Batishchev O., Ermakov Yu. 2013. Interaction of polylysines with the surface of lipid membranes: The electrostatic and structural aspects. In: *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Ed. Iglic A. et al. Amsterdam, London, San Diego: Elsevier Acad. press, p. 139–166.
31. Финогенова О.А., Батищев О.В., Инденбом А.В., Золотаревский В.И., Ермаков Ю.А. 2009. Адсорбция полилизина на липидных мембранах и слюде. *Биол. мембраны*. **26** (5), 429–436.
32. Финогенова О.А., Филинский Д.В., Ермаков Ю.А. 2008. Электростатические эффекты при адсорбции и десорбции полилизина на поверхности липидных мембран разного состава. *Биол. мембраны*. **25** (3), 217–226.
33. Марукович Н.И., Нестеренко А.М., Ермаков Ю.А. 2014. Структурные факторы во взаимодействии лизина и полилизина с липидными мембранами. *Биол. мембраны*. **31** (6), 401–409.
34. Асадчиков В.Е., Тихонов А.М., Волков Ю.О., Рошин Б.С., Ермаков Ю.А., Рудакова Е.Б., Дьячкова И.Г., Нуждин А.Д. 2017. Рентгеновское исследование структуры монослоев фосфолипида на поверхности воды. *Письма в ЖЭТФ*. **106** (8), 515–520.
35. Тихонов А.М., Асадчиков В.Е., Волков Ю.О., Рошин Б.С., Ермаков Ю.А. 2017. Рентгеновская рефлектометрия монослоев DMPS на водной подложке. *ЖЭТФ*. **152**(12), 1233–1240.
36. Ермаков Ю.А., Асадчиков В.Е., Волков Ю.О., Нуждин А.Д., Рошин Б.С., Хонкимаки В., Тихонов А.М. 2019. Электростатические и структурные эффекты при адсорбции полилизина на поверхности монослоя DMPS. *Письма в ЖЭТФ*. **109** (5), 340–346.
37. Steinkopf S., Simeunovic A., Bustad H.J., Ngo T.H., Sveaass H., Gjerde A.U., Holmsen H. 2010. pH-dependent interaction of psychotropic drug with glycerophospholipid monolayers studied by the Langmuir technique. *Biophys. Chem.* **152** (1–3), 65–73.
38. Wajnberg E., Tabak M., Nussenzweig P.A., Lopes C.M.B., Louro S.R.W. 1988. pH dependent phase transition of chlorpromazine micellat solutions in the physiological range. *Biochim. Biophys. Acta*. **944**, 185–190.
39. Eisenberg M., Gresalfi T., Riccio T., McLaughlin S. 1979. adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry*. **18** (23), 5213–5223.
40. Bennouna M., FerreiraMarques J., Banerjee S., Caspers J., Ruyschaert J.M. 1997. Interaction of chlorpromazine with phospholipid membranes: A monolayer and a microelectrophoresis approach. *Langmuir*. **13** (24), 6533–6539.
41. Ермаков Ю.А. 2000. Равновесие ионов вблизи липидных мембран — эмпирический анализ простейшей модели. *Коллоидн. журн.* **6** (4), 437–449.

Boundary Potential and the Energy of Lipid Monolayer Compression at the Liquid Expanded State

Yu. A. Ermakov*

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

*e-mail: yury.a.ermakov@gmail.com

Compression diagrams were obtained and analyzed for monolayers composed from DOPC, POPC, DMPC, DPPC, DphPC, and DMPS at the surface of solutions containing KCl, CaCl₂, or BeCl₂ and in the presence of polylysine (PLL) or chlorpromazine (CPZ). Elastic properties of monolayers are characterized by the area of lipid molecules, presented as an incompressible area with a soft shell, the size of which exponentially depends on the lateral pressure and the coefficient of elasticity. This assumption describes well the shape of the lipid compression diagrams, including lipids with saturated hydrocarbon chains (DPPC and DMPS) in the region, where they exhibit liquid crystal properties (liquid expanded state, LE). All lipids show changes in the interfacial Volta potential in this region; these changes linearly depend on the effective value of the work applied to compress the monolayer. Choosing for zero value of the Volta potential its magnitude at the point with a lateral pressure of about 1 mN/m, the slope of linear section of this dependence was estimated. The slope of this dependence makes it possible to identify the different type of membrane-active compounds affected on the elastic and electrostatic characteristics of the monolayer. It turned out that this slope is practi-

cally independent of the pH and ionic composition of the aqueous subphase but decreases upon adsorption of PLL polypeptides on the surface of the DMPS monolayer. The adsorption of small positively charged CPZ molecules on this monolayer leads to the deviation in the potential vs work dependence from the linear. A quantitative description of this deviation is in a good agreement with the assumption that CPZ molecules are incorporated into the monolayer. Their contribution to the change in the energy of the monolayer and the Volta potential is described at varied CPZ bulk concentration by the amount of incorporated molecules affected on lateral pressure similar to the Boltzmann relation.

Keywords: lipid monolayers, compression diagram, boundary (Volta) potential, work of compression, phase transition, expanded liquid

УДК 577.352

СТИРИЛОВЫЕ КРАСИТЕЛИ di-4-ANEPPS И RH-421 КАК ДАТЧИКИ ПРОТОНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

© 2021 г. А. Н. Константинова^а, Ю. В. Харитонов^{а, б}, В. Ю. Ташкин^а, В. С. Соколов^{а, *}

^аИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Москва, 119991 Россия

^бРоссийский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Москва, 125047 Россия

*e-mail: sokolovvs@mail.ru

Поступила в редакцию 09.11.2020 г.

После доработки 22.11.2020 г.

Принята к публикации 24.11.2020 г.

Показано, что электрохромные стироловые красители могут быть использованы как зонды для изучения связывания протонов на поверхности мембраны. Эти красители адсорбируются на мембране как нейтральные молекулы, обладающие значительным дипольным моментом, из-за чего на границе мембраны с раствором возникает дипольный скачок потенциала. Понижение pH приводило к исчезновению как этого скачка потенциала, так и флуоресценции связанных с мембраной молекул красителей di-4-ANEPPS или RH-421. Это объясняется тем, что протонированные молекулы красителей, образующиеся при низких pH, не способны адсорбироваться на липидных мембранах. По измеренной в эксперименте зависимости дипольного скачка потенциала от pH сделана оценка pK красителей, которая составила около 4.5. Десорбция молекул красителей с поверхности липидной мембраны происходила не только при понижении pH в растворе, но и при фотоактивированном освобождении протонов на поверхности мембраны, вызванном фотолизом молекул Caged-H⁺ — 2-метокси-5-нитрофенилсульфатом натрия. Это свидетельствует о значительном увеличении концентрации протонов на поверхности липидной мембраны, вызванном этим процессом.

Ключевые слова: липидный бислой, стироловые красители, адсорбция, дипольный потенциал, поверхностные протоны

DOI: 10.31857/S0233475521020079

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время интерес исследователей привлекает особое состояние протонов на поверхности мембраны. Предполагают, что обмен протонов, связанных на поверхности, с водным раствором происходит через высокий потенциальный барьер. Из-за барьера перемещение протонов в мембране между донором и акцептором может происходить вдоль ее поверхности, а не через водный раствор [1]. На этом основаны различные гипотезы окислительного фосфорилирования [2]. Ключевой вопрос, ответ на который позволяет проверить подобные механизмы, состоит в оценке величины потенциального барьера между протонами на поверхности и в воде. Для выяснения этого вопроса проводились исследования диффузии протонов вдоль мембраны с применением флуоресцентных зондов [3–6]. Один из экспериментальных способов обеспечить скачок концентрации протонов на поверхности мембраны основан на применении фотоактивируемых соединений “Caged-H⁺”, молекулы

которых связаны на мембране и освобождают протоны при поглощении кванта света [3, 7, 8]. Одно из таких соединений изучалось нами ранее. Было показано, что при фотоактивации этого соединения вспышкой УФ-света происходит изменение емкости мембраны и скачка электростатического потенциала на ее границе [9]. Были сделаны оценки изменения pH около мембраны, составляющие менее 0.1 ед. [10], но они представляются заниженными и, возможно, отражают изменение pH не на поверхности, а в неперемешиваемом слое в воде около мембраны. Для корректного изучения связывания протонов на поверхности мембраны желательно использовать pH-чувствительный зонд с известными характеристиками. В данной работе исследуется возможность использования в качестве такого зонда молекул стироловых красителей di-4-ANEPPS и RH-421 (рис. 1а). Ранее они использовались нами как мишени синглетного кислорода, измерение скорости окисления которых на поверхности мембраны позволяло оценить эффективность

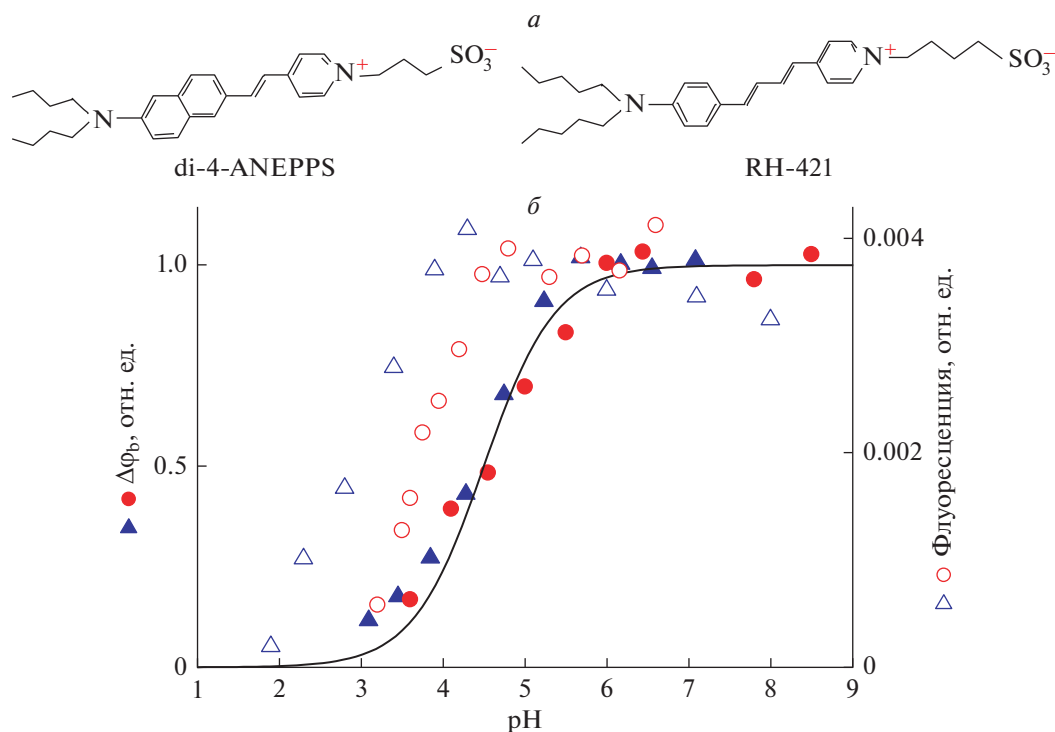


Рис. 1. *a* – Структуры di-4-ANEPPS и RH-421. *б* – Зависимости изменения граничного потенциала БЛМ (сплошные символы, шкала слева) и флуоресценции липосом (пустые символы, шкала справа) при адсорбции RH-421 (кружки) или di-4-ANEPPS (треугольники) от pH раствора. Данные для di-4-ANEPPS взяты из [12]. Концентрация RH-421 при измерении $\Delta\phi_b$ составляла 3 мкМ, при измерении флуоресценции – 1 мкМ. Раствор содержал 20 мМ KCl, 2 мМ цитрат, 2 мМ HEPES. Зависимость $\Delta\phi_b$ от pH получена при добавлении di-4-ANEPPS или RH-421 в раствор с одной стороны мембраны, а HCl или KOH – с двух сторон мембраны. Значения потенциала, нормированные на величины в области плато при высоких pH, получены усреднением по результатам не менее трех экспериментов. Кривая проведена по уравнению $\Delta\phi_b = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}}$ с параметром $pK = 4.5$.

фотосенсибилизаторов [11]. Оказалось, что адсорбция этих красителей на мембране зависит от pH [12]. В настоящей работе влияние pH на адсорбцию красителей на липидной мембране изучено более подробно, и показано, что эти красители могут быть использованы и как pH-зонды, позволяющие регистрировать скачок концентрации протонов, связанных на поверхности мембраны, при фотоактивации “Caged- H^+ ”.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бислойные липидные мембраны (БЛМ) формировали методом Мюллера–Рудина в тefлоновой ячейке на отверстии диаметром 0.8 мм из раствора дифитаноилфосфатидилхолина (Avanti Polar Lipids, США) в *n*-декане в концентрации 15 мг/мл. Растворы готовили на дважды дистиллированной воде с использованием KCl, лимонной кислоты (Россия), HEPES, Трис и имидазола (Sigma, США). В экспериментах использовались стироловые красители di-4-ANEPPS и RH-421

(Sigma-Aldrich, США), а также Caged- H^+ – 2-метокси-5-нитрофенилсульфат натрия (MNPS), синтезированный А.И. Иловайским в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. При освещении БЛМ постоянным светом использовали ультрафиолетовый светодиод LED-003W-48C-000-000LM-EL-P с длиной волны 375 нм и электрической мощностью 3 Вт (Artleds, Россия). Caged- H^+ добавляли в дальний (по отношению к источнику света) отсек ячейки. Растворы в обоих отсеках ячейки непрерывно перемешивались с помощью магнитной мешалки.

В измерениях использовали хлорсеребряные электроды с агаровыми мостиками, заполненными тем же раствором, который находился в ячейке. Разность граничных потенциалов измеряли методом компенсации внутримембранного поля, разработанным в [13] (см. также обзоры [14, 15]). Экспериментальная установка для измерений этим методом была идентична использованной в наших предыдущих работах [11].

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре “Флуорат-2 “Панорама” (Люмэкс, Россия) при длине волны возбуждения 500 нм, регистрации — 594 нм. Липосомы готовили из дифитаноилфосфатидилхолина с помощью экструдера, используя фильтры с размером пор 100 нм. Концентрация липида составляла 0.2 мг/мл. Флуоресценция красителей в водном растворе в отсутствие липосом не наблюдалась.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования адсорбции стироловых красителей на мембране показали, что она зависит от pH. Зависимость адсорбции красителей от pH изучалась двумя методами: по измерению разности граничных потенциалов $\Delta\phi$ на плоских БЛМ и флуоресценции липосом. Зависимости $\Delta\phi$ и флуоресценции от pH в случае di-4-ANEPPS изучались нами ранее [12], а для RH-421 эти зависимости были получены в настоящей работе. Для удобства сравнения двух красителей потенциалы нормировались на величины в области плато, наблюдавшееся при высоких значениях pH. Полученные зависимости изображены на рис. 1б.

Известно, что молекулы красителей обладают значительным дипольным моментом, образованным положительно заряженным атомом азота в середине молекулы и отрицательно заряженной сульфогруппой на ее конце (рис. 1а). Они адсорбируются на поверхности мембраны в нейтральном виде, встраиваясь в мембрану гидрофобным концом молекулы, и создают на ней дипольный скачок потенциала со знаком плюс внутри мембраны [16]. Исчезновение этого потенциала при уменьшении pH можно объяснить тем, что при низких pH происходит протонирование второго атома азота молекулы красителя, из-за чего она становится положительно заряженной. При этом гидрофобная область молекулы становится более полярной, что значительно уменьшает ее сродство к мембране. Протонированные молекулы красителей в водном растворе были обнаружены по спектрам поглощения, которые зависели от pH [17].

При уменьшении pH исчезает и флуоресценция красителей на липосомах, поскольку способностью к флуоресценции обладают только те молекулы красителей, которые связаны с липидной мембраной [12]. Поэтому интенсивность флуоресценции свидетельствует о количестве молекул красителя, адсорбированных на мембранах липосом. Зависимость интенсивности флуоресценции от pH приведена на рис. 1б. Как показывает рисунок, флуоресценция обоих красителей при уменьшении pH исчезала. В целом зависимости от pH флуоресценции и $\Delta\phi$ оказались похожи, но спад флуоресценции происходил при более низ-

ких значениях pH, чем спад $\Delta\phi$. Как можно видеть на рисунке, зависимости $\Delta\phi$ и флуоресценции от pH для обоих красителей (di-4-ANEPPS и RH-421) близки. Совпадение зависимостей объясняется сходством структур этих красителей. У обоих красителей имеется два атома азота, один из которых всегда заряжен, а второй протонируется и становится заряженным при низких pH. Главное различие структур красителей состоит в строении ароматических колец: у ANEPPS имеется нафталиновое кольцо, а у RH-421 — бензольное. Это различие, как показывает рис. 1б, не оказывает заметного влияния на зависимость их адсорбции на мембране от pH. По зависимости $\Delta\phi$ от pH была проведена оценка pK протонирования красителей. Ее величина составила около 4.5. Эта величина оказалась близка к значению, полученному из измерений зависимости от pH спектров поглощения водных растворов RH-421, которое составляло около 4.9 [17].

Зависимость адсорбции стироловых красителей от pH позволяет использовать их как зонды pH на поверхности мембраны. Представлялось интересным использовать их для оценки изменения pH на поверхности мембраны при фотоактивируемом выделении протонов с помощью Caged- H^+ , в качестве которого использовалось соединение MNPS. Типичная кинетика изменения потенциала представлена на рис. 2. Сначала в ячейку добавляли MNPS, в результате чего происходило изменение граничного потенциала, вызванного адсорбцией анионов MNPS на поверхности мембраны. При освещении мембраны с адсорбированными на ней ионами MNPS кинетика изменения потенциала была аналогична наблюдавшейся нами ранее [9]. Как показано в [9], это изменение потенциала вызвано разрушением MNPS и протонированием поверхности БЛМ. Далее в ячейку добавляли di-4-ANEPPS и дожидались окончания адсорбции, о чем свидетельствовало достижение стационарной величины потенциала. После включения освещения происходило изменение граничного потенциала с более сложной кинетикой, чем в отсутствие красителей. В начальный момент после включения света изменение потенциала было положительного знака и напоминало изменение потенциала, наблюдавшееся в отсутствие di-4-ANEPPS. В дальнейшем изменение потенциала происходило в отрицательную сторону. По амплитуде оно было близко к величине изменения потенциала, вызванного адсорбцией di-4-ANEPPS. Очевидно, это изменение потенциала связано с уходом молекул di-4-ANEPPS с поверхности мембраны, вызванным выделением протонов при освещении MNPS. При прекращении освещения происходило частичное восстановление потенциала, кинетика которого также отличалась от той, что

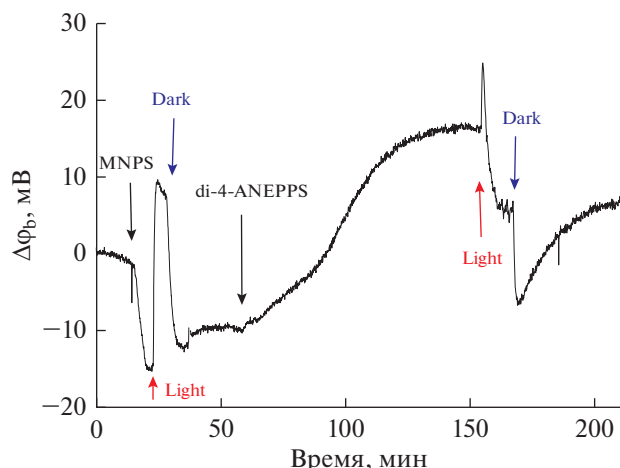


Рис. 2. Кинетика изменения разности граничных потенциалов при адсорбции на БЛМ 300 мкМ MNPS и 2 мкМ di-4-ANEPPS и освещении непрерывным светом. Моменты включения и выключения света обозначены стрелками вверх и вниз с надписями Light и Dark. Исходный раствор содержал 20 мМ KCl и по 0.2 мМ Трис, HEPES и цитрата, pH 8.0.

была в отсутствие красителей. Потенциал изменялся сначала в отрицательном направлении, затем — в положительном. Начальное отрицательное изменение потенциала напоминает восстановление потенциала, наблюдавшееся в отсутствие di-4-ANEPPS. Оно вызвано, очевидно, адсорбцией анионов MNPS и восстановлением равновесия протонов на поверхности мембраны [9]. Эти процессы происходят быстрее, чем адсорбция di-4-ANEPPS, которая вызывает медленное изменение потенциала в положительную сторону. Это объясняет начальную быструю отрицательную фазу и последующую медленную положительную фазу изменения потенциала в темноте. Аналогичная кинетика изменения потенциала при освещении с MNPS была получена и с другим красителем — RH-421.

Кинетика изменения потенциала при освещении напоминает наблюдавшуюся нами ранее при разрушении молекул di-4-ANEPPS синглетным кислородом, образующимся при освещении в присутствии фотосенсибилизаторов [11, 12], где для количественной оценки скорости разрушения красителей определяли наклон относительного изменения потенциала в момент начала освещения. Аналогичный параметр был использован и в настоящей работе. Он определялся как наклон зависимости от времени медленной фазы изменения потенциала в момент начала освещения, нормированный на величину потенциала, возникающего при адсорбции этих красителей. Этот параметр оказался пропорционален интенсивности освещения (рис. 3).

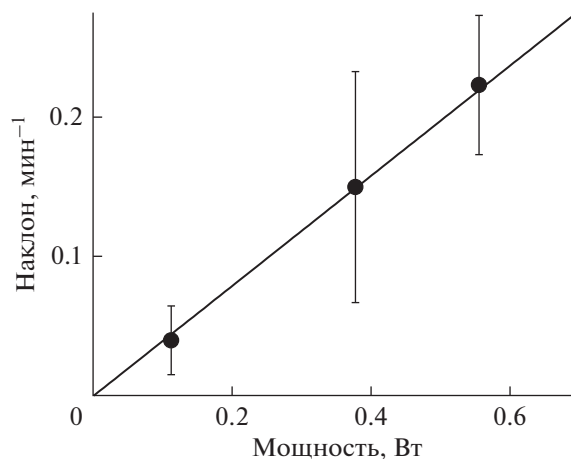


Рис. 3. Зависимость скорости медленного изменения потенциала в отрицательную сторону в начальный момент включения освещения от его электрической мощности. Средние значения скорости определяли по результатам не менее трех измерений. Исходный раствор содержал 20 мМ KCl и по 0.2 мМ Трис, HEPES и цитрата, pH 8.0. С одной стороны мембраны добавлены 300 мкМ MNPS и 2 мкМ RH-421.

Поскольку измерения проводились при pH 8, а заметное уменьшение потенциалов адсорбции красителей наблюдалось при pH меньше 5 (рис. 1б), можно предположить, что уменьшение pH на поверхности мембраны при фотолизе MNPS составляет несколько единиц. Эта величина намного превышает полученную нами ранее в [10] оценку (0.1 единиц), где изменение pH при фотолизе MNPS, вызванном вспышкой света, определяли по изменению потенциала разомкнутой цепи селективной по протонам мембраны с пентахлорфенолом. Конечно, сравнение этих экспериментов не совсем корректно, поскольку в [10] использовалась вспышка света, а в настоящей работе — непрерывное освещение. Другая существенная причина расхождения этих оценок состоит в том, что они отражают изменение pH в разных областях. Оценка, сделанная в работе [10], отражает изменение pH в воде около мембраны, поскольку равновесный потенциал мембраны, селективной по протонам, определяется разностью pH в водных растворах. В настоящей работе для оценки изменения pH использовались молекулы стирловых красителей, встроенные в мембрану, и изменение потенциала происходило при их протонировании непосредственно в мембране, из-за чего происходила десорбция молекул красителей в водный раствор.

Таким образом, стирловые красители могут быть использованы в качестве pH-зондов на поверхности мембраны. С их помощью удалось показать, что изменение pH на поверхности мембраны при фотоактивируемом фотолизе MNPS составляет несколько единиц.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № АААА-А20-120101090002-4, фотоэлектрические измерения с MNPS), а также проектов РНФ № 19-13-00410 (спектральные измерения) и РФФИ № 19-04-00694 (измерения граничных потенциалов на БЛМ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agmon N., Bakker H.J., Campen R.K., Henschman R.H., Pohl P., Roke S., Thamer M., Hassanali A. 2016. Protons and hydroxide ions in aqueous systems. *Chem. Rev.* **116** (13), 7642–7672.
2. Cherepanov D.A., Feniouk B.A., Junge W., Mulikidjanian A.Y. 2003. Low dielectric permittivity of water at the membrane interface: Effect on the energy coupling mechanism in biological membranes. *Biophys. J.* **85** (2), 1307–1316.
3. Serowy S., Saparov S.M., Antonenko Y.N., Kozlovsky W., Hagen V., Pohl P. 2003. Structural proton diffusion along lipid bilayers. *Biophys. J.* **84** (2 Pt 1), 1031–1037.
4. Springer A., Hagen V., Cherepanov D.A., Antonenko Y.N., Pohl P. 2011. Protons migrate along interfacial water without significant contributions from jumps between ionizable groups on the membrane surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108** (35), 14461–14466.
5. Weichselbaum E., Osterbauer M., Knyazev D.G., Batishchev O.V., Akimov S.A., Hai N.T., Zhang C., Knor G., Agmon N., Carloni P., Pohl P. 2017. Origin of proton affinity to membrane/water interfaces. *Sci. Rep.* **7** (1), 4553.
6. Zhang C., Knyazev D.G., Vereshaga Y.A., Ippoliti E., Nguyen T.H., Carloni P., Pohl P. 2012. Water at hydrophobic interfaces delays proton surface-to-bulk transfer and provides a pathway for lateral proton diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109** (25), 9744–9749.
7. Geissler D., Antonenko Y.N., Schmidt R., Keller S., Krylova O.O., Wiesner B., Bendig J., Pohl P., Hagen V. 2005. (Coumarin-4-yl)methyl esters as highly efficient, ultrafast phototriggers for protons and their application to acidifying membrane surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **44** (8), 1195–1198.
8. Fibich A., Janko K., Apell H.J. 2007. Kinetics of proton binding to the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase in the E1 state. *Biophys. J.* **93** (9), 3092–3104.
9. Ташкин В.Ю., Вишнякова В.Е., Щербаков А.А., Финогенова О.А., Ермаков Ю.А., Соколов В.С. 2019. Изменение емкости и граничного потенциала бислойной липидной мембраны при быстром освобождении протонов на ее поверхности. *Биол. мембраны.* **36** (2), 101–108.
10. Ташкин В.Ю., Щербаков А.А., Апель Х.-Ю., Соколов В.С. 2013. Конкурентный транспорт ионов натрия и протонов в цитоплазматическом канале Na^+, K^+ -АТФ-азы. *Биол. мембраны.* **30** (2), 105–114.
11. Sokolov V.S., Gavrilchik A.N., Kulagina A.O., Meshkov I.N., Pohl P., Gorbunova Y.G. 2016. Voltage-sensitive styryl dyes as singlet oxygen targets on the surface of bilayer lipid membrane. *J. Photochem. Photobiol. B.* **161**, 162–169.
12. Konstantinova A.N., Sokolov V.S., Jimenez-Munguia I., Finogenova O.A., Ermakov Y.A., Gorbunova Y.G. 2018. Adsorption and photodynamic efficiency of meso-tetrakis(p-sulfonatophenyl)porphyrin on the surface of bilayer lipid membranes. *J. Photochem. Photobiol. B.* **189**, 74–80.
13. Соколов В.С., Кузьмин В.Г. 1980. Измерение разности поверхностных потенциалов бислойных мембран по второй гармонике емкостного тока. *Биофизика.* **25** (1), 170–172.
14. Ermakov Yu.A., Sokolov V.S. 2003. Boundary potentials of bilayer lipid membranes: Methods and interpretations. In: *Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their applications*. Eds. Tien H.T., Ottova-Leitmannova A. Amsterdam etc.: Elsevier, p. 109–141.
15. Sokolov V.S., Mirsky V.M. 2004. Electrostatic potentials of bilayer lipid membranes: Basic research and analytical applications. In: *Ultrathin electrochemical chemical- and biosensors: Technology and performance*. Ed. Mirsky V.M. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 255–291.
16. Malkov D.Y., Sokolov V.S. 1996. Fluorescent styryl dyes of the RH series affect a potential drop on the membrane/solution boundary. *Biochem. Biophys. Acta.* **1278**, 197–204.
17. Clarke R.J., Schrimpf P., Schoneich M. 1992. Spectroscopic investigations of the potential-sensitive membrane probe RH421. *Biochim. Biophys. Acta.* **1112** (1), 142–152.

Styryl Dyes di-4-ANEPPS and RH-421 As Sensors of the Protons on the Surface of Lipid Membranes

A. N. Konstantinova¹, Yu. V. Kharitonova^{1,2}, V. Yu. Tashkin¹, V. S. Sokolov^{1, *}

¹Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Mendelev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125047 Russia

*e-mail: sokolovvs@mail.ru

Electrochromic styryl dyes have been shown to serve as sensors of binding of protons on the surface of lipid membrane. These dyes can adsorb on the membrane as neutral molecules that have considerable dipole moment, due to which they create the dipole potential drop on the membrane/solution interface. A decrease of pH led to disappearance of this potential, as well as of the fluorescence of the di-4-ANEPPS or RH-421 dyes molecules bound with liposomes. It was explained by assumption that the dye molecules with bound protons

lack the ability to adsorb on the membranes. The dependence of the dipole potential on pH measured in the experiment was used for evaluation of the dye pK, which was about 4.5. The desorption of the dye molecules from the surface of the lipid membrane was observed not only with a decrease of the solution pH but also during photoactivated release of protons on the surface of the membrane initiated by photolysis of molecules of Caged- H^+ (2-methoxy-5-nitrophenylsulfate sodium salt). This points to a considerable increase of the protons concentration on the surface of lipid membrane in this process.

Keywords: lipid bilayer, styryl dyes, dipole potential, adsorption, surface protons

вызывает падение мембранного митохондриального потенциала и разобщение процессов дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий млекопитающих и других позвоночных [14, 15]. Также известно, что данный агент способен индуцировать нарушение структуры бислойных липидных мембран, что приводит к их дестабилизации и последующей пермеабиллизации. Такое действие триклозана может приводить к набуханию митохондрий и выбросу проапоптотического белка цитохрома *c* из органелл [15, 16].

Метилтриклозан (2,4-дихлор-1-(4-хлор-2-метоксифенокси)бензол) (рис. 1б) является продуктом трансформации триклозана, образующимся путем аэробной биodeградации последнего [17, 18]. Известно, что метилтриклозан, как и его предшественник триклозан, накапливается в воде, иловых отложениях, рыбе и беспозвоночных организмах, вблизи очистных сооружений. Данные по влиянию метилтриклозана на живые организмы достаточно фрагментарны. На сегодняшний день известно, что метилтриклозан, в отличие от триклозана, не проявляет антибактериальных свойств [19]. С другой стороны, метилтриклозан подобно триклозану способен оказывать токсическое действие на эмбриональное развитие рыбок *Danio rerio* и *Paracentrotus lividus* [20], влиять на развитие дождевого червя *Eisenia andrei* [21] и оказывать токсический эффект на культуру клеток HepG2 [22].

Молекулярные механизмы токсического действия метилтриклозана на клетки эукариотических организмов до конца не установлены. Можно предположить, что метилтриклозан, как и триклозан, способен индуцировать дисфункцию митохондрий и пермеабиллизацию клеточных мембран. Однако действие метилтриклозана, оказываемое на живые организмы, может быть менее выражено по сравнению с действием триклозана в связи с заменой гидроксильной группы на метильную в его структуре (рис. 1). Известно, что подобные структурные особенности значительно снижают мембранотропные свойства различных агентов [23] и в том числе могут оказывать непосредственное влияние на эффекты, вызываемые метилтриклозаном на фосфолипидные мембраны. Поэтому в настоящей работе нами исследовано *in vitro* влияние метилтриклозана на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крысы, активность комплексов дыхательной цепи органелл и продукцию ими перекиси водорода. Кроме того, нами изучено влияние этого соединения на проницаемость внутренней мембраны митохондрий, а также фосфолипидной мембраны искусственных липосом. Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что метилтриклозан в высоких концентрациях вызывает нарушение функциональной активности комплексов дыхательной цепи мито-

хондрий, а также индуцирует неспецифическую пермеабиллизацию внутренней мембраны органелл и мембраны однослойных лецитиновых липосом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий из печени крыс. Митохондрии выделяли из печени половозрелых крыс (самцов) линии Wistar (масса 220–250 г) общепринятым методом дифференциального центрифугирования в соответствии с ранее описанной методикой [24]. Среда выделения содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ EDTA и 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Полученная суспензия митохондрий содержала 70–80 мг митохондриального белка на 1 мл, концентрация которого определялась методом Лоури [25].

Оценка дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25°C в термостатируемой ячейке объемом 1 мл с помощью кислородного электрода типа Кларк и установки Oxygraph Plus (Hansatech Instruments, Великобритания) [26]. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарную кислоту (или 2.5 мМ глутамат и 2.5 мМ малат), 5 мМ KH_2PO_4 , 0.5 мМ EGTA, 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ HEPES–KOH (pH 7.4). Концентрация митохондриального белка в кювете составляла ~1.3 мг/мл. Следующие функциональные состояния были определены: состояние 2 — базальное дыхание митохондрий в присутствии энергетического субстрата; состояние 3 — дыхание митохондрий в присутствии субстратов, стимулированное добавкой ADP; состояние 4 — митохондриальное дыхание после того, как добавленный ADP будет полностью фосфорилирован; состояние $3U_{\text{днф}}$ — максимальное дыхание митохондрий в присутствии разобщителя 2,4-динитрофенола (ДНФ). Коэффициент дыхательного контроля определяли как отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4.

Оценка активности комплексов дыхательной цепи митохондрий. Влияние метилтриклозана на активность комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс оценивали спектрофотометрически с помощью планшетного спектрофотометра Multiscan Go (Thermo, Финляндия) в соответствии с протоколом [27, 28]. Для разрушения митохондрий, освобождения индивидуальных комплексов дыхательной цепи и достижения их максимальной ферментативной активности изолированные митохондрии (10–15 мг/мл митохондриального белка) предварительно подвергали трехкратной процедуре замораживания/оттаивания при $-20/+30^\circ\text{C}$ в гипотоническом буфере, содержащем 10 мМ Трис–HCl, pH 7.6. Актив-

ность комплекса I дыхательной цепи оценивали при 25°C по эффективности окисления добавленного NADH суспензией разрушенных митохондрий (0.15 мг/мл), которое определялось по снижению светопоглощения суспензии при длине волны 340 нм. Активность комплекса II дыхательной цепи оценивали при 37°C по эффективности восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия суспензией разрушенных митохондрий (0.2 мг/мл) в присутствии субстрата окисления сукцината, которое определялось по снижению светопоглощения суспензии при длине волны 600 нм. Активность комплекса III дыхательной цепи оценивали при 25°C по эффективности восстановления добавленного цитохрома c суспензией разрушенных митохондрий (0.1 мг/мл), которое определялось по снижению оптической плотности суспензии при длине волны 550 нм. Активность комплекса IV дыхательной цепи оценивали при 25°C по эффективности окисления добавленного цитохрома c (восстановленного в соответствии с [27]) суспензией разрушенных митохондрий (0.1 мг/мл), которое определялось по снижению оптической плотности суспензии при длине волны 550 нм. Активность комплексов дыхательной цепи (в отсутствие и в присутствии метилтриклозана) регистрировали через 2–3 мин после начала окислительно-восстановительной реакции (в нмоль/мин на 1 мг белка).

Образование H_2O_2 митохондриями печени. Скорость образования H_2O_2 суспензией митохондрий печени крыс измеряли с помощью флуоресцентного индикатора Amplex Red на планшетном флуориметре Tecan Spark 10M (Tecan, Швейцария) при длине волны возбуждения 560 нм и длине волны излучения 590 нм [26]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 5 мМ сукцината, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ EGTA, 1 мкМ ротенона и 10 мМ HEPES–KOH (pH 7.4), 10 мкМ Amplex Red и пероксидазу хрена (акт. 1 ед/мл). Концентрация митохондриального белка составляла 0.15 мг/мл. Измерения проводились при 37°C и постоянном перемешивании. Количество образованной перекиси водорода рассчитывалось по калибровочной кривой.

Индукция неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий. Открытие митохондриальной поры оценивали по набуханию митохондрий, которое регистрировали по изменению оптической плотности суспензии митохондрий (A_{540}) на планшетном спектрофотометре Multiscan Go (Thermo, Финляндия). Среда инкубации содержала 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 5 мМ янтарной кислоты, 10 мкМ EGTA, 1 мкМ ротенона, 3 мМ Трис–HCl, pH 7.4. Концентрация митохондриального белка в кювете составляла ~0.4 мг/мл. Скорость набухания митохондрий ($V_{\max} = \Delta A_{540}/\text{мин}$ на 1 мг белка) рассчи-

тывали как изменение оптической плотности суспензии в течение первых 30 с от начала высокоамплитудного набухания.

Электронная микроскопия митохондрий печени крыс. Для проведения электронной микроскопии образцы митохондрий фиксировали в течение 2 ч с использованием 2.5% глutarового альдегида, предварительно растворенного в среде инкубации, состоящей из 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 5 мМ сукцината, 10 мкМ EGTA, 1 мкМ ротенона и 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4, после чего осуществлялась постфиксация 1% тетраоксидом осмия. Далее образцы заливали в эпоксидную смолу Epon 812. Микроскопические срезы, полученные с помощью микротомы Leica EM UC6 (Leica, Германия), окрашивались цитратом свинца и уранилацетатом, после этого они подвергались электронно-микроскопическому исследованию на микроскопе JEM-100B (JOEL, Япония).

Приготовление однослойных липосом. Липосомы были получены методом экструзии [16]. 7.5 мг лецитина гидратировали в течение 2 ч при периодическом перемешивании в 0.75 мл буфера, содержащего 10 мМ Трис–HCl (pH 7.5), 40 мМ KCl и 50 мкМ EGTA. Полученную суспензию многослойных липосом подвергали 5 циклам замораживания/оттаивания при температуре $-20/+30^\circ\text{C}$. На следующем этапе суспензия липосом подвергалась экструзии через поликарбонатную мембрану (диаметр пор 0.1 мкм) с использованием микроэкструдера Avanti (Avanti Polar Lipids, США). Все описанные выше операции (за исключением процедуры замораживания/оттаивания) проводились при комнатной температуре.

Приготовление липосом, загруженных сульфородамино Б. Липосомы, загруженные сульфородамино Б (СрБ), готовили из лецитина с использованием метода, описанного выше. Отличия заключались в буфере для гидратации, содержащем 50 мМ СрБ вместо 40 мМ KCl, и дополнительной очистке полученных после экструзии липосом от внешнего СрБ на колонке, заполненной сефадексом G-50. Для уравнивания колонки применялся буфер следующего состава: 10 мМ Трис–HCl (pH 7.5), 50 мкМ EGTA и 40 мМ KCl.

Измерение выхода сульфородамина Б из липосом. Выход СрБ из липосом оценивали по увеличению флуоресценции исследуемой суспензии однослойных липосом согласно ранее описанному методу [29]. Среда инкубации содержала 40 мМ KCl, 50 мкМ EGTA, 10 мМ Трис–HCl (pH 7.5). Изменение уровня флуоресценции измерялось с использованием спектрофлуориметрической оптоволоконной системы USB 2000 (Ocean Optics, Inc, США) (длины волн возбуждения и излучения флуоресценции — 565 и 586 нм, соответственно). Выход СрБ из липосом определялся в течение

Таблица 1. Влияние метилтриклозана и триклозана на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс, окисляющих глутамат и малат

Метилтриклозан, мкМ	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{днф}	ДК, отн. ед.
	нмоль O ₂ /мин на 1 мг белка				
0	2.96 ± 0.25	31.74 ± 2.26	5.56 ± 0.45	28.28 ± 1.46	5.72 ± 0.10
5	2.70 ± 0.20	29.91 ± 1.29	5.30 ± 0.30	27.80 ± 0.40	5.65 ± 0.08
10	2.58 ± 0.03	31.00 ± 2.25	5.50 ± 0.40	26.22 ± 0.02	5.64 ± 0.03
20	2.83 ± 0.37	29.63 ± 1.88	5.25 ± 0.15	27.80 ± 2.00	5.45 ± 0.02
50	2.90 ± 0.10	23.64 ± 0.39*	5.15 ± 0.25	22.38 ± 0.42*	4.60 ± 0.30*
5 мкМ триклозан	4.35 ± 0.23*	26.04 ± 0.46*	6.14 ± 0.17*	25.41 ± 0.21*	4.25 ± 0.19*

Примечание. Приведены средние значения ± ошибка среднего ($n = 3$). ДК – коэффициент дыхательного контроля (состояние 3/состояние 4).

* Различия между контролем (в отсутствие метилтриклозана или триклозана) и экспериментом (в присутствии метилтриклозана или триклозана) статистически значимы, $p < 0.05$.

5 мин после добавления триклозана и метилтриклозана. Уровень СрБ, загруженный в липосомы, определялся после добавления 0.1% раствора неионного детергента Тритона X-100.

Статистический анализ. Полученные данные были проанализированы с использованием программ GraphPad Prism 7 и Microsoft Excel и представлены как средние значения ± ошибка среднего ($n = 3-7$). Статистический анализ проводили с использованием t -критерия, при этом значимыми считались различия, удовлетворяющие условию $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метилтриклозан ингибирует дыхание митохондрий печени крысы

В настоящей работе изучено влияние метилтриклозана на дыхание митохондрий печени крысы в разных функциональных состояниях. Измерения проводили в присутствии глутамата и малата – субстратов комплекса I дыхательной цепи и сукцината, субстрата комплекса II дыхательной цепи митохондрий.

В табл. 1 показано влияние различных концентраций метилтриклозана на дыхание митохондрий печени крысы, энергизованных глутамат/малатом. Установлено, что в концентрациях 5, 10 и 20 мкМ данный агент не оказывает влияния на скорость потребления кислорода митохондриями. Лишь 50 мкМ метилтриклозан вызывает снижение скорости потребления кислорода при стимуляции дыхания ADP (состояние 3) и ДНФ (состояние 3U_{днф}), не оказывая влияние на дыхание органелл в состояниях 2 и 4. Также было установлено, что метилтриклозан достоверно снижает коэффициент дыхательного контроля (ДК) только в концентрации 50 мкМ. В то же время

можно отметить, что триклозан уже в концентрации 5 мкМ существенно стимулирует дыхание в состояниях 2 и 4 и ингибирует дыхание органелл, стимулированное ADP и ДНФ (состояние 3 и 3U_{днф}), тем самым значительно снижая параметр дыхательного контроля (табл. 1).

При использовании сукцината в качестве субстрата дыхания метилтриклозан уже в концентрации 10 мкМ вызывает снижение скорости потребления кислорода в состоянии 3U_{днф}. В концентрации 20 мкМ метилтриклозан стимулирует скорость дыхания митохондрий в состоянии 2, но при этом подавляет стимуляцию дыхания разбавителем ДНФ (дыхание митохондрий в состоянии 3U_{днф}). Метилтриклозан в концентрации 50 мкМ увеличивает скорость потребления кислорода в состояниях 2 и 4 и снижает скорость дыхания в состояниях 3 и 3U_{днф}. Показатель дыхательного контроля статистически значимо снижается только при использовании метилтриклозана в концентрации 50 мкМ. В то же время триклозан в концентрации 5 мкМ существенно увеличивает скорость дыхания в состояниях 2 и 4 и ингибирует дыхание органелл в состояниях 3 и 3U_{днф}, что сопровождается значительным снижением параметра дыхательного контроля (табл. 2).

На рис. 2 показано влияние метилтриклозана на активность комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс. Из рисунка следует, что метилтриклозан не оказывает влияния на активность комплексов I и III (рис. 2а, 2в). Однако в концентрации 50 мкМ метилтриклозан статистически достоверно ингибирует активность комплексов II и IV дыхательной цепи на 10 и 15% соответственно.

Таблица 2. Влияние метилтриклозана и триклозана на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс, окисляющих сукцинат

Метилтриклозан, мкМ	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{ДФ}	ДК, отн. ед.
	нмоль O ₂ /мин на 1 мг белка				
0	12.41 ± 0.26	57.80 ± 0.29	12.50 ± 0.46	69.67 ± 0.49	4.65 ± 0.12
5	13.79 ± 0.93	57.15 ± 1.95	12.98 ± 1.07	71.28 ± 4.50	4.40 ± 0.23
10	13.01 ± 0.81	57.48 ± 0.95	13.09 ± 0.40	62.92 ± 0.33*	4.39 ± 0.07
20	13.81 ± 0.16*	56.56 ± 1.83	13.60 ± 0.54	58.97 ± 3.59*	4.15 ± 0.29
50	14.13 ± 0.10*	56.77 ± 0.06*	14.92 ± 0.32*	60.80 ± 1.08*	3.81 ± 0.09*
5 мкМ триклозан	17.94 ± 0.32*	50.34 ± 2.05*	17.14 ± 0.71*	56.74 ± 2.02*	2.95 ± 0.24*

Примечание. Приведены средние значения ± ошибка среднего ($n = 3$).

* Различия между контролем (в отсутствие метилтриклозана или триклозана) и экспериментом (в присутствии метилтриклозана или триклозана) статистически значимы, $p < 0.05$.

Влияние метилтриклозана на продукцию H₂O₂ митохондриями

На рис. 3 продемонстрирована способность метилтриклозана статистически значимо усиливать продукцию перекиси водорода митохондри-

ями. При этом данный эффект является дозозависимым, минимальная действующая концентрация составляет 5 мкМ, а максимальный эффект наблюдается при концентрации этого агента равной 50 мкМ.

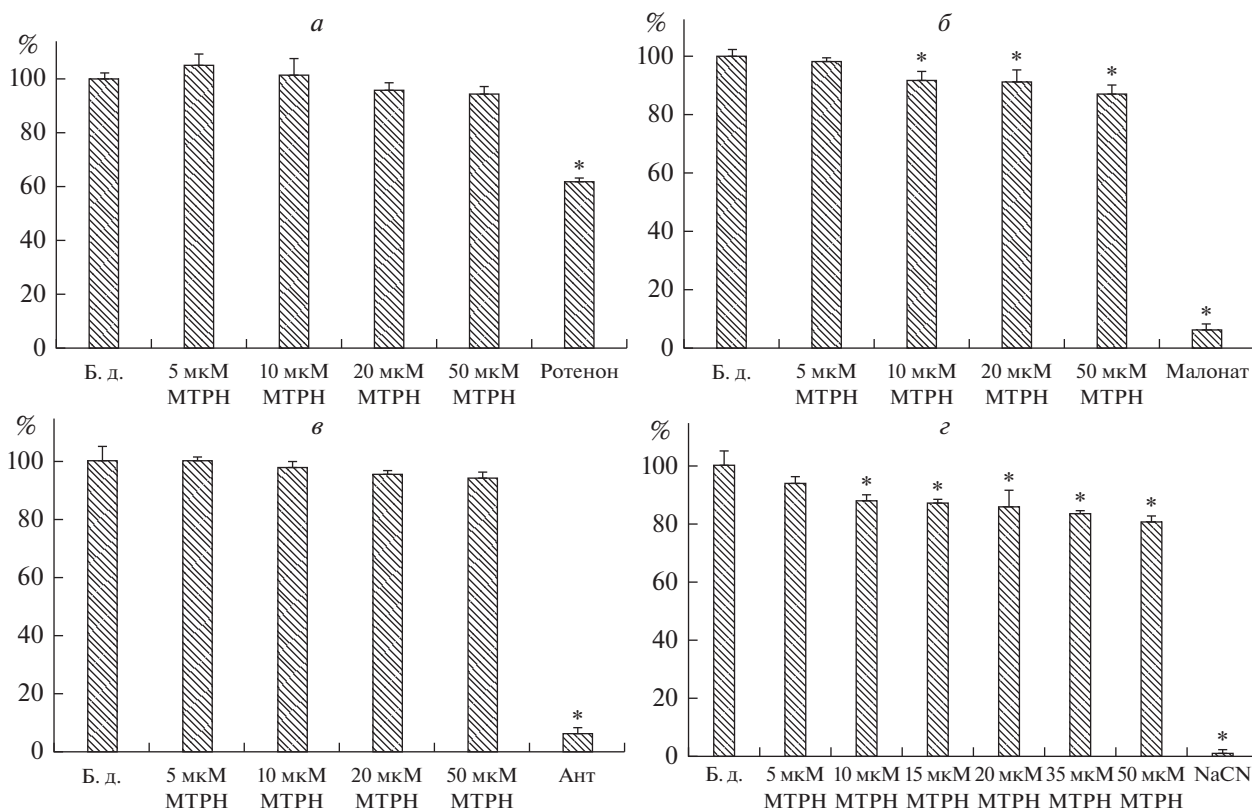


Рис. 2. Влияние метилтриклозана на активность комплексов I (а), II (б), III (в) и IV (г) дыхательной цепи митохондрий печени крыс (в % от контроля). Активность комплексов в контроле, т.е. без добавок (Б.д.), принята за 100%. Концентрация митохондриального белка в кювете 0.1–0.15 мг/мл. В отсутствие добавок (Б.д.) активность комплексов I, II, III, IV составляла 341 ± 18 , 449 ± 14 , 695 ± 21 и 483 ± 24 нмоль/мин/мг белка соответственно. Добавки: метилтриклозан (МТРН) в указанных на рисунке концентрациях, 10 мкМ ротенон, 10 мМ маланат, 10 мкг/мл антимицин А (Ант), 300 мкМ NaCN. Приведены средние значения ± ошибка среднего ($n = 5$). * – Различия между контролем (в отсутствие добавок) и экспериментом (в присутствии метилтриклозана или специфического ингибитора) статистически значимы, $p < 0.05$.

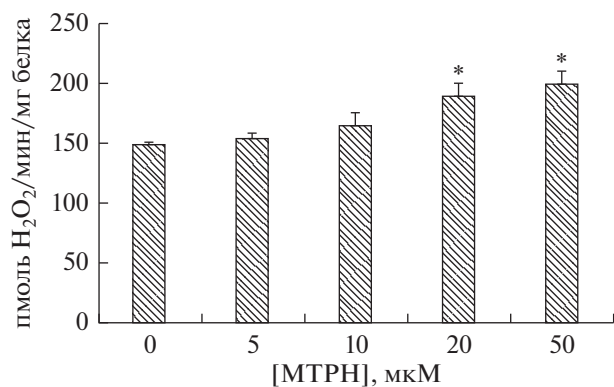


Рис. 3. Влияние различных концентраций метилтриклозана (МТРН) на продукцию H_2O_2 митохондриями печени крысы. Приведены средние $\pm$ ошибка среднего ($n = 5$). * — Отличие от контроля (в отсутствие добавок) статистически значимо при $p < 0.05$.

Метилтриклозан индуцирует пермеабиллизацию митохондрий печени крыс

Известно, что в концентрации 10^{-5} М триклозан индуцирует пермеабиллизацию внутренней мем-

браны митохондрий и однослойных лецитиновых липосом [16]. В связи с этим была изучена способность метилтриклозана индуцировать неспецифическую проницаемость митохондрий печени крысы.

На рис. 4а показано, что добавление 50 мкМ метилтриклозана к суспензии митохондрий приводит к высокоамплитудному набуханию органелл, которое сопровождается лаг-периодом. В то же время можно видеть, что триклозан в той же концентрации индуцирует интенсивное набухание органелл без лаг-периода (рис. 4а). Показано, что 50 мкМ метилтриклозан индуцирует максимальное набухание органелл (рис. 4б). Дальнейшее увеличение концентрации метилтриклозана приводит к снижению скорости митохондриального набухания. В то же время эффект триклозана дозозависим и достигает максимума при 100 мкМ этого агента (рис. 4б). Как показано ранее, эффект триклозана проявляется в присутствии циклоспорина А, известного ингибитора МРТ-поры [16]. Набухание митохондрий, индуцированное метилтриклозаном, также не чувствительно к циклоспирину А (рис. 4в). Последнее говорит о том, что механизм набухания в этом случае не

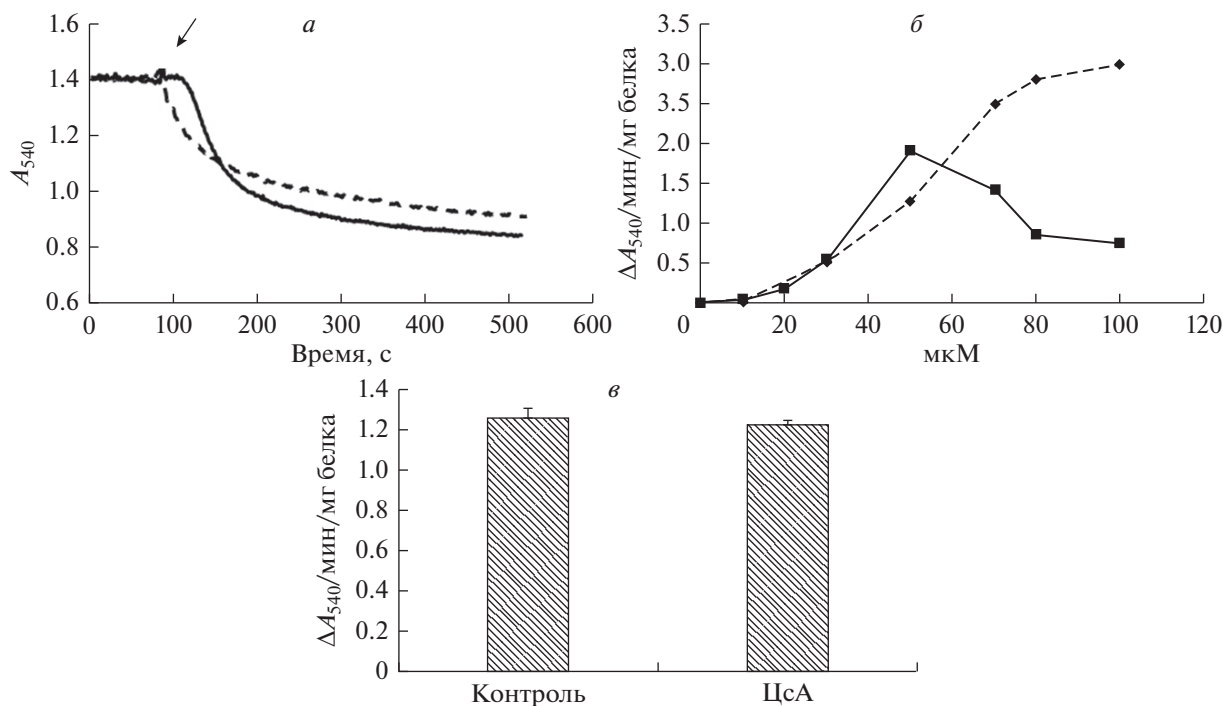


Рис. 4. Набухание митохондрий печени крыс в присутствии триклозана и метилтриклозана. а — Изменение оптической плотности суспензии митохондрий печени крысы, индуцированное 50 мкМ метилтриклозана (сплошная линия) и 50 мкМ триклозана (штриховая линия). Стрелкой обозначено время добавки изучаемых агентов. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. б — Зависимость скорости изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени крыс от концентрации метилтриклозана (сплошная линия) и триклозана (штриховая линия). Приведены средние значения $\pm$ ошибка средней ($n = 5$). в — Скорость набухания митохондрий печени крысы, индуцированного 50 мкМ метилтриклозана в отсутствие (Контроль) и в присутствии 1 мкМ циклоспорина А (ЦсА). Приведены средние значения $\pm$ ошибка среднего ($n = 5$).

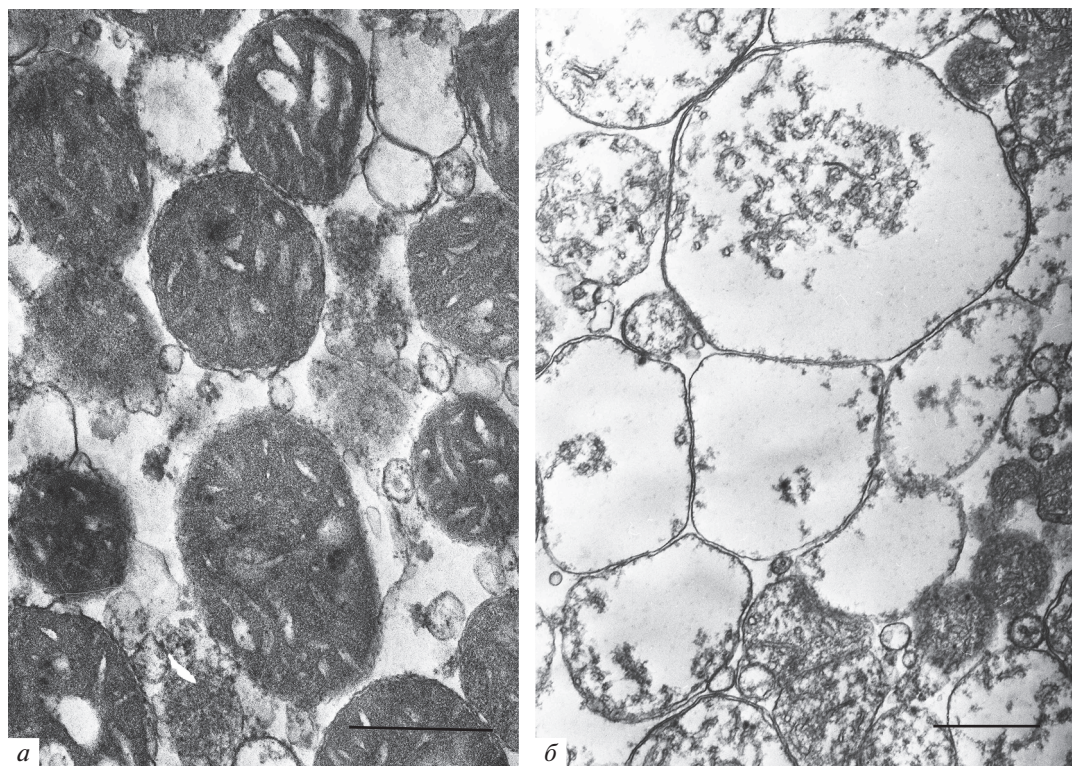


Рис. 5. Микрофотографии митохондрий печени крысы в отсутствие (а) и в присутствии 140 мкМ метилтриклозана (б). Шкала 1 мкм.

связан с образованием белковой МРТ-поры. Возможно, в основе процесса лежит образование пор в липидной фазе внутренней мембраны органелл, как это показано нами ранее для триклозана [16].

На рис. 5 представлены типичные микрофотографии митохондрий печени крыс до и после обработки суспензии органелл метилтриклозаном. Можно видеть, что контрольные митохондрии обладают плотной структурой матрикса и четко различимыми кристами. Добавление метилтриклозана к митохондриям печени приводит к их набуханию: происходит увеличение размера митохондрий, снижение плотности матрикса и потеря внешней митохондриальной мембраны.

Метилтриклозан индуцирует пермеабиллизацию липосомальной мембраны

Поскольку метилтриклозан вызывает циклоспорин А-нечувствительное набухание митохондрий, была оценена способность данного агента индуцировать пермеабиллизацию липосомальной мембраны. Для этого были использованы однослойные лецитиновые липосомы, загруженные СрБ. Из рис. 6а следует, что добавление 50 мкМ метилтриклозана к суспензии липосом приводит к резкому кратковременному увеличению интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о

выходе СрБ из липосом. На рис. 6б показана зависимость выхода СрБ из липосом от концентрации метилтриклозана. Минимальная действующая концентрация метилтриклозана составляет 25 мкМ. При концентрации метилтриклозана 125 мкМ наблюдается 90% выброс красителя из липосом. Стоит обратить внимание, что в этом случае концентрация метилтриклозана в 3 раза выше, чем концентрация липидов в системе (125 мкМ метилтриклозана против 40–45 мкМ лецитина). Можно отметить, что, как и в предыдущих экспериментах данного исследования, триклозан является более эффективным агентом: в концентрации 50 мкМ он индуцирует практически полный выброс красителя из липосом (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе исследовано влияние метилтриклозана на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крысы. Можно видеть, что данный агент, в отличие от триклозана, оказывает слабое влияние на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий. Лишь в концентрации 20 мкМ и более метилтриклозан способен активировать дыхание органелл, окисляющих сукцинат в состояниях 2 и 4 и снижать скорость ДНФ-стимулированного дыхания митохондрий. В этом случае метилтри-

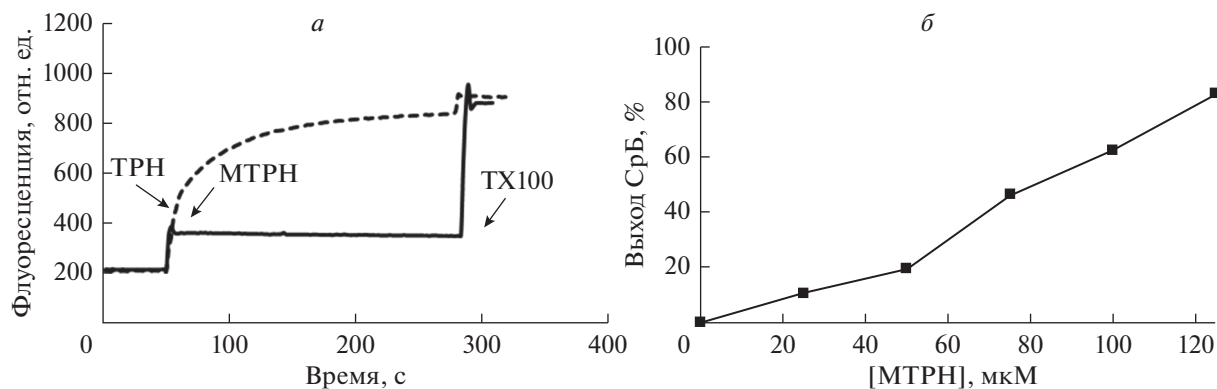


Рис. 6. Влияние триклозана и метилтриклозана на проницаемость мембраны однослойных лецитиновых липосом. *a* – Выход СрБ из липосом, индуцированный МТРН (сплошная линия) и ТРН (штриховая линия). Добавки: 50 мкМ МТРН, 50 мкМ ТРН, 0.1% тритон X-100 (TX100). *б* – Зависимость выхода СрБ из липосом от концентрации метилтриклозана. Приведены средние значения $\pm$ ошибка среднего ($n = 5$).

клозан достоверно снижает коэффициент дыхательного контроля лишь в концентрации 50 мкМ, в то время как триклозан снижает коэффициент ДК уже в концентрации 5 мкМ (табл. 1 и 2). При этом нами установлено, что метилтриклозан, в отличие от триклозана, не оказывает существенного влияния на активность комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс. Лишь в высоких концентрациях (50 мкМ) метилтриклозан незначительно (но статистически достоверно) подавляет активность комплексов II и IV дыхательной цепи митохондрий (рис. 2). Это ингибирующее действие может объяснить подавление дыхания митохондрий метилтриклозаном.

Ранее мы установили, что триклозан способен индуцировать дозозависимое набухание митохондрий, не чувствительное к циклоспорино А [16]. В настоящей работе показано, что метилтриклозан также способен индуцировать неспецифическую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны и набухание органелл. Набухание органелл было продемонстрировано как в экспериментах по светорассеянию суспензии митохондрий, так и с помощью электронной микроскопии. Как и в случае с триклозаном, метилтриклозан индуцировал циклоспорин А-нечувствительное набухание органелл. Данный факт свидетельствует о том, что пермеабилizующее действие метилтриклозана не связано с индукцией МРТ-поры во внутренней мембране митохондрий. При этом эффекты триклозана и метилтриклозана различаются как по динамике набухания митохондрий, так и по концентрациям, при которых развиваются эффекты. При добавлении метилтриклозана к суспензии митохондрий набухание запускается после небольшого лаг-периода (около 10–15 с), а набухание митохондрий, обработанных триклозаном, происходит без лаг-фазы (рис. 4*a*) [16]).

Ранее мы установили, что в основе механизма пермеабилizующего действия триклозана лежит формирование поры в липидной фазе мембраны [16]. При высоких концентрациях (более 50 мкМ) триклозан проявлял детергентное действие [16]. В настоящей работе мы также исследовали влияние метилтриклозана на проницаемость липосомальной мембраны для флуоресцентного зонда сульфородамина В. Метилтриклозан подобно триклозану индуцирует неспецифическую проницаемость липосомальной мембраны. Но по сравнению с триклозаном этот агент менее эффективен, поскольку индуцирует полный выход красителя из липосом лишь в концентрации более чем 120 мкМ, в то время как триклозан демонстрирует подобный эффект при концентрации 50 мкМ (рис. 6*a*).

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что метилтриклозан, как и триклозан, вызывает комплексное нарушение функционирования митохондрий. В частности, метилтриклозан снижает скорость потребления кислорода митохондриями вследствие ингибирования активности комплексов II и IV дыхательной цепи, усиливает продукцию перекиси водорода органеллами, а также индуцирует пермеабилizацию митохондрий печени крыс и однослойных лецитиновых липосом, что, по всей видимости, обусловлено образованием липидных пор.

Следует отметить, что метилтриклозан, в отличие от триклозана, оказывает более “мягкое” влияние на органеллы и их мембраны. Можно полагать, что это связано с их разными химическими структурами (рис. 1). В процессе биотрансформации происходит замена гидроксильной группы в молекуле триклозана на метильную. Подобная модификация может обуславливать снижение мембранотропных (разобщающих, пермеабилizующих и детергентных) эффектов метилтрикло-

зана [23]. Возможно, подобные перестройки объясняют разницу и между эффектами, оказываемыми на митохондрии печени и липосомы триклозаном и метилтриклозаном. Более того, появление метильной группировки в молекуле триклозана должно способствовать снижению токсического действия данного соединения на живые организмы в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-015-00124) и гранта президента РФ для поддержки молодых ученых (МК-61.2019.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weatherly L.M., Grosse J.A. 2017. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* **20** (8), 447–469.
2. Levy C.W., Roujeinikova A., Sedelnikova S., Baker P.J., Stuitje A.R., Slabas A.R., Rice D.W., Rafferty J.B. 1999. Molecular basis of triclosan activity. *Nature*. **398**, 383–384.
3. Heath R.J., Rubin J.R., Holland D.R., Zhang E., Snow M.E., Rock C.O. 1999. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 11110–11114.
4. Zhang L., Niu J., Wang Y. 2016. Full life-cycle toxicity assessment on triclosan using rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **127**, 30–35.
5. Wang F., Xu R., Zheng F. 2018. Effects of triclosan on acute toxicity, genetic toxicity and oxidative stress in goldfish. *Exp. Anim.* **67** (2), 219–227.
6. Palenske N.M., Nallani G.C., Dzialowski E.M. 2010. Physiological effects and bioconcentration of triclosan on amphibian larvae. *J. CBPC*. **152** (2), 232–240.
7. Matozzo V.A., Devoti C., Marin M.G. 2012. Immunotoxic effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology*. **21** (1), 66–74.
8. Feng Y., Zhang P., Zhang Z., Shi J., Jiao Z., Shao B. 2016. Endocrine disrupting effects of triclosan on the placenta in pregnant rats. *PLoS One*. **11** (5), e0154758.
9. Louis G.W., Hallinger D.R., Braxton M.J., Kamel A., Stoker T.E. 2017. Effects of chronic exposure to triclosan on reproductive and thyroid endpoints in the adult Wistar female rat. *Toxicol. Environ. Health A*. **80** (4), 236–249.
10. Paul K.B., Hedge J.M., Bansal R., Zoeller R.T., Peter R., DeVito M.J., Crofton K.M. 2012. Developmental triclosan exposure decreases maternal, fetal, and early neonatal thyroxine: A dynamic and kinetic evaluation of a putative mode-of-action. *J. Toxicology*. **300** (1–2), 31–45.
11. Zorrilla L.M., Gibson E.K., Jeffay S.C., Crofton K.M., Setzer W.R., Cooper R.L., Stoker T.E. 2009. The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats. *Toxicol. Sci.* **107** (1), 56–64.
12. Axelstad M., Boberg J., Vinggaard A.M., Christiansen S., Hass U. 2013. Triclosan exposure reduces thyroxine levels in pregnant and lactating rat dams and in directly exposed offspring. *J. Food Chem. Toxicol.* **59**, 534–540.
13. Wang, X., Chen X., Feng X., Chang F., Chen M., Xia Y., Chen L. 2015. Triclosan causes spontaneous abortion accompanied by decline of estrogen sulfotransferase activity in humans and mice. *J. Sci. Rep.* **5**, 18252.
14. Teplova V.V., Belosludtsev K.N., Kruglov A.G. 2017. Mechanism of triclosan toxicity: Mitochondrial dysfunction including complex II inhibition, superoxide release and uncoupling of oxidative phosphorylation. *Toxicol. Lett.* **275**, 108–117.
15. Dubinin M.V., Tenkov K.S., Svinin A.O., Samartsev V.N., Belosludtsev K.N. 2020. Effect of triclosan on the functioning of liver mitochondria and permeability of erythrocyte membranes of marsh frog (*Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)). *J. Membr. Biol.* **253** (1), 1–10.
16. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Tenkov K.S., Penkov N.V., Agafonov A.V., Pavlik L.L., Yashin V.A., Samartsev V.N., Dubinin M.V. 2018. Study of the mechanism of permeabilization of lecithin liposomes and rat liver mitochondria by the antimicrobial drug triclosan. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860** (2), 264–271.
17. Lindstrom A., Buerge I.J., Poiger T., Bergqvist P.A., Muller M.D., Buser H.R. 2002. Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 2322–2329.
18. Chen X., Nielsen J. L., Furgal K., Liu Y., Lolas I.B., Bester K. 2011. Biodegradation of triclosan and formation of methyl-triclosan in activated sludge under aerobic conditions. *Chemosphere*. **84**, 452–456.
19. Clayborn A.B., Toofan S.N., Champlin F.R. 2011. Influence of methylation on the antibacterial properties of triclosan in *Pasteurella multocida* and *Pseudomonas aeruginosa* variant strains. *J. Hosp. Infect.* **77**, 129–133.
20. Fu J., Gong Z., Bae S. 2019. Assessment of the effect of methyl-triclosan and its mixture with triclosan on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos using mass spectrometry-based metabolomics. *J. Hazard Mater.* **368**, 186–196.
21. Chevillot F., Guyot M., Desrosiers M., Cadoret N., Veilleux E., Cabana H., Bellenger J.P. 2019. Accumulation and sublethal effects of triclosan and its transformation product methyl-triclosan in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to environmental concentrations in an artificial soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **37** (7), 1940–1948.
22. Wang L., Mao B., He H., Shang Y., Zhong Y., Yu Z., Yang Y., Li H., An J. 2018. Comparison of hepatotoxicity and mechanisms induced by triclosan (TCS) and methyl-triclosan (MTCS) in human liver hepatocellular HepG2 cells. *Toxicol. Res. (Camb)*. **8** (1), 38–45.
23. Rosen M. 2004. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 444 p.
24. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Agafonov A.V., Astashev M.E., Kazakov A.S., Saris N.-E.L., Mironova G.D. 2014. Ca^{2+} -dependent permeabilization of mitochondria and liposomes by palmitic and oleic acids: A comparative study. *Biochim. Biophys. Acta*. **1838** (10), 2600–2606.
25. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1), 265–275.
26. Dubinin M.V., Svinin A.O., Vedernikov A.A., Starnets V.S., Tenkov K.S., Belosludtsev K.N., Samartsev V.N.

- sev V.N. 2019. Effect of hypothermia on the functional activity of liver mitochondria of grass snake (*Natrix natrix*): inhibition of succinate-fueled respiration and K^+ transport, ROS-induced activation of mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* **3**, 219–229.
27. Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L., Angelini C. 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* **7**, 1235–1246.
28. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., Mikheeva I.B., Yashin V.A., Penkov N.V., Vydrina V.A., Ishmuratov G.Y., Sharapov V.A., Khoroshavina E.I., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. 2020. Effect of betulin and betulonic acid on isolated rat liver mitochondria and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1862** (10), 183383.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183383>
29. Agafonov A., Gritsenko E., Belosludtsev K., Kovalev A., Gateau-Roesch O., Saris N.-E.L., Mironova G.D. 2003. A permeability transition in liposomes induced by the formation of Ca^{2+} /palmitic acid complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1609**, 153–160.

Effect of Methyltriclosan on the Functioning of Isolated Rat Liver Mitochondria and Permeability of Liposomal Membranes

K. S. Tenkov^{1,*}, M. V. Dubinin¹, A. A. Semenova¹, K. N. Belosludtsev^{1,2,3}

¹Mari State University, Yoshkar-Ola, 424000 Russia

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

³Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: kirill.tenkove@gmail.com

Effects of methyltriclosan, a biodegradation product of the antimicrobial agent triclosan, on the functional parameters of rat liver mitochondria were studied. It was found that methyltriclosan inhibits the activity of complexes II and IV of the respiratory chain. This causes a decrease in the rate of oxygen consumption by mitochondria in states 3 and 3U_{DNP}. Methyltriclosan was shown to increase the rate of hydrogen peroxide production by rat liver mitochondria. In addition, methyltriclosan induces permeabilization of both mitochondrial membranes and the liposome membranes. Methyltriclosan, in contrast to triclosan, has a milder effect on organelles and their membranes. Possible mechanisms of methyltriclosan effects on mitochondria and liposomes are discussed.

Keywords: liver mitochondria, methyltriclosan, triclosan, oxidative phosphorylation, MPT pore, liposomes

УДК 577.352.4

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДА ДЕФЛАЗАКОРТА НА ДЫХАНИЕ И КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМУЮ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

© 2021 г. М. В. Дубинин^{а, *}, А. А. Семенова^а, Е. И. Хорошавина^а, К. Н. Белослудцев^{а, б}

^аМарийский государственный университет,
Йошкар-Ола, Республика Марий Эл, 424000 Россия

^бИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пущино, 142290 Россия

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2020 г.

После доработки 30.11.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

Изучено влияние глюкокортикоида дефлазакорта на функционирование митохондрий печени крыс. Показано, что дефлазакорт в концентрациях до 100 мкМ не оказывает влияния на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс, энергизованных как в присутствии глутамат/малата (субстраты комплекса I дыхательной цепи), так и сукцината (субстрат комплекса II дыхательной цепи). Выяснено, что дефлазакорт не влияет на проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени, но снижает устойчивость органелл к индукции кальций-зависимой МРТ поры. Кроме того, установлено, что этот глюкокортикоид способен индуцировать снижение уровня митохондриального NAD(P)H, а также ингибировать продукцию перекиси водорода органеллами. Обсуждается, как влияние дефлазакорта на функционирование митохондрий может быть связано с терапевтическими эффектами этого агента.

Ключевые слова: митохондрии печени, глюкокортикоиды, дефлазакорт, окислительное фосфорилирование, кальций-зависимая пора, NAD(P)H

DOI: 10.31857/S0233475521020031

ВВЕДЕНИЕ

Природные и синтетические глюкокортикоиды влияют на большинство физиологических систем и являются наиболее часто используемыми агентами для терапии заболеваний различной этиологии, а также благодаря своим иммуносупрессивным свойствам активно используются при трансплантации органов и тканей. Общеизвестно, что глюкокортикоиды участвуют в поддержании гиперметаболического состояния в ответ на стрессовые условия и травмы, что проявляется в повышении интенсивности метаболизма белков в скелетных мышцах, глюконеогенеза в печени, а также в развитии гипергликемии и резистентности к инсулину [1].

Действие глюкокортикоидов в организме в основном проявляется через глюкокортикоидные рецепторы. Такие рецепторы обнаружены в мембранах клеток и их ядер, а также на мембранах митохондрий [2–5]. Известно, что их активация глюкокортикоидами приводит к запуску внутриклеточных сигнальных путей, оказывающих в

том числе значительное влияние на биогенез и функциональную активность митохондрий [6–9]. Так, показано, что основным эффектом глюкокортикоидов является активация ядерных генов, приводящая к усилению митохондриального биогенеза и массы органелл [9]. Кроме того, известно, что глюкокортикоиды оказывают значительное влияние на экспрессию ядерных генов, кодирующих белки системы окислительного фосфорилирования митохондрий, и, таким образом, влияют на дыхательную активность этих органелл [6–8, 10]. Наряду с этим выяснено, что глюкокортикоиды способны оказывать непосредственное влияние на митохондриальную биоэнергетику, не связанное с участием специализированных рецепторов. Так, было показано, что природные и синтетические глюкокортикоиды способны ингибировать дыхание изолированных митохондрий почек и мозга, которое, как предполагается, обусловлено снижением активности АТР-синтазы и цитохром-с-оксидазы [11–13]. Сообщается о способности кортикосте-

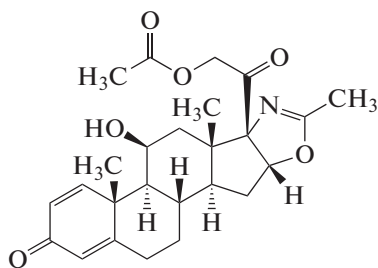


Рис. 1. Структура дефлазакорта.

рона подавлять транспорт электронов от NADH к комплексу I дыхательной цепи в кортикальных митохондриях [14]. Кроме того, известно, что глюкокортикоиды оказывают модулирующее влияние на работу мембранных белков, участвующих в том числе в транспорте ионов кальция в клетке и митохондриях [15].

В настоящей работе нами изучено влияние глюкокортикоида дефлазакорта, активно применяемого для коррекции нервно-мышечных заболеваний и, в частности, мышечной дистрофии Дюшенна, на функционирование митохондрий печени крыс в условиях *in vitro*. Дефлазакорт (рис. 1) представляет собой оксазолон-производное глюкокортикоида преднизона, обладающее сравнимыми с ним противовоспалительными и иммуносупрессивными эффектами, но менее выраженными побочными эффектами по сравнению с предшественниками [16, 17]. Дефлазакорт, метаболизируясь в печени до активного метаболита — 21-деацетилдефлазакорта, воздействует на глюкокортикоидные рецепторы, что приводит к подавлению высвобождения цитокинов и пролиферации CD4⁺ лимфоцитов, но в то же время увеличению количества CD8⁺ клеток, что способствует подавлению иммунного ответа и воспалительных процессов в мышечной ткани [16, 17]. Показано, что его использование продлевает двигательную способность пациентов, страдающих дистрофией Дюшенна, на срок от 2 до 5 лет и улучшает мышечную силу и сердечно-легочную функцию [17]. Однако его использование, тем не менее, сопровождается побочными эффектами, такими как синдром Кушинга, эритема, гирсутизм, увеличение веса, назофарингит, задержка полового созревания и катаракта [18–20].

Ранее нами было показано, что терапия с использованием дефлазакорта может быть использована для коррекции митохондриальной дисфункции, характерной для скелетной мускулатуры модельных мышей, страдающих дистрофией Дюшенна [21, 22]. Было предположено, что такое действие этого агента опосредовано его действи-

ем на глюкокортикоидные рецепторы, активирующие внутриклеточные сигнальные пути, затрагивающие, в том числе, и митохондрии. В то же время практически ничего не известно о непосредственном влиянии дефлазакорта на функционирование митохондрий. Поэтому в настоящей работе нами изучено влияние этого глюкокортикоида на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс, проницаемость внутренней мембраны органелл, а также индукцию Ca²⁺-зависимой митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore, MPT-поры). Показано, что 1) дефлазакорт не оказывает влияния на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс, а также на активность комплексов дыхательной цепи органелл; 2) дефлазакорт индуцирует снижение уровня митохондриального пула NAD(P)H и оказывает ингибирующее влияние на генерацию перекиси водорода органеллами; 3) дефлазакорт снижает кальциевую емкость митохондрий печени и устойчивость органелл к индукции Ca²⁺-зависимой MPT-поры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий печени крыс. Митохондрии из печени половозрелых самцов крыс линии Вистар (весом 210–250 г) выделяли методом дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА) фракции V в соответствии с описанной ранее методикой [23]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA, 5 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Концентрацию белка митохондрий определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали раствор БСА. Во время проведения эксперимента суспензию митохондрий (70–80 мг митохондриального белка в 1 мл) хранили на льду.

Оценка дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25°C в ячейке объемом 0.5 мл с помощью кислородного электрода типа Кларк и установки Oxygraph Plus (Hansatech Instruments, Великобритания) [24]. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ KCl, 5 мМ KH₂PO₄, 0.5 мМ EGTA, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 0.2 мМ ADP, 50 мкМ 2,4-динитрофенол и 1 мкМ ротенон. Оценивали дыхание митохондрий в основном метаболическом состоянии (т.е.

в присутствии экзогенных субстратов или состоянии 2), в состоянии 3 (в присутствии экзогенных субстратов и ADP), в состоянии 4 (после того, как весь добавленный ADP был израсходован в процессе синтеза АТФ), скорость дыхания митохондрий в состоянии $3U_{\text{ДНФ}}$ (в присутствии протониформного разобщителя 2,4-динитрофенола (ДНФ) в концентрации 50 мкМ, вызывающей максимальную стимуляцию дыхания). Скорость окисления субстратов выражена в $\text{нмоль O}_2 \times \text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$ белка митохондрий. Коэффициент дыхательного контроля (ДК = состояние 3/состояние 4). ADP/O — стехиометрический коэффициент, показывающий эффективность окислительного фосфорилирования. Значение коэффициента ADP/O определяли пульсовым методом [25]. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла ~ 1.0 мг/мл.

Оценка активности комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс. Влияние дефлаза-корта на активность комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс оценивали спектрофотометрически согласно общепринятым протоколам [26, 27] с использованием планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo, США). Для разрушения митохондрий, освобождения индивидуальных комплексов дыхательной цепи и достижения их максимальной ферментативной активности изолированные митохондрии (10 мг/мл митохондриального белка) предварительно подвергали трехкратной процедуре замораживания/оттаивания при $-20/+30^\circ\text{C}$ в гипотоническом буфере, содержащем 10 мМ Трис—HCl, pH 7.6. Состав буферов, использованных для анализа активности индивидуальных комплексов дыхательной цепи, приведен в работах [27]. Активность комплекса I оценивалась при 25°C по эффективности восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола разрушенными митохондриями (50 мкг митохондриального белка/мл), которое оценивалось по скорости уменьшения оптической плотности при 600 нм после внесения 100 мкМ NADH [26]. Активность комплекса II дыхательной цепи оценивали при 37°C по эффективности восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия суспензией разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл) в присутствии субстрата окисления сукцината, которое определялось по снижению светопоглощения суспензии при длине волны 600 нм после внесения 50 мкМ дециллубихинона. Активность комплекса III дыхательной цепи оценивали при 25°C по эффективности восстановления добавленного цитохрома c суспензией разрушенных митохондрий (25 мкг митохондриального белка/мл), которое определялось по снижению оптической плотности суспензии при длине волны 550 нм по-

сле внесения 100 мкМ дециллубихинола. Активность комплекса IV дыхательной цепи оценивали при 25°C по эффективности окисления добавленного цитохрома c (восстановленного в соответствии с [27]) суспензией разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл), которое определялось по снижению оптической плотности суспензии при длине волны 550 нм после внесения суспензии разрушенных органелл. Суммарная активность комплексов I и III оценивалась при 25°C по эффективности восстановления добавленного цитохрома c суспензией разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл), что выражалось в снижении поглощения при длине волны 550 нм после внесения 200 мкМ NADH. Суммарная активность комплексов II и III была оценена при 37°C по эффективности восстановления добавленного цитохрома c суспензией разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл), что выражалось в снижении поглощения при длине волны 550 нм после внесения 50 мкМ цитохрома c (окисленной формы). Активность комплексов дыхательной цепи оценивали в течение первых 1–2 мин с начала редокс-реакции (нмоль/мин на 1 мг белка). Влияние дефлаза-корта на активность комплексов дыхательной цепи выражали в процентах от средней активности, регистрируемой в серии контрольных экспериментов.

Оценка разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий. Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катиона тетрафенилфосфония (TFF^+) через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали с помощью TFF^+ -чувствительного электрода и многоканальной электрометрической системы Record 4usb (разработка ИБК РАН, Россия) в кювете объемом 1.2 мл при 25°C и постоянной аэрации, и перемешивании [28]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES—KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 50 мкМ 2,4-динитрофенол и 1 мкМ ротенон. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла ~ 1.0 мг/мл.

Оценка кальцевой емкости митохондрий печени крыс. Транспорт Ca^{2+} через внутреннюю митохондриальную мембрану оценивали спектрофотометрически с помощью индикатора арсеназо III (3,6-бис-[(2-арсонофенил)азо]-4,5-дигидрокси-2,7-нафталиндисульфокислота) индикатора при

675–685 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo, США) при 25°C и постоянном перемешивании [29]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 50 мкМ арсеназо III, 10 мкМ EGTA, 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла ~ 0.5 мг/мл. Для определения способности митохондрий удерживать Ca^{2+} , 5 мкМ CaCl_2 последовательно добавлялись в реакционную среду. После нескольких добавлений происходило увеличение внешней $[\text{Ca}^{2+}]$, что указывало на массивное высвобождение иона из органелл вследствие открытия кальций-зависимой МРТ-поры. Способность Ca^{2+} индуцировать открытие поры в митохондриях выражалась количественно как кальциевая емкость (КЕ) митохондрий, т.е. то максимальное количество Ca^{2+} , которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры.

Оценка интенсивности набухания митохондрий. Открытие митохондриальной поры оценивали по набуханию митохондрий, которое регистрировали по изменению оптической плотности суспензии митохондрий при длине волны 540 нм (A_{540}) при постоянном перемешивании и термостатировании при 25°C на планшетном спектрофотометре Multiskan GO (Thermo). Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ сукцинат, 1 мкМ ротенон, 10 мкМ EGTA, 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла ~ 0.5 мг/мл. Скорость набухания митохондрий ($V_{\max} = \Delta A_{540}/\text{мин}$ на 1 мг белка) рассчитывали как изменение оптической плотности суспензии в течение первых 30 с от начала высокоамплитудного набухания.

Оценка состояния пула NAD(P)H. Автофлуоресценцию NAD(P)H измеряли при длине волны возбуждения 340 нм и длине волны излучения 450 нм с использованием спектрофлуориметра Fluorat-02-Panorama (Lumex Instruments, Россия). Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ EGTA, 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла ~ 0.5 мг/мл. 5 мкМ *n*-трифторометоксикарбонилцианидфенилгидразона (FCCP) до-

бавляли в конце измерений, чтобы вызвать максимальное окисление NAD(P)H.

Оценка скорости образования H_2O_2 митохондриями печени. Скорость образования H_2O_2 измеряли с помощью тест-системы, включающей в себя флуоресцентный индикатор Amplex Red и пероксидазу хрена на планшетном флуориметре Tecan Spark 10M (Tecan, Швейцария) при длине волны возбуждения 560 нм и длине волны излучения 590 нм. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 5 мМ сукцинат, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ ЭГТА, 1 мкМ ротенон и 10 мМ HEPES–KOH (pH 7.4), 10 мкМ Amplex Red и пероксидазу хрена (акт. 1 ед/мл). Концентрация митохондриального белка составляла 0.15 мг/мл. Измерения проводились при 37°C и постоянном перемешивании. Количество образованной перекиси водорода рассчитывалось по калибровочной кривой. Стандартный раствор H_2O_2 был приготовлен непосредственно в день проведения эксперимента; его концентрацию определяли с использованием коэффициента молярной экстинкции $E_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Статистическая обработка результатов. Данные были проанализированы с использованием программ Graph Pad Prism 5 и Microsoft Excel и представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка средней. Полученные данные были обработаны статистически с использованием *t*-критерия. Для оценки значимости различий использовался уровень вероятности $p < 0.05$.

Материалы. Дефлазакорт и другие реактивы, используемые в работе, были приобретены в Sigma-Aldrich (США). Дефлазакорт растворяли в ДМСО (10 мМ сток-раствор). В контрольных пробах к митохондриям добавляли ДМСО в том же объеме, как в добавках дефлазакорта. Во всех случаях ДМСО не влиял на исследуемые параметры митохондрий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние различных стероидов *in vitro* на функциональную активность митохондрий ранее было подробно исследовано. В частности, было показано, что предшественник дефлазакорта, глюкокортикоид преднизон, дозозависимо в концентрациях 10–100 мкМ и более существенно снижал скорость дыхания митохондрий печени и почек в состоянии 3 (ADP-стимулированном) [11, 12, 30, 31]. Подобным эффектом обладали и другие природные и синтетические глюкокортикоиды (кортизон, кортизол, гидрокортизон, преднизолон, дексаметазон и др.) [12]. Такое действие указанных стероидов сопровождалось существенным

Таблица 1. Влияние дефлазакорта и преднизолона на дыхание митохондрий в разных функциональных состояниях в присутствии глутамата и малата

Дефлазакорт, мкМ	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{ДНФ}	ДК	ADP/O
	V дыхания, нмоль O ₂ /мин/мг белка митохондрий				отн. ед.	
0	4.68 ± 0.44	24.01 ± 0.23	5.94 ± 0.30	27.53 ± 1.40	4.08 ± 0.26	2.61 ± 0.11
20	3.89 ± 0.28	21.87 ± 1.33	5.19 ± 0.25	25.48 ± 1.61	4.21 ± 0.05	2.63 ± 0.09
50	4.50 ± 0.49	25.45 ± 0.56	6.17 ± 0.27	30.35 ± 0.71	4.13 ± 0.22	2.64 ± 0.07
100	4.01 ± 0.13	23.94 ± 1.56	6.12 ± 0.64	27.71 ± 0.57	3.94 ± 0.14	2.52 ± 0.13
100 мкМ преднизолон	5.21 ± 0.32	21.75 ± 0.53*	8.26 ± 0.44*	25.41 ± 1.09	2.71 ± 0.16*	2.15 ± 0.08*

Примечание. Дыхание митохондрий в состоянии 3 индуцировали добавлением 200 мкМ ADP. Скорость разобщенного дыхания измеряли в присутствии 50 мкМ ДНФ (состояние 3U_{ДНФ}). Дыхательный контроль (ДК) рассчитан как отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 3$). * — различия между данными опытов (присутствие указанной концентрации преднизолона) и контролем (отсутствие преднизолона) статистически значимы, $p < 0.05$.

Таблица 2. Влияние дефлазакорта и преднизолона на дыхание митохондрий в разных функциональных состояниях в присутствии сукцината

Дефлазакорт, мкМ	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{ДНФ}	ДК	ADP/O
	V дыхания, нмоль O ₂ /мин/мг белка митохондрий				отн. ед.	
0	9.44 ± 1.05	45.61 ± 1.98	11.97 ± 0.62	63.41 ± 2.38	3.82 ± 0.17	1.63 ± 0.08
20	7.92 ± 0.65	48.89 ± 3.30	12.84 ± 0.35	65.65 ± 2.92	3.81 ± 0.16	1.61 ± 0.11
50	7.90 ± 0.34	45.47 ± 0.68	11.78 ± 0.22	61.01 ± 0.28	3.86 ± 0.09	1.61 ± 0.05
100	8.96 ± 0.61	47.12 ± 1.12	12.95 ± 0.21	65.04 ± 0.95	3.65 ± 0.09	1.60 ± 0.09
100 мкМ преднизолон	10.17 ± 0.88	37.86 ± 0.92*	15.81 ± 0.52*	57.24 ± 0.78	2.43 ± 0.11*	1.21 ± 0.09*

Примечание. В качестве субстрата дыхания применяли 5 мМ янтарную кислоту. Дыхание митохондрий в состоянии 3 индуцировали добавлением 200 мкМ ADP. Скорость разобщенного дыхания измеряли в присутствии 50 мкМ ДНФ (состояние 3U_{ДНФ}). Дыхательный контроль (ДК) рассчитан как отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 3$). * — различия между данными опытов (присутствие указанной концентрации преднизолона) и контролем (отсутствие преднизолона) статистически значимы, $p < 0.05$.

снижением дыхательного контроля (ДК) и коэффициента ADP/O , что свидетельствовало об угнетении функциональной активности органелл.

В настоящей работе мы оценили влияние глюкокортикоида дефлазакорта, применяемого для коррекции мышечной дистрофии Дюшенна, на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс. В табл. 1 представлены результаты, описывающие эффект дефлазакорта на дыхание митохондрий печени крыс в разных функциональных состояниях в присутствии глутамата и малата, субстратов комплекса I дыхательной цепи. Можно видеть, что дефлазакорт в концентрациях 20–100 мкМ не влияет на скорости дыхания митохондрий печени крыс во всех метаболических состояниях (состоя-

ние 2, состояние 3, состояние 4 и состояние 3U_{ДНФ}), а также не влияет на параметр ДК и эффективность синтеза АТР, что оценивалось по коэффициенту ADP/O . Аналогичные результаты получены в присутствии сукцината, субстрата комплекса II дыхательной цепи митохондрий (табл. 2), можно видеть, что дефлазакорт и в этом случае не влияет на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования органелл во всем диапазоне изучаемых концентраций. В то же время другой глюкокортикоид — преднизолон в концентрации 100 мкМ достоверно снижал скорость ADP-стимулированного дыхания митохондрий печени и, напротив, увеличивал скорость дыхания органелл в состоянии 4 вне зависимости от используемого субстрата дыхания (табл. 1 и 2).

Таблица 3. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс в присутствии 50 мкМ дефлазакарта (в % от контроля)

Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV	Комплекс I + III	Комплекс II + III
100.5 ± 2.5	101.5 ± 3.0	96.5 ± 6.7	97.7 ± 3.3	103.1 ± 1.9	103.3 ± 1.1

Примечание. Активность комплексов в отсутствие дефлазакарта принята за 100%. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

Такое действие преднизолона сопровождалось снижением параметра дыхательного контроля ДК и коэффициента ADP/O . Это соответствует известным данным, свидетельствующим об угнетающем влиянии преднизолона на функциональную активность митохондрий печени [30].

Из данных табл. 3 видно, что дефлазакарт в концентрации 50 мкМ не оказывает действия на активность как отдельных комплексов дыхательной цепи органелл (комплексы I, II, III и IV), так и суммарную активность комплексов I + III и II + III, что свидетельствует об отсутствии влияния этого агента на мобильность коэнзима Q и его доступность для комплексов дыхательной цепи.

Ранее было показано, что кортикостероиды и, в частности, предшественник дефлазакарта преднизон, оказывают ингибирующее влияние на активность комплексов дыхательной цепи митохондрий и, прежде всего, цитохром *c* оксидазы (комплекс IV), которое сопровождается подавлением дыхания органелл [12]. При этом предполагается, что такое действие глюкокортикоидов может лежать в основе многочисленных побочных эффектов этих терапевтических соединений и, прежде всего, психических расстройств [12]. В нашем случае можно отметить, что дефлазакарт, в отличие от других природных и синтетических глюкокортикоидов не оказывает влияния на активность цитохром *c* оксидазы и других комплексов дыхательной цепи и ее компонентов. В то же время следует отметить наши недавние данные, свидетельствующие о том, что *in vivo* введение дефлазакарта модельным мышам, страдающим мышечной дистрофией Дюшенна, приводит к увеличению уровня комплексов III и IV в митохондриях скелетных мышц, а также АТР-синтазы [22]. Однако в этом случае можно полагать, что действие дефлазакарта обусловлено известной способностью этих агентов активировать глюкокортикоидные рецепторы и внутриклеточные сигнальные пути, затрагивающие, в том числе, ядерные гены и гены митохондриальной ДНК, кодирующие белки комплексов дыхательной цепи митохондрий [5]. С другой стороны, введение

этого агента здоровым мышам не приводило к достоверному изменению уровня комплексов дыхательной цепи органелл [22]. Полученные результаты можно рассматривать как свидетельство того, что дефлазакарт, в отличие от своего предшественника преднизона, не способен оказывать прямое влияние на функционирование системы окислительного фосфорилирования митохондрий. Возможно, что это также обуславливает менее выраженные психиатрические побочные эффекты, характерные для терапии с использованием дефлазакарта по сравнению с преднизолоном и другими глюкокортикоидами [16, 17].

Известно, что глюкокортикоиды в концентрациях порядка 1 мМ индуцируют набухание митохондрий, что может свидетельствовать о способности этих соединений влиять на проницаемость внутренней мембраны органелл [30]. Однако меньшие концентрации этих агентов не эффективны [12]. В настоящей работе мы также оценили влияние дефлазакарта на проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени крыс, которое может быть зарегистрировано по снижению оптической плотности суспензии органелл, свидетельствующему об их набухании. Из рис. 2 можно видеть, что дефлазакарт в концентрациях до 100 мкМ не оказывает влияния на оптическую плотность суспензии митохондрий печени вне зависимости от используемого субстрата дыхания (глутамат/малат или сукцинат). В этом случае лишь дальнейшее добавление известного каналобразующего агента аламетицина индуцировало высокоамплитудное набухание органелл. Кроме того, мы изучили влияние дефлазакарта на изменение $\Delta\psi$ на внутренней мембране митохондрий, которое оценивали по распределению ТФФ⁺. Как видно на рис. 3, пульсовое внесение дефлазакарта к суспензии органелл практически не оказывает влияния на изменение $\Delta\psi$ на внутренней мембране митохондрий. Лишь в конечной концентрации 100 мкМ дефлазакарт вызывает незначительное снижение мембранного потенциала органелл, энергизованных NAD-зависимыми субстратами. Наряду с этим можно отметить, что дефлазакарт в концентрациях 50 и 100 мкМ, добавленный к ми-

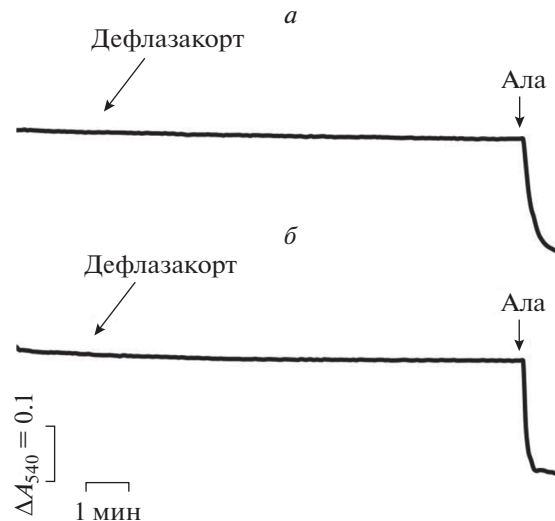


Рис. 2. Влияние 50 мкМ дефлазакорта на изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени, энергизованных глутамат/малатом (а) и сукцинатом (б). Субстраты и реагенты: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия (а), 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон (б). Концентрация митохондриального белка в кювете — 0.5 мг/мл. 5 мкг/мл аламетицина (Ала) добавлено в конце каждого эксперимента для оценки максимального набухания органелл. На каждом из рисунков представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

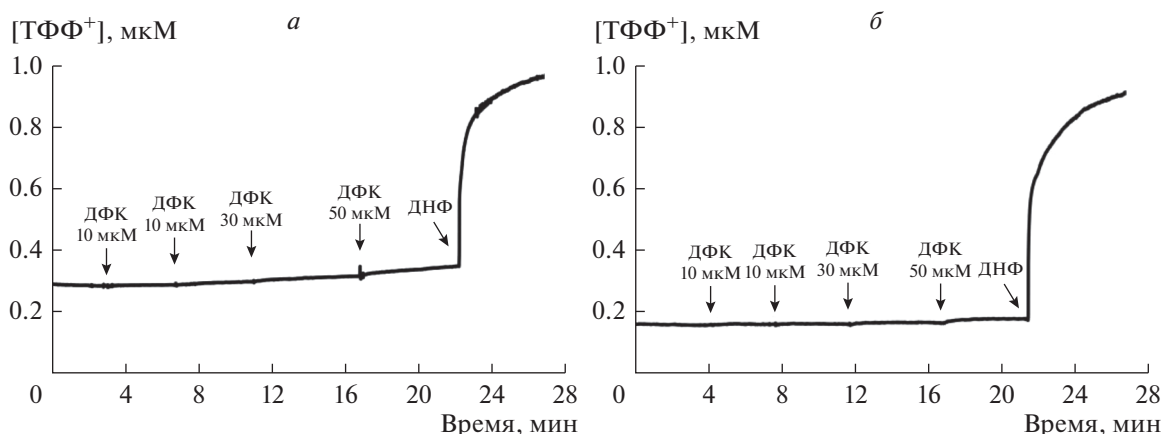


Рис. 3. Влияние дефлазакорта (ДФК) на мембранный потенциал митохондрий печени крыс, энергизованных глутамат/малатом (а) и сукцинатом (б). Субстраты и реагенты: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия (а), 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон (б), 50 мкМ ДНФ (а, б). На каждом из рисунков представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

тохондриям печени крыс, энергизованным глутамат/малатом, вызывает дозозависимое уменьшение интенсивности автофлуоресценции NAD(P)H, что свидетельствует о снижении уровня восстановленной формы нуклеотидов (рис. 4а). Подобного не наблюдается при внесении к митохондриям эквивалентного количества растворителя — ДМСО (рис. 4а). Аналогичные результаты получены в случае энергизации митохондрий сукцинатом — дефлазакорт также индуцировал

дозозависимое уменьшение интенсивности автофлуоресценции NAD(P)H, свидетельствующее о снижении пула восстановленной формы последних (рис. 4б). Стоит отметить, что такое действие дефлазакорта проявлялось только в присутствии субстрата окисления и не наблюдалось в случае неэнергизованных митохондрий (рис. 4в). Кроме того, в контрольных экспериментах (при внесении восстановленной формы пиридиновых нуклеотидов в среду инкубации в отсутствие мито-

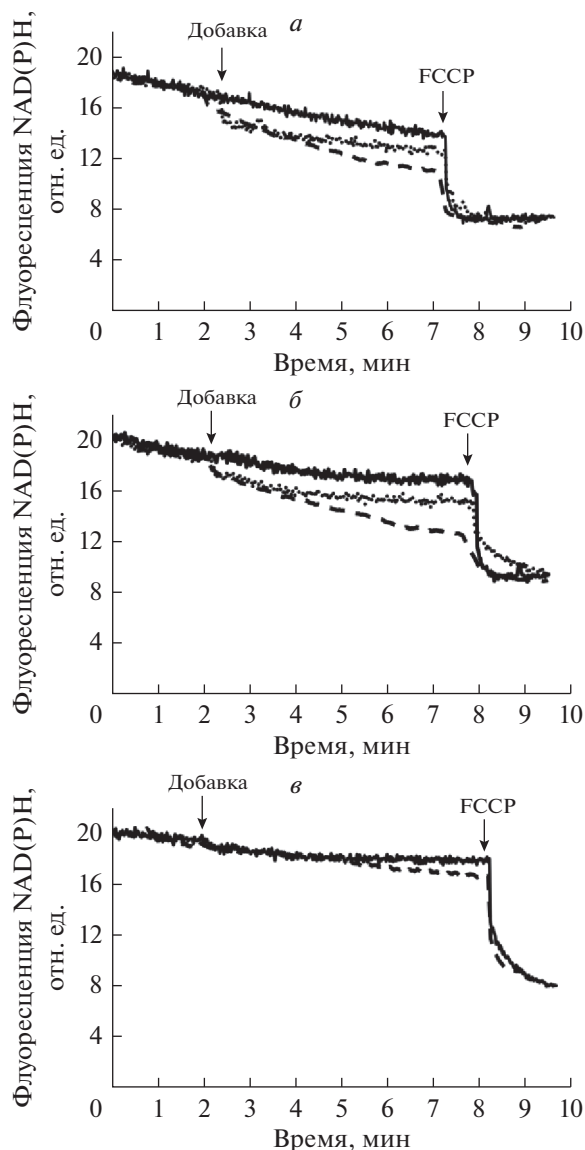


Рис. 4. Изменение редокс-состояние пула NAD(P)H в митохондриях печени крыс, энергизованных глутамат/малатом (а), сукцинатом (б) и в отсутствии субстратов окисления (в) при добавлении 50 мкМ (точечная линия) и 100 мкМ дефлазакурта (пунктирная линия) или эквивалентного количества растворителя — ДМСО (сплошная линия). Субстраты и реагенты: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия (а), 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон (б), 1 мкМ ротенон (в). Концентрация митохондриального белка в кювете — 0.5 мг/мл. 5 мкМ FCCP добавлено в конце каждого эксперимента для оценки максимального окисления пиридиновых нуклеотидов. На каждом из рисунков представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

хондрий) выяснено, что дефлазакурт не оказывает непосредственного влияния на редокс-состояние пиридиновых нуклеотидов (данные не приведены). Исходя из этого, можно предполагать, что дефлазакурт способен активировать митохондриальные процессы, требующие участия NAD(P)H. К таким процессам могут относиться NAD(P)H-зависимые антиоксидантные системы митохондрий и, в частности, тиол-дисульфидная глутатионовая редокс-система и ее ферменты: глутатион-

пероксидаза и глутатионредуктаза, участвующие в утилизации перекиси водорода, генерируемой, прежде всего, дыхательной цепью митохондрий [32]. В этом случае стоит ожидать снижения уровня H_2O_2 в митохондриях. Действительно, можно видеть, что дефлазакурт дозозависимо снижает скорость генерации H_2O_2 митохондриями как в присутствии субстратов комплекса I дыхательной цепи (глутамата/малат), так и субстрата комплек-

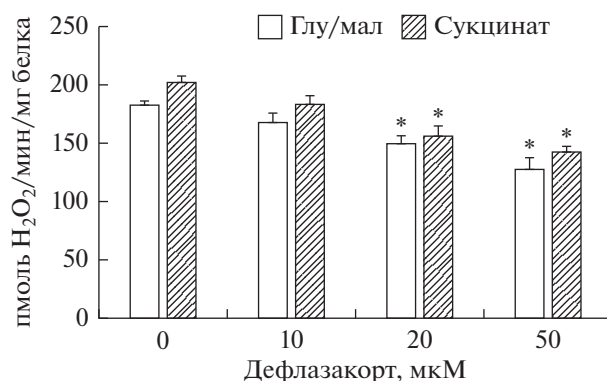


Рис. 5. Влияние различных концентраций дефлазакорта на продукцию H_2O_2 митохондриями печени крысы, энергизованными глутамат/малатом или сукцинатом. Приведены средние $\pm$ ошибка среднего ($n = 4$). * — различия между данными опытов (присутствие указанных концентраций дефлазакорта) и контролем (отсутствие дефлазакорта) статистически значимы, $p < 0.05$.

са II дыхательной цепи (сукцинат в присутствии ротенона) (рис. 5).

Общепризнано, что митохондрии не только обеспечивают клетку АТФ и теплом, но играют ведущую роль в процессах регуляции ее функций при участии свободного Ca^{2+} [33–35]. Известно, что изолированные митохондрии из различных органов и тканей животных в энергизованном состоянии обладают способностью аккумулировать и удерживать Ca^{2+} в матриксе [34, 35]. Однако при критической перегрузке матрикса органелл ионами кальция наблюдается индукция неспецифической проницаемости внутренней мембраны для ионов и растворимых в воде веществ с молекулярной массой до 1500 Да по их градиенту концентрации (или открытие митохондриальной поры) [33–35]. Образование такой поры приводит к нарушению энергетических функций митохондрий, прежде всего синтеза АТФ, а также может вызвать набухание матрикса митохондрий, разрыв внешней мембраны и, как следствие, выход находящихся в межмембранном пространстве цитохрома *c* и других, так называемых апоптогенных белков [33–35]. В связи с этим индукция поры во внутренней мембране митохондрий рассматривается как один из факторов гибели клеток при различных патологических состояниях [33–36].

Известно, что природные и синтетические глюкокортикоиды способны модулировать внутриклеточные потоки ионов кальция [15]. В тоже время в случае митохондрий действие глюкокортикоидов достаточно специфично. Так было показано, что дексаметазон в высоких концентрациях (до 200 мкМ) ингибирует открытие кальций-зависимой МРТ-поры в митохондриях печени и почек в экспериментах *in vitro* [37]. С другой стороны, в подобных эксперименталь-

ных условиях другие глюкокортикоиды (преднизолон, гидрокортизон и др.) в концентрациях менее 100 мкМ не оказывали значительного влияния на кальций-зависимое набухание изолированных митохондрий почек [12].

В настоящей работе мы также оценили влияние дефлазакорта на эффективность индукции кальций-зависимой поры в митохондриях печени крыс. На рис. 6 представлены результаты сравнительного изучения кинетики поглощения Ca^{2+} митохондриями печени крыс, энергизованными глутамат/малатом или сукцинатом в инкубируемых в отсутствие и в присутствии дефлазакорта. Можно видеть, что митохондрии печени крыс, энергизованные глутамат/малатом, полностью поглощают Ca^{2+} при условии добавления CaCl_2 8 раз по 10 нмоль на 1 мг белка (рис. 6а, кривая 1) и удерживают его в матриксе в течение как минимум 10 мин (данные не приведены). В этом случае только после девятой добавки CaCl_2 наблюдается выход Ca^{2+} из митохондрий (рис. 6а, кривая 1). Предварительная инкубация митохондрий в присутствии 20 мкМ дефлазакорта не оказывает существенного влияния на способность митохондрий поглощать ионы кальция (рис. 6а, кривая 2). Однако внесение дефлазакорта в концентрации 50 и 100 мкМ приводит к тому, что выход кальция из митохондрий происходит, соответственно, уже после 8 и 7 добавки CaCl_2 в том же количестве (рис. 6а, кривые 3 и 4). Подобная картина наблюдается и в случае митохондрий, энергизованных сукцинатом (рис. 4б), — предварительная инкубация органелл с 50 и 100 мкМ дефлазакорта приводит к снижению способности митохондрий поглощать ионы кальция.

Способность Ca^{2+} индуцировать открытие поры в митохондриях можно выразить количе-

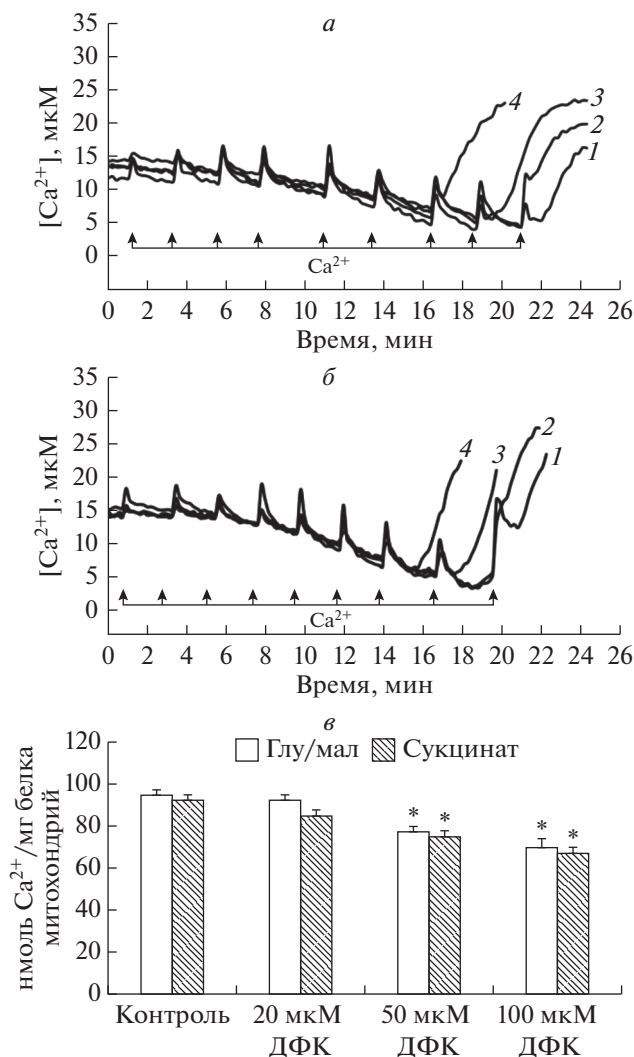


Рис. 6. Влияние дефлазакурта (ДФК) на транспорт кальция в митохондриях печени крыс. *а* – Поглощение добавок Ca^{2+} (пульсы по 5 мкМ) митохондриями печени, энергизованными глутамат/малатом, в отсутствие добавок (1) и в присутствии 20 мкМ (2), 50 мкМ (3) и 100 мкМ (4) дефлазакурта. *б* – Поглощение добавок Ca^{2+} (пульсы по 5 мкМ) митохондриями печени, энергизованными сукцинатом, в отсутствие добавок (1) и в присутствии 20 мкМ (2), 50 мкМ (3) и 100 мкМ (4) дефлазакурта. *в* – Кальциевая емкость митохондрий печени крыс в отсутствие (контроль) и в присутствии различных концентраций дефлазакурта. Субстраты и реагенты: 2,5 мМ малат калия, 2,5 мМ глутамат калия (*а*), 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон (*б*). Концентрация митохондриального белка в кювете – 0,5 мг/мл. На панелях *а* и *б* представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в трех независимых экспериментах. Панель *в* – приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 4$). * – различия между данными опытов (присутствие указанных концентраций дефлазакурта) и контролем (отсутствие дефлазакурта) статистически значимы, $p < 0.05$.

ственно как кальциевая емкость (КЕ) митохондрий, т.е. то максимальное количество Ca^{2+} , которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры [34]. Очевидно, что, исходя из кинетики поглощения Ca^{2+} (рис. 6*а* и 6*б*), можно определить КЕ митохондрий печени в отсутствие и в присутствии различных концентраций дефлазакурта. Как показано на рис. 6*в*, дефлазакурт в концентрации 20 мкМ не оказывает существенного влияния на этот параметр митохондрий вне зависимости от субстрата окисления. В то же время 50 и 100 мкМ дефлазакурта вызывают достоверное снижение КЕ митохондрий печени крыс по сравнению с контролем.

Другим параметром, позволяющим оценить влияние дефлазакурта на эффективность индукции Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры, является регистрация набухания органелл в ответ на добавку ионов кальция. Известно, что набухание митохондрий приводит к уменьшению рассеивания проходящего через суспензию света, и это может быть зарегистрировано как снижение оптической плотности суспензии этих органелл [21]. Как видно на рис. 7*а* (кривая 1), добавление 60 нмоль на 1 мг белка $CaCl_2$ к митохондриям печени крыс, инкубируемым в среде с P_i и энергизованным путем окисления сукцината, приводит к существенному снижению оптической плотности суспензии. В то время как в присутствии циклоспорина А (ЦсА), ингибитора митохондриальной МРТ-поры, такого эффекта не наблюдается (рис. 7*а*, кривая 2). Предварительная инкубация органелл с дефлазакуртом в концентрациях 20, 50 и 100 мкМ приводит к дозозависимому увеличению эффективности Ca^{2+} -индуцированного набухания органелл (рис. 7*а*, кривые 3–5), которое также блокируется ЦсА (рис. 7*а*, кривая 6). Полученные данные суммированы на рис. 7*б*, где представлены скорости Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий печени крыс в отсутствие и в присутствии дефлазакурта. Можно видеть, что дефлазакурт дозозависимо увеличивает эффективность Ca^{2+} как индуктора МРТ-поры. Таким образом, этот глюкокортикоид способен снижать резистентность органелл к индукции ЦсА-чувствительной митохондриальной поры. Стоит отметить, что подобные результаты были получены нами ранее и в экспериментах *in vivo* – терапия с использованием дефлазакурта достоверно снижала КЕ митохондрий скелетных мышц и, соответственно, устойчивость органелл к индукции кальций-зависимой МРТ-поры [22]. Однако в этом случае действие этого агента было также обусловлено запуском внутриклеточных сигнальных путей и увеличением экспрессии ге-

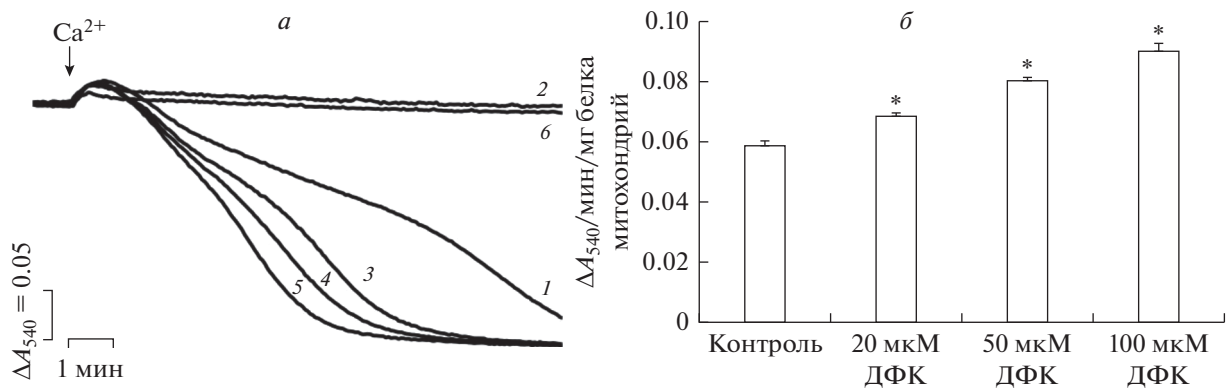


Рис. 7. Влияние дефлазакурта (ДФК) на Ca^{2+} -зависимое набухание митохондрий печени. *a* — кинетика изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени в присутствии 30 мкМ Ca^{2+} (1); 1 мкМ ЦсА и 30 мкМ Ca^{2+} (2); 20 мкМ ДФК и 30 мкМ Ca^{2+} (3); 50 мкМ ДФК и 30 мкМ Ca^{2+} (4); 100 мкМ ДФК и 30 мкМ Ca^{2+} (5); 1 мкМ ЦсА, 100 мкМ ДФК и 30 мкМ Ca^{2+} (6). Концентрация митохондриального белка в кювете — 0.5 мг/мл. *б* — зависимость скорости Ca^{2+} -зависимого набухания митохондрий печени от концентрации ДФК. На панели *a* представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в трех независимых экспериментах. Панель *б* — приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 4$). * — различия между данными опытов (присутствие указанных концентраций дефлазакурта) и контролем (отсутствие дефлазакурта) статистически значимы, $p < 0.05$.

нов, кодирующих белки — предполагаемые компоненты МРТ-поры и, прежде всего, изоформы ADP/АТР-антипортера ANT2 [22]. Можно полагать, что снижение устойчивости митохондрий к индукции кальций-зависимой поры в присутствии дефлазакурта также может быть связано с редокс-состоянием пула NAD(P)H. Действительно, известно, что снижение уровня митохондриального NAD(P)H может приводить к уменьшению резистентности органелл к индукции кальций-зависимой МРТ-поры [38–40].

Суммируя полученные данные, можно полагать, что действие дефлазакурта в организме, с одной стороны, может реализовываться через рецепторы и активацию сигнальных клеточных путей, затрагивающих митохондрии. С другой стороны, этот глюкокортикоид, по всей видимости, способен оказывать непосредственное влияние на функционирование митохондриальных ферментов и индукцию кальций-зависимой МРТ-поры.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-75-10006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brillon D.J., Zheng B., Campbell R.G., Matthews D.E. 1995. Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* **268** (3), 501–513.
- Gregory M.C., Duval D., Meyer P. 1976. Changes in cardiac and hepatic glucocorticoid receptors after adrenalectomy. *Clin. Sci. Mol. Med.* **51**, 487–493.
- Demonacos C., Tsawdaroglou N.C., Djordjevic-Mar-kovic R., Papalopoulou M., Galanopoulos V., Papadogeorgaki S., Sekeris C.E. 1993. Import of the glucocorticoid receptor into rat liver mitochondria *in vivo* and *in vitro*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **46**, 401–413.
- Tsiriyotis C., Spandidos D.A., Sekeris C.E. 1997. The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: mitochondrial nucleotide sequences, showing similarity to hormone response elements, confer dexamethasone inducibility to chimaeric genes transfected in LATK-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 349–354.
- Lee S.R., Kim H.K., Song I.S., Youm J., Dizon L.A., Jeong S.H., Ko T.H., Heo H.J., Ko K.S., Rhee B.D., Kim N., Han J. 2013. Glucocorticoids and their receptors: Insights into specific roles in mitochondria. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **112** (1–2), 44–54.
- Kittas C., Chaniotis F.J., Antonakopoulos G., Papacharalampous N.X. 1984. The effects of bilateral adrenalectomy on the fine structure of the rat myocardium. *Zentralbl. Allg. Pathol.* **129**, 225–229.
- Djouadi F., Bastin J., Gilbert T., Rotig A., Rustin P., Merlet-Benichou C. 1994. Mitochondrial biogenesis and development of respiratory chain enzymes in kidney cells: Role of glucocorticoids. *Am. J. Physiol.* **267**, 245–254.
- Prieur B., Bismuth J., Delaval E. 1998. Effects of adrenal steroid hormones on mitochondrial maturation during the late fetal period. *Eur. J. Biochem.* **252**, 194–199.
- Goffart S., Wiesner R.J. 2003. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp. Physiol.* **88**, 33–40.
- Desquiere V., Gueguen N., Malthiery Y., Ritz P., Simard G. 2008. Mitochondrial effects of dexamethasone imply both membrane and cytosolic-initiated pathways in HepG2 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1629–1641.

11. Morin C., Zini R., Simon N., Charbonnier P., Tillement J. P., Le Louet H. 2000. Low glucocorticoid concentrations decrease oxidative phosphorylation of isolated rat brain mitochondria: An additional effect of dexamethasone. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **14** (5), 493–500.
12. Simon N., Jolliet P., Morin C., Zini R., Urien S., Tillement J.P. 1998. Glucocorticoids decrease cytochrome c oxidase activity of isolated rat kidney mitochondria. *FEBS Lett.* **435**, 25–28.
13. Katyare S.S., Balasubramanian S., Parmar D.V. 2003. Effect of corticosterone treatment on mitochondrial oxidative energy metabolism in developing rat brain. *Exp. Neurol.* **183**, 241–248.
14. Fujita C., Ichikawa F., Teratani T., Murakami G., Okada T., Shinohara M., Kawato S., Ohta Y. 2009. Direct effects of corticosterone on ATP production by mitochondria from immortalized hypothalamic GT1–7 neurons. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **117**, 50–55.
15. Du J., Wang Y., Hunter R., Wei Y., Blumenthal R., Falke C., Khairova R., Zhou R., Yuan P., Machado-Vieira R., McEwen B.S., Manji H.K. 2009. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 3543–3548.
16. Markham A., Bryson H.M. 1995. Deflazacort. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs.* **50** (2), 317–333.
17. Bylo M., Farewell R., Coppenrath V.A., Yogaratnam D. 2020. A review of deflazacort for patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Pharmacother.* **54** (8), 788–794.
18. Bello L., Gordish-Dressman H., Morgenroth L.P., Henricson E.K., Duong T., Hoffman E.P., Cnaan A., McDonald C.M. 2015. Prednisone/prednisolone and deflazacort regimens in the CINRG Duchenne natural history study. *Neurology.* **85** (12), 1048–1055.
19. Griggs R.C., Miller J.P., Greenberg C.R., Fehlings D.L., Pestronk A., Mendell J.R., Moxley R.T., King W., Kissel J.T., Cwik V., Vanasse M., Florence J.M., Pandya S., Dubow J.S., Meyer J.M. 2016. Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* **87** (20), 2123–2131.
20. McDonald C.M., Henricson E.K., Abresch R.T., Duong T., Joyce N.C., Hu F., Clemens P.R., Hoffman E.P., Cnaan A., Gordish-Dressman H. 2018. Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: A prospective cohort study. *Lancet.* **391** (10119), 451–461.
21. Dubinin M.V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Sharapov M.G., Belosludtsev K.N. 2020. Duchenne muscular dystrophy is associated with the inhibition of calcium uniport in mitochondria and an increased sensitivity of the organelles to the calcium-induced permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1866** (5), 165674.
22. Dubinin M.V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Belosludtseva N.V., Belosludtsev K. N. The effect of deflazacort treatment on the functioning of skeletal muscle mitochondria in Duchenne muscular dystrophy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, **21** (22), 8763.
23. Dubinin M.V., Samartsev V.N., Stepanova A.E., Khoroshavina E.I., Penkov N.V., Yashin V.A., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. 2018. Membranotropic effects of ω -hydroxypalmitic acid and Ca^{2+} on rat liver mitochondria and lecithin liposomes. Aggregation and membrane permeabilization. *J. Bioenerg. Biomembr.* **50** (5), 391–401.
24. Dubinin M.V., Svinin A.O., Vedernikov A.A., Starinets V.S., Tenkov K.S., Belosludtsev K.N., Samartsev V.N. 2019. Effect of hypothermia on the functional activity of liver mitochondria of grass snake (*Natrix natrix*): inhibition of succinate-fueled respiration and K^+ transport, ROS-induced activation of mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* **51** (3), 219–229.
25. Chance B., Williams G.R. 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* **217** (1), 383–393.
26. Pollard A.K., Craig E.L., Chakrabarti L. 2016. Mitochondrial complex I activity measured by spectrophotometry is reduced across all brain regions in ageing and more specifically in neurodegeneration. *PLoS One.* **11** (6), e0157405.
27. Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L., Angelini C. 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* **7** (6), 1235–1246.
28. Kamo N., Muratsugu M., Hongoh R., Kobatake Y. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* **49**, 105–121.
29. Dubinin M.V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Belosludtsev K.N. 2020. Transport of Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent permeability transition in heart mitochondria in the early stages of Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics.* **1861** (10), 148250.
30. Symons A.M., Lewis D.A., Ancill R.J. 1974. The actions of anti-inflammatory steroids on isolated rat liver mitochondrial function. *J. Ster. Biochem.* **5** (7), 639–644.
31. Pandya J.D., Agarwal N.A., Katyare S.S. 2004. Effect of dexamethasone treatment on oxidative energy metabolism in rat liver mitochondria during postnatal developmental periods. *Drug Chem. Toxicol.* **27** (4), 389–403.
32. Ribas V., García-Ruiz C., Fernández-Checa J. C. 2014. Glutathione and mitochondria. *Front. Pharmacol.* **5**, 151.
33. Chalmers S., Nicholls D.G. 2003. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278**, 19062–19070.
34. Rasola A., Bernardi P. 2011. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* **50**, 222–233.
35. Белослудцев К.Н., Дубинин М.В., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. 2019. Транспорт ионов Ca^{2+} мито-

- хондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки. *Биохимия*. **6** (84), 759–775.
36. Malhi H., Guicciardi M.E., Gores G.J. 2010. Hepatocyte death: A clear and present danger. *Physiol. Rev.* **90**, 1165–1194.
 37. Campbell P.I., Al-Nasser I.A. 1995. Dexamethasone inhibits inorganic phosphate stimulated Ca^{2+} -dependent damage of isolated rat liver and renal cortex mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol.* **111**, 221–225.
 38. Nieminen A.L., Byrne A.M., Herman B., Lemasters J.J. 1997. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol.* **272**(4), 1286–1294.
 39. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS letters*. **495** (1–2), 12–15.
 40. Bernardes C.F., Meyer-Fernandes J.R., Basseres D.S., Castilho R.F., Vercesi A.E. 1994. Ca^{2+} -dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). *Biochim. Biophys. Acta*. **1188** (1–2), 93–100.

Effect of Glucocorticoid Deflazacort on Respiration and Calcium-Dependent Permeability of Rat Liver Mitochondria

M. V. Dubinin^{1,*}, A. A. Semenova¹, E. I. Khoroshavina¹, K. N. Belosludtsev^{1,2}

¹Mari State University, pl. Lenina, 1, Yoshkar-Ola, 424000 Russia

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Institutskaya, 3, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

This study examines the effect of glucocorticoid deflazacort on the functioning of rat liver mitochondria. Deflazacort at concentrations up to 100 μM has been shown to have no effect on respiration and oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria, energized both in the presence of glutamate/malate (substrates of complex I of the respiratory chain) and succinate (substrate of complex II of the respiratory chain), and also does not affect activity of complexes of the respiratory chain of organelles. It was found that deflazacort does not affect the permeability of the inner membrane of liver mitochondria, but reduces the resistance of organelles to the induction of calcium-dependent MPT pore. In addition, we have found that this glucocorticoid is able to induce a decrease in the level of mitochondrial NAD(P)H, as well as inhibit the production of hydrogen peroxide by organelles. The paper discusses how the effects of deflazacort on mitochondrial function may be related to the therapeutic effects of this agent.

Keywords: liver mitochondria, glucocorticoids, deflazacort, oxidative phosphorylation, calcium-dependent pore, NAD(P)H

УДК 577.352.26

ВЛИЯНИЕ ОКСИМОВ ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБАМИМИДОИЛА НА СВОЙСТВА МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

© 2021 г. С. С. Ефимова^{а, *}, Д. Н. Чернышова^а, З. М. Саркисян^б,
П. Бремонт^с, О. С. Остроумова^а

^аИнститут цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

^бСанкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург, 194110 Россия

^сAix Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM,
Marseille, 13009 France (Марсель, Франция)

*e-mail: efimova@incras.ru

Поступила в редакцию 31.10.2020 г.

После доработки 26.11.2020 г.

Принята к публикации 02.12.2020 г.

В работе исследовали молекулярные механизмы действия дициклогексилсодержащих производных О-иминоизомочевины, (Е)-О-(N,N'-дициклогексилкарбамимидоил)оксим циклогексанона (**1**), (Е)-О-(N,N'-дициклогексилкарбамимидоил)оксим пропан-2-она (**2**) и (1-(Е)-[(Е)-(N,N'-дициклогексилкарбамимидоил)окси]имино-1-(пиридин-4-ил)этана (**3**), на модельные липидные мембраны, однослойные везикулы и плоские липидные бислои. Установлено, что все тестируемые производные не влияют на электрические свойства незаряженных мембран из 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ), в то время как оксим **2** при концентрации более 0.2 мМ вызывает рост граничного потенциала отрицательно заряженных мембран из 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-1'-*rac*-глицерина (ПОФГ) на 40 мВ. Показано, что способность индуцировать утечку флуоресцентного маркера кальцеина из ПОФХ-липосом при эквимольном соотношении оксим : липид уменьшается в ряду $2 > 1 \approx 3$ от 25 до 15%. Соединение **2** высвобождает до 50% всего захваченного ПОФГ-везикулами кальцеина, а производные **1** и **3** – не более 15%. Обнаруженные отличия способности соединения **2** вызывать утечку маркера из ПОФХ- и ПОФГ-липосом могут быть объяснены образованием ион-проницаемых пор в ПОФГ-мембранах. Большая эффективность соединения **2** по сравнению с **1** и **3** обусловлена разупорядочивающим действием производного **2** на липидные бислои, что подтверждается данными дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. Полученные результаты важны при выборе матрицы для дальнейшей химической модификации при разработке противораковых препаратов на основе дициклогексилкарбамимидоила.

Ключевые слова: липидные мембраны, липосомы, карбамимидоилы

DOI: 10.31857/S0233475521020043

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на большие успехи в изучении процессов канцерогенеза, в разработке новых высокоэффективных лекарственных препаратов и методов ранней диагностики различных опухолей, темпы снижения онкологической летальности до сих пор не достаточны. По этой причине поиск новых противораковых средств остается актуальной задачей современной фармакохимии.

Особый интерес в этой связи представляют алкоксиамины. В определенных условиях эти со-

единения способны продуцировать свободные радикалы, которые могут быть использованы для индукции окислительного стресса в опухолевых клетках. В частности, оксимы дициклогексилкарбамимидоила могут при температурах выше 80°C запускать радикальную полимеризацию [1]. Таким образом, встает вопрос о выборе химического скаффолда, который может быть использован для дальнейшей модификации оксимов дициклогексилкарбамимидоила с целью снижения температуры образования свободных радикалов при разработке противораковых препаратов. При выборе стратегии химической модификации также следует учесть и сведения о биологической активности близкородственных веществ. В частности, N,N'-дициклогексил-4-морфолинкарбоксамидин является селективным блокатором почечных

Список сокращений: ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ПОФГ – 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-1'-*rac*-глицерин, ДПФХ – 1,2-ди-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ДПФГ – 1,2-ди-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-1'-*rac*-глицерин.

Таблица 1. Физико-химические параметры молекул тестируемых производных

Агент	Химическое название	Химическая структура	Коэффициент распределения октанол/вода*	Заряд молекулы при pH 7.4*	Дипольный момент, Д**
1	(<i>E</i>)-О-(<i>N,N'</i> -дициклогексилкарба- мимидоил)оксим циклогексано		5.47	0	1.23
2	(<i>E</i>)-О-(<i>N,N'</i> -дициклогексилкарба- мимидоил)оксим пропан-2-она		4.09	0	2.19
3	1-(<i>E</i>)-[(<i>E</i>)-(<i>N,N'</i> -дициклогексил- карбамимидоил)окси]имино-1-(пиридин-4-ил)этан		4.30	0	0.49

Примечание: Вычисления произведены с помощью программ: * – “ChemAxon”, Chemicalizer; ** – “HyperChem 7.0”, Hypercube.

АТР-чувствительных K^+ -каналов и может быть использован в качестве перорального калийсберегающего мочегонного средства [2]. Пралидоксим, тримедоксим, Н1-6, обидоксим и метоксим (производные пиридинальдоксимов) применяются в качестве антидотов при поражении нервно-паралитическими ядами и пестицидами, поскольку реактивируют фосфорилированную ацетилхолинэстеразу и используются для восстановления нервно-мышечной передачи [3]. WIN 64338 является первым непептидным антагонистом рецептора брадикинина B2 [4, 5].

Необходимым этапом на пути создания современного фармакологического средства является изучение его взаимодействия с клеточной мембраной как первичной мишенью действия любых экзогенных соединений. При разработке противораковых препаратов, действующих путем индукции окислительного стресса, необходимо исключить возможность влияния пролекарства, предшественника свободных радикалов, на свойства мембран, а также обеспечить избирательность действия соединения на опухолевые клетки.

Клеточные мембраны – это сложноорганизованные структуры, поэтому для изучения влияния на них различных экзогенных соединений во многих случаях целесообразно использовать модельные системы, плоские липидные бислои и липосомы.

Целью работы являлось исследование механизмов взаимодействия дициклогексилсодержащих производных О-иминоизомочевины с бислойными липидными мембранами. Химическая структура тестируемых соединений представлена в табл. 1. Полученные результаты расширяют представления о влиянии молекул-предшественников свободных радикалов на свойства модельных и биологических мембран. Эти результаты имеют важное значение для оценки перспектив использования этих структурных матриц для дальнейшей химической модификации дициклогексилсодержащих производных О-иминоизомочевины при разработке противораковых препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали: 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-1'-*rac*-глицерин (ПОФГ), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-1'-*rac*-глицерин (ДПФГ), KCl, KOH, HEPES, диметилсульфоксид (ДМСО), EDTA, тритон X-100, кальцеин, пентан, этанол (Sigma-Aldrich).

Синтез соединений 1–3. Оксиды 1–3 синтезированы в Университете Марселя совместно с Санкт-Петербургским государственным педиатрическим медицинским университетом согласно методике [6]. Структура и состав полученных соединений были доказаны с помощью масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Формирование плоских липидных бислоев и регистрация токов, протекающих через модельные мембраны. Формирование бислойных липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера [7]. Плоские липидные бислои формировали из ПОФХ или ПОФГ. Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе разделяемых мембраной водных растворов электролита (0.1 M KCl, 5 mM HEPES-KOH, pH 7.4). Тестируемые соединения 1, 2 и 3 добавляли из раствора в ДМСО (78 mM, 104 mM, 150 mM соответственно) в *цис*-отсек камеры до конечной концентрации 1.5, 1.6 и 2.0 mM. Для каждой системы “агент–липидный бислой” было проведено не менее трех независимых экспериментов (повторов).

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью усилителя Axopatch 200B и аналогоцифрового преобразователя Digidata 1440A (Axon Instrument, США). Для обработки данных использовали 8-полярный фильтр Бесселя (Model 9002, Frequency Devices) и частоту фильтрации 1 кГц. Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (Origin Lab., США).

Оценка изменений электрического потенциала на границе мембрана/водный раствор. Ионфоронактин из раствора в этаноле добавляли в омывающие растворы с обеих сторон ПОФХ- или ПОФГ-мембраны до конечной концентрации 0.1–1.0 мкМ. Проводимость липидного бислоя (G) рассчитывали как отношение стационарного трансмембранного тока, индуцированного комплексом нонактина с ионами калия, к трансмембранному потенциалу, равному 50 мВ. Изменения электрического потенциала на границе мембрана/водный раствор при введении тестируемых

производных 1–3 ($\Delta\phi_d$) определяли как описано ранее в [8, 9]:

$$\Delta\phi_b = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{G_m}{G_m^0} \right), \quad (1)$$

где G_m^0 и G_m – значения стационарной K^+ -проводимости бислоя, индуцированной нонактином до и после введения агента.

Проводили независимые эксперименты (4–6) и определяли среднее значение изменения граничного потенциала мембран при адсорбции тестируемых соединений для каждой из экспериментальных систем (среднее $\pm$ SE).

Измерение утечки флуоресцентного маркера из липидных везикул. Липосомы из ПОФХ или ПОФГ формировали методом экструзии с использованием мини-экструдера производства Avanti Polar Lipids (США) и заполняли раствором, состоящим из 35 mM кальцеина, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4, как описано ранее в [10, 11]. В каждый экспериментальный образец вводили соединение 1, 2 или 3 из исходного раствора в ДМСО до соотношения липид : агент, равного 1 : 1. Максимальная утечка кальцеина из липосом в присутствии ДМСО в эквивалентных добавке тестируемых соединений концентрациях составляла не более 4%.

Проницаемость одноламеллярных липосом для флуоресцентного красителя кальцеина определяли с помощью спектрофлуориметра “Флюорат Панорама-02” (Россия) путем измерения интенсивности флуоресценции маркера, вытекающего из липидных везикул при длине волны возбуждения (490 нм) и эмиссии (520 нм).

Относительную величину утечки красителя из липосом под действием соединений 1–3 определяли как:

$$IF = \frac{I_i - I_0}{(I_{\max}/0.9) - I_0} \times 100\%, \quad (2)$$

где I_i и I_0 – интенсивности флуоресценции образцов при добавлении производных и в их отсутствие соответственно, $I_{\max}$ – интенсивность флуоресценции раствора после введения 10 mM тритона X-100 (коэффициент 0.9 введен для учета разбавления экспериментального образца тритоном). Полученные зависимости IF от времени аппроксимировали экспоненциальными функциями с параметрами, равными максимальной относительной утечке ($IF_{\max}$) и характеристическому времени (τ).

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия липосом. Гигантские одноламеллярные липосомы формировали из ДПФХ или ДПФГ в электрическом поле с помощью прибора Nanion vesicle prep pro (Германия), как описано в [11, 12]. Концентрация липида в суспензии составляла

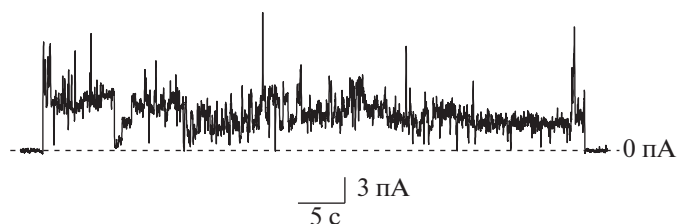


Рис. 1. Записи соответствующих образованию ион-проницаемых дефектов флуктуаций трансмембранного тока, индуцированных соединением **2** в концентрации 0.5 мМ. Мембраны из ПОФГ омываются 0.1 М KCl (pH 7.4). Приложенный трансмембранный потенциал составляет 150 мВ.

5 мМ. В экспериментальные образцы вводили тестируемые соединения **1**, **2** или **3** в эквимолярном соотношении к липиду, а в ячейку сравнения добавляли эквивалентный объем ДМСО. Термограммы липосомных суспензий получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра μ DSC7 (Setaram, Франция) при скорости сканирования 0.2°C/мин. Пики на термограммах характеризовали температурой предперехода (T_p), а также температурой плавления (T_m) и шириной пика, соответствующего основному фазовому переходу ($\Delta T\alpha$). Значение минимальной и максимальной температуры при установлении ширины пика основного фазового перехода определяли по резкому возрастанию и снижению скорости изменения теплового потока с ростом температуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение оксимов **1**, **2**, **3** в растворы, омывающие ПОФХ-мембраны, до концентрации 1.5, 1.6 и 2.0 мМ соответственно не вызывает изменений ионной проницаемости бислоев указанного со-

става. Дальнейшее увеличение концентрации оксимов приводит к дестабилизации мембран и последующему их разрушению. Замена незаряженного ПОФХ на отрицательно заряженный ПОФГ в физиологических условиях сопровождается снижением пороговой концентрации соединений: разрыв ПОФГ-бислоев происходит при концентрациях агентов, в 1.5–2.0 раза меньших, чем в случае ПОФХ-мембран. Стоит отметить, что в присутствии соединения **2** в концентрации 0.5–0.8 мМ в омывающем мембраны растворе при трансмембранном напряжении более 150 мВ наблюдаются ступенеобразные флуктуации трансмембранного тока, имеющие различную амплитуду и в подавляющем большинстве случаев предшествующие полному разрушению бислоев из ПОФГ. На рис. 1 представлен пример записей подобных флуктуаций тока, которые могут быть результатом появления под действием соединения **2** в мембране ион-проницаемых дефектов.

В табл. 2 представлены характеристические параметры влияния тестируемых соединений на физико-химические свойства липидных бислоев различного состава. Для установления влияния

Таблица 2. Характеристические параметры влияния тестируемых агентов на свойства бислоевых липидных мембран

Агент	$\Delta\phi_b(\text{max})$, мВ	IF_{max} , %	τ , мин	ΔT_p , °C	ΔT_m , °C	$\Delta\Delta T\alpha$, °C
	ПОФХ			ДПФХ		
1	-6 ± 3	18 ± 5	12 ± 4	-5.5 ± 0.8	-1.6 ± 0.2	-0.7 ± 0.2
2	-5 ± 4	25 ± 4	26 ± 7	—*	-1.7 ± 0.1	2.8 ± 1.1
3	-4 ± 3	15 ± 3	13 ± 3	-5.8 ± 0.5	-1.1 ± 0.2	-0.6 ± 0.1
	ПОФГ			ДПФГ		
1	-4 ± 2	16 ± 2	11 ± 2	—*	-0.4 ± 0.1	-0.3 ± 0.2
2	40 ± 9	50 ± 4	25 ± 4	—*	-0.5 ± 0.1	1.9 ± 0.5
3	-3 ± 2	15 ± 3	11 ± 4	—*	-0.2 ± 0.1	-0.2 ± 0.1

Примечание: $\Delta\phi_b(\text{max})$ — максимальное изменение граничного потенциала бислоя при адсорбции тестируемых соединений; IF_{max} — максимальная утечка кальцеина из липосом в присутствии тестируемых соединений при эквимолярном отношении липид : агент; τ — характеристическое время, описывающее экспоненциальную зависимость оксим-индуцированной утечки от времени; ΔT_p , ΔT_m , $\Delta\Delta T\alpha$ — изменение температуры максимума предперехода, температуры плавления и ширины пика, соответствующего основному фазовому переходу ДПФХ или ДПФГ при эквимолярном отношении липид : агент.

* — Предпереход на термограмме в присутствии оксима не обнаруживается.

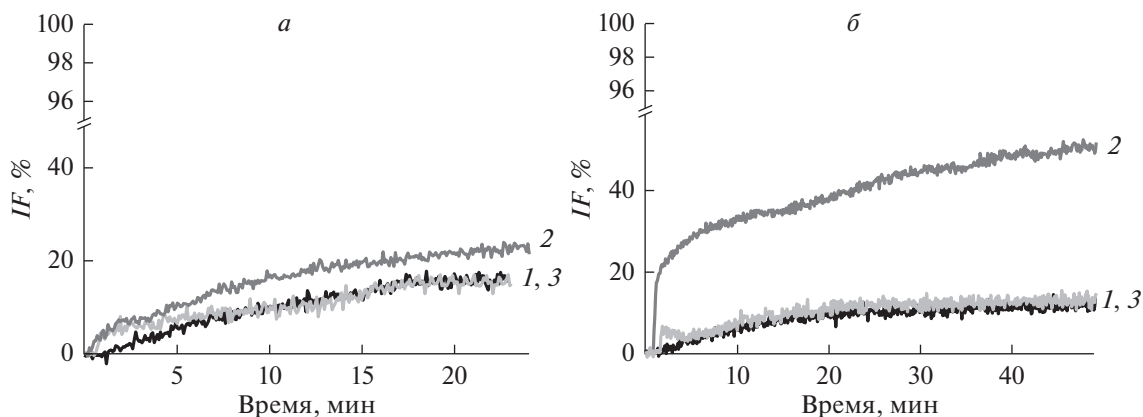


Рис. 2. Временные зависимости высвобождения кальцеина из ПОФХ- (а) и ПОФГ-везикул (б) под действием тестируемых производных: 1 (черные кривые), 2 (темно-серые кривые) и 3 (светло-серые кривые). Соотношение липид : агент составляет 1 : 1.

тестируемых соединений на электрические параметры была проведена оценка изменения граничного потенциала модельных липидных мембран ($\Delta\phi_b$) при добавлении соединений 1–3. Максимальная величина уменьшения граничного потенциала ПОФХ-мембран не зависит от типа оксима и в среднем составляет не более 5 мВ (табл. 2). Адсорбция соединений 1 и 3 приводит к сходному незначительному падению граничного потенциала ПОФГ-мембран (не более 4 мВ), в то время как введение агента 2 сопровождается более ощутимым эффектом — ростом ϕ_b на 40 мВ (табл. 2). Граничный потенциал мембраны представляет собой сумму двух компонент — поверхностного и дипольного потенциалов. Первая, экранируемая компонента обусловлена наличием заряда у мембранообразующих или сорбирующихся на бислой молекул, а вторая, неэкранируемая — специфической взаимной ориентацией диполей мембранообразующих молекул и воды [13–15]. Учитывая электронейтральность тестируемых соединений при pH 7.4 (табл. 1), при их адсорбции можно ожидать изменения только дипольной компоненты граничного потенциала. Нами оценены величины дипольных моментов соединений 1, 2 и 3 в вакууме (табл. 1). Среди тестируемых соединений производное 2 имеет наибольший дипольный момент, что хорошо согласуется с его высокой модифицирующей способностью в отношении ПОФГ-бислоев. При этом различная эффективность электронейтрального агента 2 для нейтральных и отрицательно заряженных мембран может указывать на различие его ориентации в ПОФХ и ПОФГ мембранах.

Проницаемость липосомальных мембран для кальцеина определяли путем измерения флуоресценции красителя, высвобождаемого из липосом под действием тестируемых соединений. На рис. 2 представлены временные зависимости высво-

бождения кальцеина из везикул различного состава при добавлении соединений 1, 2 и 3. Кинетические зависимости высвобождения кальцеина из липосом под действием тестируемых оксимов удовлетворительно описываются экспоненциальными функциями с параметрами, равными максимальной относительной утечке ($IF_{\max}$) и характеристическому времени (τ). В табл. 2 представлены параметры экспоненциальных функций, аппроксимирующих полученные временные зависимости утечки кальцеина из незаряженных и отрицательно заряженных липосом в присутствии агентов 1–3 в суспензии при эквимолярном отношении липид : агент. Из представленных данных видно, что соединения 1 и 3 способны высвободить около 15% захваченного ПОФХ-липосомой кальцеина, а производное 2 — около 25% (табл. 2). В случае адсорбции соединений 1 и 3 наблюдается сходный рост проницаемости ПОФГ-липосом ($IF_{\max}$ составляет около 15%) (табл. 2). Введение агента 2 в суспензию ПОФГ-везикул сопровождается большей утечкой флуоресцентного красителя (около 50%) (рис. 2б, табл. 2). Из табл. 2 видно, что τ не зависит от липидного состава везикул, а определяется видом оксима: высвобождение красителя под действием соединения 2 происходит медленнее, чем утечка, индуцированная агентами 1 и 3.

Возрастание в ряду $2 \leq 3 < 1$ десятичного логарифма коэффициента распределения между октанолом и водой (табл. 1) не позволяет объяснить большую величину $IF_{\max}$ в присутствии оксима 2 по сравнению с 1 и 3 (табл. 2) его большей липофильностью. Кроме того, электронейтральность производного 2 (табл. 1) не позволяет говорить о преимущественном взаимодействии этого производного с отрицательно заряженными мембранами, что могло бы быть причиной различия $IF_{\max}$ для ПОФХ и ПОФГ мембран (табл. 2). Причиной

различий во влиянии тестируемых агентов на утечку маркера из липосом может быть изменение трансмембранного распределения латерального давления в присутствии оксимов. По всей вероятности, соединение **2** характеризуется большим разупорядочивающим действием на липидные бислои по сравнению с **1** и **3**, что может быть связано как с большей глубиной погружения оксима **2** в мембрану, так и с различием в ориентации тестируемых соединений при встраивании в липидный матрикс. Различная способность оксима **2** вызывать утечку кальцеина из ПОФХ- и ПОФГ-липосом хорошо согласуется с предположением о различной ориентации этого производного в мембранах указанного состава. Кроме того, более выраженное влияние соединения **2** на ПОФГ-везикулы по сравнению с ПОФХ-липосомами может быть объяснено способностью этого оксима индуцировать дополнительные транспортные пути для кальцеина за счет формируемых им ион-проницаемых дефектов в ПОФГ-мембранах (рис. 1).

Предположение о различном разупорядочивающем действии тестируемых агентов верифицировали с помощью дифференциальной сканирующей микрокалориметрии суспензии липосомальных везикул, сформированных из ДПФХ или ДПФГ. В отсутствие растворителя и тестируемых соединений основные характеристики эндотерм плавления ДПФХ и ДПФГ хорошо согласуются с данными литературы [16–19]. Известно, что ДМСО вызывает рост температуры фазовых переходов липидов, в частности, увеличивает температуру предперехода и основного фазового перехода ДПФХ [20]. Считается, что сдвиг в сторону больших температур является результатом конденсации и связывания липидов молекулами ДМСО на поверхности мембраны [21, 22]. Сходные эффекты ДМСО были обнаружены при изучении плотности упаковки дипальмитоилфосфоэтаноламиновых, дипальмитоилфосфоглицериновых и дипальмитоилфосфосериновых монослоев [21].

Нами определены эндотермы плавления ДПФХ и ДПФГ в присутствии разных объемных концентраций ДМСО, которые были выбраны с учетом растворимости тестируемых оксимов. Введение ДМСО в суспензию липосом до концентраций 20, 0.5 и 3% соответствует содержанию растворителя в пробах при добавлении соединений **1**, **2** и **3** до эквимольного отношения липид : агент. На рис. 3а–3д представлены термограммы плавления липидов в присутствии указанных количеств ДМСО (сплошные линии). Сравнение представленных на рис. 3б и 3д термограмм с термограммами плавления ДПФХ и ДПФГ в отсутствие растворителя (вставки на рис. 3а, 3е) позволяет заключить, что ДМСО в концентрации 0.5% практически не влияет на эндотермы плавления

ДПФХ и ДПФГ. Увеличение концентрации ДМСО до 3% приводит к значительному росту температуры предперехода ДПФХ и менее выраженному увеличению температуры основного фазового перехода ДПФХ и ДПФГ, что согласуется с литературными данными об увеличении температуры фазового перехода липидов под действием ДМСО. Увеличение концентрации растворителя до 20% приводит к существенной модификации эндотерм плавления липидов: температура плавления ДПФХ и ДПФГ возрастает, ширина пиков, соответствующих основному фазовому переходу ДПФХ и ДПФГ, увеличивается, в случае ДПФГ также наблюдается разделение основного пика на несколько компонент (рис. 3а, 3б). Влияние производных **1**–**3** на эндотермы плавления мембранообразующих липидов оценивали по изменению температуры предперехода ДПФХ (ΔT_p), изменению температуры плавления ДПФХ и ДПФГ (ΔT_m) и ширины пика, соответствующего основному фазовому переходу указанных липидов ($\Delta T\alpha$) по сравнению с липосомными суспензиями в присутствии эквивалентных количеств растворителя (табл. 2). При эквимольном отношении липид : агент соединения **1** и **3** вызывают значительное падение температуры предперехода ДПФХ (пик сдвигается влево почти на 6°C), менее существенное уменьшение температуры плавления (на 1.1–1.6°C) и ширины основного пика, соответствующего переходу ДПФХ из риппл-фазы в жидкокристаллическое состояние (на 0.6–0.7°C) (рис. 3а, 3в, табл. 2). Добавление в липосомальную суспензию производного **2** приводит к исчезновению предперехода, уменьшению температуры плавления ДПФХ (на 1.7°C) и увеличению ширины основного пика почти на 3°C (рис. 3б, табл. 2). Оксимы **1** и **3** вызывают незначительное уменьшение ширины пика, соответствующего основному фазовому переходу ДПФГ (изменения не превышают 0.2–0.3°C) (рис. 3г, 3е), при этом наблюдается и некоторое уменьшение температуры плавления ДПФГ (в присутствии оксимов **1** и **3** пик сдвигается влево на 0.4 и 0.2°C соответственно). Как и в случае незаряженных липосом из ДПФХ, производное **2** вызывает значительный рост ширины основного пика на термограмме плавления ДПФГ (почти на 2°C) при его сдвиге влево на 0.5°C (рис. 3д, табл. 2).

Анализируя результаты измерения утечки флуоресцентного маркера из липосом и изучения термотропного поведения липидов в присутствии тестируемых агентов, можно отметить следующие закономерности: 1) высвобождение кальцеина из липидных везикул под действием соединений **1** и **3** не зависит от их состава; 2) способность агента **2** индуцировать утечку маркера из ПОФГ-липосом выше, чем везикул из ПОФХ; 3) производное **2** характеризуется большей эффективностью в отношении увеличения проницаемости

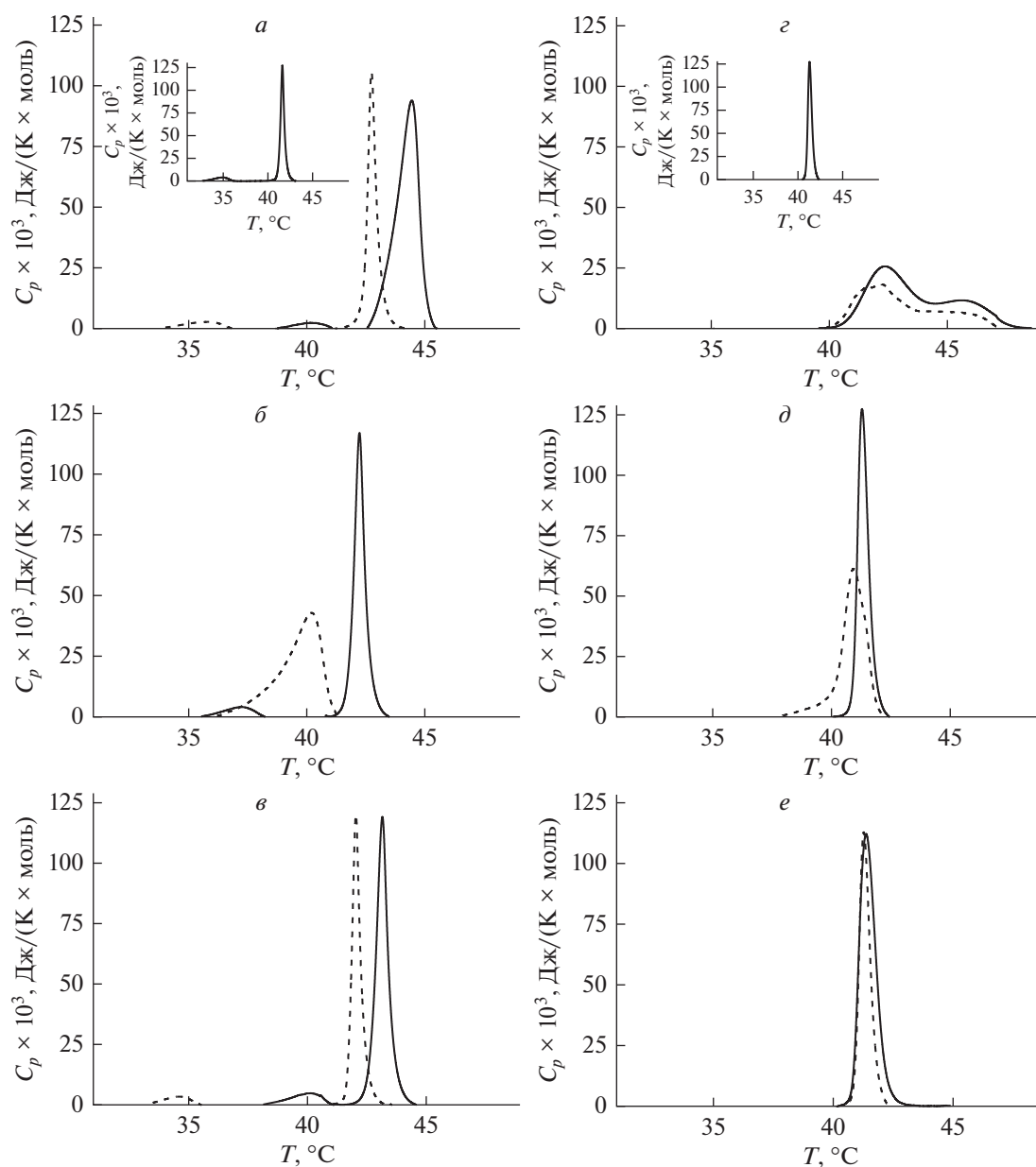


Рис. 3. Термограммы плавления ДПФХ и ДПФГ в присутствии 20 (а, г), 0.5 (б, д) и 3% (в, е) ДМСО (черные сплошные линии) и соединений **1** (а, г), **2** (б, д) и **3** (в, е) в эквимолярном соотношении к липиду (черные пунктирные линии). На вставке термограмма плавления ДПФХ (а) и ДПФГ (г) в отсутствие каких-либо растворителей и агентов.

ПОФХ- и ПОФГ-мембран для кальцеина по сравнению с оксимами **1** и **3**; 4) соединения **1** и **3** вызывают незначительный рост размера кооперативной единицы ДПФХ и ДПФГ в присутствии ДМСО; 5) размер кооперативной единицы ДПФХ и ДПФГ под действием оксима **2** существенно падает.

Таким образом, данные о влиянии соединений **1** и **3** на плавление мембранообразующих липидов и утечку флуоресцентного красителя из липосом (табл. 2) свидетельствует об их незначительном разупорядочивающем действии, которое

обусловлено малым погружением в липидный бислой. Напротив, соединение **2** характеризуется выраженным разупорядочивающим действием, заключающимся в увеличении проницаемости липидных везикул для кальцеина и падении размера кооперативной единицы из мембранообразующих липидов, что указывает на значительное погружение этого оксима в мембрану.

Полученные результаты расширяют представления о молекулярных механизмах действия тестируемых оксимов на свойства модельных липидных мембран как на первичную мишень

действия молекул-предшественников свободных радикалов. Эти результаты имеют значение для оценки перспектив использования дициклогексилсодержащих производных О-иминоизоурей в разработке противораковых препаратов. На основании полученных данных можно сделать заключение о том, что наиболее предпочтительными матрицами для дальнейшей химической модификации при разработке противораковых соединений являются соединения **1** и **3**, поскольку они не оказывают выраженного действия на электрические и эластические свойства липидного матрикса мембран в отличие от производного **2**.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00110).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee K.C., Jeong S.B., Kim D.Y., Lee T.H., Kim S.G., Kim S.G., Lee S.-H., Noh S.M., Park Y. 2018. Synthesis and radical polymerization properties of thermal radical initiators based on O-imino-isourea: The effect of the alkyl side chain on the radical initiation temperature. *J. Pol. Sci. Part A: Polymer Chem.* **56**, 1749–1756.
2. Perricone S.C., Humphrey S.J., Skaletsky L.L., Graham B.E., Zandt R.A., Zins G.R. 1994. Synthesis and diuretic activity of alkyl- and arylguanidine analogs of N,N'-dicyclohexyl-4-morpholinecarboxamidine in rats and dogs. *J. Med. Chem.* **37**, 3693–3700.
3. Kamata Y., Fujita T., Kato T., Hayashi I., Kurosaka M., Katori M., Fujita Y., Majima M. 2009. An ATP-sensitive potassium channel blocker suppresses sodium-induced hypertension through increased secretion of urinary kallikrein. *Hypertens. Res.* **32**, 220–226.
4. Salvino J.M., Seoane P.R., Douty B.D., Awad M.M., Dolle R.E., Houck W.T., Faunce D.M., Sawutz D.G. 1993. Design of potent non-peptide competitive antagonists of the human bradykinin B2 receptor. *J. Med. Chem.* **36**, 2583–2584.
5. Sawutz D.G., Salvino J.M., Dolle R.E., Casiano F., Ward S.J., Houck W.T., Faunce D.M., Douty B.D., Baizman E., Awad M.M. 1994. The nonpeptide WIN 64338 is a bradykinin B2 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 4693–4697.
6. Kim B., Lee D.G., Kim D.Y., Kim H.J., Kong N.S., Kim J.C., Noh S.M., Jung H.W., Park Y.I. 2016. Thermal radical initiator derivatives based on O-imino-isourea: synthesis, polymerization, and characterization. *J. Pol. Sci. Part A: Polymer Chem.* **54**, 3593–3600.
7. Montal M., Muller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **65**, 3561–3566.
8. Ефимова С.С., Остроумова О.С. 2015. Модификаторы дипольного потенциала липидных бислоев. *Acta Naturae*. **7** (4), 79–88.
9. Ефимова С.С., Шагина Л.В., Остроумова О.С. 2017. Диполь-модифицирующее действие стирилпиридиновых красителей и флавоноидов на модельные мембраны различного состава. *Цитология*. **59** (3), 229–235.
10. Ефимова С.С., Медведев Р.Я., Шагина Л.В., Остроумова О.С. 2016. Увеличение текучести модельных липидных мембран под действием местных анестетиков. *Цитология*. **58** (5), 378–384.
11. Ефимова С.С., Остроумова О.С. 2020. Разупорядочивающее действие растительных метаболитов на модельные липидные мембраны различной толщины. *Цитология*. **62** (4), 293–302.
12. Ефимова С.С., Медведев Р.Я., Чулков Е.Г., Шагина Л.В., Остроумова О.С. 2018. Регуляция порообразующей активности цекропина А местными анестетиками. *Цитология*. **60** (3), 219–227.
13. Gawrisch K., Ruston D., Zimmerberg J., Parsegian V.A., Rand R.P., Fuller N. 1992. Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophys. J.* **61**, 1213–1223.
14. Wang L. 2012. Measurements and implications of the membrane dipole potential. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 615–635.
15. Ermakov Yu.A., Nesterenko A.M. 2017. Boundary potential of lipid bilayers: methods and interpretations. *J. Phys.: Conf. Ser.* **780**, 012002.
16. Wang P.Y., Lu J.Z., Chen J.W., Hwang F. 1994. Interaction of the interdigitated DPPG or DPPG/DMPC bilayer with human erythrocyte band 3: Differential scanning calorimetry and fluorescence studies. *Chem. Phys. Lipids*. **69**, 241–249.
17. Riske K.A., Barroso R.P., Veqi-Suplicy C.C., Germano R., Henriques V.B., Lamy M.T. 2009. Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. *Biochim. Biophys. Acta*. **1788**, 954–963.
18. Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Zylka R., Oszmianski J., Kleszczynska H. 2014. Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Rev. Intern.* **65**, 47–58.
19. Pruchnik H., Bonarska-Kujawa D., Zylka R., Oszmianski J., Kleszczynska H. 2018. Application of the DSC and spectroscopy methods in the analysis of the protective effect of extracts from the blueberry fruit of the genus *Vaccinium* in relation to the lipid membrane. *J. Therm. Anal. Calorim.* **134**, 679–689.
20. Ricci M., Oliva R., Del Vecchio P., Paolantoni M., Morresi A., Sassia P. 2016. DMSO-induced perturbation of thermotropic properties of cholesterol-containing DPPC liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1858**, 3024–3031.
21. Chen X., Huang Z., Hua W., Castada H., Allen H.C. 2010. Reorganization and caging of DPPC, DPPE, DPPG, and DPPS monolayers caused by dimethylsulfoxide observed using brewster angle microscopy. *Langmuir*. **26**, 18902–18908.
22. Cheng C.Y., Song J., Pas J., Meijer L.H., Han S. 2015. DMSO induces dehydration near lipid membrane surfaces. *Biophys. J.* **109**, 330–339.

Effects of Dicyclohexylcarbamidoyl Oximes on the Properties of Model Lipid Membranes

S. S. Efimova^{1,*}, D. A. Chernyshova¹, Z. M. Sarkisyan², P. Brémond³, O. S. Ostroumova¹

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

²*St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, 194110 Russia*

³*Aix Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, 13009 France*

**e-mail: efimova@incras.ru*

In this work, we have investigated the mechanisms of action of dicyclohexyl containing derivatives of O-imino-isourea: oximes of (*E*)-O-(N,N'-dicyclohexylcarbamidoyl)cyclohexanone oxime (**1**), (*E*)-O-(N,N'-dicyclohexylcarbamidoyl)propan-2-one oxime (**2**) and (1-(*E*)-[(*E*)-(N,N'-dicyclohexylcarbamidoyl)oxyl]imino-1-(pyridin-4-yl)ethane (**3**), on the model lipid membranes, planar lipid bilayers and liposomes. It was found that compounds **1–3** do not affect the electrical properties of uncharged palmitoylcholine (POPC) membranes, while only derivative **2** at the concentration of 0.2 mM increases the boundary potential of the negatively charged palmitoylcholinephosphoglycerol (POPG) bilayers by 40 mV. It was shown that the ability to induce the leakage of calcein from POPC liposomes at an equimolar oxime : lipid ratio decreases in the series **2** > **1** ≈ **3** from 25 to 15%. Compound **2** releases up to 50% of the total calcein captured by POPG vesicles, while derivatives **1** and **3** induce the release of no more than 15%. The observed differences in the ability of compound **2** to induce calcein leakage from POPC and POPG liposomes can be explained by the formation of ion-permeable pores in POPG membranes. The higher efficiency of compound **2** in comparison with **1** and **3** is associated with the disordering action of derivative **2** on lipid bilayers, which is confirmed by the data of differential scanning microcalorimetry. The results obtained are important for choosing a matrix for further chemical modification in the development of anticancer drugs based on dicyclohexylcarbamidoyl.

Keywords: lipid membranes, liposomes, carbamidoyls