

О молекулярной природе различий в реакции сенсорных нейронов и фибробластов на убаин

© М.М. Халисов,¹ В.А. Пеннийнен,¹ С.А. Подзорова,¹ А.В. Анкудинов,^{2,¶} К.И. Тимошук,¹ Б.В. Крылов¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
19034 Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

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

Поступило в Редакцию 18 сентября 2020 г.

В окончательной редакции 19 ноября 2020 г.

Принято к публикации 10 декабря 2020 г.

Методом атомно-силовой микроскопии в физиологически адекватных условиях исследовали влияние убаина на механические характеристики первичных сенсорных нейронов и фибробластов 10–12-дневных куриных эмбрионов. Фибробласты экспрессируют только $\alpha 1$ -изоформу Na,K-АТФазы, а сенсорные нейроны $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформы. Было обнаружено, что действие убаина в концентрации, соответствующей эндогенному значению, приводит к увеличению жесткости мембраны сенсорных нейронов, что обусловлено, по-видимому, активацией не насосной, а трансдукторной функции Na,K-АТФазы. Действие убаина в эндогенной концентрации не приводило к изменению механических характеристик фибробластов. Полученные результаты позволяют предположить, что эндогенный убаин модулирует трансдукторную функцию именно $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы мембраны сенсорных нейронов. Таким образом, метод атомно-силовой микроскопии позволил провести сравнительное исследование внутриклеточных сигнальных каскадов в живых клетках.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, сенсорные нейроны, фибробласты, убаин, Na,K-АТФаза.

DOI: 10.21883/JTF.2021.05.50704.272-20

Введение

Натрий-калиевая аденозинтрифосфатаза (Na,K-АТФаза) — это фермент, присутствующий в плазматической мембране большинства эукариотических клеток. Хорошо изучена насосная функция Na,K-АТФазы, заключающаяся в транспорте ионов калия в клетку и натрия из нее за счет гидролиза АТФ. Эта функция имеет решающее значение для создания трансмембранного градиента концентрации ионов натрия и калия, а также осмотического баланса и регуляции объема клеток [1–6]. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что помимо насосной, Na,K-АТФаза выполняет также трансдукторную функцию, выступая в качестве усилителя (трансдуктора) сигнала [7–9]. Взаимодействие кардиотонических стероидов (убаина, дигоксина, маринобуфагенина) в субнанолярных и нанолярных концентрациях, сходных с концентрациями, обнаруженными в плазме крови [10], с Na,K-АТФазой вызывает активацию различных сигнальных каскадов в кардиомиоцитах, эпителиальных клетках почек, нейронах и некоторых других типах клеток [8,9,11–14]. Эти каскады включают в себя активацию Src, фосфолипазы C, MAPK, Akt и т.п. [13]. Na,K-АТФаза–опосредованная сигнализация участвует во многих физиологических процессах, включая рост клеток, дифференцировку, апоптоз, воспаление, сократимость мышц и функцию почек [15–19]. В первичном сенсорном нейроне был обнаружен новый механизм мембранной сигнализации,

запускаемый убаином в концентрации, соответствующей его эндогенным значениям (эндогенный убаин (ЭУ)), функцию трансдуктора сигнала в котором выполняет Na,K-АТФаза [8,20,21]. ЭУ синтезируется в коре надпочечников и гипоталамусе [10,22]. В эндогенных концентрациях этот агент не может связываться с другими мишенями, кроме одной из изоформ Na,K-АТФазы. Остается неясным, какая из них вовлечена в этот процесс. Повышение уровня эндогенных кардиотонических стероидов приводит к возникновению патологических состояний, таких как артериальная гипертензия, почечная недостаточность, преэклампсия, фиброз и т.п. [5].

Na,K-АТФаза представляет собой гетеромерный трансмембранный белок, состоящий из незаменимых α - и β -субъединиц [23], а также необязательной третьей γ -субъединицы, экспрессия которых является тканеспецифичной [3,5,19,24]. Субъединицы α и β Na,K-АТФазы выполняют разные функции: α -субъединица содержит сайты связывания для Na^+ , K^+ , кардиотонических стероидов (убаина, дигаксина, маринобуфагенина) и АТФ, а β -субъединица необходима для образования α/β -комплекса и его встраивания в плазматическую мембрану. α -субъединица Na,K-АТФазы имеет четыре изоформы ($\alpha 1$ – $\alpha 4$), которые различаются паттернами экспрессии и функциональными свойствами. Уровни экспрессии изоформ зависят от различных факторов: стадии развития организма, типа клетки, вида ткани, действия определенных гормонов [3,19]. В некоторых клетках (фибробластах, адипоцитах, эритроцитах) присутствует

только $\alpha 1$ -изоформа [3,25]. В дополнение к $\alpha 1$ -изоформе, которая присутствует почти во всех клетках организма, другие три экспрессируются тканеспецифичным образом. $\alpha 2$ -изоформа в основном присутствует в скелетных мышцах, сердце и мозге, $\alpha 3$ -изоформа преобладает в нервной ткани, а $\alpha 4$ -изоформа была обнаружена в семенниках [3,5,18,19,26]. В нервной ткани $\alpha 1$ -изоформа экспрессируется как в нейронах, так и в глиальных клетках, $\alpha 2$ -изоформа в основном обнаруживается в астроцитах и олигодендроцитах, тогда как в нейронах в избытке присутствует $\alpha 3$ -изоформа [3,6,19]. В первичных нейронах спинальных ганглиев преимущественно экспрессируются $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы [27–29].

Тканеспецифичное распределение комплексов α/β и $\alpha/\beta/\gamma$ указывает на то, что каждая комбинация обладает уникальными клеточными функциями и, по-видимому, находится под контролем специфических для клетки регуляторных механизмов [3,5,13,19].

Известно, что изоформы α -субъединиц Na,K-АТФазы различаются чувствительностью к специфическому ингибитору убаину [3,30]. Например, у грызунов $\alpha 1$ -изоформа примерно на 2–3 порядка менее чувствительна к данной субстанции (константа диссоциации ~ 50 – $450 \mu\text{M}$), чем $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы.

Различные внешние воздействия могут влиять на сложные физиологические внутриклеточные процессы, приводя к изменению физико-химических характеристик клеток. Одним из индикаторов состояния клетки служат ее механические свойства. Используя такие механические параметры, как жесткость, модуль Юнга, величина деформации, можно исследовать клеточную реакцию в ответ на внешние воздействия, в частности на убаин [31,32]. Взаимодействие ЭУ с Na,K-АТФазой может приводить к активации различных сигнальных каскадов, что, в свою очередь, может оказывать влияние и на механические свойства клетки.

Одним из методов количественного изучения механических свойств клеток является атомно-силовая микроскопия (АСМ). В основе данного метода исследования поверхности лежит силовое взаимодействие между нанометрово-острым зондом и образцом. АСМ позволяет исследовать нативные клетки в физиологически адекватных условиях, обеспечивает прецизионный контроль силы и, как следствие, неразрушающее воздействие на клетку, дает возможность картировать механические характеристики клеток с высоким пространственным разрешением. Вследствие этих особенностей АСМ зарекомендовала себя как эффективный инструмент для изучения механических свойств живых клеток [31–33].

Ранее с помощью АСМ было обнаружено, что первичные сенсорные нейроны демонстрируют тенденцию к увеличению жесткости мембраны под воздействием ЭУ [34,35]. В литературе отсутствуют данные о влиянии ЭУ на модуль Юнга других типов клеток. Первичные сенсорные нейроны экспрессируют $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы. Учитывая имеющиеся свидетельства о различной чувствительности к убаину разных изоформ

Na,K-АТФазы, можно предположить, что реакция фибробластов, экспрессирующих только $\alpha 1$ -изоформу, на воздействие ЭУ будет отлична от реакции нейронов. Настоящая работа посвящена сравнительному АСМ-исследованию механических характеристик двух типов клеток, различающихся по экспрессируемым изоформам α -субъединиц Na,K-АТФазы, с целью прояснения молекулярных механизмов ответа сенсорных нейронов и фибробластов на ЭУ.

1. Методы исследования

В настоящей работе использовался атомно-силовой микроскоп BioScope Catalyst (Bruker, США). Он оптимизирован для изучения биологических объектов — совмещен с инвертированным оптическим микроскопом Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), оснащен нагревательным элементом под управлением термоконтроллера 335-й модели (Lake Shore Cryotronics, США) для поддержания физиологически адекватной температуры объекта исследования. Кроме того, помимо стандартных статического (контактного) и динамического (прерывисто-контактного) режимов работы в данном атомно-силовом микроскопе реализован новый квазистатический режим PeakForce QNM, который хорошо подходит для исследования нативных клеток, поскольку зонд в этом режиме оказывает наиболее щадящее воздействие на их поверхность. Это достигается, с одной стороны, за счет того, что работа механизма обратной связи в данном режиме основана на непосредственном контроле нормальной силы воздействия на образец, а с другой стороны — на особенности алгоритма движения зонда, заключающейся в отскоке зонда от образца на заданное расстояние после их кратковременного контактного взаимодействия. Последнее позволяет снизить вред от разрушительной для нативных клеток латеральной компоненты силы. В PeakForce QNM зонд поточно индентирует (продавливает) поверхность образца; производимый прямо во время сканирования анализ зависимостей силы от расстояния зонд–образец, силовых кривых, регистрируемых в каждой точке индентации, позволяет изучать механические характеристики клеток, картируя такие параметры как кажущийся модуль Юнга, амплитуда деформации. Подробную информацию о принципах изучения механических характеристик нативных клеток посредством АСМ можно, например, найти в работах [36–39].

Методики выделения и подготовки нативных фибробластов сердца и сенсорных нейронов 10–12-дневных куриных эмбрионов к АСМ-исследованию подробно описаны в предыдущих работах [40,41] соответственно. АСМ-сканирование клеток осуществлялось прямо в 40 mm пластиковых чашках Петри с питательной средой при постоянной температуре $\approx 37^\circ\text{C}$. Клетки культивировали в питательной среде следующего состава: 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла, 10% фетальной сы-

воротки коровы, 0.5 U/ml инсулина, 0.6% глюкозы, 2 mM глутамина и 100 U/ml гентамицина. Для более надежной иммобилизации объектов исследования чашки Петри заранее обрабатывали веществами, усиливающими адгезию клеток к подложке: коллагеном для фибробластов и поли-L-лизинном для сенсорных нейронов. Уабаин добавляли в культуральную среду к сенсорным нейронам за 72 h до исследования в концентрации 10^{-10} M и фибробластам — в концентрациях 10^{-10} , 10^{-8} и 10^{-7} M. Контрольные клетки культивировались в стандартной питательной среде.

Перед исследованием клеток каждый зондовый датчик подвергался калибровке: сначала измерялась чувствительность кантилевера к отклонению на сапфировом образце из стандартного тестового набора для режима PeakForce QNM PFQNM-SMPKIT-12M (Bruker, США), затем по методу тепловых шумов определялась константа жесткости кантилевера. После помещения зонда в питательную среду — чашку Петри с клетками, производилось повторное измерение чувствительности к отклонению на чистом, свободном от клеток, участке подложки. Это позволяло проконтролировать правильность переюстировки системы регистрации отклонений кантилевера и убедиться, что после погружения в питательную среду к зонду не прикрепилась фрагменты клеток.

Ниже приведены модели АСМ-зондов и параметры сканирования в режиме PeakForce QNM, с которыми осуществлялось изучение влияния уабаина на механические характеристики клеток.

Сенсорные нейроны + уабаин 10^{-10} M: модель зонда — SNL-(D) (Bruker, США), пиковая сила — 1 nN, частота и амплитуда вертикального движения зонда соответственно — 250 Hz и 1000 nm, частота строчной развертки — 0.1 Hz, АСМ-кадр — 512 или 1024×128 .

Фибробласты + уабаин 10^{-10} M: SNL-(D), пиковая сила — 3 nN, частота и амплитуда вертикального движения зонда соответственно — 250 Hz и 500 nm, частота строчной развертки — 0.1 Hz, АСМ-кадр — 1024×128 точек.

Фибробласты + уабаин 10^{-8} M: SNL-(D), пиковая сила — 3 nN, частота и амплитуда вертикального движения зонда соответственно — 250 Hz и 1000 nm, частота строчной развертки — 0.1 Hz, АСМ-кадр — 512×128 точек.

Фибробласты + уабаин 10^{-7} M: модель зонда — CSG10 (HT-МДТ СИ, Россия), пиковая сила — 3 nN, частота и амплитуда вертикального движения зонда соответственно — 250 Hz и 1000 nm, частота строчной развертки — 0.15 Hz, АСМ-кадр — 128×128 точек.

Механические свойства клеток характеризовали с помощью величины кажущегося модуля Юнга. Значение данного параметра определялось автоматически в каждой точке индентации по модели Снеддона, согласно которой форма зонда аппроксимируется конусом [42]. Полученные АСМ-карты распределения кажущегося модуля Юнга по поверхности клеток обрабатывали с

помощью программ для анализа АСМ-изображений Bruker NanoScope Analysis версий 1.40 и 1.80, а также Gwyddion 2.55 [43]. В случае фибробластов определяли среднее значение модуля Юнга по всей поверхности клетки, попавшей в АСМ-кадр, за исключением краевых областей, где толщина исследуемого объекта минимальна и может составлять всего несколько сотен нанометров. Затем, используя средние значения модуля Юнга каждого фибробласта, производили расчет средних величин данного параметра в контрольной группе клеток и группе после воздействия уабаина в разных концентрациях. В различных сериях экспериментов модели зондов и параметры сканирования не были одинаковы. В связи с этим сравнение средних значений модуля Юнга для группы фибробластов после воздействия уабаина в данной концентрации производилось с соответствующими значениями группы контрольных клеток, АСМ-сканирование которых осуществлялось зондами той же модели и с идентичными параметрами сканирования. В случае первичных сенсорных нейронов средние значения модуля Юнга определялись по всей площади сомы клетки (граничные области сомы с крутыми склонами клетки исключались из анализа). Далее аналогично фибробластам вычислялись, а затем сравнивались между собой средние значения параметра для группы сенсорных нейронов, культивированных в присутствии ЭУ, и контрольной группы клеток.

Непараметрический статистический U -критерий Манна-Уитни применялся для оценки значимости различий между величинами модуля Юнга в экспериментальной и контрольной группах клеток (при $p < 0.05$ различия считались значимыми).

2. Результаты и обсуждение

Сенсорные нейроны и фибробласты для изучения с помощью атомно-силового микроскопа отбирали, используя инвертированный оптический микроскоп. АСМ-сканированию подвергали лишь надежно иммобилизованные на подложке интактные клетки без видимых загрязнений плазматической мембраны. Посредством светового микроскопа визуально состояние клеток контролировали на протяжении всего АСМ-эксперимента.

Фибробласты распластываются по подложке и, как следствие, имеют пологие склоны. При этом за исключением краевой области их толщина позволяет соблюдать условие максимального соотношения величины деформации к толщине клетки, при котором вкладом твердой подложки в результаты измерения механических характеристик можно пренебречь [36]. Кроме того, фибробласты, как правило, обладают развитым цитоскелетом, и легко выдерживают механическое воздействие со стороны АСМ-зонда, не повреждаясь. Все это делает фибробласты удобным объектом для изучения с помощью АСМ. В отличие от фибробластов сенсорные нейроны представляют собой не столь простой объект

Таблица 1. Результаты измерения модуля Юнга контрольных сенсорных нейронов и клеток после воздействия ЭУ

| Контрольные нейроны | | | | Нейроны при воздействии ЭУ 10^{-10} М | |
|------------------------------|----------------|----------|-----------------|---|----------------|
| № клетки | E_{cp} , кПа | № клетки | E_{cp} , кПа | № клетки | E_{cp} , кПа |
| 1 | 34 | 9 | 35 | 1 | 77 |
| 2 | 70 | 10 | 81 | 2 | 154 |
| 3 | 72 | 11 | 219 | 3 | 72 |
| 4 | 70 | 12 | 27 | 4 | 286 |
| 5 | 55 | 13 | 37 | 5 | 284 |
| 6 | 112 | 14 | 155 | 6 | 296 |
| 7 | 111 | 15 | 108 | 7 | 221 |
| 8 | 36 | | | 8 | 314 |
| Среднее значение модуля Юнга | | | 80 ± 50 кПа | 210 ± 100 кПа | |

Примечание. E_{cp} — средний кажущийся модуль Юнга сомы каждого сенсорного нейрона.

для исследования, поскольку имеют выпуклую веретенообразную форму и крутые склоны, поэтому во время АСМ-сканирования их легче повредить или открепить от подложки. Следует отметить, что эти геометрические особенности сенсорных нейронов приводят также к ошибочным измерениям механических характеристик на границах клеток, так как механизм обратной связи не всегда успевает достаточно быстро среагировать на резкое изменение высоты сканируемого объекта по отношению к уровню гладкой подложки. Кроме того, наличие толстых пучков актиновых микрофиламентов, стресс-фибрилл, часто в большом количестве встречающихся в фибробластах, не характерно для нейронов [44], что делает нейроны более чувствительными к механическому повреждению. С учетом вышесказанного в настоящей работе при АСМ-сканировании сенсорных нейронов частота строчной развертки и пиковая сила взаимодействия зонд–клетка были минимизированы.

Механическое воздействие нанометрово-острого АСМ-зонда в течение приблизительно 15–20 min (время, затрачиваемое на получение одного кадра АСМ-изображения) в большинстве случаев не приводило к повреждению плазматической мембраны сенсорных нейронов и фибробластов и не вызывало видимых изменений их механических свойств. В редких случаях, когда клетка все же повреждалась, это происходило с сенсорными нейронами, данные исключались из дальнейшего анализа.

В табл. 1 приведены данные, демонстрирующие результаты АСМ-индентирования сенсорных нейронов после воздействия ЭУ в концентрации 10^{-10} М и контрольных клеток. Сравнение значений модуля Юнга показывает, что величина параметра в среднем почти в три раза выше у экспериментальных нейронов, чем у контрольных. Таким образом, зарегистрировано достоверное увеличение жесткости поверхности сенсорных нейронов после действия ЭУ (U -критерий, $p < 0.05$). Известно, что в сенсорных нейронах экспрессируются $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы [27,29,45–47]. $\alpha 3$ -изоформа Na,K-АТФазы более чувствительна к ЭУ,

чем $\alpha 1$ [3,30,48]. Таким образом, обнаруженное нами увеличение жесткости мембраны сенсорного нейрона при действии ЭУ позволяет предположить, что данный эффект связан с активацией трансдукторной функции $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы.

Несмотря на то что ЭУ (10^{-10} М) приводил к достоверному росту жесткости мембраны сенсорных нейронов, при исследовании воздействия ЭУ в той же концентрации не было обнаружено его влияния на механические свойства фибробластов. Интересно, что в более высоких концентрациях убаина (10^{-8} и 10^{-7} М) также не влиял на механические свойства фибробластов.

Данные, полученные в результате АСМ-индентирования фибробластов, сведены в табл. 2. Видно, что значения модуля Юнга у клеток, культивированных в присутствии убаина, и у контрольных клеток различаются слабо.

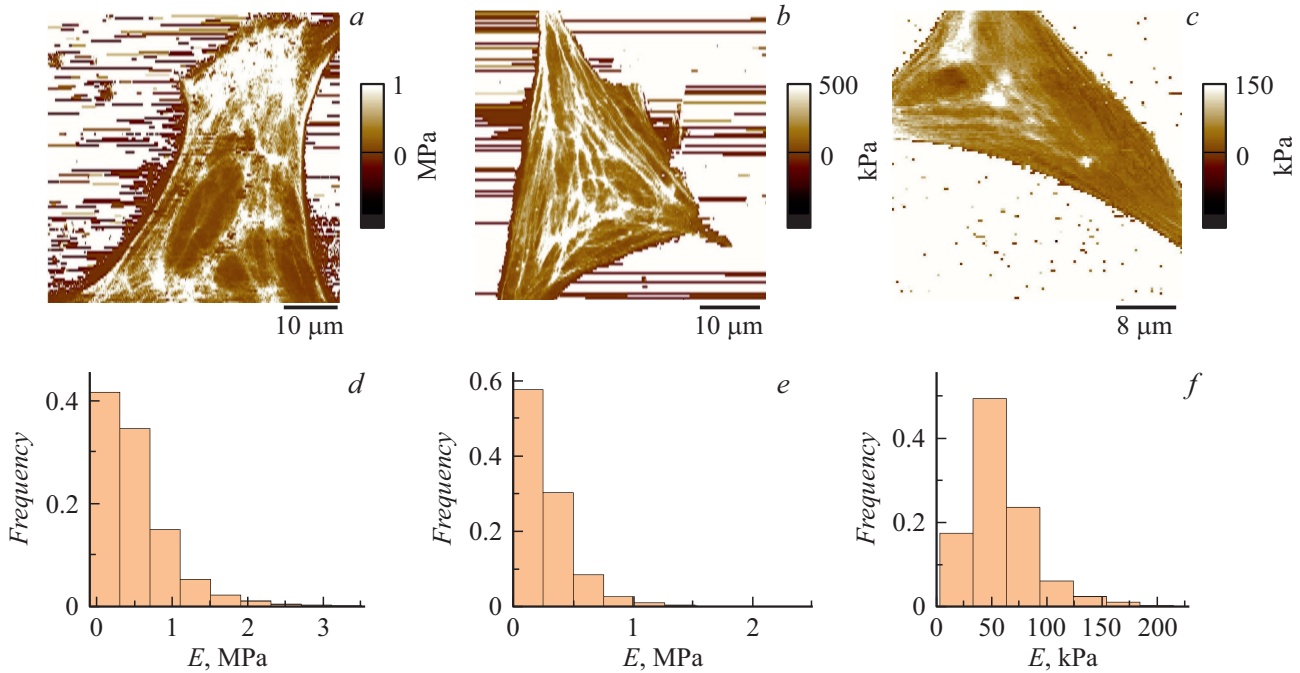
Пример АСМ-данных с контрольными фибробластами из экспериментов по исследованию действия на клетки убаина в разных концентрациях приведен на рисунке.

В сериях экспериментов с разной концентрацией убаина наблюдалась значительная разница в величинах модуля Юнга у фибробластов. Такое расхождение могло быть вызвано следующими причинами. Известно, что механические свойства клеток зависят от скорости воздействия [49,50]. Так, в экспериментах с наименьшей концентрацией исследуемого вещества (10^{-10} М) АСМ-индентирование проводилось с более высокой скоростью относительно остальных случаев из-за меньшей выбранной амплитуды вертикального движения зонда — 500 nm — против 1000 nm в других экспериментах. Различие между значениями модуля Юнга в экспериментах с двумя другими концентрациями убаина можно связать с тем, что в них для АСМ-индентирования фибробластов применялись разные модели зондов с неодинаковыми величинами отношения высоты зонда к длине консоли кантилевера. Ранее в работе [41] подобный результат зависимости кажущегося модуля Юнга сенсорных нейронов от отношения высоты зонда к длине консоли кантилевера был объяснен тем, что рост этого отношения

Таблица 2. Результаты измерения модуля Юнга контрольных фибробластов и клеток после воздействия убаина в разных концентрациях

| Концентрация убаина | 10^{-10} М | 10^{-8} М | 10^{-7} М |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Контроль | 480 ± 100 kPa ($n = 6$) | 230 ± 220 kPa ($n = 13$) | 70 ± 50 kPa ($n = 29$) |
| Убаин | 460 ± 230 kPa ($n = 6$) | 290 ± 240 kPa ($n = 13$) | 70 ± 70 kPa ($n = 36$) |
| p (U -критерий) | 0.70 | 0.58 | 0.48 |

Примечание. n — число изученных клеток.



АСМ-карты модуля Юнга контрольных фибробластов из экспериментов с концентрацией убаина: a — 10^{-10} , b — 10^{-8} , c — 10^{-7} М; $d-f$ — распределения модуля Юнга (E) по поверхности фибробластов ($a-c$) соответственно.

способствует заземлению кончика зонда на поверхности образца, что приводит к аномальному прогибу кантилевера с вытекающим из этого ошибочным определением механических характеристик клетки.

Несмотря на различия в абсолютных значениях кажущегося модуля Юнга в экспериментах с разной концентрацией убаина, в рамках эксперимента с одной и той же концентрацией всегда использовались одинаковые модели зондов и неизменные параметры АСМ-сканирования. Это обеспечивало надежность полученных результатов при сравнении механических характеристик фибробластов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что ни одна исследованная концентрация убаина не влияла на механические свойства фибробластов. В отличие от этого нами ранее было показано, что вещество, действующее непосредственно на цитоскелет клеток, колхицин, вызывает рост жесткости фибробластов куриных эмбрионов и фибробластов крысы [51,52]. Отсутствие влияния ЭУ на механические свойства ис-

следуемых клеток может быть связано с тем, что фибробласты в отличие от сенсорных нейронов экспрессируют только убаин-резистентную $\alpha 1$ -изоформу Na,K-АТФазы [3,25]. При исследовании влияния ЭУ на механические характеристики сенсорных нейронов, экспрессирующих не только $\alpha 1$ -, но и $\alpha 3$ -изоформу Na,K-АТФазы, было зарегистрировано увеличение жесткости мембраны исследованных клеток. Полученные экспериментальные данные позволяют предположить, что выявленное действие ЭУ на сенсорные нейроны может быть результатом активации трансдукторной функции $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы. Это предположение хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными, согласно которым убаин в значительно более высоких концентрациях может активировать трансдукторную функцию $\alpha 1$ -изоформы Na,K-АТФазы в разных клетках [53–55]. Uddin и соавторы показали, что в цитотрофобластах клеточной линии SGHPL-4 маринобуфагенин и убаин в концентрациях 10 и 100 пМ индуцируют активацию Jnk, p38 и Src, активируют каспазы 9 и 3/7,

и повышают секрецию IL-6, т.е. эти кардиотонические стероиды запускают апоптотический каскад [53]. Необходимо отметить, что после культивирования фибробластов с убаином апоптоз мы не наблюдали. Обработка фибробластов легких человека (W138) убаином в концентрации 10^{-6} М и выше значительно увеличивала уровень экспрессии мРНК ИЛ-6. Более низкие концентрации вещества (10^{-9} и 10^{-8} М) не вызывали такой реакции клеток [55]. По данным других исследований культивирование фибробластов сердца взрослой мыши с убаином в концентрации 10^{-5} М индуцировало активацию Erk1/2 и значительно увеличивало количество активной Src-киназы. Также убаин стимулировал синтез коллагена и пролиферацию фибробластов сердца. По мнению авторов, пролиферативный эффект может быть результатом комбинированного действия убаина, как на насосную, так и на трансдукторную функции $\alpha 1$ -изоформы Na,K-АТФазы [54]. Учитывая все вышесказанное и полученные нами экспериментальные данные, можно заключить, что убаин в столь низкой эндогенной концентрации (10^{-10} М) не влияет на механические характеристики фибробластов, поскольку эти клетки экспрессируют только убаин-резистентную $\alpha 1$ -изоформу Na,K-АТФазы. В то время как сенсорные нейроны, экспрессирующие также $\alpha 3$ -изоформу Na,K-АТФазы, под действием ЭУ изменяют свои механические свойства, по-видимому, за счет активации трансдукторной функции $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы.

Заключение

В последние годы в литературе широко обсуждается вопрос о роли трансдукторной функции Na,K-АТФазы в клетке [13,14,20,56]. Вероятно, действие убаина является не только ткане-, но и клеточно-специфичным. Это предположение подтверждают экспериментальные данные, полученные в настоящей работе. Исследуемые в работе клетки различаются паттернами экспрессии изоформ α -субъединицы Na,K-АТФазы. Сенсорные нейроны, экспрессирующие $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы [27–29], под действием ЭУ демонстрируют увеличение жесткости мембраны, а фибробласты, экспрессирующие лишь одну убаин-резистентную $\alpha 1$ -изоформу [3,25,30], не меняют механических характеристик под действием данного вещества. Полученные результаты позволяют предположить, что ЭУ активирует трансдукторную функцию $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы и приводит к изменению механических характеристик сенсорных нейронов в результате активации внутриклеточных каскадных процессов. Можно заключить, что метод АСМ позволяет изучать механизмы внутриклеточной сигнализации в живых клетках.

Финансирование работы

Работа сотрудников Института физиологии им. И.П. Павлова РАН выполнена при поддержке

Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-015-00079), а также программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 г. (ГП-14, раздел 64).

Соблюдение этических стандартов

Эксперименты были разработаны в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЭС). Местный комитет по уходу и использованию животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН утвердил все экспериментальные методики с животными, разрешение № 12/03 (20.04.2018).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] J.C. Skou. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **23** (11), 394 (1957).
- [2] J.C. Skou, M. Esmann. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24** (3), 249 (1992). DOI: 10.1007/BF00768846
- [3] G. Blanco, R.W. Mercer. *Am. J. Physiol.*, **275** (5), F633 (1998). DOI: 10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633
- [4] J.H. Kaplan. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 511 (2002). DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218
- [5] E. Silva, P. Soares-da-Silva. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **294**, 99 (2012). DOI: 10.1016/B978-0-12-394305-7.00002-1
- [6] M.V. Clausen, F. Hilbers, H. Poulsen. *Front Physiol.*, **8**, 371 (2017). DOI: 10.3389/fphys.2017.00371
- [7] P. Kometiani, J. Li, L. Gnudi, B.B. Kahn, A. Askari, Z. Xie. *J. Biol. Chem.*, **273** (24), 15249 (1998). DOI: 10.1074/jbc.273.24.15249
- [8] Б.В. Крылов, А.В. Дербенев, С.А. Подзорова, М.И. Людино, А.В. Кузьмин, Н.Л. Изварина. *Физиол. журн.*, **85** (2), 225 (1999). [B.V. Krylov, A.V. Derbenev, S.A. Podzorova, M. Liudyno, A.V. Kuz'min, N.L. Izvarina. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova*, **85** (2), 225 (1999).]
- [9] M. Haas, A. Askari, Z. Xie, *J. Biol. Chem.*, **275** (36), 27832 (2000). DOI: 10.1074/jbc.M002951200
- [10] J.M. Hamlyn, M.P. Blaustein, S. Bova, D.W. DuCharme, D.W. Harris, F. Mandel, W.R. Mathews, J.H. Ludens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88** (14), 6259 (1991). DOI: 10.1073/pnas.88.14.6259
- [11] S.J. Khundmiri, M.A. Metzler, M. Ameen, V. Amin, M.J. Rane, N.A. Delamere. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291** (6), C1247 (2006). DOI: 10.1152/ajpcell.00593.2005
- [12] V. Buckalew. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **297** (6), H1972 (2009). DOI: 10.1152/ajpheart.01002.2009
- [13] X. Cui, Z. Xie. *Molecules*, **22**, 990 (2017). DOI: 10.3390/molecules22060990
- [14] M.P. Blaustein. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **314** (1), C3 (2018). DOI: 10.1152/ajpcell.00196.2017
- [15] J. Li. *Na, K-ATPase as a Signaling Transducer* (Stockholm, 2007)
- [16] E.V. Lopatina, I.L. Yachnev, V.A. Penniyaynen, V.B. Plakhova, S.A. Podzorova, T.N. Shelykh, I.V. Rogachevsky, I.P. Butkevich, V.A. Mikhailenko, A.V. Kipenko, B.V. Krylov. *Medicinal Chem.*, **8** (1), 33 (2012). DOI: 10.2174/157340612799278531

- [17] F. Lai, N. Madan, Q. Ye, Q. Duan, Z. Li, S. Wang, S. Si, Z. Xie. *J. Biol. Chem.*, **288** (19), 13295 (2013). DOI: 10.1074/jbc.M113.467381
- [18] D. Lichtstein, A. Ilani, H. Rosen, N. Horesh, S.V. Singh, N. Buzaglo, A. Hodes. *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (8), 2314 (2018). DOI: 10.3390/ijms19082314
- [19] F.K. Khalaf, P. Dube, A. Mohamed, J. Tian, D. Malhotra, S.T. Haller, D.J. Kennedy. *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (9), 2576 (2018). DOI: 10.3390/ijms19092576
- [20] B.V. Krylov, I.V. Rogachevskii, T.N. Shelykh, V.B. Plakhova. *New Non-Opioid Analgesics: Understanding Molecular Mechanisms on the Basis of Patch-Clamp and Quantum-Chemical Studies* (Bentham Sci. Publ., Sharjah, 2017). DOI: 10.2174/97816080593001170101
- [21] V.A. Penniyaynen, V.B. Plakhova, I.V. Rogachevsky, S.G. Terekhin, S.A. Podzorova, B.V. Krylov. *Pathophysiology*, **26** (3–4), 245 (2019). DOI: 10.1016/j.pathophys.2019.06.003
- [22] Kawamura, J. Guo, Y. Itagaki, C. Bell, Y. Wang, G.T. Jr. Hauptert, S. Magil, R.T. Gallagher, N. Berova, K. Nakanishi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** (12), 6654 (1999). DOI: 10.1073/pnas.96.12.6654
- [23] J.B. Lingrel, T. Kuntzweiler. *J. Biol. Chem.*, **269** (31), 19659 (1994).
- [24] K. Geering. *J. Bioenerg Biomembr.*, **37** (6), 387 (2005). DOI: 10.1007/s10863-005-9476-x
- [25] J.L. Brodsky. *J. Biol. Chem.*, **265** (18), 10458 (1990).
- [26] R. Holm, M.S. Toustrup-Jensen, A.P. Einholm, V.R. Schack, J.P. Andersen, B. Vilsen. *Biochim. Biophys. Acta*, **1857** (11), 1807 (2016). DOI: 10.1016/j.bbap.2016.08.009
- [27] M. Mata, G.J. Siegel, V. Hieber, M.W. Beaty, D.J. Fink. *Brain Res.*, **546** (1), 47 (1991). DOI: 10.1016/0006-8993(91)91157-v
- [28] D. Romanovsky, A.E. Moseley, R.E. Mrak, M.D. Taylor, M. Dobretsov. *J. Comp. Neurol.*, **500** (6), 1106 (2007). DOI: 10.1002/cne.21218
- [29] D. Paul, R.D. Soignier, L. Minor, H. Tau, E. Songu-Mize, H.J. Gould 3rd. *J. Neurol. Sci.*, **340** (1–2), 139 (2014). DOI: 10.1016/j.jns.2014.03.012
- [30] A. Mobasheri, J. Avila, I. Cozar-Castellano, M.D. Brownleader, M. Trevan, M.J.O. Francis, J.F. Lamb, P. Martin-Vasallo. *Biosci. Reports.*, **20** (2), 51 (2000). DOI: 10.1023/a:1005580332144
- [31] M. Li, D. Dang, L. Liu, N. Xi, Y. Wang. *IEEE Trans Nanobioscience*, **16** (6), 523 (2017). DOI: 10.1109/TNB.2017.2714462
- [32] X. Deng, F. Xiong, X. Li, B. Xiang, Z. Li, X. Wu, C. Guo, X. Li, Y. Li, G. Li, W. Xiong, Z. Zeng. *J. Nanobiotechnology*, **16** (1), 102 (2018). DOI: 10.1186/s12951-018-0428-0
- [33] E. Spedden, C. Staii. *Int. J. Mol. Sci.*, **14** (8), 16124-40 (2013). DOI: 10.3390/ijms140816124
- [34] M.M. Khalisov, A.V. Ankudinov, V.A. Penniyaynen, D. Dobrota, B.V. Krylov. *Acta Physiol. Hung.*, **102** (2), 125 (2015). DOI: 10.1556/036.102.2015.2.2
- [35] M.M. Khalisov, A.V. Ankudinov, V.A. Penniyaynen, T.E. Timoshenko, K.I. Timoshchuk, M.V. Samsonov, V.P. Shirinsky. *IOP Conf. Series: Mater. Sci. Eng.*, **256** (012010), 1 (2017). DOI:10.1088/1757-899X/256/1/012010
- [36] T.G. Kuznetsova, M.N. Starodubtseva, N.I. Yegorenkov, S.A. Chizhik, R.I. Zhdanov. *Micron*, **38** (8), 824 (2007). DOI:10.1016/j.micron.2007.06.011
- [37] N. Gavara. *A. Microsc. Res. Tech.*, **80** (1), 75 (2017). DOI: 10.1002/jemt.22776
- [38] М.М. Халисов. Автореф. канд. дисс. (СПб НИУ ИТМО, СПб, 2018)
- [39] К.И. Тимошук. Автореф. канд. дисс. (СПб НИУ ИТМО, СПб, 2019)
- [40] М.М. Халисов, В.А. Пенниайнен, Н.А. Есикова, А.В. Анкудинов, Б.В. Крылов. *Письма в ЖТФ*, **43** (1), 89 (2017). DOI: 10.21883/PJTF.2017.01.44094.16394 [М.М. Khalisov, V.A. Penniyaynen, B.V. Krylov, A.V. Ankudinov, N.A. Esikova. *Tech. Phys. Lett.*, **43** (1), 85 (2017).]
- [41] А.В. Анкудинов, М.М. Халисов, В.А. Пенниайнен, С.А. Подзорова, К.И. Тимошук, Б.В. Крылов. *Письма в ЖТФ*, **44** (15), 38 (2018). DOI: 10.21883/PJTF.2018.15.46438.17351 [А.В. Ankudinov, M.M. Khalisov, V.A. Penniyaynen, S.A. Podzorova, K.I. Timoshchuk, B.V. Krylov. *Tech. Phys. Lett.*, **44** (15), 38 (2018).]
- [42] I. Sneddon. *INT. J. Eng. Sci.*, **3**, 47 (1965). DOI: 10.1016/0020-7225(65)90019-4
- [43] D. Nečas, P. Klapetek. *Cent. Eur. J. Phys.*, **10** (1), 181 (2012).
- [44] G. Pigino, Y. Song, L.L. Kirkpatrick, S.T. Brady. In: *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology, edition: 8th*, ed. by S.T. Brady, G.J. Siegel, R.W. Albers, D.L. Price (Academic Press, English, 2012), p. 109.
- [45] M. Dobretsov, S.L. Hastings, J.R. Stimers. *Neuroscience*, **93**, 723 (1999). DOI: 10.1016/s0306-4522(99)00122-0
- [46] A. Parekh, A.J. Campbell, L. Djouhri, X. Fang, S. McMullan, C. Berry, C. Acosta, S.N. Lawson. *J. Physiol.*, **588** (Pt 21), 4131 (2010). DOI: 10.1113/jphysiol.2010.196386
- [47] I.J. Edwards, G. Bruce, C. Lawrenson, L. Howe, S.J. Clapcote, S.A. Deuchars, J. Deuchars. *J. Neurosci.*, **33** (24), 9913 (2013). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5584-12.2013
- [48] W.J. O'Brien, J.B. Lingrel, E.T. Wallick. *Arch. Biochem. Biophys.*, **310** (1), 32 (1994). DOI: 10.1006/abbi.1994.1136
- [49] B. Fabry, G.N. Maksym, J.P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N.A. Taback, E.J. Millet, J.J. Fredberg. *Phys. Rev. E*, **68**, 041914-1–18 (2003). DOI: 10.1103/PhysRevE.68.041914
- [50] E. Moeendarbary, A. R. Harris. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **6** (5), 371 (2014). DOI: 10.1002/wsbm.1275
- [51] К.И. Тимошук, М.М. Халисов, В.А. Пенниайнен, Б.В. Крылов, А.В. Анкудинов. *Письма в ЖТФ*, **45** (18), 44 (2019). DOI: 10.21883/PJTF.2019.18.48238.17878 [К.И. Timoshchuk, M.M. Khalisov, V.A. Penniyaynen, B.V. Krylov, A.V. Ankudinov. *Tech. Phys. Lett.*, **45** (9), 947 (2019).] DOI:10.1134/S1063785019090293
- [52] М.М. Халисов, В.А. Пенниайнен, С.А. Подзорова, К.И. Тимошук, А.В. Анкудинов, Б.В. Крылов. *ЖТФ*, **90** (11), 1938 (2020). DOI: 10.21883/JTF.2020.11.49987.118-20
- [53] M.N. Uddin, D. Horvat, S.S. Glaser, B.M. Mitchell, J.B. Puschett. *J. Biol. Chem.*, **283**, 17946 (2008). DOI: 10.1074/jbc.m800958200
- [54] L.E.M. Quintas, S.V. Pierre, L. Liu, Y. Bai, X. Liu, Z.J. Xie. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **49** (3), 525 (2010). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.04.015
- [55] M. Akashi, A.H. Loussarian, D.C. Adelman, M. Saito, H.P. Koeffler. *J. Clin. Invest.*, **85**, 121 (1990). DOI: 10.1172/jci114401
- [56] A. Askari. *Pharmacol. Res. Perspect.*, **7** (4), e00505 (2019). DOI: 10.1002/prp2.505