

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/232711492>

[Use of the most recent reagent (CuFL) for stimulation of NO synthesis by the medicinal leech salivary cell secretion in the cultures of human endothelium cells (HUVEC) and in rat...

Article in *Biomeditsinskaya Khimiya* · January 2012

DOI: 10.18097/pbmc20125801065 · Source: PubMed

CITATION

1

READS

28

6 authors, including:



Anna Alekseeva

Wageningen University & Research

13 PUBLICATIONS 119 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Svetlana Kostyuk

Russian Academy of Medical Sciences

71 PUBLICATIONS 653 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Nataly Veiko

Russian Academy of Medical Sciences

175 PUBLICATIONS 1,206 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



cell-free DNA in schizophrenia patients [View project](#)



The effect of extracellular DNA on human cell cultures [View project](#)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 57.085.19;57.033

© Коллектив авторов

ПРИМЕНЕНИЕ НОВОГО РЕАГЕНТА Cu-FL ДЛЯ АНАЛИЗА СТИМУЛЯЦИИ СИНТЕЗА NO СЕКРЕТОМ СЛЮННЫХ КЛЕТОК МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ В КУЛЬТУРЕ ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА (HUVES) И КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ

И.П. Баскова^{1}, А.Ю. Алексеева¹, С.В. Костюк², М.Е. Неверова²,
Т.Д. Смирнова², Н.Н. Вейко²*

¹Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва;
эл. почта: saliva1@yandex.ru

²Медико-генетический Научный Центр, 115543 Москва, Россия;
эл. почта: ribgene@rambler.ru

Впервые показана способность секрета слюнных клеток (ССК) медицинской пиявки продуцировать оксид азота в культуре эндотелия человека (HUVES) и в кардиомиоцитах крысы (КМК) при непосредственном его определении с помощью нового NO-специфичного реагента - комплекса двухвалентной меди с производным флуоресцеина (Cu-FL). NO детектировали в клетках методом флуоресцентной микроскопии и определяли количественно в клетках и в культуральной жидкости методом флуоресценции. Стимулированная ССК интенсивность синтеза NO в клетках HUVES, но не в КМК, такова, что оксид азота выходит в межклеточное пространство и это обеспечивает их дальнейшее распространение. Представлена локализация центров синтеза NO в клетках и показано, что увеличение количества NO при действии ССК на HUVES и на КМК происходит в результате увеличения активности eNOS/nNOS, но не iNOS. В эндотелиальных клетках в присутствии ССК активируются процессы нитрозилирования, что проявляется в увеличении количества нитрит-ионов в среде культивирования по отношению к количеству NO. Поэтому важно, особенно в течение первого часа наблюдения за синтезом NO, использовать Cu-FL, но не реактив Грисса. NO-зависимый механизм действия ССК, возможно, является одним из факторов, обеспечивающих его положительное действие при гирудотерапии.

Ключевые слова: оксид азота, секрет слюнных клеток медицинской пиявки, NO-зонд Cu-FL, флуоресцентная микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия, реактив Грисса, NO-синтазы.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы активно развивается гирудотерапия - метод лечения самых разных заболеваний путём постановки медицинских пиявок на определённые зоны кожного покрова пациента. Этот древний метод прекрасно зарекомендовал себя как самостоятельный при терапии различных патологий, в том числе и сердечно-сосудистых [1, 2]. Гуморальным агентом гирудотерапии является секрет слюнных клеток (ССК), диссеминированных среди мышечной ткани в головной области медицинской пиявки. Через клеточные протоки секрет изливается в ранку на кожном покрове, нанесенную укусом медицинской пиявки. Методом двумерного электрофореза обнаружено присутствие в составе ССК более 100 белков с молекулярной массой 10-97 кДа в интервале pH 4,1-8,2 [3]; с помощью микрохромато-масс-спектрометрии в составе ССК обнаружено

* - адресат для переписки

Cu-FL ДЛЯ АНАЛИЗА СИНТЕЗА NO КЛЕТКАМИ

несколько сотен низкомолекулярных соединений (мол. массы 280-850 Да) [4]. Этот же метод позволил идентифицировать в составе пиявочного секрета свободные стероидные гормоны: кортизол, дегидроэпиандростерон, андростендион и тестостерон, а также гистамин и серотонин [4]. Более 50 белковых компонентов ССК было детектировано методом масс-спектрометрии с использованием схемы Zip-Tip/золотой чип и катионообменных чипов CM-10 [5]. Эти результаты позволяют рассматривать ССК как поликомпонентную сбалансированную систему высоко- и низкомолекулярных биологически активных соединений. Для понимания механизмов гуморального действия ССК при гирудотерапии важно представлять его взаимодействие не только с компонентами кожной микроциркуляции, в частности, с тучными клетками подкожно-жировой клетчатки [6], с компонентами системы гемостаза и фибринолиза [7-9], что было продемонстрировано в работах И.П. Басковой и соавторов, но и с эндотелиальными клетками, непосредственно участвующими как в регуляции гемостаза, так и обеспечивающими вазомоторную функцию сосудов [10] и, наконец, с кардиомиоцитами, ритмичные сокращения которых, обеспечивают работу сердца как насоса по перекачиванию крови. Целью работы был анализ влияния ССК на способность культуры клеток эндотелия человека (HUVEC) и культуры кардиомиоцитов крысы продуцировать NO. Для этого использовали флуоресцентный зонд, представляющий комплекс двухвалентной меди с производным флуоресцеина (Cu-FL), непосредственный высокочувствительный детектор оксида азота, который в последние годы широко используется для визуализации NO в живых клетках [11-14], когда концентрация оксида азота составляет около 100 пикомолей [15].

МЕТОДИКА.

Секрет слюнных клеток медицинских пиявок (ССК) отбирали методом [13] от медицинских пиявок *Hirudo verbana*, содержащихся на биофабрике "Гируд И.Н." (г. Балаково Саратовской области) и голодавших не менее 4 месяцев. Каждый препарат ССЖ представлял собой пул порций секрета, полученный от 8-10 особей. Концентрация белка - 0,4-0,6 мг/мл.

Выделение и культивирование клеток эндотелия HUVEC [16]. Клетки выделяли из образцов ткани из сосудов пупочного канатика плода человека. Пупочный канатик был получен от здоровой роженицы с нормально протекающей беременностью с информированного согласия пациентки. Ферментативную деградацию образцов проводили в среде 199, содержащей 10% сыворотки и 0,03% коллагеназы тип II ("Sigma", США) при инкубации в термостате при 37°C в течение 16 ч. Суспензию клеток центрифугировали в течение 10 минут при 200 g. Супернатант удаляли, а клетки культивировали при 37°C в среде 199 ("ПАН ЭКО", Россия), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки ("РАА Laboratories", Австрия), пенициллин 50 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, гентамицин 10 мкг/мл, НЕРЭС 20 мкл (реагенты - фирмы "ПАН ЭКО"). Использовали клетки 2-4 пассажей, субконфлюентную культуру. Инкубацию проводили в слайд-флаконах ("Nunclon", Германия) и планшетах на 96 лунок ("Corning-Costar", Великобритания). Для оценки количества клеток использовали метод подсчета в камере Горяева.

Выделение и культивирование кардиомиоцитов крыс линии Wistar [17]. Образцы ткани получали из желудочков сердца здоровых молодых животных после их декапитации. Все последующие манипуляции проводили в стерильных условиях. Использовали материалы и реагенты фирмы "ПанЭко". Образцы подвергали ферментативной деградации 0,1% раствором трипсина в растворе цитрата натрия, приготовленном на физиологическом растворе, инкубируя 14-16 ч при температуре +4°C. Образцы промывали 199 средой, разведенной на растворе Хенкса с 200 мМ глутамином, рН 7,2. Далее к ним добавляли 250 мл раствора, содержащего 120 мл 199 среды, 120 мл среды Игла, 150 мг раствора L-глутамин (концентрация 3,2 мг/мл), 10 мл раствора фетальной телячьей сыворотки (ФТС)

и антибиотики: пенициллин 25000 Ед и стрептомицин 25000 мкг и инкубировали в термостате при температуре +37°C в течение 1 ч. Затем 2 раза промывали 30 мл того же раствора, но не содержащего ФТС, и 1 раз 30 мл раствора, содержащего ФТС с ингибиторами трипсина. Далее в емкость с образцами заливали 199 среду, приготовленную на растворе Хенкса с 200 мМ глутамином, рН 7,2 и с помощью стерильной пипетки на 5-10 мл разбивали сгустки ткани до гомогенного состояния. Затем приливали раствор, содержащий 15 мл среды 199, 20 мл среды Игла и 4 мл ФТС. Таким образом, общий объем раствора, включая образец ткани, составлял ~50 мл. Клеточную суспензию тщательно перемешивали и разливали по 2,5 мл в пенициллиновые пузырьки, закрываемые резиновыми пробками, на дне каждого из которых находился фрагмент покровного стекла, на поверхности которого клетки впоследствии адгезировали. Клетки инкубировали в термостате при температуре +37°C на специальных штативах. Замену среды производили на следующий день после посева и далее каждые 2 дня. Эксперименты проводили на клетках после 2 недель инкубации.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Срезы культуральных клеток эндотелия человека (HUVES) анализировали в трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ). После фиксации клеток глутаровым альдегидом и дофиксации их 2% водным раствором четырехоксида осмия, проводили их обезвоживание спиртами возрастающих концентраций и пропитку смолами известным способом [18]. Контрастирование полученных срезов проводили 1% уранилацетатом и реактивом Рейнольдса. Срезы просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе "Geol" (Япония), при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Проточная цитометрия. Окрашенные Cu-FL или неокрашенные HUVES промывали 1 раз раствором Версена, далее добавляли 0,25% трипсин, контролируя гидролиз методом световой микроскопии. Клетки переносили в центрифужную пробирку и промывали средой 199. После центрифугирования 10 мин при 200 g суспендировали в растворе Хенкса и анализировали на приборе Partec (Германия). Использовали лазер FL1. Каждый образец анализировали по три раза (по 100 тыс. клеток).

Определение содержания NO с помощью красителя Cu-FL [19]. В слайд-флаконы с культурой клеток эндотелия HUVES (2-4 пассаж) или кардиомиоцитов крысы, содержащие по 4 мл клеточной среды, добавляли 2-16 мкл раствора ССК медицинской пиявки. Клетки инкубировали указанное время при температуре 37°C, в среду добавляли 1 мкл свежеприготовленного раствора флуоресцентного красителя Cu-FL ("Strem", США). Спустя необходимое время инкубации (см. текст) при 37°C надклеточную жидкость сливали в пробирку и анализировали флуоресценцию на флуориметре "Perkin Elmer LS55" (США), при $\lambda_{\text{возб}}=495\text{нм}$, с эмиссией $\lambda=526$, в режиме "time-drive" или на ридере в 96-луночной планшете ("EnSpire", Финляндия). Для построения калибровочной зависимости, связывающей сигнал и количество NO-FL, получали NO-FL путём пропускания через раствор Cu-FL с известной концентрацией газообразного оксида азота. После удаления надклеточной жидкости, NO-FL из оставшихся клеток экстрагировали 0,5 мл ДМСО ("Sigma") добавляли 3,5 мл раствора 0,1 М Трис-НСI (рН 8,0), и измеряли флуоресценцию. Фотографии клеток получали с использованием флуоресцентного микроскопа AxioPlan ("Opton", Германия) и цифровой камеры RETIGA 2000R ("IMAGING", Канада). В качестве ингибитора синтеза NO применяли N ω -Nitro-L-arginine ("Sigma"). Для окраски ядер пропидий йодидом (PI) окрашенные Cu-FL клетки фиксировали 3% формальдегидом, обрабатывали 0,05% тритоном X-100. Использовали раствор PI ("Sigma") в фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 в концентрации 10 мкмоль/мл.

Определение содержания оксида азота методом Грисса [20]. Анализируемые образцы в объеме 50 мкл помещали в ячейки, плашки для иммуно-ферментного анализа в 2-3 повторах. Добавляли по 50 мкл раствора сульфаниламида,

Cu-FL ДЛЯ АНАЛИЗА СИНТЕЗА NO КЛЕТКАМИ

приготовленного путём разведения 2,25 мл 1% его раствора 5% фосфорной кислотой до конечного объёма 50 мл. После инкубации при комнатной температуре в течение 5-10 мин в защищенном от света месте добавляли по 50 мкл раствора дигидрохлорида N-1-нафтиламина, приготовленного путём разведения 2,25 мл 0,1% его раствора 5% фосфорной кислотой до конечного объёма 50 мл (реагенты - фирмы "ПАН ЭКО"). Спустя 5-10 мин определяли поглощение на спектрофотометре "Shimadzu UV-160A" (Япония) при длине волны 550 нм. Для определения концентрации нитритов в среде культивирования клеток эндотелия использовали калибровочный график, построенный для различных концентраций (1,56-200 мкМ) нитрита натрия.

Оценка экспрессии eNOS и iNOS методом ПЦР в режиме реального времени. Выделение РНК проводили с использованием фирменного набора реагентов (Trizol RNA Prep 100) ("Invitrogene", США). Получали кДНК путём проведения обратной транскрипции с помощью реактивов фирмы "Силекс" (РФ) по стандартной методике.

Для анализа кДНК применили метод ПЦР по принципу "TaqMan". В реакции амплификации использовали модифицированный олигонуклеотид, который на 5'-конце содержал флуоресцеиновую группу (FAM, RGG, Cy5, ROX), а на 3'-конце - тушитель флуоресценции (BHQ1, BHQ2, RTQ1, RTQ2) (таблица). В качестве внутреннего стандарта использовали гены GAPDH и AKTB, экспрессия которых стабильна в клетках эндотелия. МРНК стандартных генов определяли с помощью меченного карбоксиметилфлуоресцеином (R6G) олигонуклеотида. Измерения проводили в нескольких независимых опытах.

Таблица. Список праймеров, использованных для амплификации кДНК iNOS, eNOS, GAPDH и AKTB ("Синтол").

Ген	Ф-праймер 5'-----→3'	Проба 5'-----→3'	Р-праймер 5'-----→3'
<i>iNOS</i>	gcgttactccaccaaatggca	FAMagcggagtgatggcaagcagcacttBHQ1	atagcggatgagctgagcattcca
<i>eNOS</i>	tggtggtacatgagcactgagat	RGGtacaacatcctggaggatgtggctgtBHQ1	cacgttgattccactgctgcctt
<i>GAPDH</i>	gaaggtgaaggtcggagtc	Cy5caagcttccgttctcagccRTQ2	gaagatggtgatgggatttc
<i>AKTB</i>	accaactgggacgacatggagaaa	ROXaccacaccttctacaatgagctgcgtBHQ2	tagcacagcctggatagcaacgta

Примечание: FAM - 5(6)-карбоксифлуоресцин, R6G - 5(6)-карбоксиродамин, Cy5 - тетраметил-индокарбоцианин, ROX - 5(6)-карбокси-X-родамин, BHQ1 - black hole quencher 1, BHQ2 - black hole quencher 2, RTQ2 - тушитель флуоресценции, аналог BHQ1.

Состав реакционной смеси в объёме 25 мкл: 1,5 мкл кДНК, 2,5 мкл ПЦР буфера (700 мМ Tris-HCl, pH 8,6; 166 мМ сульфат аммония, 35 мМ MgCl₂); 4 мкл 1,5 мМ раствора dNTP; по 0,4 мкл (iNOS)/ 0,25 мкл (eNOS)/ 0,2 мкл (GAPDH)/ 0,4 мкл (AKTB) раствора Ф-праймеров и по 0,4 мкл (iNOS)/ 0,25 мкл (eNOS)/ 0,2 мкл (GAPDH)/ 0,4 мкл (AKTB) раствора Р-праймеров (см. таблицу); 0,5 мкл 2 ед Taq-полимеразы. Температура отжига праймеров 58°C. Условия постановки ПЦР-реакции: после денатурации (95°C, 5 мин) проводили 37 циклов амплификации в режиме: 95°C - 15 сек, 58°C - 20 сек, 72°C - 20 сек. Затем - 72°C в течение 5 мин. Проводили реакцию ПЦР в приборе Rotor Gene™ 3000 ("Corbett", Австрия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ "Statgraphics" и "Excel", используя критерий Стьюдента (t-тест) для малых выборок (при нормальном распределении). При отсутствии нормального распределения полученных результатов использовался статистический непараметрический критерий Манна-Уитни (U-тест).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Настоящее исследование направлено на изучение способности ССК влиять на синтез NO эндотелиальными клетками сосудов человека (HUVEC) и кардиомиоцитами крысы. Предварительно методом ТЭМ было анализировано влияние ССК на морфологические изменения клеток HUVEC после продолжительной (90 мин) инкубации при 37°C по сравнению с контролем (физиологический раствор). В контроле (рис. 1, левый снимок) клетки имеют четко выраженные оболочки, одинаковую плотность цитоплазмы, видны клеточные органеллы. После инкубации с ССК (там же, правый снимок) цитоплазма клеток во многих местах разреженная, в отдельных местах нарушена целостность наружной мембраны. На поперечном срезе видно выпячивание мембраны, что может свидетельствовать о нарушении проницаемости клетки и/или о накоплении пузырьков газа.

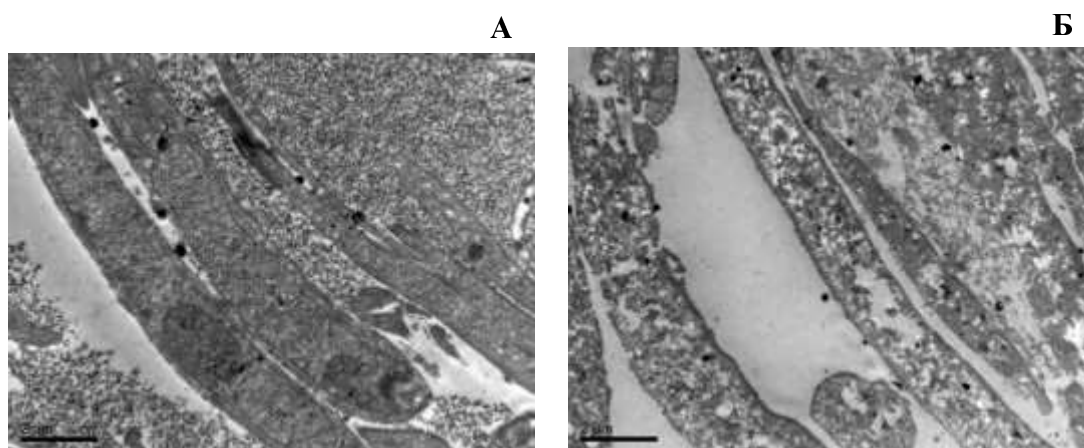


Рисунок 1.

ТЭМ- фотографии препаратов клеток эндотелия человека после инкубации с физиологическим раствором -контроль (левый снимок) и после инкубации в течение 90 мин при 37°C с препаратом ССК 1:10 (правый снимок). Масштаб: — 2мкм.

Для определения NO в живых клетках эндотелия мы впервые применили новый реагент Cu-FL (рис. 1а), который был разработан Липпардом и соавт. Соединение Cu-FL с низкой флуоресценцией ($\Phi_{Cu-FL}=0,077$) при взаимодействии с NO образует сильно флуоресцирующий NO-FL ($\Phi_{NO-FL}=0,58$). Реагент специфичен в отношении NO на фоне RNS и ROS, включая H_2O_2 , HNO^* , NO_2^- , NO_3^- , $ONOO^-$. Ранее было показано, что Cu-FL позволяет в режиме реального времени с использованием флуоресцентной микроскопии детектировать NO, синтезируемый в клетках нейробластомы и макрофагов мыши конститутивной и индуцибельной NO-синтазами соответственно [19, 21-24]. Мы показали, что Cu-FL можно использовать для определения NO тремя методами - флуоресцентной микроскопией, проточной цитометрией и методом измерения флуоресценции растворов.

Визуализация NO в HUVEC с использованием Cu-FL. Инкубация HUVEC с Cu-FL (1 мкМ, 30 мин) сопровождается появлением зелёной флуоресценции (рис. 2б, в, д (см. вклейку)). Интенсивность свечения значительно снижается при использовании неселективного ингибитора синтеза NO (200 мкМ N ω -Nitro-L-arginine метиловый эфир, L-NAME) (данные не приводятся). С точки зрения характера окрашивания и интенсивности свечения клеточную популяцию, достигшую состояния субконфлуентности, можно условно разделить на две субпопуляции (рис. 2б). Первая включает клетки с очень ярким свечением, имеющие размытые контуры и признаки сорбции NO-FL на клеточной поверхности (рис. 2д). Свечение также наблюдается и в межклеточном пространстве. Клетки этой фракции буквально "фонтанируют" на поверхности большими количествами оксида азота.

Cu-FL ДЛЯ АНАЛИЗА СИНТЕЗА NO КЛЕТКАМИ

Эта популяция составляет примерно 10% от общего числа клеток. Остальные клетки имеют более слабое свечение, при этом хорошо различимы структуры, где происходит синтез NO: сеть "каналов" вблизи ядерной мембраны и отдельные компактные включения по периферии клеток. Наблюдаемая картина полностью соответствует описанной ранее схеме распределения молекул активной eNOS в эндотелиальной клетке [25-29]. Одна часть молекул eNOS локализована в районе цитоплазматической мембраны, другая - в комплексе Гольджи. При использовании Cu-FL мы наблюдали слабые размытые сигналы в ядрах клеток (рис. 2в). Чтобы определить, какие структуры в ядре окрашивает реагент, мы окрасили обработанные Cu-FL и затем фиксированные формальдегидом клетки пропидий йодидом (PI) (рис. 2е). Процедура фиксации существенно не изменяет общую картину окраски клеток реагентом, наблюдается лишь небольшое размытие окраски тонких структур. Зафиксированные образцы могут храниться не менее месяца в темноте при -5°C. Оказалось, что Cu-FL слабо окрашивает ядрышки. Эти сигналы не появляются в присутствии ингибитора синтеза NO (L-NAME), а также в клетках, где не наблюдается интенсивного окрашивания цитоплазмы. Мы полагаем, что образующееся в цитоплазме HUVEC производное NO-FL диффундирует в ядро и сорбируется на структурах ядрышка, однако нельзя полностью исключить и синтез NO в ядре [30, 31].

Наличие двух фракций HUVEC, которые в несколько раз различаются по интенсивности свечения NO-FL, подтверждается данными проточной цитометрии (рис. 2г). В клеточной популяции обнаруживается до 10-15% клеток с очень интенсивным свечением (плечо 2 на гистограмме, рис. 2г). Распределение клеток по фракциям 1 и 2 зависит от длительности культивирования HUVEC: клетки, которые культивировали в течение 5 дней после достижения состояния контактного ингибирования, содержат более 70% клеток 2-й фракции. Такая культура продуцирует большее количество NO, что соответствует полученным ранее данным других авторов [32-35]. В наших дальнейших экспериментах мы работали с HUVEC, которые достигли субконфлуентного состояния. Методом проточной цитометрии мы также показали, что краситель NO-FL не диффундирует из клеток в раствор: флуоресценция клеток не изменяется в течение не менее часа. Таким образом, новый реагент Cu-FL может быть успешно применён для анализа синтеза NO в живых клетках эндотелия с использованием микроскопии и проточной цитометрии. Поскольку NO-FL не диффундирует из клеток даже после фиксации и обработки 0,05% раствором тритона X-100, то Cu-FL, по-видимому, может быть применен в сочетании с анализом клеточных структур методами иммуноцитохимии.

Влияние ССК на синтез NO в HUVEC. Были приготовлены 4 разведения ССК (концентрация белка 0,49 мг/мл) физиологическим раствором: (1:1), (1:10), (1:100) и (1:1000). Растворы ССК добавляли к HUVEC (2 мкл / 4 мл среды), клетки культивировали 15 мин, а затем добавляли 1 мкМ Cu-FL и инкубировали 30 мин. Оказалось, что ССК в большой концентрации (1:1) вызывает снижение количества NO-FL в клетках, такое же, как и в случае применения ингибитора эндотелиальной NO-синтазы. Максимальная интенсивность флуоресценции соответствует разведениям ССК в 10-100 раз (рис. 3а (см. вклейку)). Анализ клеток при большом увеличении показал, что в культуре возрастает интенсивность синтеза NO в центрах, расположенных вблизи цитоплазматической мембраны. При этом, как видно на рисунке 3б (окрашивание справа от клетки), молекулы оксида азота успевают диффундировать в межклеточную среду на достаточно большое расстояние.

Количественный анализ NO в HUVEC. Поскольку известно, что реагент Cu-FL может быть успешно использован для анализа количества NO в водных растворах [21], мы применили его для количественного определения NO в среде культивирования HUVEC и в клетках, отделённых от среды (см. раздел "Методика"). В контрольных HUVEC 85±5% от суммарного количества образующегося NO-FL определяется в среде культивирования. Полученные

данные позволили рассчитать количественные характеристики синтеза NO в HUVEC. Суммарное количество NO, которое синтезируется 1 млн клеток за 5 мин, составляет в среднем 1,3 нмоля или 4,3 пмоль/сек. Без учёта потери NO до момента взаимодействия с Cu-FL за счет быстрых реакций (например, образование пероксинитрита, NO₂ или нитрозилирование белков), каждая клетка в среднем за 1 секунду синтезирует 2,5 млн молекул NO. Из этого количества примерно 375 тыс. остаются в клетке и 2,1 млн молекул диффундирует в окружающую среду. Концентрация NO в клетке составляет в среднем 50-100 нМ. Это значение очень близко к новой оценке концентрации NO в клетках нормально функционирующего эндотелия [36], которая, как минимум, на порядок ниже, чем приводимые ранее данные, полученные электрохимическими методами [37].

Далее мы проанализировали динамику изменения содержания NO в клетках и в культуральной жидкости при инкубации HUVEC с ССК (1:10). В первые минуты после воздействия ССК на клетки концентрация NO-FL в среде культивирования снижается (рис. 4а, кривая 1). При этом наблюдается увеличение количества NO в самих клетках (кривая 2). Через 15-20 минут оба эффекта уменьшаются. Таким образом, ССК, стимулируя кратковременно синтез NO в клетке, снижает количество NO, детектируемое в среде культивирования. ССК в используемой концентрации практически не влиял на интенсивность флуоресценции NO-FL. Снижение количества NO в среде могло быть связано, как с замедлением его диффузии из клеток, так и с быстрыми реакциями NO с активными формами кислорода. Для прояснения этого вопроса мы исследовали изменение концентрации метаболита NO - нитрит-иона в среде культивирования с использованием колориметрического метода Грисса.

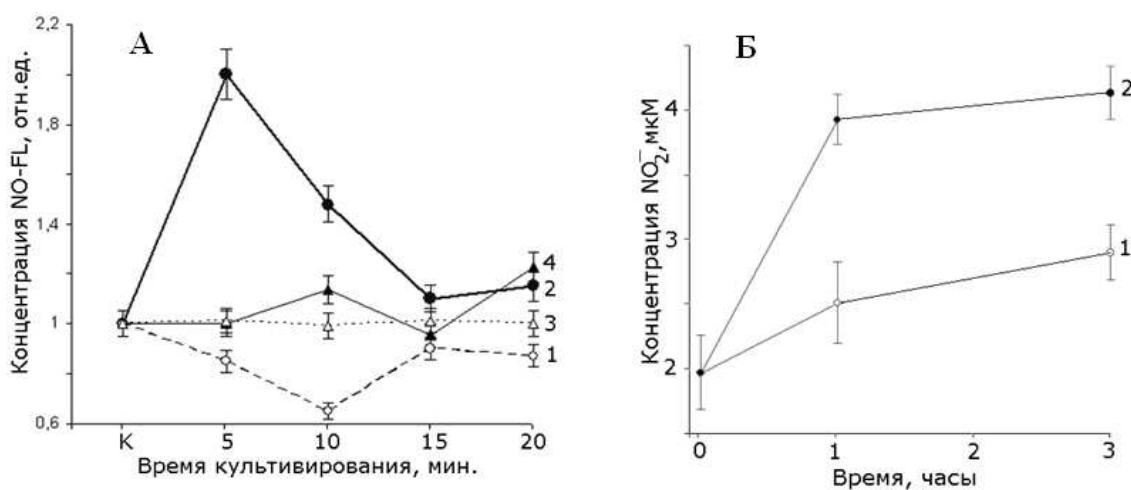


Рисунок 4.

Изменение во времени количества NO- (А) и NO₂- (Б) при воздействии ССК (1:10) на HUVEC.

А - среда культивирования контрольных клеток (3) и обработанных ССК (1), клетки контрольные (4) и обработанные ССК (2).

Б - Среда культивирования клеток в отсутствие (1) и в присутствии ССК 1:10 (2).

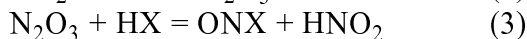
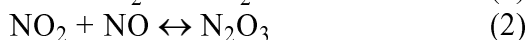
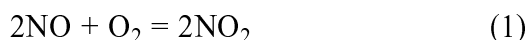
Определение концентрации метаболита NO - нитрит-иона по методу Грисса. HUVEC инкубировали с ССК (1:10). Через 1 и 3 ч во внеклеточной жидкости определяли содержание нитритов, используя реактив Грисса. Полученные результаты представлены на рисунке 4б. Концентрация нитрит-ионов в среде культивирования клеток субконфлюентной культуры (~1 млн. клеток) составляет в среднем 2 мкМ. В присутствии ССК (1:10) через 1 час концентрация нитрита возрастает в 2 раза и далее не изменяется. В контроле за это же время концентрация увеличивается на 0,5 мкМ (различия с контролем в начальный момент исследования недостоверно, $p > 0,05$). За это же время (1 ч)

Cu-FL ДЛЯ АНАЛИЗА СИНТЕЗА NO КЛЕТКАМИ

в тех же условиях культивирования концентрация NO в среде, определённая с использованием Cu-FL, составила 0,14 мкМ (контроль) и 0,20 мкМ (ССК 1:10). На одну молекулу NO в среде контрольных клеток за 1 ч образуется 3,5 молекул нитрит иона, в присутствии ССК - 10 молекул.

Благодаря использованию Cu-FL мы впервые получили ценную информацию о влиянии ССК на биохимические пути метаболизма окиси азота в клетках HUVEC.

Скорость синтеза NO непосредственно в клетках возрастает в 2 раза в первые минуты после действия ССК. Одновременно в среде культивирования с помощью Cu-FL мы обнаружили снижение количества NO, но с помощью реагента Грисса - значительное увеличение количества метаболита NO - нитрит-иона. Увеличение концентрации нитритов на фоне снижения концентрации NO говорит о том, что в клетках, помимо стимуляции синтеза NO, активировались пути, связанные с окислением NO и активацией реакций нитрозилирования [38]:



Известно, что реакция 1 эффективно протекает только в гидрофобной среде, например, в липидных слоях клеточной мембраны. Значительное изменение клеточной мембраны в присутствии ССК, по-видимому, способствует этой реакции. Полученные нами результаты трансмиссионной электронной микроскопии указывают на морфологические изменения эндотелиальных клеток под действием ССК (рис. 1), что, по-видимому, обусловлено амфипатическими свойствами входящего в состав ССК дестабилазы-лизоцима [39]. Реакции умеренного нитрозилирования (белков и глутатиона), которые протекают, благодаря активности eNOS, благоприятны для клетки, они увеличивают кругооборот NO в клетке, поскольку обратимы и NO может выделяться вновь из нитрозилированных продуктов. Кроме того, обратимое нитрозилирование белков - это один из известных путей регуляции клеточных процессов. Показано [40], что NO регулирует иммунную систему путем S-нитрозилирования известного фактора транскрипции NF-каппа В. Разбалансировка регуляции активности этого фактора в эндотелии при старении - одна из причин заболеваний сердечно-сосудистой системы у пожилых людей [41]. В эндотелиальной клетке NO контролирует также сигнальные пути, связанные с активацией рецепторов "врожденного иммунитета" TLR, через S-нитрозилирование универсального белка-адаптора MyD88 и этот процесс напрямую зависит от активности eNOS [42]. Нитрозилирование перечисленных белков снижает воспалительные реакции в острой фазе иммунного ответа и благоприятно для пожилого организма, так как снижает активность фактора NF-каппа В [41]. Для получения представлений о влиянии ССК на уровень eNOS в клетках HUVEC, мы определяли в них количество мРНК eNOS и iNOS.

Количество мРНК eNOS и iNOS. Уровень экспрессии генов eNOS и iNOS определяли методом ПЦР TaqMan, в качестве внутреннего стандарта использовали гены GAPDH и АКТВ, которые обладают постоянным уровнем экспрессии в исследуемых клетках. В присутствии ССК (1:10, 1 час) в HUVEC на 25±5% возросло количество мРНК eNOS (различие с контролем достоверно, $p < 0,01$). Количество мРНК iNOS практически не изменялось ($p > 0,01$).

Визуализация NO в кардиомиоцитах крысы (КМК). Кардиомиоциты, как и клетки эндотелия, очень чувствительны к изменению количества окиси азота. Умеренные количества оксида азота, которые синтезирует эндотелиальная (eNOS) и/или нейрональная (nNOS) NO-синтазы, выполняют защитную функцию в кардиомиоцитах [22, 43]. Фармацевтические препараты, улучшающие функционирование сердечной мышцы, как правило, стимулируют синтез NO эндотелиальной NO-синтазой. Большие количества NO, наблюдаемые при

увеличении экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS), сопровождаются гибелью кардиомиоцитов и развитием воспаления [43, 44]. Мы проанализировали изменения количества NO в клетках кардиомиоцитов крысы (КМК) при действии на клетки малых количеств H_2O_2 (10 мкМ, 1 час), ССК (1:100, 1 час) и лиганда рецепторов TLR9 - ДНК *E. coli*. Для визуализации синтеза NO в КМК (крысы WKY) мы применили реагент Cu-FL. Результаты представлены на рисунках 5 и 6 (см. вклейку).

В отличие от HUVEC, интактные КМК не окрашиваются реагентом Cu-FL (результат не приводится), что говорит о гораздо более низких количествах NO в этих клетках. При действии ССК (1:100) и малых доз H_2O_2 (10 мкМ, 1 час) мы детектировали практически одинаковую картину, отражающую увеличение количества NO в КМК: в цитоплазме КМК в присутствии Cu-FL появляется слабое окрашивание (рис. 5-1б). При большом увеличении (рис. 5-2в) можно увидеть отдельные, достаточно четкие, мелкие окрашенные точки, которые группируются ближе к ядерной мембране. Вблизи цитоплазматической мембраны изредка встречаются крупные окрашенные участки. Мы не обнаружили признаков "фонтанирования" NO в среду, как это имело место в случае клеток эндотелия.

Известно, что малые дозы перекиси водорода индуцируют в КМК адаптивный ответ, т.е. развивают толерантность КМК к последующему действию больших доз окисляющего агента [45]. В этом процессе существенная роль отводится молекуле NO, которая синтезируется эндотелиальной NO-синтазой. eNOS локализована в КМК в caveолах вблизи цитоплазматической мембраны [43]. Вблизи ядерной мембраны КМК локализованы преимущественно молекулы нейрональной NO-синтазы [43]. Расположение окрашенных участков (рис. 5) указывает на то, что при действии на КМК ССК (1:100), равно, как и адаптивных доз H_2O_2 , наблюдается увеличение синтеза NO двумя синтазами - nNOS и eNOS.

Качественно иную картину синтеза NO в КМК мы наблюдали в присутствии лигандов TLR9 (рис. 6). При активации этих рецепторов в КМК происходит увеличение концентрации TNF-альфа, интерлейкина (IL)-1 β , IL-6 и активация пути, связанного с ядерным фактором каппа В. Кардиомиоциты теряют сократительную функцию. Все перечисленные события связаны с увеличением активности индуцибельной NO-синтазы в КМК [46, 47]. В нашем опыте инкубирование КМК с лигандами TLR9 (ДНК *E. coli* или CpG-богатые фрагменты плазмидной ДНК) также сопровождалось уменьшением частоты сокращений КМК [48]. При концентрации лиганда в среде более 50 нг/мл (24 часа) мы наблюдали полное блокирование сократительной активности КМК.

С помощью Cu-FL мы впервые смогли наблюдать токсичный для КМК синтез NO, осуществляемый iNOS (рис. 6). Неокрашенные КМК в присутствии лиганда TLR9 демонстрируют слабое увеличение автофлуоресценции (рис 6-2, жёлтые сигналы). В присутствии Cu-FL в КМК наблюдается значительное увеличение числа окрашенных сферических гранул (зелёный цвет, рис. 6-3). Причем, эти относительно крупные ярко-зелёные гранулы расположены в КМК иначе, чем в случае действия малых доз перекиси водорода или ССК. Они локализованы в отдельных районах цитоплазмы. При большом увеличении выявляются три очень характерные особенности этих сигналов (рис. 6-3а).

(1) Каждая сфера в свою очередь состоит из более мелких "шариков". "Шарики" в пространстве образуют также упорядоченную структуру (в форме розетки, рис. 6-3б).

(2) Расположение этих сфер в рассматриваемых участках цитоплазмы упорядочено, сферы не перекрываются между собой.

(3) Синтез NO в "шариках" каждой сферы одинаков и автономен, то есть одновременно возрастает количество NO во всей сфере, независимо от синтеза в соседней сфере. Вне участка, содержащего эти сферы, мы наблюдали качественно другую картину окраски, характерную для стимуляции синтеза NO индуктором eNOS: отдельные слабо светящиеся неупорядоченные точки. Наиболее яркие из точек были локализованы вблизи клеточной мембраны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В культуре HUVEC клетки с высоким уровнем синтеза NO служат основными поставщиками этого газа в межклеточную среду. В этих клетках NO образуется в основном в кавеолах и "струями" диффундирует с поверхности клеток в среду. В КМК мы не наблюдали "выбросов" NO из клеток. Образовавшийся NO-FL локализован в отдельных структурах, распределение и форма сигнала зависит от типа NO-синтазы, которая активирована в КМК при заданных условиях. Выброс оксида азота в кардиомиоцитах идет квантово и менее интенсивно, так что соединение NO-FL не успевает равномерно распределиться по клеткам и выйти во внеклеточное пространство [49]. В клетках с умеренным уровнем синтеза NO новый реагент позволяет выявлять очень тонкие структуры. Производное NO-FL прочно сорбируется на компонентах клетки и межклеточного матрикса и может детектироваться даже после фиксации формальдегидом и обработок клеток тритоном.

Введение в среду клеток ССК в разведении 1:10 и 1:100 стимулирует и в HUVEC и в КМК синтез NO. Увеличение количества оксида азота при действии на HUVEC и на КМК ССК (1 ч, 1:10-1:100) происходит вследствие увеличения активности eNOS/nNOS, но не iNOS. Мы сделали этот вывод, во-первых, на основании сравнительной картины распределения центров синтеза NO в клетках при действии ССК и индукторов активности eNOS/nNOS (10 мкМ H₂O₂) и iNOS (лиганды TLR9), для которых известен механизм изменения количества NO в анализируемых клетках. Центры синтеза NO в присутствии ССК и малых доз пероксида водорода расположены там же, где по литературным данным локализованы молекулы eNOS/nNOS и значительно отличаются от центров, возникающих за счет экспрессии iNOS. Во-вторых, мы не обнаружили активации транскрипции гена iNOS в HUVEC. Количество мРНК eNOS за 1 час увеличивалось на 25%. Поскольку известно, что время полураспада мРНК eNOS довольно большое (22-24 ч, [50]), то дополнительное количество мРНК eNOS отражает слабое увеличение транскрипционной активности. Скорее всего, существенная активация синтеза NO в первые минуты действия ССК происходит не на уровне транскрипции гена eNOS. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

На основании полученных нами экспериментальных данных можно представить, что при постановке пиявки на кожный покров человека при гирудотерапии, ССК, вводимый ею в ранку, нанесенную прокусыванием участка кожи, воздействует на эндотелиальные клетки сосудов микроциркуляции кровеносных и лимфатических сосудов, стимулируя синтез NO уже в первые минуты. Локальное повышение концентрации оксида азота в кожной микроциркуляции несомненно отражается на способности эндотелия регулировать тонус сосудов. В последние годы показано [51], что эндогенно генерируемый оксид азота обладает не только паракринными, но и эндокринными функциями, обеспечивая вазодилатацию дистальных органов и систем организма.

Выявленный нами эффект стимулирования синтеза NO пиявочным секретом в клетках культуры кардиомиоцитов крысы и снижение при этом частоты сокращений клеток (результаты не представлены) может иметь место и при гирудотерапии, но для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баскова И.П., Исаханян Г.С. (2004) Гирудотерапия. Наука и практика, Монолит, Москва.
2. Michalsen A., Roth M. (2006) Blutegeltherapie, Verlag, Stuttgart.
3. Баскова И.П., Завалова Л.Л., Басанова А.В., Мошковский С.А., Згода В.Г. (2004) Биохимия, **69**, 945-951.
4. Баскова И.П., Фернер З., Балкина А.С., Козин С.В., Харитоновна О.В., Завалова Л.Л., Згода В.Г. (2008) Биомед. химия, **54**, 127-139.

5. Баскова И.П., Кострюкова Е.С., Власова М.А., Харитонов О.В., Левицкий С.А., Завалова Л.Л., Мошковский С.А., Лазарев В.Н. (2008) Биохимия, **71**, 388-394.
6. Баскова И.П., Гольцова К.В., Завалова Л.Л., Климович Л.Г. (2005) Рос. физиол. ж. им. Сеченова, **91**, 195–207.
7. Баскова И.П., Миссельвитц Ф., Никонов Г.И., Лейтин В.Л. (1984) Бюлл. эксперим. биол. мед., **97**, 696-699.
8. Баскова И.П., Халиль С., Никонов Г.И. (1984) Бюлл. эксперим. биол. мед., **97**, 142-143.
9. Baskova I.P., Nikonov G.I. (1991) Blood Coagul. Fibrinol., **2**, 167-172.
10. Ganz P., Vita J.A. (2003) Circulation, **108**, 2049-2053.
11. Ouyang J., Hong H., Shen C., Zhao Y., Ouyang C., Dong L., Zhu J., Guo Z., Zeng K., Chen J., Zhang C., Zhang J. (2008) Free Radic. Biol. Med., **45**, 1426-1436.
12. Pluth M.D., McQuade L.E., Lippard S.J. (2010) Org. Lett., **12**, 2318-2321.
13. McQuade L.E., Lippard S.J. (2010) Inorg. Chem., **49**, 7464-7471.
14. McQuade L.E., Ma J., Lowe G., Ghatpande A., Gelperin A., Lippard S.J. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107**, 8525-8530.
15. Hall C.N., Garthwaite J. (2009) Nitric Oxide, **21**, 92-103.
16. Mather J.P., Roberts P.E. (1998) Introduction to cell and tissue culture, Plenum Press, NY.
17. Неверова М.Е., Мкртумова Н.А., Фиделина О.В., Адамская Е.И., Цорин И.Б., Чичканов Г.Г., Чудаков Л.И. (2006) Экспер. клин. фармакол., **69**, 24-26.
18. Нетрусов А.И. (ред.) (2005) Практикум по микробиологии, АСADEMIА, Москва.
19. Lim M.H., Xu D., Lippard S.J. (2006) Nat. Chem. Biol., **2**, 375-380.
20. Moorcroft M.J., Davis J., Compton R.G. (2001) Talanta, **54**, 785-803.
21. Lim M.H., Wong B.A., Pitcock Jr. W.H., Mokshagundam D., Baik M.H., Lippard S.J. (2006) J. Am. Chem. Soc., **128**, 14364–14373.
22. Barouch L.A., Harrison R.W., Skaf M.W., Rosas G.O., Cappola T.P., Kobeissi Z.A., Hobai I.A., Lemmon C.A., Burnett A.L., O'Rourke B., Rodriguez E.R., Huang P.L., Lima J.A., Berkowitz D.E., Hare J.M. (2002) Nature, **416**(6878), 337-339.
23. Lim M.H. (2007) Nat. Protoc., **2**, 408–415.
24. McQuade L.E., Ma J., Lowe G., Ghatpande A., Gelperin A., Lippard S.J. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107**, 8525–8530.
25. Fulton D., Fontana J., Sowa G., Gratton J.P., Lin M., Li K.X., Mitchell B., Kemp B.E., Rodman D., Sessa W.C. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 4277–4284.
26. Fulton D., Babbitt R., Zoellner S., Fontana J., Acevedo L., McCabe T.J., Iwakiri Y., Sessa W.C. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 30349–30357.
27. García-Cardeña G., Fan R., Stern D.F., Liu J., Sessa W.C. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 27237–27240.
28. García-Cardeña G., Oh P., Liu J., Schnitzer J.E., Sessa W.C. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 6448–6453.
29. Sessa W.C., García-Cardeña G., Liu J., Keh A., Pollock J.S., Bradley J., Thiru S., Braverman I.M., Desai K.M. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 17641–17644.
30. Provost C., Choufani F., Avedanian L., Bkaily G., Gobeil F., Jacques D. (2010) Can. J. Physiol. Pharmacol., **88**, 296–304.
31. Gobeil F.Jr., Zhu T., Brault S., Geha A., Vazquez-Tello A., Fortier A., Barbaz D., Checchin D., Hou X., Nader M., Bkaily G., Gratton J.P., Heveker N., Ribeiro-da-Silva A., Peri K., Bard H., Chorvatova A., D'Orléans-Juste P., Goetzl E.J., Chemtob S. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 16058–16067.
32. Searles C.D., Ide L., Davis M.E., Cai H., Weber M. (2004) Circ. Res., **95**, 488–495.
33. Kondrikov D., Han H.R., Block E.R., Su Y. (2006) Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., **290**, L41–L50.
34. Govers R., Bevers L., de Bree P., Rabelink T.J. (2002) Biochem. J., **361**, 193–201.
35. Whitney A., German Z., Sherman T.S., Yuhanna I.S., Shaul P.W. (2000) Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., **278**, L131–L138.

Cu-FL ДЛЯ АНАЛИЗА СИНТЕЗА NO КЛЕТКАМИ

36. *Hall C.N., Garthwaite J.* (2009) *Nitric Oxide*, **21**(2), 92-103.
37. *Malinski T., Bailey F., Zhang Z.G., Chopp M.* (1993) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **13**, 355–358.
38. *Nedospasov A., Rafikov R., Beda N., Nudler E.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13543-13548.
39. *Seddon M., Shah A.M., Casadei B.*, (2007) *Cardiovasc. Res.*, **75**, 315-326.
40. *Marshall H.E., Stamler J.S.* (2001) *Biochemistry*, **40**, 1688–1693.
41. *Pierce G.L., Lesniewski L.A., Lawson B.R., Beske S.D., Seals D.R.* (2009) *Circulation*, **119**, 1284-1292.
42. *Into T., Inomata M., Nakashima M., Shibata K., Häcker H., Matsushita K.* (2008) *Mol. Cell Biol.*, **28**, 1338-1347.
43. *Okhotin V.E., Shuklin A.V.* (2006) *Morfologiya*, **129**, 7-17.
44. *Drexler H., Kästner S., Strobel A., Studer R., Brodde O.E., Hasenfuss G.* (1998) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **32**(4), 955-963.
45. *Rui T., Kvietys P.R.* (2005) *FASEB J.*, **19**, 1908-1910.
46. *Drexler H., Kästner S., Strobel A., Studer R., Brodde O.E., Hasenfuss G.* (1998) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **32**, 955-963.
47. *Knuefermann P., Schwederski M., Velten M., Krings P., Ehrentraut H., Rüdiger M., Boehm O., Fink K., Dreiner U., Grohé C., Hoeft A., Baumgarten G., Koch A., Zacharowski K., Meyer R.* (2008) *Cardiovasc. Res.*, **78**(1), 26-35.
48. *Bulicheva N., Fidelina O., Mkrtumova N., Neverova M., Bogush A., Bogush M., Roginko O., Veiko N.* (2008) *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **1137**, 273-277.
49. *Feron O., Saldana F., Michel J.B., Michel T.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 3125-3128.
50. *Takemoto M., Sun J., Hiroki J., Shimokawa H., Liao J.K.* (2002) *Circulation*, **106**, 57–62.
51. *Greenacre S.A., Ischiropoulos H.* (2001) *Free Radic. Res.*, **34**, 541-581.

Поступила: 23. 06. 2011.

USE OF THE MOST RECENT REAGENT (CuF) FOR STIMULATION OF NO SYNTHESIS BY THE MEDICINAL LEECH SALIVARY CELL SECRETION IN THE CULTURES OF HUMAN ENDOTHELIUM CELLS (HUVEC) AND IN RAT CARDIOMIOCYTES

I.P. Baskova¹, A.Yu. Alekseeva¹, S.V. Kostyuk², M.E. Neverova², T.D. Smirnova², N.N. Veiko²

¹Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskye Gory, 1/12, Moscow, 119991 Russia; fax: (495)939-4309; e-mail: saliva1@yandex.ru

²Medical Genetic Research Center, Moscow, 115543 Russia, e-mail: ribgene@rambler.ru

The medicinal leech salivary cell secretion (SCS) may stimulate NO-production in cultures of human endothelium cells (HUVEC) and rat cardiomyocytes (RCM). This effect was detected using a NO specific reagent, - the complex Cu²⁺ with a fluorescein derivative (Cu-Fl). NO had also been detected in the cells by fluorescent electronic microscopy and determined quantitatively in the cells and in culture fluid by the fluorescence method. SCS stimulated NO synthesis in HUVEC cells (but not in RCM) is accompanied by NO release into intercellular space. Localization of NO synthesis centers is presented and it is shown that the increase in NO levels during the SCS action on HUVEC and RCM is associated with the increase in the activity of eNOS/nNOS, but not iNOS. In endothelial cells SCS activates nitrosylation processes, assessed by the increase of nitrite-ions in the culture medium. It is therefore important to use Cu-Fl, other than Griss-reagent, during the first hour of analysis of NO synthesis. The NO-depended mechanism of SCS action on endothelial cells might be a factor in providing of its positive action in hirudotherapy.

Key words: nitric oxide, medicinal leech salivary gland cell secretion, NO-zond Cu-Fl, fluorescent microscopy, transmission electron microscopy, Griss-reagent, NO-synthases.