

Возможный молекулярный механизм рецепции низкоинтенсивного инфракрасного излучения: роль Src-киназы

© И.Л. Ячнев, Т.Н. Шелых, С.А. Подзорова, И.В. Рогачевский, Б.В. Крылов, В.Б. Плахова

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: krylov@infran.ru

(Поступило в Редакцию 20 октября 2015 г.)

Ранее нами с помощью метода локальной фиксации потенциала было установлено, что воздействие низкоинтенсивного инфракрасного (ИК) излучения приводит к изменению эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов мембраны ноцицептивного нейрона. Мишенью ИК-излучения служат молекулы АТФ, которые в момент захвата ИК-фотона находятся на сайте связывания Na^+ , K^+ -АТФазы, где протекает процесс гидролиза АТФ. Na^+ , K^+ -АТФаза, являясь трансдуктором сигнала, передает его к медленным натриевым каналам и на геном клетки. В настоящей работе показано, что на фоне действия ингибитора Src-киназы *PP2* излучение не вызывает изменения ответов сенсорного нейрона. Полученные данные позволяют заключить, что Src-киназа как последовательное звено участвует во внутриклеточных каскадных процессах, которые запускаются низкоинтенсивным излучением CO_2 -лазера.

Известно, что Src-киназа является активным участником сигнальных путей в клетках, контролирующим разнообразный спектр внутриклеточных каскадных процессов [1]. Обычно ключевую роль в трансдукции сигналов в ответ на рецептор-опосредованное воздействие различных адекватных стимулов, а также эндогенных и экзогенных фармакологических агентов играют G-белки. Согласно нашим исследованиям ноцицептивных нейронов [2,3], а также данным других авторов, полученным при изучении кардиомиоцитов [4], функцию трансдуктора сигнала может также выполнять Na^+ , K^+ -АТФаза. Выявление и идентификация физиологической функции белков, непосредственно взаимодействующих с Na^+ , K^+ -АТФазой в различных тканях при различных условиях, является задачей, позволяющей понять механизмы регуляции активности самого фермента, а также его роли в передаче внутриклеточных сигналов.

Ранее нами было показано, что воздействие излучения с длиной волны $10.6 \mu\text{m}$ модулирует трансдукторную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы [5], и это приводит к снижению потенциалочувствительности активационной воротной системы медленных натриевых каналов $\text{Na}_v 1.8$, вызывая антиноцицептивный эффект. Взаимодействуя с Na^+ , K^+ -АТФазой, Src-киназа способна образовывать функциональный сигнальный комплекс [6–8], роль которого в рецепции низкоинтенсивного ИК-излучения неизвестна. Исследование этой функции Src-киназы при воздействии низкоинтенсивного ИК-излучения являлось целью настоящей работы.

Оптическая схема установки представлена на рис. 1. Источником излучения являлся волонодвный CO_2 -лазер с длиной волны излучения $10.6 \mu\text{m}$. Мощность ИК-излучения контролировали в пучке, отраженном от передней поверхности оптического клина, находящегося на оси оптической схемы, опорным измерителем мощности ИМО-2Н. Для визуализации положения луча

CO_2 -лазера в пространстве использовали полупроводниковый лазер с длиной волны излучения 635 nm , луч которого совмещали с ИК-лучом при помощи оптического клина. Варьирование мощности излучения осуществлялось при помощи дискового ослабителя. Зеркалом излучение направляли в экспериментальную ванночку с физиологическим раствором, в котором находился нейрон. Диаметр ванночки равнялся 8.3 mm , глубина — 18 mm . Диаметр лазерного пучка в плоскости поверхности физиологического раствора составлял 1 cm . Подачу лазерного излучения на нейрон и прекращение облучения осуществляли при помощи механического экрана. До начала и во время действия излучения контролировали температуру окружающей среды, которая за время облучения, составлявшее 3 min , изменялась

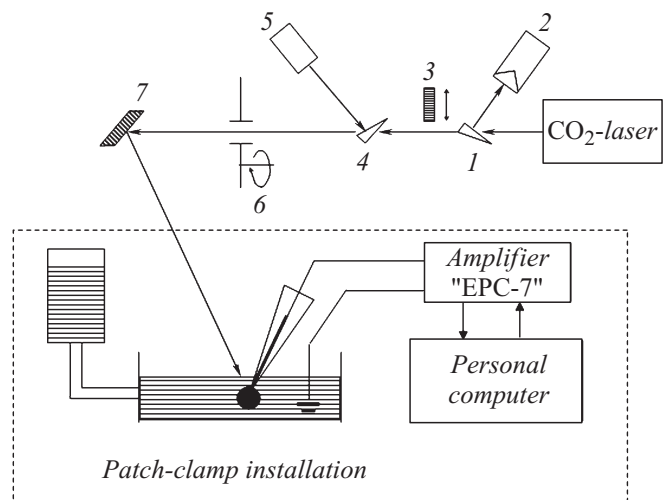


Рис. 1. Оптическая схема установки: 1, 4 — оптический клин, 2 — измеритель мощности излучения, 3 — механический экран, 5 — полупроводниковый лазер, 6 — дисковый ослабитель, 7 — зеркало.

на 2°C, от 20 до 22°C. В этих условиях влияние температурного фактора было полностью исключено, о чем свидетельствовало отсутствие изменения кинетики токов медленных натриевых каналов [9]. Для измерения мощности излучения, поступающего на поверхность физиологического раствора в ванночке, использовался дополнительный измеритель мощности излучения, располагавшийся на месте ванночки таким образом, что плоскость его входной апертуры соответствовала поверхности физиологического раствора в ванночке. При одновременном измерении мощности излучения опорным и дополнительным измерителями определялся коэффициент, позволяющий во время опытов с облучением нейрона определять мощность излучения, поступающего на поверхность физиологического раствора, по величине мощности излучения, регистрируемой опорным измерителем мощности излучения. Распределение мощности излучения по сечению лазерного пучка было измерено в отдельном опыте с помощью калиброванных диафрагм, располагавшихся в плоскости поверхности физиологического раствора.

Ответы сенсорного нейрона, находящегося в экспериментальной ванночке, на воздействие низкоинтенсивного ИК-излучения регистрировали с помощью метода локальной фиксации потенциала. Токи натриевых каналов $\text{Na}_v1.8$ записывали до и после воздействия излучения. Регистрировали величину эффективного заряда активационного воротного устройства этих каналов с помощью метода Алмерса [10]. Применение этого метода подробно описано в наших предыдущих работах [5, 11]. Наиболее важным стационарным параметром, определяющим электровозбудимость медленного натриевого канала ($\text{Na}_v1.8$), является эффективный заряд (Z_{eff}) его активационной воротной системы. Именно он позволяет количественно оценить эффект исследуемого воздействия. Отметим, что ИК излучение отвечало критерию низкой интенсивности, т.е. отсутствовал нагрев мембраны нейрона. Основанием для такого вывода был факт, отмеченный выше. Действительно, каналы $\text{Na}_v1.8$ не отвечали на включение излучения изменением кинетики воротных процессов [9]. Отметим, что изменение кинетики является самым чувствительным показателем температурного воздействия на этот мембранный белок.

Для проверки предположения об участии Src-киназы в рецепции ИК-излучения были проведены исследования влияния ингибитора Src-киназы *PP2* на величину Z_{eff} , при воздействии на сенсорный нейрон низкоинтенсивного излучения CO_2 -лазера. Изменение эффективного заряда в ответ на действие излучения наблюдалось при следующих условиях: мощность лазерного излучения $W_0 = 1.4 \text{ W}$, длительность облучения $t = 180 \text{ s}$, пропускание оптической схемы $T = 7.4 \cdot 10^{-3}$, толщина слоя физиологического раствора над нейроном $L = 380 \mu\text{m}$. При этом энергия излучения, поступающая на поверхность физиологического раствора, $Q_1 = 0.69 W_0 t T = 1.3 \text{ J}$. Коэффициент 0.69 определяет долю полной мощности излучения, соответствующую диаметру ванночки. Энергия

излучения, прошедшая через слой физиологического раствора, определяется выражением $Q_2 = Q_1 \exp(-\mu L)$, где μ — коэффициент поглощения излучения внеклеточным раствором. Специально проведенные измерения показали, что коэффициент поглощения физиологического раствора на длине волны $10.6 \mu\text{m}$ равен коэффициенту поглощения воды в пределах погрешности измерений, не превышающей $\pm 10\%$, и что потерями излучения, связанными с процессами его отражения от поверхности раствора и рассеяния в слое раствора толщиной до $400 \mu\text{m}$, можно пренебречь. При $Q_1 = 1.3 \text{ J}$, $\mu = 856.7 \text{ cm}^{-1}$ [12] и $L = 0.038 \text{ cm}$, $Q_2 = 9.4 \cdot 10^{-15} \text{ J}$. Согласно распределению мощности излучения по сечению лазерного пучка, осевой области пучка диаметром $d = 2 \text{ mm}$ соответствует 9% полной мощности излучения. В области диаметров от 0 до 2 mm зависимость мощности излучения от диаметра пучка может быть аппроксимирована прямой линией. С учетом этого обстоятельства энергия излучения на поверхности мембраны нейрона определяется выражением $Q_N = 0.09 Q_2 (d/2) / 0.69$, где $d = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mm}$ — диаметр нейрона в миллиметрах. При энергии излучения, прошедшего через слой раствора $Q_2 = 9.4 \cdot 10^{-15} \text{ J}$, энергия излучения на поверхности мембраны нейрона $Q_N = 1.2 \cdot 10^{-17} \text{ J}$. Отметим, что наименьшая энергия излучения на мембране нейрона, при которой еще наблюдалась его реакция на действие излучения, равнялась $3.0 \cdot 10^{-18} \text{ J}$.

Для получения „надежного“ ответа исследуемой мембраны на действие ИК-излучения необходимо, чтобы отношение сигнал/шум превышало величину kT . Это условие выполняется, когда энергия падающего на нейрон излучения превышает среднюю кинетическую энергию молекул воды, определяемую температурой наружного раствора. Проверка показала, что в условиях наших опытов изменение кинетики токов медленных натриевых каналов мембраны сенсорного нейрона происходит, когда температура физиологического раствора, определяемая поглощаемой им энергией излучения, превышает 25°C [9]. При температуре 25°C (298 K) величина $kT = 4.11 \cdot 10^{-21} \text{ J}$. Она на четыре порядка ниже величины $3.4 \cdot 10^{-17} \text{ J}$, которая в соответствии с нашими данными, полученными при температуре 25°C, определяет порог изменения кинетики токов. Эти расчеты свидетельствуют о достаточной обоснованности полученных нами данных благодаря высочайшей чувствительности мембраны сенсорного нейрона к действию низкоинтенсивного излучения среднего ИК-диапазона длин волн. Выполненные оценки позволили определить диапазон энергии излучения, в котором наблюдаются изменения возбудимости мембраны ноцицептивного нейрона. Согласно полученным данным и проведенным оценкам, диапазон энергии излучения, при котором происходит изменение эффективного заряда, является относительно узким. С одной стороны, энергия излучения, достигающего мембраны нейрона, должна превышать порог чувствительности к воздействию излучения CO_2 -лазера, а с другой — отвечать критерию низкой интенсивности

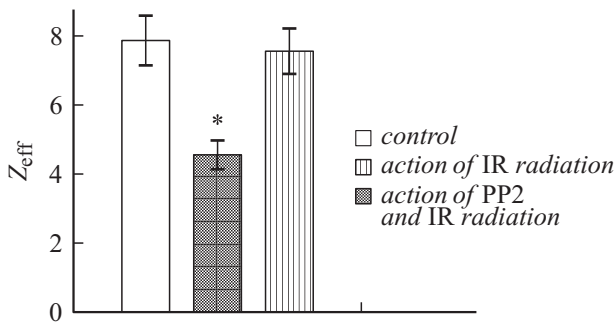


Рис. 2. Инфракрасное излучение не влияет на изменение величины эффективного заряда при ингибировании Src-киназы (* — различие статистически достоверно).

излучения, при котором температура мембраны практически не меняется. Нижняя граница этого диапазона соответствует энергии $3.0 \cdot 10^{-18}$ J, а верхняя, превышение которой вызывает изменение кинетики токов медленных натриевых каналов, — энергии излучения $3.4 \cdot 10^{-17}$ J.

Роль Src-киназы в передаче сигналов, вызванных воздействием излучения CO₂-лазера на мембрану сенсорного нейрона, была исследована с помощью метода локальной фиксации потенциала. В конфигурации регистрации активности целой клетки были изучены ответы каналов Na_v1.8. При отсутствии во внеклеточном растворе ингибитора Src-киназы действие излучения вызывало статистически достоверное уменьшение величины эффективного заряда активационной воротной системы этих каналов от контрольного значения 7.9 ± 0.7 ($n = 14$) до 4.6 ± 0.4 ($n = 17$). Эти значения представлены в единицах заряда электрона (рис. 2). Применение ингибитора Src-киназы PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) в концентрации 10 μM при выключенном излучении не вызывало изменения величины Z_{eff} . Это свидетельствует о том, что сам по себе ингибитор, добавленный во внеклеточный физиологический раствор, не влияет на изменение потенциалочувствительности медленных натриевых каналов. Сочетанное действие излучения и PP2 также не приводило к изменению эффективного заряда. Величина Z_{eff} в этом случае соответствовала своим контрольным значениям 7.6 ± 0.6 ($n = 28$). Величина энергии излучения, падающего на мембрану нейрона, в этих опытах варьировала в области $(1-2) \cdot 10^{-17}$ J. Полученный результат выключения чувствительности мембраны сенсорного нейрона к действию ИК-излучения при ингибировании активности Src-киназы свидетельствует о ее важной роли в передаче энергии низкоинтенсивного ИК-излучения от Na⁺, K⁺-АТФазы к медленным натриевым каналам.

Впервые молекулярный механизм действия на биологические ткани низкоинтенсивного ИК-излучения, не приводящего к нагреву облучаемого объекта, был описан при исследовании мембраны холоднокровных животных. Было показано, что такое воздействие приводит к снижению частоты повторных ответов ней-

рона-рецептора растяжения ракообразных [13]. При этом было установлено, что в рецепции ИК-излучения холоднокровных животных участвует Na⁺, K⁺-АТФаза. Возможные механизмы рецепции низкоинтенсивного ИК-излучения мембраной клеток теплокровных животных были изучены в наших предыдущих работах при исследовании ответов мембраны ноцицептивного нейрона и при исследовании роста нейритов в органотипической культуре эмбриональной ткани [5,14,15]. Подробному анализу молекулярного механизма взаимодействия излучения CO₂-лазера с мембраной сенсорного нейрона посвящена работа [5]. На основании полученных данных этот механизм может быть представлен последовательностью следующих процессов. Первичным актом является поглощение излучения молекулами АТФ, имеющими ИК-полосу поглощения с максимумом интенсивности на длине волны 10.43 μm и полушириной 1.1 μm, в которую попадает длина волны излучения лазера (10.6 μm). Измеренная нами в отдельном опыте величина сечения поглощения излучения молекулами АТФ, $\sigma_a = 2.0 \cdot 10^{-17}$ cm², позволяет считать процесс поглощения достаточно эффективным. Поглощающие излучение молекулы АТФ, находящиеся в цитозоле, достаточно быстро теряют эту энергию в столкновениях. Возможность передать ее Na⁺, K⁺-АТФазе существует только у тех молекул АТФ, которые в момент захвата ИК-фотона находятся на сайте связывания Na⁺, K⁺-АТФазы, где протекает процесс гидролиза АТФ. Энергия этого ИК-фотона $h\nu = 1.87 \cdot 10^{-20}$ J является колебательной энергией. Для поглощения колебательной энергии необходимо, чтобы поглощающая молекула имела частоту колебаний, равную или близкую к частоте излучения. Фрагментом молекулы АТФ, поглощающим излучение, является терминальный фосфатный остаток: частота группового деформационного колебания (O—P—O)_γ (957 cm⁻¹) близка к частоте излучения 944.19 cm⁻¹. При таком различии частот колебаний поглощение излучения является возможным в силу присутствия в колебательной моде вращательных энергетических уровней. При гидролизе молекулы АТФ фосфатный остаток передает энергию излучения в колебательную моду Na⁺, K⁺-АТФазы. Передаваемая Na⁺, K⁺-АТФазе энергия излучения вызывает изменение ее конформации, отличное от конформационных переходов, осуществляющихся в процессе функционирования Na⁺, K⁺-АТФазы как натриевого насоса, что ведет к активации именно трансдукторной функции. При активации трансдукторной функции происходит передача сигнала к медленным натриевым каналам, точнее, к их активационному воротному устройству. В результате ответной реакции каналов происходит снижение их потенциалочувствительности, что, в свою очередь, ведет к снижению возбудимости мембраны ноцицептивного нейрона и к купированию боли [16,17]. Условием поглощения излучения молекулами АТФ является проникновение излучения через мембрану. В литературе отсутствуют данные о поглощении мембраной нейрона

излучения с длиной волны $10.6\ \mu\text{m}$. Простая оценка показывает, что оно не может быть большим. При толщине мембраны $6\ \text{nm}$ [18] для поглощения в ней всего 1% мощности излучения необходимо, чтобы ее коэффициент поглощения был равным $16750.5\ \text{cm}^{-1}$, т.е. нереально большим для мягких биологических тканей. Дополнительным подтверждением эффекта проникновения излучения CO_2 -лазера через цитоплазматическую мембрану является результат, полученный при просвечивании слоя ткани, состоявшего из слоя свежесделанных спинальных ганглиев, плотно расположенных на прозрачной для излучения пластинке. В каждом ганглии содержится несколько тысяч нейронов. В нейрональных клетках помимо мембраны структурами, поглощающими излучение, являются молекулы АТФ, комплексы молекул воды и, возможно, другие имеющиеся в цитоплазме органеллы. Специально проведенные измерения показали, что через такое многокомпонентное образование проходит 11% мощности падающего на него излучения. Это позволяет заключить, что возможность прохождения излучения через мембрану нейрона не вызывает сомнения. Молекулы воды, участвующие в процессе гидролиза, не имеют полосы поглощения в области $10\ \mu\text{m}$ [19]. Сильное поглощение излучения CO_2 -лазера водой обусловлено димерами $(\text{H}_2\text{O})_2$ [20]. Данные о поглощении десятимикронного излучения молекулами Na^+ , K^+ -АТФазы в литературе отсутствуют. Измерения поглощения выделенных молекул Na^+ , K^+ -АТФазы на длине волны $10.6\ \mu\text{m}$ представляются нецелесообразными из-за возможного сильного отличия свойств таких молекул от интактных молекул, находящихся в мембране живого нейрона. Косвенным аргументом, вызывающим сомнение в том, что Na^+ , K^+ -АТФаза поглощает излучение, является оценка коэффициента поглощения молекул Na^+ , K^+ -АТФазы, сделанная в предположении, что только эти молекулы поглощают излучение в мембране нейрона. Минимальная энергия, поступающая на поверхность мембраны нейрона, при которой еще наблюдается уменьшение эффективного воротного заряда, равна $3.0 \cdot 10^{-18}\ \text{J}$. Для поглощения минимальной доли этой энергии, равной энергии одного фотона, поглощающая среда должна иметь коэффициент поглощения, равный $1 \cdot 10^4\ \text{cm}^{-1}$. Эта величина превышает характерные величины коэффициентов поглощения мягких биологических тканей. Так, например, коэффициент поглощения кожи человека на длине волны $10.6\ \mu\text{m}$ равен $480\ \text{cm}^{-1}$ [21].

Тот факт, что ингибирование Src-киназы полностью устраняло реакцию мембраны сенсорного нейрона на действие излучения, указывает на последовательное включение Src-киназы в те каскадные процессы, которые передают сигнал к медленным натриевым каналам. Существенной особенностью Src-киназы является наличие у нее сайтов гидролиза АТФ. При гидролизе на сайте связывания колебательно возбужденной молекулы АТФ, поглотившей фотон, энергия излучения фосфатным остатком передается киназе и может являться фак-

тором, обеспечивающим передачу и усиление сигналов, поступающих на медленные натриевые каналы как на эффекторное звено.

Участие Src-киназы наряду с Na^+ , K^+ -АТФазой в регуляции ее трансдукторной функции было впервые исследовано на кардиомиоцитах [4]. Этот механизм, согласно нашим данным, полученным при исследовании органотипической культуры сенсорных нейронов, активируется и при воздействии низкоинтенсивного излучения CO_2 -лазера [22].

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, позволяют заключить, что Src-киназа участвует в рецепции низкоинтенсивного ИК-излучения, являясь последовательным звеном, включенным в цепь каскадных процессов. Здесь нами впервые показано, что Src-киназы сенсорных нейронов передают сигнал не только на геном клетки, но и к соседним мембранным белковым структурам, которыми являются медленные натриевые каналы. Известно, что именно они участвуют в переработке ноцицептивной информации, поступающей в мозг. Поэтому агенты, специфически модулирующие механизмы передачи ноцицептивной информации, могут претендовать на роль анальгетиков. К купированию боли, согласно нашим данным, может приводить и воздействие низкоинтенсивного ИК-излучения CO_2 -лазера. Детализация молекулярных процессов, позволяющая выяснить роль Src-киназы не только в рецепции ИК-излучения, но и при физиотерапевтическом применении лазерных приборов, представляет, на наш взгляд, большой интерес и с практической точки зрения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00440.

Список литературы

- [1] Thomas S.M., Brugge J.S. // *Ann. Rev. Cell Dev. Bi.* 1997. Vol. 13. P. 513–609.
- [2] Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А., Людино М.И., Кузьмин А.В., Изварина Н.А. // *Физиологический журн.* 1999. Т. 85. № 2. С. 225–236.
- [3] Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Kipenko A.V., Krylov B.V. // *Med. Chem.* 2012. Vol. 8. N 1. P. 33–39.
- [4] Xie Z., Askari A. // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269. N 10. P. 2434–2439.
- [5] Yachnev I.L., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Krylov B.V. // *Med. Chem.* 2012. Vol. 8. N 1. P. 14–21.
- [6] Zhang S., Malmersjo S., Li J., Ando H., Aizman O., Uhlen P., Mikoshiba K., Aperia A. // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. P. 21954–21962.
- [7] Liang M., Tian J., Liu L., Pierre S., Liu J., Shapiro J., Xie Z.J. // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. N 14. P. 10585–10593.
- [8] Schoner W., Scheiner-Bobis G. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. Vol. 293. P. 509–536.

- [9] Подзорова С.А., Катина И.Е., Плахова В.Б., Горобец В.А., Петухов В.О., Ячнев И.Л., Крылов Б.В. // Сенсорные системы. 2010. Т. 24. № 2. С. 168–174.
- [10] Алмерс В. Мембраны: ионные каналы. М.: Мир, 1981. С. 129–236.
- [11] Katina I., Yachnev I., Plakhova V., Shelykh T., Rogachevsky I., Podzorova S., Krylov B. // Proc. of the NATO Advanced Research Workshop „Advanced Bioactive Compounds Countering the Effects of Radiological, Chemical and Biological Agents“. Winnipeg, Manitoba, 2013. NATO Science Series. Ed. by G.N. Pierce. Ch. 3. P. 29–42.
- [12] Hale G.V., Querry M.R. // Appl. Opt. 1973. Vol. 12. N 3. P. 555.
- [13] Павленко В.К., Снетков В.И., Лебедев О.Е., Гордиенко В.А. // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. 1975. Т. 52. № 6. С. 925–932.
- [14] Плахова В.Б., Подзорова С.А., Мищенко И.Т., Баграев Н.Т., Клячкин Л.Е., Маляренко А.М., Романов В.В., Крылов Б.В. // Сенсорные системы. 2003. Т. 17. № 1. С. 24–31.
- [15] Горобец В.А., Петухов В.О., Ячнев И.Л., Пенниайнен В.А., Лопатина Е.В., Подзорова С.А., Крылов Б.В. // Журн. прикл. спектр. 2010. Т. 77. № 3. С. 445–450.
- [16] Карымова Е.А., Катина И.Е., Плахова В.Б., Подзорова С.А., Кулов М.А., Крылов Б.В. // Сенсорные системы. 2008. Т. 22. № 3. С. 264–277.
- [17] Дик О.Е., Шельх Т.Н., Плахова В.Б., Ноздрачев А.Д., Крылов Б.В. // ЖТФ. 2015. Т. 85. Вып. 10. С. 131–134.
- [18] Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии. М.: Мир, 1981. Т. 3. С. 1427.
- [19] Benedict W.S., Claassen H.H., Shay J.H. // J. Res. Nat. Bur. Stand. 1952. Vol. 49. N 2. P. 91–99.
- [20] Адикс Т.Г., Арефьев В.Н., Дианов В.И. // Квант. электрон. 1975. Т. 2. № 5. С. 885.
- [21] Жаров В.П., Зубов Б.В., Лоцинов В.И., Мурина Т.М., Никифоров С.М., Прохоров А.М., Чеботарев Г.П. // Квант. электрон. 1989. Т. 16. № 9. С. 1941–1943.
- [22] Пенниайнен В.А., Ячнев И.Л., Кипенко Ф.В., Лопатина Е.В., Крылов Б.В. // Сенсорные системы. 2014. Т. 28. № 4. С. 90–94.