

14

Особенности рецептор- и трансдуктор-опосредованной активации внутриклеточных сигнальных каскадов в сенсорном нейроне, выявленные методом атомно-силовой микроскопии

© М.М. Халисов^{1,2}, В.А. Пеннийнен¹, Н.А. Есикова³,
А.В. Анкудинов^{2,4,¶}, Б.В. Крылов¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики

³ Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

⁴ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург

¶ E-mail: alexander.ankudinov@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 1 июля 2016 г.

Исследованы механические свойства сенсорных нейронов при активации внутриклеточных каскадных процессов коеновой кислотой, связывающейся с мембранным опиоидоподобным рецептором (рецептор-опосредованно), а также очень низкой (эндогенной) концентрацией уабаина (трансдуктор-опосредованно). С помощью атомно-силовой микроскопии установлено, что воздействие уабаина в отличие от воздействия коеновой кислоты приводит к упрочнению сомы нейрона. Это свидетельствует о том, что рецептор-опосредованная передача сигнала на геном клетки осуществляется с помощью механизмов, отличающихся от трансдуктор-опосредованных сигнальных путей.

DOI: 10.21883/PJTF.2017.01.44094.16394

Проявлению механизмов протекания внутриклеточных процессов может способствовать атомно-силовая микроскопия (АСМ), обеспечивающая проведение измерений морфологии и механических характеристик живых эукариотических клеток с субмикронным разрешением. Одна из важных характеристик, которую позволяет изучать АСМ, — модуль Юнга. Было показано, что по величине модуля Юнга можно отличать клетки интактные и при некоторых патологиях [1,2];

отмечалась также эффективность использования этой характеристики для анализа действия на клетки различных субстанций, в том числе лекарственных препаратов [3,4]. В частности, измерялся модуль Юнга сенсорных нейронов до и после воздействия неопиоидного анальгетика — гликозида убаина в эндогенной концентрации [5,6]. Сенсорные нейроны непосредственно участвуют в передаче болевых сигналов в центральную нервную систему и потому являются основным объектом изучения при разработке и тестировании обезболивающих препаратов. Было установлено, что действие убаина в эндогенной концентрации упрочняет клетку [5,6]. Эффект можно объяснить специфическим взаимодействием очень низких концентраций убаина с трансдукторным сайтом Na^+ , K^+ -АТФазы, осуществляющим запуск ее сигнальной, а не насосной функции [7]. Ранее в мембране сенсорного нейрона был обнаружен рецептор-опосредованный механизм сигнализации [8]. Запуск такого механизма коеновой кислотой (производной гамма-пирона) приводит к эффективному купированию хронической боли [9]. В настоящей работе предпринята попытка с помощью АСМ выявить особенности этих тонких внутриклеточных процессов в механических свойствах сенсорного нейрона.

Нами проведены прижизненные исследования сенсорных нейронов 10–12-дневных куриных эмбрионов. Исследовали три группы клеток, культивированных в чашках Петри диаметром 40 mm, покрытых поли-L-лизинем: 1) контрольные сенсорные нейроны, 2) в присутствии коеновой кислоты (10^{-8} M), 3) в присутствии убаина (10^{-10} M). Измерения модуля Юнга велись на АСМ-установке Bruker BioScope Catalyst, интегрированной в инвертированный оптический микроскоп, позволяющий осуществлять выбор клеток для АСМ-эксперимента и контроль их состояния. Во время измерений в чашке Петри с клетками поддерживалась температура 37°C с помощью термоконтроллера Lakeshore 335. В работе использовали стандартные острые зонды Bruker SNL-10 D, значение жесткости которых калибровалось непосредственно перед экспериментом методом тепловых шумов. Карты модуля Юнга сенсорных нейронов формировались по результатам многократного индентирования клеток в режиме АСМ PeakForce QNM [5,6]. В точках индентирования модуль Юнга вычислялся в рамках модели Снедонна для упругого контакта конус–плоскость. Каждый сенсорный нейрон характеризовался средним значением этого параметра по телу клетки — *соте* (см. рисунок, *a*). Область АСМ-сканирования выбиралась

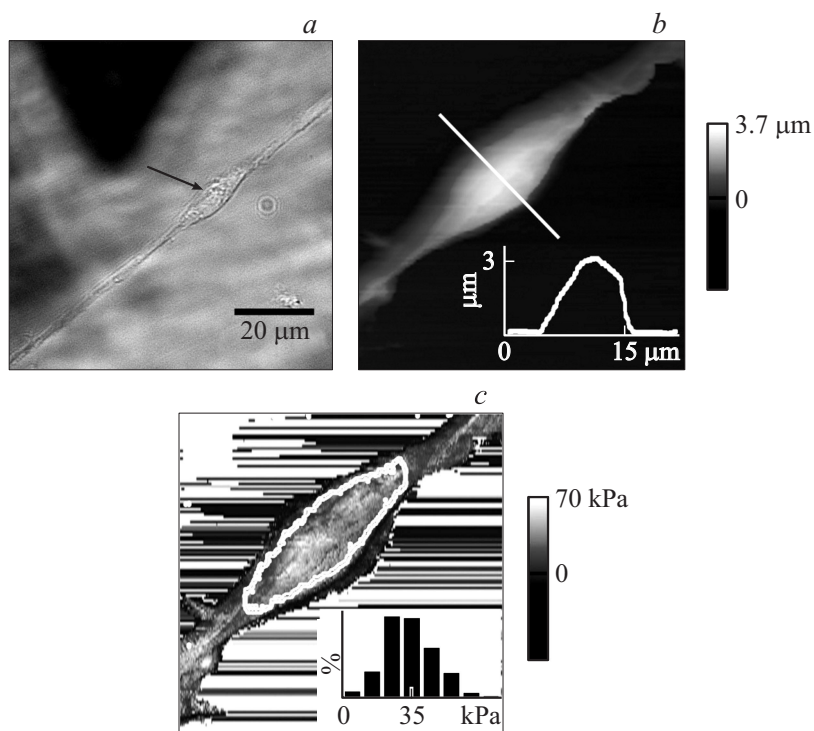
так, чтобы сома нейрона целиком попадала в кадр изображения (см. рисунок, *b*). Результаты обрабатывали с помощью штатной программы Nanoscope Analysis 1.50 и программного пакета Gwyddion 2.44, позволяющего выделять маской и извлекать для построения гистограмм АСМ-данные по соме (контур маски показан на рисунке, *c*).

Согласно полученным АСМ и оптическим данным, формы сенсорных нейронов как в контроле, так и после воздействия коеновой кислоты и уабаина практически не различались. Средняя длина сомы в каждой из трех групп клеток составляла: $29 \pm 7 \mu\text{m}$, число исследованных клеток $n = 40$; $28 \pm 5 \mu\text{m}$, $n = 31$; $30 \pm 6 \mu\text{m}$, $n = 19$ соответственно. Клетки практически не отличались и по средней максимальной высоте сомы: $3.1 \pm 0.9 \mu\text{m}$, $n = 30$; $3.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$, $n = 19$; $3.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$, $n = 14$ соответственно.

АСМ-измерения сенсорных нейронов показали, что коеновая кислота не меняет модуля Юнга клеток, а уабаин вызывает их упрочнение. Среднее статистическое значение модуля Юнга сомы сенсорных нейронов в присутствии коеновой кислоты (10^{-8} М), 120 ± 97 кПа, $n = 21$, практически не отличается от контрольного, 115 ± 90 кПа, $n = 30$. Тогда как у нейронов, культивированных в присутствии уабаина (10^{-10} М), оно выросло до 172 ± 109 кПа, $n = 15$.

Стоит отметить, что для иммобилизации сенсорных нейронов использовался полилизин. Это обеспечило более надежное прикрепление клеток, чем на подложке из коллагена с фибронектином, примененной нами ранее [5,6], но одновременно привело к общему, почти четырехкратному росту значений модуля Юнга сенсорных нейронов. Несмотря на столь сильное влияние подложки на механические свойства клеток, относительное действие уабаина сохраняется и на таком фоне и, по сравнению с нашими предыдущими данными [5,6], даже усиливается: обнаружено полуторакратное упрочнение клеток. Таким образом, наблюдение реакции на уабаин у сенсорных нейронов, иммобилизованных на разных подложках, может указывать на достаточно универсальный механизм эффекта.

Второй важный результат, полученный в этой работе, заключается в нечувствительности модуля Юнга сомы нейрона к присутствию коеновой кислоты. Как предполагаем, это свидетельствует об активации специфических внутриклеточных сигнальных процессов, отличающихся от каскадов, которые включает уабаин [5,6].



a — оптическое изображение сенсорного нейрона, включенного в нейронную сеть. *b* — АСМ-топография этого нейрона, со вставкой, профилем высоты, соответствующим линии поперек тела клетки. *c* — полученная одновременно с (*b*) АСМ-карта сигнала модуля Юнга; на вставке гистограмма значений сигнала для сомы нейрона. На изображении (*a*) стрелка указывает на сому; на изображении (*c*) на соме нейрона отмечена граница области, внутри которой брались данные для построения гистограммы. Размер кадров АСМ-изображений $(40\ \mu\text{m})^2$. Параметры АСМ-режима: пиковая сила 1.0 nN, амплитуда и частота вертикального зондирования 1.0 μm и 250 Hz, частота строчной развертки 0.1 Hz, направление сканирования — справа налево.

Взаимодействие убаина в эндогенной концентрации с Na^+ , K^+ -АТФазой запускает трансдукторную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы, активируя сигнальные пути [10–14], что может упрочнять нейрон.

Действительно, связывание убаина с Na^+ , K^+ -АТФазой приводит к активации различных сигнальных молекул, таких как Src, кавеолин-1, фосфоинозитол-3-киназа, белок фосфатазы 2 и рецептор эпидермального фактора роста, активируя тем самым ряд внутриклеточных сигнальных каскадов, в том числе MAPK- и Akt-пути, регулируя рост, пролиферацию и гибель клеток, экспрессию различных генов [13–19]. С другой стороны, коленовая кислота рецептор-опосредованно модулирует сигнальную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы [20], и культивирование клеток в ее присутствии, как и ожидалось, не меняет механических свойств нейрона.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-15-00677.

Список литературы

- [1] Maciaszek J.L., Andemariam B., Lykotrafitis G. // J. Strain Analysis. 2011. V. 46. P. 368–379.
- [2] Rebelo L.M., de Sousa J.S., Santiago T.M., Mendes Filho J. // Microscopy: advances in scientific research and education. 2014. P. 141–152.
- [3] Zuk A., Targosz-Korecka M., Szymonski M. // Int. J. Nanomedicine. 2011. V. 6. P. 249–257.
- [4] Szymonski M., Targosz-Korecka M., Malek-Zietek K.E. // Pharmacol. Rep. 2015. V. 67. N 4. P. 728–735.
- [5] Khalisov M.M., Ankudinov A.V., Penniyaunen V.A. et al. // Acta Physiol. Hung. 2015. V. 102. N 2. P. 125–130.
- [6] Анкудинов А.В., Халисов М.М., Пенниайнен В.А. и др. // ЖТФ. 2015. Т. 85. В. 10. С. 126–130.
- [7] Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaunen V.A. et al. // Medicinal Chem. 2012. V. 8. N 1. P. 33–39.
- [8] Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А. и др. // Рос. физиол. журн. 1999. Т. 85. В. 2. С. 225–236.
- [9] Plakhova V., Rogachevsky I., Lopatina E. et al. // Activitas Nervosa Superior Rediviva. 2014. V. 56. N 3–4. P. 55–64.
- [10] Пенниайнен В.А., Ячнев И.Л., Купенко А.В. и др. // Сенсорные системы. 2014. Т. 28. В. 4. С. 90–94.
- [11] Ячнев И.Л., Шелых Т.Н., Подзорова С.А. и др. // ЖТФ. 2016. Т. 86. В. 6. С. 132–137.
- [12] Schoner W., Scheiner-Bobis G. // Dtsch. Med. Wochenschr. 2009. V. 134. N 13. P. 632–636.

- [13] Xie Z., Askari A. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. N 10. P. 2434–2439.
- [14] Silva E., Soares-da-Silva P. // Int. Rev. Cell Mol. Biol. 2012. V. 294. P. 99–132.
- [15] Aperia A. // J. Intern. Med. 2007. V. 261. P. 44–52.
- [16] Haas M., Wang H., Tian J., Xie Z. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 18694–18702.
- [17] Li Z., Langhans S.A. // Front. Cell. Dev. Biol. 2015. V. 3. P. 66.
- [18] Manunta P., Hamlyn J.M., Simonini M. et al. // J. Hypertens. 2011. V. 29. P. 349–356.
- [19] Xie J.X., Li X., Xie Z. // IUBMB Life. 2013. V. 65. N 12. P. 991–998.
- [20] Дербенев А.В., Крылов Б.В., Шурыгин А.Я. // Рос. физиол. журн. 1999. Т. 16. В. 3. С. 310–317.