

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРИТЕРПЕНОвого ГЛИКОЗИДА КУКУМАРИОЗИДА A₂-2 С МЕМБРАННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ МАКРОФАГОВ МЫШИ

¹Пислягин Е.А., ¹Юрченко Е.А., ²Горпенченко Т.Ю., ¹Давыдова В.Н., ¹Аминин Д.Л.

¹ФГБУ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток;

²ФГБУ Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, e-mail: pislyagin@hotmail.com

Исследован молекулярный механизм иммуностимулирующего действия тритерпенового гликозида кукумариозида A₂-2 из дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica*. С помощью анализа флуоресцентного изображения клеток изучено взаимодействие кукумариозида A₂-2 с мембранными рецепторами перитонеальных макрофагов мыши, главным образом с пуриновыми рецепторами P2X семейства (как потенциальными мембранными мишенями действия гликозида). Проведено фармакологическое типирование рецепторов и ионных каналов различными блокаторами и модуляторами Ca²⁺ транспорта. Методом проточной цитофлуориметрии и FACS-анализа установлен композиционный состав клеток, входящих в популяцию иммунокомпетентных клеток мышей и принимающих участие в иммунном ответе на воздействие гликозида.

Ключевые слова: Тритерпеновые гликозиды голотурий, иммуномодулирующая активность, макрофаги, молекулярный механизм действия, пуриновые рецепторы

INTERACTION OF TRITERPENE GLYCOSIDE CUCUMARIOSIDE A₂-2 WITH MEMBRANE RECEPTORS OF MOUSE MACROPHAGES

¹Pislyagin E.A., ¹Yurchenko E.A., ²Gorpenchenko T.Y., ¹Davidova V.N., ¹Aminin D.L.

¹G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok;

²Institute of Biology and Soil Sciences, FEB RAS, Vladivostok, e-mail: pislyagin@hotmail.com

The molecular mechanism of the immunostimulatory action of triterpene glycoside cucumarioside A₂-2 isolated from the Far Eastern sea cucumber *Cucumaria japonica* was studied. Using fluorescent imaging approach the interaction of cucumarioside A₂-2 with membrane receptors of mouse peritoneal macrophages, mainly purine receptors of P2X family (as the membrane targets of glycoside action) was investigated. A pharmacological typing of different membrane receptors and ion channel by various blockers and modulators of Ca²⁺ transport was carried out. Using flow cytometry and FACS-analysis technique a composite structure of the mouse immune cell population and their participation in the immune response to the glycoside application was revealed.

Keywords: triterpene glycosides of sea cucumbers, immunomodulatory activity, macrophages, the molecular mechanism of action, purine receptors

Тритерпеновые гликозиды голотурий изучаются на протяжении длительного времени. Установлено, что они обладают широким спектром биологической активности. Для этих соединений отмечены такие свойства, как антимикробная, иммуномодулирующая, иммуноадаьювантная и противовоспалительная активности. Кроме того, тритерпеновые гликозиды обладают выраженной мембранолитической активностью, проявляющейся в микромолярном диапазоне концентраций.

Ранее было показано, что тритерпеновый гликозид кукумариозид A₂-2, выделенный из дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica*, в наномолярных концентрациях обладает иммуностимулирующим действием, которое выражаются, главным образом, в активации клеточного звена иммунитета: усиливается адгезия, распластывание и подвижность макрофагов, усиливается фагоцитоз и формирование активных форм кислорода, увеличивается скорость пролиферации лимфоцитов, количество антител-образующих клеток селезенки, индуцируется синтез некоторых цитокинов [2, 8].

Однако, несмотря на большое количество работ, связанных с изучением физиологической активности тритерпеновых гликозидов голотурий, механизм их иммуномодулирующего действия на клеточном и субклеточном уровне изучен недостаточно. Имеющиеся в литературе данные об иммуномодулирующей активности тритерпеновых гликозидов голотурий не дают четкого представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе проявления ими стимулирующего эффекта. Практически полностью отсутствуют сведения о мембранных и внутриклеточных мишенях действия гликозидов и сигнальных путях.

Целью исследования являлось выяснение молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия тритерпенового гликозида кукумариозида A₂-2, выделенного из голотурии *Cucumaria japonica*.

В рамках поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Исследовать влияние кукумариозида A₂-2 на транспорт ионов кальция в иммунокомпетентных клетках и фармакологически определить природу рецепторов, ионных ка-

налов и переносчиков, принимающих участие в Ca^{2+} ответе клеток на действие гликозида;

2. Провести иммуноцитохимическое исследование перитонеальных макрофагов, принимающих участие во взаимодействии с кукумариозидом A_2-2 .

Материалы и методы исследования

Получение клеток. Макрофаги получали из перитонеальной жидкости мышей линии BALB/c (самки весом 20-22 г). В брюшную полость вводили 3 мл ФСБР и интенсивно пальпировали брюшную полость в течение 1-2 мин [1]. Затем с помощью шприца собирали перитонеальную жидкость и переносили ее на покровные стекла в специальные камеры (объемом 200 мкл) для анализа изображения клеток. Камеры инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 часа до полного прикрепления макрофагов ко дну камеры. В дальнейшем клеточный монослой использовали для окрашивания специфическими флуоресцентными зондами и последующего анализа изображения клеток.

Микроцитофлуориметрическая оценка транспорта Ca^{2+} . После адгезии и промывки прикрепившиеся макрофаги нагружали зондом Fura-2/AM (10 мкМ, Molecular Probes, USA) стекла с клетками монтировали в проточной камере (RC-30HV, Warner Instruments, USA) на предметном столе системы для ратиометрической регистрации флуоресценции клеток (Caim Research Ltd., UK). Измерение $[Ca^{2+}]_i$ в клетках осуществлялось инструментальными средствами программы AQM Advance 6 (Kinetic Imaging Ltd., UK).

Иммуноцитохимическое исследование перитонеальных макрофагов. Перитонеальные макрофаги мыши (адгезированные на покровных стеклах или суспензированные в ФСБР) фиксировали путем добавления по каплям холодного 100%-ного метанола в течение 5 мин при интенсивном встряхивании, трижды промывали ФСБР и блокировали неспецифическое связывание 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой в ФСБР, содержащей 0,2% Triton X-100, при комнатной температуре. После промывки в ФСБР клетки инкубировали с первичными антителами в 5%-ной сыворотке в ФСБР 18 ч при 4°C, а затем с конъюгированными с флуорохромами вторичными антителами согласно протоколам производителей. Для выявления F4/80 и CD14 маркеров использовали первичные антитела (BioLegend Ltd., США); для выявления пуриновых рецепторов P2X1 (Abcam, Великобритания), P2X4 или P2X7 (Biorbyt Ltd., Великобритания); FITC- или TRITC-конъюгированные вторичные антитела (BioLegend Ltd., США; Abcam, Великобритания). Флуоресцентное изображение монослоя клеток получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM510 META (Zeiss, Германия). Суспензию перитонеальных макрофагов помещали в проточный цитофлуориметр FACScalibur (Becton-Dickinson, США). Оценку результатов проводили с помощью программного обеспечения LSM510 Release 3.5 (Zeiss, Германия), BD CellQuest Pro (Becton-Dickinson, США) и WinMDI 2.9 (США) соответственно.

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние кукумариозидов A_2-2 на функционирование пуриновых рецепторов в макрофагах

В настоящее время очевидно, что АТФ (и некоторые другие нуклеотиды) могут выполнять роль нейротрансмиттеров и модуляторов клеточных сигналов во многих типах клеток и периферических тканях. Было установлено, что физиологические эффекты внеклеточной АТФ реализуются посредством специфических рецепторов, получивших название пуринорецепторы. Агонистами этих рецепторов являются не только пуриновые, но и пиримидиновые нуклеотиды. Мембрано-ассоциированные пуриновые рецепторы P2X семейства по механизму реализации своего эффекта являются лиганд-оперирующими ионными каналами, регулирующими, главным образом, вход Ca^{2+} в клетки, тогда как P2Y рецепторы имеют G-протеин-опосредованный механизм [4, 7].

В нашей работе изучалась возможность участия пуриновых рецепторов P2X семейства в активации транспорта Ca^{2+} и стимуляции перитонеальных мышечных макрофагов кукумариозидом A_2-2 . В ходе наших исследований было показано, что добавление АТФ к монослою перитонеальных макрофагов в микромолярных концентрациях (10-100 мкМ) вызывает резкое обратимое увеличение концентрации цитоплазматического кальция в клетках (Рис. 1, Б). Было установлено, что наблюдается определенная схожесть в действии на макрофаги кукумариозидов A_2-2 и АТФ: одинаковая амплитуда и временной диапазон длительности пика (Рис. 1), а также одинаковое количество отвечающих на индукторы клеток, составляющее примерно 20%-25% от общего числа регистрируемых клеток.

Хорошо известно, что АТФ вызывает вход Ca^{2+} в цитоплазму перитонеальных макрофагов мыши из внешней среды благодаря избирательному взаимодействию с пуриновыми рецепторами семейства P2X, локализованными в мембранах [9]. Предполагается, что перитонеальные макрофаги мыши содержат ограниченный набор пуриновых рецепторов P2X семейства: P2X1, P2X4 и, возможно, P2X7 [9]. Чтобы определить, какие именно P2X рецепторы участвуют в Ca^{2+} ответе макрофагов на действие гликозида, мы использовали ряд относительно селективных блокаторов P2X рецепторов: сурамин (P2X1); PPADS (P2X1); феноловый красный (P2X1); фенолфталеин (P2X4); бриллиантовый голубой G-250 (P2X4, P2X7) и KN-62 (P2X7) (Sigma-RBI eHandbook).

Результаты экспериментов по регистрации Ca^{2+} ответа макрофагов на добавление кукумариозидов A_2-2 после предварительного инкубирования клеток с блокаторами представлены на рис. 2, А. Из приведенных

результатов видно, что наиболее эффективными являются фенолфталеин (наиболее селективен к P2X4 рецепторам) и ВВГ (наиболее селективен к P2X4 и P2X7 рецепторам), в микромолярных концентрациях ингибирующего стимулирующего действие кукумариозида A₂-2 на 100% и 50% соответственно. В то же время, использование блокаторов P2X1 рецепторов, таких как

сурамин и PPADS, не приводило к статистически значимому блокированию, а при использовании фенолового красного наблюдалось лишь незначительное (порядка 30%) ингибирование входа Ca²⁺ в клетки. Применение соединения KN-62, высоко селективного блокатора P2X7 рецепторов, также не привело к значимым изменениям в динамике транспорта Ca²⁺.

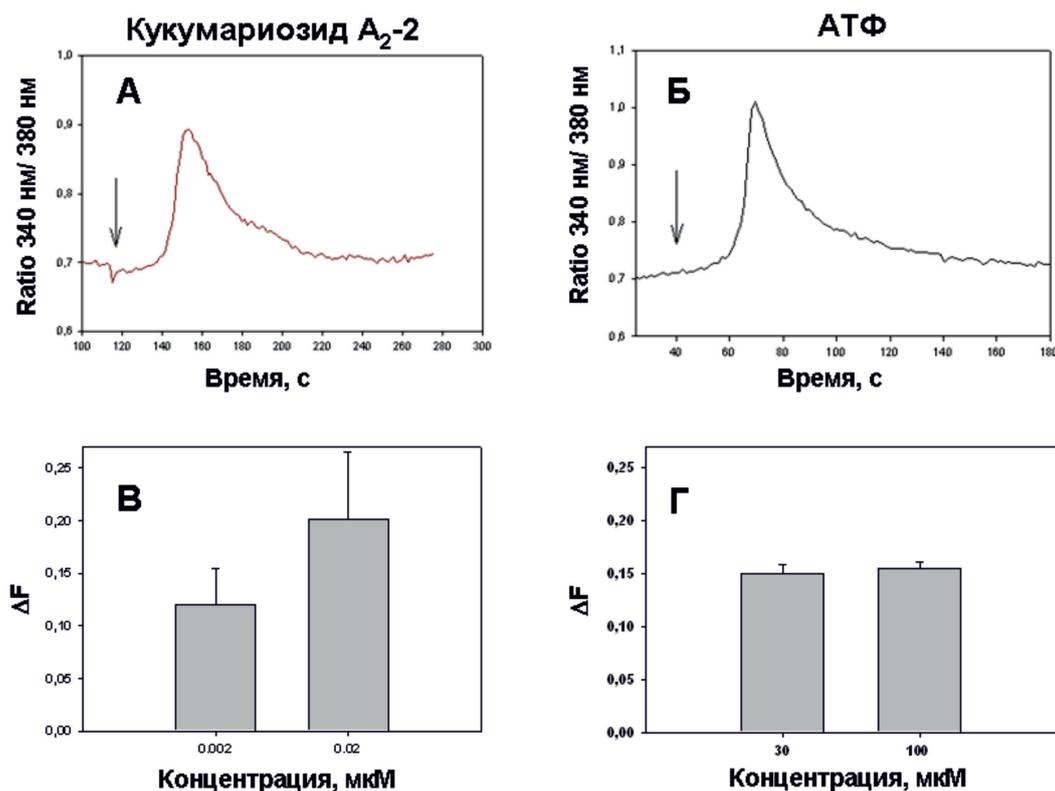


Рис. 1. Влияние кукумариозида A₂-2 и АТФ на динамику изменения Ca²⁺ ответа перитонеальных макрофагов мыши, нагруженных зондом Fura-2/AM. Изменение продолжительности (А, Б) и амплитуды (В, Г) Ca²⁺ ответа клеток (ΔF) под воздействием индукторов. Стрелки указывают время введения индукторов. Данные представлены как $m \pm sd$

Фермент апираза (аденозиндифосфатаза) способен расщеплять АТФ путем отщепления остатков фосфорной кислоты и тем самым удалять АТФ из инкубационной среды. В процессе выделения и получения первичной культуры клеток во внешней культуральной среде всегда присутствует незначительное количество АТФ вследствие механического разрушения части клеток при манипуляциях с ними, а также за счет выброса АТФ из клеток по нелитическому механизму (например, через каналы типа Pannexin 1) [6]. Установлено, что культура перитонеальных макрофагов постоянно содержит АТФ во внешней среде в диапазоне концентраций 0,1–10,0 нМ [3]. В наших экспериментах предварительная

обработка культуры макрофагов апиразой в концентрации 20 ед/мл в течение 3 ч, приводящая к полному устранению АТФ из инкубационной среды, ингибировала активирующее влияние кукумариозида A₂-2 на вход Ca²⁺ в макрофаги практически на 100% (Рис. 2, А).

Семь пуриновых рецепторов P2X семейства (P2X1-P2X7) ранее были обнаружены в теплокровных животных, а мРНК для P2X1, P2X4 и P2X7 рецепторов были идентифицированы в клетках иммунной системы, таких как моноциты, макрофаги и микроглия головного мозга [7]. В перитонеальных макрофагах мыши эти рецепторы воспринимают внешние сигналы, опосредованные внеклеточным АТФ, и принима-

ют участие в модуляции клеточной активности с участием входящих в цитоплазму ионов кальция, высвобождением различных цитокинов, в фагоцитозе, в процессах хемотаксиса и формировании воспаления, а также в инициации апоптоза. В настоящий момент роли пуриновых рецепторов

в формировании иммунного ответа клеток в ответ на разнообразные стимулы придает-ся большое значение, а поиски новых агонистов и антагонистов пуриновых рецепторов могут привести к созданию новых препаратов, эффективных в лечении различных заболеваний иммунной системы [5, 10].

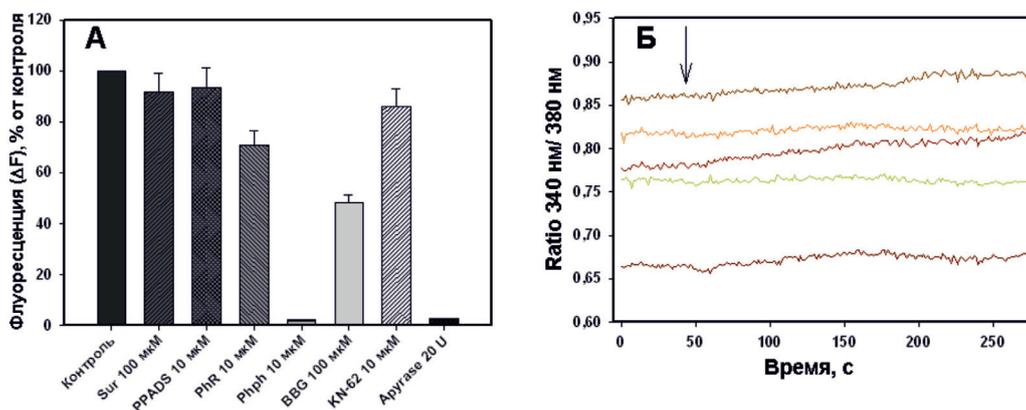


Рис. 2. А – влияние блокаторов пуриновых рецепторов и фермента апиразы на вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги мыши линии Balb/c. Данные представлены как $m \pm sd$. Б – изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} после применения кукумериозида A_2-2 в концентрации 2 мкМ в присутствии фермента апиразы. Сокращения: Sur – сурамин; PhR – феноловый красящий; Phrh – фенолфталеин; BBG – бриллиантовый голубой G-250; apyrase – апираза

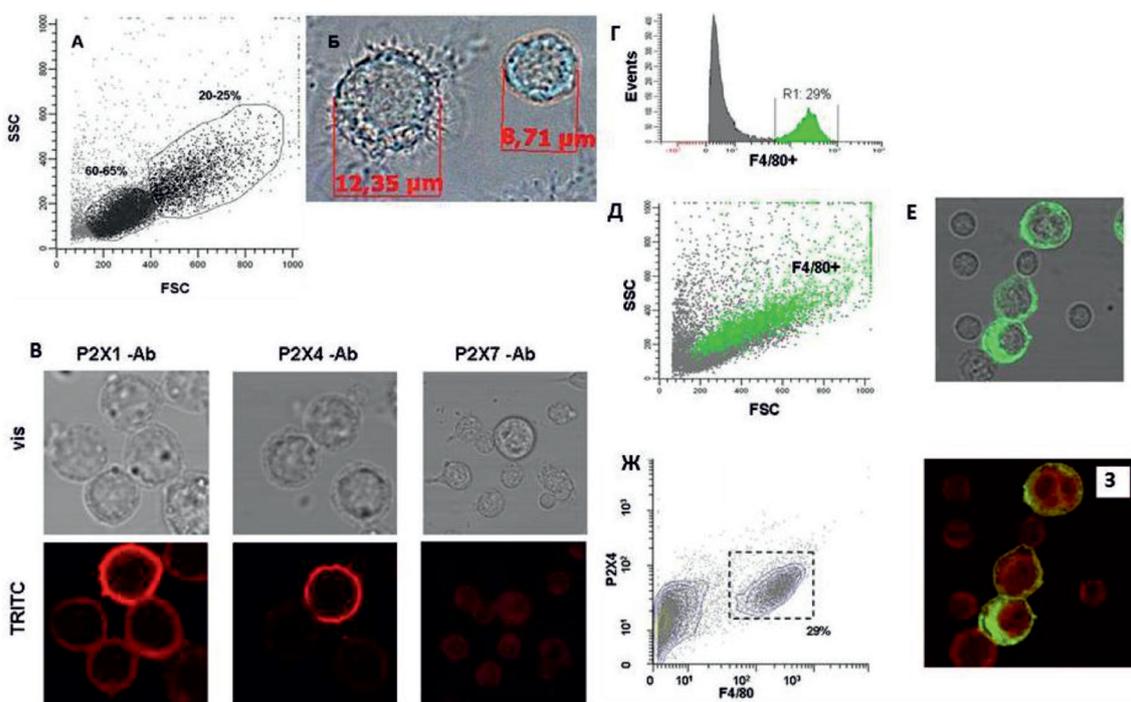


Рис. 3. Определение геометрических размеров клеток в популяции перитонеальных макрофагов мыши линии BALB/c методами А – проточной цитофлуориметрии и Б – микроскопии. В – локализация пуриновых рецепторов P2X типа на поверхности перитонеальных макрофагов методом иммуноцитохимии и последующей конфокальной микроскопии. Определение количества F4/80+ клеток (зрелые макрофаги) в популяции перитонеальных макрофагов мыши Г, Д – методом проточной цитофлуориметрии и Е – конфокальной микроскопии, и колокализация P2X4+ / F4/80+ клеток установленная методами Ж – проточной цитофлуориметрии и З – конфокальной микроскопии

В данной серии экспериментов нами было показано, что одними из наиболее вероятных молекулярных мишеней действия кукумариозида A_2-2 могут быть пуриnergические рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X1 и P2X4 типа). Взаимодействие кукумариозида A_2-2 с этими рецепторами может приводить к активации входа Ca^{2+} в клетки и временному увеличению $[Ca^{2+}]_i$, а применение определенных селективных блокаторов этих рецепторов ингибирует процесс активации кальциевого транспорта. Полное отсутствие влияния гликозида на вход ионов кальция в культуре макрофагов, предварительно инкубированных с апиразой, свидетельствует о необходимости и важности присутствия АТФ для проявления стимулирующего эффекта кукумариозида A_2-2 . Это указывает на то, что гликозид не является непосредственным агонистом пуриновых рецепторов макрофагов, но может выступать в качестве аллостерического модулятора, проявляющего свой стимулирующий эффект в присутствии незначительных количеств специфического лиганда – АТФ.

Типирование популяции перитонеальных макрофагов мыши, принимающих участие в Ca^{2+} ответе на кукумариозид A_2-2

Обнаружено, что популяция перитонеальных макрофагов мыши не однородна и состоит как минимум из двух субпопуляций клеток, различающихся по размеру и гранулированности (маленькие макрофаги с размером $7,13 \pm 0,88$ мкм и крупные макрофаги $12,77 \pm 2,20$ мкм в диаметре) (Рис. 3, А-Б). Только субпопуляция крупных зрелых макрофагов окрашивается антителами к F4/80 (Рис. 3, Е). CD14+ моноциты/макрофаги в культуре не выявлены. На поверхности макрофагов всех субпопуляций выявлены пуриновые рецепторы P2X1 и P2X4 типа, в то время как рецепторы P2X7 типа обнаруживаются в незначительных количествах (Рис. 3, В). Установлено, что плотность пуриновых рецепторов варьирует: выявляются макрофаги (порядка 25–35%) с повышенной плотностью пуриновых рецепторов, локализованных на F4/80+ макрофагах. Не исключено, что именно такие макрофаги принимают участие в Ca^{2+} -ответе на аппликацию кукумариозида A_2-2 (Рис. 3, Ж, З).

Закключение

Таким образом, нами было показано, что кукумариозид A_2-2 в субтоксических иммуномодулирующих концентрациях способен активировать резкий и обратимый вход

ионов кальция в клетки из внеклеточного пространства. Мембранными мишеней действия гликозида являются пуриновые рецепторы P2X семейства (P2X1 и P2X4 типы), обеспечивающие Ca^{2+} -проводимость в мембране макрофагов. Иммуномодулирующее действие кукумариозида A_2-2 , вероятнее всего, связано с тем, что кукумариозид A_2-2 действует в качестве аллостерического модулятора пуриновых рецепторов, связываясь с ними, усиливая ответ клеток на АТФ.

В перитонеальной полости мыши присутствует как минимум две субпопуляции макрофагов, различающиеся размерами, наличием маркеров зрелых макрофагов F4/80 и плотностью пуриновых рецепторов P2X1 и P2X4 типа. Очевидно, именно крупные F4/80+ / P2X+ положительные перитонеальные макрофаги с повышенной плотностью пуриновых рецепторов принимают участие в Ca^{2+} ответе на аппликацию кукумариозида A_2-2 .

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам ТИБОХ ДВО РАН д.х.н., в.н.с. Авилову С.А. и к.х.н., н.с. Сильченко А.С. за любезное предоставление кукумариозида A_2-2 . Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-31435 мол.а. Часть работы, связанной с типированием перитонеальных макрофагов, была выполнена при поддержке гранта РНФ №14-25-00037.

Список литературы

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. – М.: Мир. 1983. – 264 с.
2. Aminin D.L., Koy C., Dmitrenok P.S., Müller-Hilke B., Koczan D., Arbogast B., Silchenko A.A., Kalinin V.I., Avilov S.A., Stonik V.A., Collin P.D., Thiesen H.J., Deinzer M.L., Glocker M.O. // Journal of Proteomics. – 2009. Vol. 72, № 5. – P. 886–906.
3. Beigi R.D., Dubyak G.R. Endotoxin activation of macrophages does not induce ATP release and autocrine stimulation of P2 nucleotide receptors // Journal of Immunology. – 2000. Vol. 165, № 12. – P. 7189–7198.
4. Burnstock G., Williams M. P2 purinergic receptors: Modulation of cell function and therapeutic potential // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2000. Vol. 295, № 3. – P. 862–869.
5. Di Virgilio F., Chiozzi P., Ferrari D., Falzoni S., Sanz J.M., Morelli A., Torboli M., Bolognesi G., Baricordi O.R. Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells // Blood. – 2001. Vol. 97, № 3. – P. 587–600.
6. Locovei S., Bao L., Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: Function without a gap // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2006. Vol. 103, № 20. – P. 7655–7659.
7. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors // Physiological reviews. – 2002. Vol. 82, № 4. – P. 1013–1067.
8. Pisyagin E.A., Gladkikh R.V., Kapustina I.I., Kim N.Y., Shevchenko V.P., Nagaev I.Y., Avilov S.A., Aminin D.L. Interaction of holothurian triterpene glycoside with biomembranes of mouse immune cells // Int Immunopharmacol. – 2012. Vol. 14, № 1. – P. 1–8.
9. Sim J.A., Park C.K., Oh S.B., Evans R.J., North R.A. P2X1 and P2X4 receptor currents in mouse macrophages // British Journal of Pharmacology. – 2007. Vol. 152, № 8. – P. 1283–1290.
10. Surprenant A., North R.A. Signaling at Purinergic P2X Receptors // Annual Review of Physiology – 2009. Vol. 71. – P. 333–359.