

ДЕЙСТВИЕ NT-1505 НА СТРУКТУРУ МЕМБРАН ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА *in vivo*

© 2015 г. Н.Ю. Герасимов, О.В. Неврова, В.В. Каспаров, А.Л. Коварский,
А.Н. Голощапов, Е.Б. Бурлакова

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Поступила в редакцию 02.07.15 г.

Проведено исследование влияния NT-1505 на мембраны эндоплазматического ретикулума. Показано, что динамика изменений липидной и прибелковой областей микровязкости мембран эндоплазматического ретикулума при введении препарата носит антибатный характер, что указывает на отсутствие патологических нарушений в структуре мембран. Микровязкость мембран измеряли методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксила (липидный зонд) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболин-3-оксила (прибелковый зонд). С целью получения более полной информации об изменениях структуры мембран при воздействии нейропротектора NT-1505 измеряли температурную зависимость времени корреляции вращательной диффузии в диапазоне температур 283–317 К (10–44°C). Для контрольной группы были характерны два структурных перехода в температурных интервалах 16–20°C и 32–38°C для обеих областей мембран, которые сохранялись при введении NT-1505. Таким образом, NT-1505 не влияет существенно на структуру мембран эндоплазматического ретикулума.

Ключевые слова: текучесть мембран, спиновый зонд, структура мембран, липид-белковые взаимодействия.

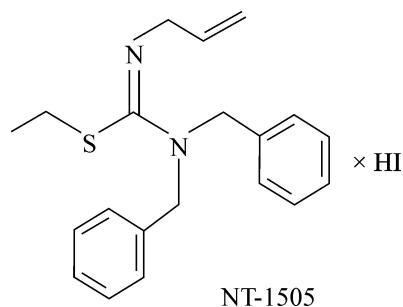
Болезнь Альцгеймера представляет собой нейродегенеративное заболевание, которое затрагивает многие клеточные функции, такие как транспорт ионов, синаптическая передача и др., которые так или иначе связаны с функциональным и структурным состоянием мембран. Практически все современные терапевтические стратегии лечения болезни Альцгеймера нацелены на одну из многих мишеней – на блокаду кальциевых каналов или на угнетение ацетилхолинэстеразы, либо на синтез, агрегацию или деградацию β-амилоида. Нам кажется очевидным, что при всех этих воздействиях происходит модификация структуры мембран, которая может играть важную роль при развитии и терапии болезни Альцгеймера.

Ранее нами было показано, что при развитии деменции альцгеймеровского типа происходит нарушение структуры мембран, при этом микровязкость мембран резко снижается [1]. Поэтому мы считаем важным изучение действия препаратов, предлагаемых для терапии болезни Альцгеймера, на структуру липидного бислоя. Структурное состояние мембран может изме-

няться как из-за изменения состава липидов, так и из-за их перераспределения внутри мембраны, что может происходить при изменении конформации мембранных белков. Как известно, синтез белков и липидов происходит на мембранах эндоплазматического ретикулума. Поэтому представляло интерес изучение действия нейропротектора NT-1505 на мембраны эндоплазматического ретикулума.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

NT-1505 вводили каждые сутки внутривенно в концентрации 1 мг/кг. Пробы были взяты через 3, 7 и 15 сут после введения. Подопытные животные – самки беспородных мышей массой по 20–23 г.



Сокращения: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

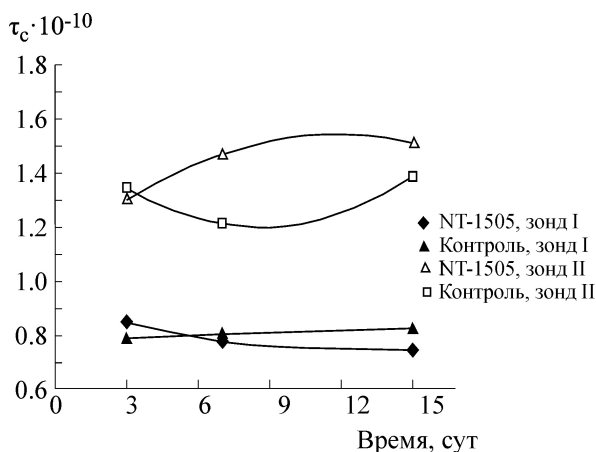


Рис. 2. Зависимости τ_c от времени введения NT-1505 для мембран эндоплазматического ретикулума при температуре 297°K.

туры прибрежковых областей мембран, которые связаны с функционированием мембранных белков. Вслед за этим изменяются структура и структурные характеристики липидных областей мембран [9]. В данном эксперименте мы не наблюдали никаких изменений в липидной фазе мембран контрольной группы, вероятно потому, что эти изменения могли происходить в интервалах времени между измеряемыми точками.

В прибрежковых областях при введении препарата текучесть мембран возрастала с течением времени. Для липидных областей мембран эндоплазматического ретикулума было характерно падение значений τ_c при длительном введении препарата. Динамика изменений липидной и прибрежковой областей микровязкости мембран эндоплазматического ретикулума носит антибатный характер (рис. 2), что указывает на отсутствие патологических нарушений в структуре мембран, так как подобные изменения обычно наблюдаются в норме [9]. Стоит отметить, что характер изменений времени корреляции вращательной диффузии в прибрежковых областях мембран при введении NT-1505 имеет противоположную направленность относительно контроля (рис. 2), что также ранее наблюдалось в мембранах синапсом [10].

Из рис. 3 видно, что при хроническом введении исследуемого нейропротектора через трое суток наблюдалось увеличение микровязкости липидных областей и незначительное увеличение текучести прибрежковых областей мембран эндоплазматического ретикулума. При дальнейшем введении NT-1505, через 7 и 15 сут, величина времени корреляции вращательной диффузии в липидной области была ниже кон-

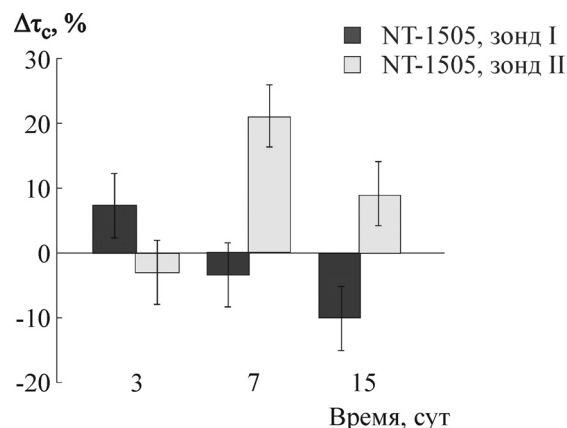


Рис. 3. Относительные значения времени корреляции вращательной диффузии от времени введения препарата при 297°K.

трольных значений, тогда как в прибрежковой – выше. Следует особо подчеркнуть, что относительные изменения микровязкости прибрежковых и липидных областей мембран эндоплазматического ретикулума имеют разнонаправленный характер относительно контроля на всех сроках введения препарата (рис. 3), что характерно при отсутствии патологических нарушений структуры мембран [9,10]. Кроме того, отметим, что подобное поведение микровязкости наблюдалось на всем исследуемом температурном интервале для обоих зондов, что указывает на корректность измерения микровязкости при комнатных температурах.

С целью получения более полной информации об изменениях структуры мембран при воздействии нейропротектора NT-1505 измеряли температурную зависимость времени корреляции вращательной диффузии в диапазоне температур 283–317 К (10–44°С). Зависимость $\ln\tau_c$ от $1/T$ представляет собой ломаную с наклонными и практически горизонтальными прямыми. Горизонтальные прямые соответствуют термоиндуцированным структурным перестройкам в мембранах. В таблице показаны структурные переходы, а также энергии активации соответствующих структурных состояний. Как видно из таблицы, для контрольной группы характерны два структурных перехода в температурных интервалах 16–20°С и 32–38°С для обеих областей мембран, которые сохранялись при введении NT-1505.

Отметим, что энергия активации соответствующих структурных состояний также оставалась на уровне контроля. Таким образом, NT-1505 не влияет существенно на структуру мембран эндоплазматического ретикулума.

Структурные переходы в микросомальных мембранах при воздействии хронического введения NT-1505 с энергиями активации соответствующих структурных состояний

		Микросомы											
		3-и сутки				7-е сутки				15-е сутки			
		Контроль		NT-1505		Контроль		NT-1505		Контроль		NT-1505	
Т, К	Т, С	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II
283	10	25	33	29	33	25	32	29	33	28	30	30	31
285	12												
287	14												
289	16												
291	18												
293	20				24				20				26
295	22	15	23	18		15	21	18		18	27	18	
297	24												
299	26												
301	28												
303	30												
305	32												
307	34												
309	36												
311	38												
313	40												
315	42												
317	44												

Ранее нами было показано изменение структуры мембран синапсом при воздействии препаратов *in vivo* [10]. Структурные переходы в липидной и приобелковой фазе мембран при воздействии NT-1505 были сдвинуты в область более низких температур (14–18°C и 34–38°C) по отношению к контролю (16–20°C и 38–44°C). По-видимому, данное вещество встраивалось в белковые структуры, в том числе рецепторы и каналы [10], что приводило к изменениям структуры мембранных белков и их липидного окружения. Липидная фаза мембран, свободная от белков, при этом практически не отличалась от контроля. При однократном и многократном введении NT-1505 проявлял активность в изменении микровязкости приобелковых областей мембран синапсом. Вероятно, данный нейропротектор вследствие особенностей своей структуры не задерживается в организме, что в свою очередь позволяет избежать различных побочных действий препарата.

Исходя из вышесказанного, можно заметить, что NT-1505 изменяет структуру липидного бислоя синапсом (сдвигает термоиндуцированные структурные переходы) и не влияет существенно на структуру мембран эндоплаз-

матического ретикулума. При этом данный препарат заметно изменяет микровязкость мембран как синапсом [10], так и эндоплазматического ретикулума на всем протяжении эксперимента. В работах [11,12] было показано, что NT-1505 может связываться с мембранными белками. Изменения конформации белковых структур в мембранах синапсом могут приводить к изменениям структуры клеточных мембран, а вслед за этим к запуску синтеза липидов, необходимых для стабилизации новой структуры [13]. В результате этого может меняться не только состав липидов мембран синапсом, но и состав липидного бислоя эндоплазматического ретикулума, что может приводить к изменениям структурных характеристик мембран. Вязкостные свойства мембран могут изменяться не только вследствие изменения состава липидов, но и из-за перераспределения липидов внутри мембраны с возможным изменением их конформации. Простое перераспределение липидов в мембране не должно приводить к существенным изменениям структуры липидного бислоя, что, скорее всего, происходит вследствие модификации липидного состава. Изменение состава липидов в первую оче-

редь должно заметно влиять на структуру мембран эндоплазматического ретикулума, так как именно здесь происходит их синтез. В ходе эксперимента существенных структурных изменений мембран эндоплазматического ретикулума выявлено не было. Вероятно, NT-1505, обладая достаточно гибкой структурой, может легко проникать внутрь клетки. Затем, связываясь с мембранными белками эндоплазматического ретикулума, как и с белками в мембранах синапсом [10], изменяет их конформацию, что приводит к изменению липидного окружения мембранных белков. Вслед за этим меняется микровязкость при белковых и липидных областях мембран вследствие перераспределения липидов внутри мембраны. NT-1505, вследствие структурной гибкости молекулы, высвобождается из мембранных белков настолько быстро, что стабилизирующие новую структуру мембран липиды не успевают синтезироваться, и, вероятно, поэтому существенного изменения липидного бислоя эндоплазматического ретикулума не происходит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования можно сказать, что указанный нейропротекторный препарат NT-1505 не оказывает значительного влияния на структуру мембран эндоплазматического ретикулума. При воздействии нейропротектора наблюдается существенное изменение микровязкости липидного бислоя. Таким

образом, внутри мембраны происходит перераспределение липидов с возможным изменением их пространственной структуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. Ю. Герасимов, А. Н. Голощапов и Е. Б. Бурлакова, Хим. физика **28** (7), 82 (2009).
2. М. И. Прохорова, *Методы биохимических исследований* (Изд-во Ленинград. ун-та, 1982).
3. В. И. Бинюков, С. Ф. Борунова, М. Г. Гольдфельд и др., Биохимия **36** (6), 1149 (1971).
4. А. М. Вассерман, А. Л. Бучаченко, А. Л. Коварский и И. Б. Нейма, Высокомолекуляр. соединения **10A**, 1930 (1968).
5. А. Н. Кузнецов, *Метод спинового зонда* (М., Наука, 1976).
6. Х. Кухлинг, *Справочник по физике* (Мир, М., 1983).
7. D. Chapman, Quart. Rev. Biophys. **8**, 185 (1975).
8. M. Shinitzky and M. Inbar, Biochim. Biophys. Acta **133** (1976).
9. А. Н. Голощапов и Е. Б. Бурлакова, Биофизика **25** (1), 97 (1980).
10. Н. Ю. Герасимов, В. В. Каспаров, О. В. Неврова и др., Биофизика **58** (2), 252 (2013).
11. S. Bachurin, S. Tkachenko, I. Baskin, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. **939**, 219 (2001).
12. V. V. Grigoriev, A. N. Proshin, A. S. Kinzirkii, and S. O. Bachurin, Bull. Exp. Biol. Med. **153** (3), 298 (2012).
13. Е. Б. Бурлакова, Журн. физ. химии **18** (5), 1311 (1989).

The Effect of NT-1505 on a Membrane Structure of Endoplasmic Reticulum *in vivo*

N.Yu. Gerasimov, O.V. Nevrova, V.V. Kasparov, A.L. Kovarskii,
A.N. Goloshchapov, and E.B. Burlakova

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334, Russia

The effect of neuroprotector NT-1505 on endoplasmic reticulum membranes was studied. It was shown that the dynamics of changes in lipid and near-protein areas microviscosity of endoplasmic reticulum membranes at drug administration is of an antibate nature. This points to the absence of pathological disturbances in the membrane structure. Membrane microviscosity was measured by electron paramagnetic resonance spin labeling of 2,2,6,6-tetramethyl-4-capryloyl-oxyloxy-piperidine-1-oxyl (lipid probe) and 5,6-benzo-2,2,6,6-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydro- γ -carboline-3-oxyl (near protein probe). To obtain more complete information about changes in membrane structure under the action of neuroprotector NT-1505 the temperature dependence of rotational diffusion correlation time was measured in the temperature range of 283–317 K (10–44°C). The two structural transitions were characterized for both areas of membranes of control group in temperature intervals 16–20°C and 32–38°C which were still present after NT-1505 introduction. Therefore, NT-1505 has no significant effect on membrane structure of the endoplasmic reticulum.

Key words: membrane fluidity, spin probe, membrane structure, lipid-protein interactions