

УДК 577.1.04; 577.15.03

ОСОБЕННОСТИ РЕГИСТРАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ОТВЕТОВ БИООБЪЕКТОВ В ПРИСУТСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

О.М. Алексеева¹, А.В. Кременцова¹, О.В. Шаталова¹, Ю.А. Ким²

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

² Институт биофизики клетки РАН, Московская область, Россия

Для достижения целей медицинской биотехнологии и биофармацевтики необходимы тест-объекты со стабильными характеристиками, простые в получении. В исследованиях мы использовали суспензию клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) для тестирования воздействия биологически активных веществ (БАВ): мелафена и феноксана (рис. 1), на один из сигнальных путей клеток животного происхождения – метаболитный Ca^{2+} -зависимый путь при действии АТФ на P2Y рецепторы.

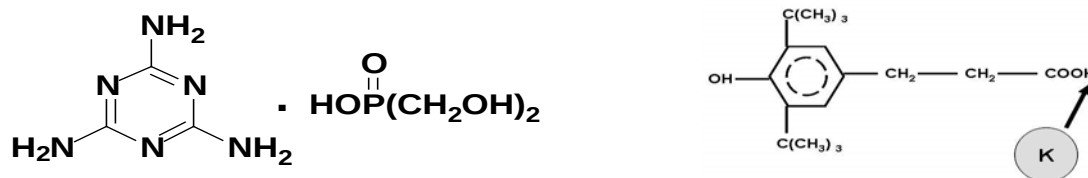


Рис. 1. Структурные формулы мелафена и феноксана

Мелафен – это меламинавая соль бис (оксиметил) фосфиновой кислоты, он синтезирован в ИОФХ РАН им. А.Е. Арбузова для стимуляции прорастания семян сельскохозяйственных культур [1]. Феноксан – это калиевая соль антиоксиданта фенозана (- β -(4-гидрокси – 3,5 – ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота), синтезированного в ИХФ РАН им. Н.Н. Семенова [2]. Фенозан первоначально предназначался для стабилизации полимеров и резин. Впоследствии было обнаружено, что и фенозан и феноксан проявляют свойства биологически активных веществ, являясь антиоксидантами и адаптогенами.

Мелафен и фенозан изменяют жирнокислотный состав мембран, как растительных, так и животных клеток, улучшают выживаемость организмов, в стрессовых условиях [3–5]. На уровне модельных экспериментальных объектов показаны изменения в организации липидных и белковых микродоменов, микровязкости биомембран [6]. БАВ влияют на топографию поверхности и морфологию эритроцитов [7,8]. Все эффекты являются доза-зависимыми. Водные растворы БАВ: мелафена или феноксана, в широком диапазоне концентраций (10^{-17} – 10^{-2} М) приготавливали методом последовательных разбавлений с интенсивным перемешиванием с помощью вортекса. Перед измерениями раствор БАВ добавляли в образец сравнения, содержащий раствор ХЕНКСА, образец вносили в контрольную кювету. Кювета с опытным образцом содержала суспензию клеток АКЭ и БАВ. Поддерживались температура 24 °С и неинтенсивное перемешивание.

С целью исследования действия БАВ на функции целых изолированных клеток тестирование выполнялось на модели клеток короткоживущей асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мышей. Клетки АКЭ на определенных этапах развития карциномы обладают характерной для многих видов клеток системой пуринов-зависимой клеточной Ca^{2+} сигналикации. Некоторые пути Ca^{2+} сигналикации, в том числе и пуринов-зависимая, влияют на объем клетки, что соответственно отражается на светорассеивающих параметрах разбавленной суспензии клеток. Регистрацию светорассеяния суспензии клеток АКЭ, коррелирующее с изменением объема, проводили на спектрофлуориметре Perkin-Elmer при одинаковых длинах волн возбуждения и регистрации в видимом диапазоне согласно ранее разработанным методам измерения [9, 10]. Метод светорассеяния под углом 90°, позволяет оценить общий клеточный ответ на добавление БАВ без внесения каких-либо красителей, меток и т. д. При этом регистрируется прямая реакция клетки на исследуемое вещество. Светорассеяние зависит от количества и размеров рассеивающих частиц в растворе. В разбавленных суспензиях клеток наблюдается только однократное (первичное) светорассеяние независимыми частицами [9, 10]. Светорассеяние под углом 90° резко возрастает при сжатии объема клеток в разбавленной суспензии. Уменьшение интенсивности первичного светорассеяния происходит при набухании клеток в результате компенсаторного вхождения воды для поддержания осмотических параметров клетки. Затем восстанавливаются исходные размеры клетки, и величина светорассеяния возвращается к исходной. Форма клетки поддерживается цитоскелетом, объем – обеспечением осмотического баланса при работе ионных насосов и каналов. Клетки, проявляя свойства осмометра, контролируют содержание ионов и воды внутри и вне клетки. Баланс ионов влияет на вход и выход воды через мембраны, и происходят значительные изменения объема клетки. Эти свойства животных клеток и были использованы при регистрации клеточной активности с помощью первичного светорассеяния [11]. Объем клетки среди многих механизмов в значительной мере контролируется функционированием кальций-зависимых K^+ и Cl^- -каналов плазмолеммы, Ca^{2+} регуляторные центры, которых расположены внутри клетки. Поэтому изменение объема клетки коррелирует с активностью кальций-зависимых K^+ и Cl^- -каналов плазмолеммы и концентрацией свободного Ca^{2+} внутри клетки [11].

АТФ-зависимый сигнальный путь инициировали повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при активации пуринорецепторов добавками АТФ [12]. Этот путь повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} доказан ингибиторным анализом. АТФ-удаляющий фермент – гексокиназа, и ингибитор пуринорецепторов – сурамин, полностью блокируют выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо [9, 10, 13]. Известно, что на 7–8 сутки развития карциномы после перевитых мышам препаратов клеток АКЭ метаболитные пуринорецепторы P2Y демаскированы на внешней поверхности плазмалеммы клеток [14].

Согласно данным с привлечением методов ингибиторного анализа, опубликованным в работах [9, 10, 15–19], нами была составлена схема действия БАВ на метаболитные пуринорецепторы P2Y и каналы SOC (рис. 2).

Модель клетки АКЭ, имеет полную систему передачи сигнала до внутриклеточных Ca^{2+} депо эндоплазматического ретикулума с обратной связью до ионных каналов на плазмалемме. Сигнализация продолжается до ядра, так как перинуклеарное пространство, окруженное ядерными оболочками, – это непрерывное продолжение пространств а ретикулума. Пуринов-зависимая передача является специфической для каждого вида клеток. Появление АТФ во внеклеточном пространстве активирует на плазмалемме метаболитные пуринорецепторы (P2Y), инициирующие опосредованно через G-белки [22] работу фосфолипазы C (PLC). PLC расщепляет фосфолипиды плазмалеммы на инозитолтрифосфат и диацилглицерол (IP3 и DAG). IP3 действует на встроенный в эндоплазматический ретикулум каналаобразующий инозитолтрифосфатный рецептор (IP3R), вызывая освобождение Ca^{2+} из этого внутриклеточного Ca^{2+} депо.

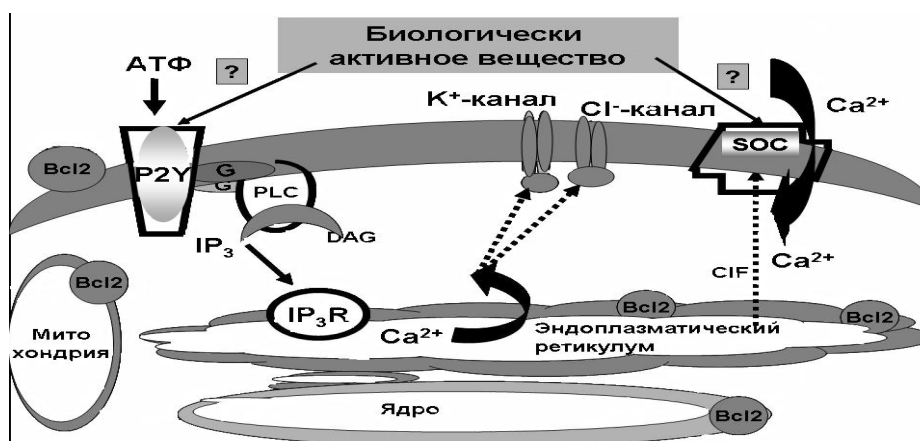


Рис. 2 Схема Ca^{2+} сигнальной системы. P2Y – метаботропные пуринорецепторы клеток АКЭ; G – G-белки; PLC – фосфолипаза C; IP₃ – инозитолтрифосфат; IP₃R – рецептор; DAG – диацилглицерол; ClF – цитоплазматический информационный фактор; (SOC store operated channels) – депо управляемые каналы; Bcl2 – антиапоптотические 26-килодальтонные белки, локализующиеся во всех мембранах, регулирующих Ca^{2+} потоки клетки [20], определяющие судьбу клетки [21]. Ca^{2+} зависимые K^+ и Cl^- – каналы – это каналы, которые участвуют в регуляции объема клетки

Резкое повышение концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме вызывает сжатие клетки из-за увеличения осмотического градиента через плазмолемму. Свободный Ca^{2+} активирует работу K^+ и Cl^- – каналов, Ca^{2+} связывающие регуляторные центры которых экспонированы внутрь клетки. Происходит быстрый ионный обмен и вхождение воды в клетку, возвращающие клетке почти прежний объем. Эти изменения объема клеток, отражают первичный клеточный ответ, который регистрируется как резкое и кратковременное повышение светорассеяния в разбавленной суспензии клеток. Опустошение Ca^{2+} депо эндоплазматического ретикулума в свою очередь активирует вторичный вход Ca^{2+} в клетки через SOC (store operated channels – депо-регулируемые каналы), пронизывающие плазмолемму. Регистрируется плавный и продолжительный вторичный клеточный ответ. Типичная кинетическая кривая представлена на рисунке 3 – это кривая 1. Ответы на добавки АТР – бимодальные (рис. 3). Вид ответа клеток АКЭ на АТФ в значительной степени зависит от стадии развития карциномы [14, 23].

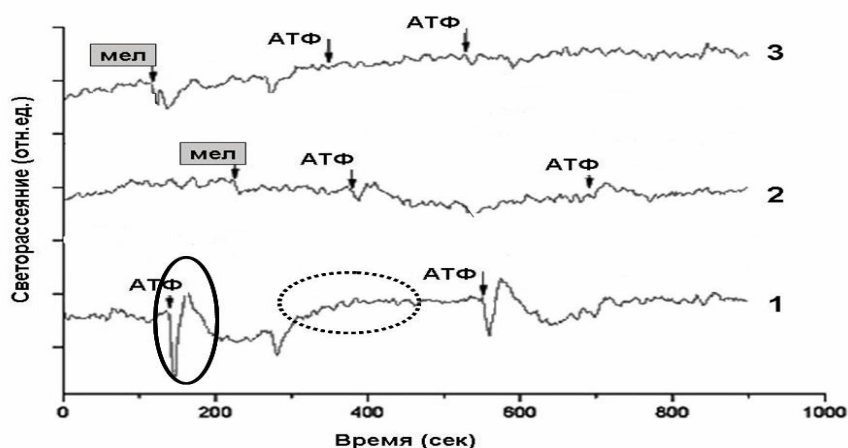


Рис. 3. Кинетические кривые зависимости светорассеяния суспензии клеток АКЭ от концентрации мелафена. 1-контроль; 2 – 10^{-8} М мелафен; 3 – 10^{-3} М мелафен. Овалами отмечены изменения светорассеяния суспензии, связанные с изменениями объемов клеток. Овал – сплошная линия, – первый клеточный ответ при активации P2Y – метаботропных пуринорецепторов клеток АКЭ. Овал – прерывистая линия, – второй клеточный ответ при активации неметаботропных Ca^{2+} – каналов SOC (store operated channels) – депо управляемые каналы клеток АКЭ

При тестировании влияния БАВ было обнаружено, что большие дозы мелафена (10^{-9} – 10^{-3} М) значительно меняют реакцию клетки. Мелафен влияет на обе фазы внутриклеточной сигнализации клеток АКЭ: при концентрации 10^{-4} М и выше на 40 % снижается ответ первой фазы. При концентрациях выше 10^{-8} М, снижая величину первого ответа на 60 %, при концентрации выше 10^{-6} М блокирует вторичный вход Ca^{2+} в клетки через (SOC store operated channels), служащий для восстановления истощенного Ca^{2+} депо. С увеличением концентрации эффект усиливается, и при 10^{-4} М ингибирование достигает 80 %, 10^{-3} М вызывает 100 % – полное ингибирование всех фаз прохождения сигнала. При концентрации 10^{-4} М и выше полностью ингибируется пурин-зависимая Ca^{2+} сигнализация, работа Ca^{2+} зависимых K^{+} и Cl^{-} каналов и SOC. Применяемые в растениеводстве концентрации мелафена (менее 10^{-13} М) не оказывают угнетающего действия на трансдукцию пурин-зависимого Ca^{2+} сигнала на модельной системе животных клеток – клетках АКЭ

Пуринозависимая Ca^{2+} сигнализация клеток АКЭ подвергается также угнетению феноксаном при концентрациях 10^{-7} – 10^{-5} М. Влияние феноксана на общие клеточные ответы (первый и второй) клеток АКЭ, отражающиеся в изменении клеточного объема, также приводило к изменениям светорассеяния разбавленных суспензий клеток. Угнетение второго клеточного ответа, отражающего влияние БАВ на SOC каналы, происходило при меньших концентрациях БАВ, чем начиналось угнетение первого ответа, отражающего работу метаболитного пути при активации P2Y – пуринорецепторов. Так при активации Ca^{2+} сигнальной системы добавками АТФ происходило набухание клеток и пропорционально изменялась интенсивность светорассеяния в суспензии клеток. Взаимодействие АТФ с пуринорецепторами P2Y на поверхности клетки приводило к повышению цитоплазматической концентрации Ca^{2+} , последующей активации Ca -зависимых K^{+} каналов и Ca -зависимых Cl^{-} каналов, изменяющих объем клеток. При повторении добавки АТФ опять происходил первый общий клеточный ответ, за ним следовал второй, отражающий увеличение содержания ионов кальция в цитоплазме в результате компенсаторного входа через каналы SOC (каналы, регулируемые опустошением кальциевого депо ретикулума). Оказалось, что все тестируемые в настоящей работе биологически активные вещества доза-зависимо изменяли объем клеток.

ВЫВОДЫ

Показан цитотоксический эффект больших концентраций БАВ для карциномы, вызываемый угнетением пурин-зависимого Ca^{2+} сигнального пути. БАВ изменяют бимодальный характер кинетических кривых светорассеяния суспензии клеток АКЭ, что свидетельствует об изменении формы клетки и, соответственно, о влиянии на функции всех звеньев Ca^{2+} сигнального пути: активации фосфолипазы С, опустошения Ca^{2+} депо эндоплазматического ретикулума, активации кальций-зависимых K^{+} и Cl^{-} каналов плазмолеммы, Ca^{2+} регуляторные центры, которых расположены внутри клетки, также и на функционирование SOC каналов. Влияние БАВ на активацию SOC каналов могло происходить непосредственно на поверхности клеток или опосредованно через весь метаболический путь, приводящий к опустошению Ca^{2+} депо эндоплазматического ретикулума, и передаче сигнала на внутриклеточные центры SOC каналов. Показано, что БАВ: мелафен и феноксан, регулируют Ca^{2+} потоки как внутри клетки, так и внеклеточный вход Ca^{2+} .

ЛИТЕРАТУРА

1. Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меламиновая соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафен) как регулятор роста и развития растений нового поколения. // В сб. докладов 13-ой Международной конференции по химии соединений фосфора. С. – Петербург 2002. С. 80.
2. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно – затруднённые фенолы. // М. Химия. 1972. 352 с.
3. Жигачева, И.В., Фаткуллина Л.Д., Шугаев А.Г. Сверхмалые концентрации препарата «Мелафен» изменяют структурно-функциональные характеристики биологических мембран растительного и животного происхождения // Мелафен: механизм действия и области применения. Под ред. С.Г. Фаттахова, В.В. Кузнецова, Н.В. Загоскиной. – Казань: «Печать-Сервис XXI век». 2014. С. 136–147.
4. Фаткуллина Л.Д. и др. «Действие антиоксиданта фенозана на структурные характеристики мембран и ДНК при развитии спонтанного лимфолейкоза мышей» Сборник материалов IX Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». Москва 20–25 апреля 2015 г. под ред. Загоскиной Н.В. С 151–154.

5. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Русина И.Ф., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И. Антистрессовые свойства препарата мелафен. // ДАН. 2007. Т. 414 № 2. С. 263–265.
6. Alekseeva O.M., Fatkullina L.D., Kim Yu. A., Zaikov G.E. The melafen influence to the erythrocyte's proteins and lipids // Вестник Казанского технологического Университета 2014 Т.17. Вып.9. С. 176–181.
7. Гендель Л.Я., Ким Л.В., Лунёва О.Г., Федин В.А., Круглякова К.Е. «Изменения поверхностной архитектоники эритроцитов под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана-1». // Известия РАН. Сер. Биол. 1996. № 4. С. 508–512.
8. Бинюков В.И., Алексеева О.М., Миль Е.М., Албантова А.А., Фаттахов С.Г., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б., Коновалов А.И. «Изучение влияния фенозана, ИХФАН-10 и мелафена на эритроциты in vivo методом АСМ». // ДАН 2011. Т. 441. № 1. С. 114–117.
9. Баумуратов А.С., Кононов А.В., Ли В.В., Зинченко В.П. Импульсное освобождение АТФ из клеток асцитной карциномы Эрлиха при действии сапонина и ОН. // Биол. мембраны 2004 Т.21. С. 46–52.
10. Зинченко В.П., Касымов В.А., Ли В.В., Каймачников Н.П. Ингибитор кальмодулина R24571 индуцирует кратковременный вход Ca^{2+} и импульсную секрецию АТФ в клетках асцитной карциномы Эрлиха. // Биофизика. 2005. Т. 50. № 6. С. 1055–1069.
11. Cornet M., Lambert I.H., Hoffman E.K. Relation between cytoskeletal hypoosmotic treatment and volume regulation in Erlich ascites tumor cells. // J. Membr. Biol. 1993. V.131. P. 55–66.
12. Sekar M.C., Hokin L.E. The role of phosphoinositides in signal transduction. // J. Membr. Biol. 1986. V. 89. P. 193–210.
13. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е., Бернсток Дж. Экто-АТФазы и рецепторы АТФ. // Эксп. Клинич. Фармакол. 1997. (6). № 3. С. 78–82.
14. Замай А.С., Замай Т.Н. Влияние АТФ на асцитные клетки в разные фазы опухолевого роста // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Пушкино. 2005. С. 48–51.
15. Arslan P., DiVirgilio F., Betzame M., Tsien R.I., Pozzan T. Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. // J. Biol. Chem. 1985. V.260. P. 2719–2727.
16. Нуриева Р.И., Абдрасилов Б.С., Ким Ю.А., Леонтьева Г.А., Пак Хва Дин, Зинченко В.П. Механизм активации клеток асцитной карциномы Эрлиха общей фракцией сапонинов из корейского женьшеня. // Антибиотики и химиотерапия. 1995. N.11–12. С. 25–28.
17. Abdrasilov B.S., Kim Yu. A., Nurieva R.I., Dedkova E.N., Leonteva G.A., Hwa Jin Park, Zinchenko V.P. The effect of total saponins from Panax Ginseng C.A. Meyer on the intracellular signalling system in Ehrlich ascites tumor cells. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1996. V. 38. № 38. P. 519–526.
18. Dubyak G.R. Extracellular ATP activates poliphosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilisation in Ehrlich ascites tumor cells. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 245. P. 84–95.
19. Artalej O.A., J. Garcia – Sancho, Mobilization of intracellular calcium by extracellular ATP and by calcium ionophores in the Ehrlich ascities tumor cells. // Biochem. Biophys. Acta 1988. V. 941. № 9. P.48–54.
20. Kuo T.H. Kim H.R., Zhu L., Yu Y., Lim H.M., Tsang W. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. // Oncogene. 1998. V. 17, № 15. P. 1903–1910.
21. Cory S., Adams J.M. The Bcl 2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. // Nat. Rev. Cancer. 2002. № 2. P. 647–656.
22. Webb T.E., Simon J., Krishek B.J., et al. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. // FEBS Lett. 1993. V. 324 P. 219.
23. Замай Т.Н., Замай А.С. Изменение концентрации кальция в асцитных клетках карциномы Эрлиха в динамике ее роста. // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Пушкино. 2005. С. 51–54.