

МОДУЛЯЦИЯ СЛИЯНИЯ ВЕЗИКУЛЯРНЫХ МЕМБРАН И АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ ДЕЙСТВИИ АЛКАЛОИДА САНГВИНАРИНА И ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА УКРАИН НА МАКРОФАГИ

© Т. П. Моженок, Т. Н. Беляева, Е. А. Леонтьева, М. Д. Фаддеева

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: mozhenok@mail.cytspb.rssi.ru*

Изучено влияние растительного алкалоида сангвинарина и производного полусинтетического препарата Украин, обладающих малигнотоксическим действием, на процесс слияния лизосом с фагосомами (СЛФ) и на содержание фибриллярного актина (Ф-актина) в перитонеальных макрофагах мыши. Изучали также влияние этих веществ на реакцию полимеризации *in vitro* мономерного глобулярного актина (Г-актина) из мышц кролика. Показано, что и сангвинарин, и Украин вызывают стимуляцию слияния лизосом с фагосомами и повышают содержание полимеризованной фибриллярной формы актина в макрофагах мыши. Обнаружено, что действие этих веществ зависит от их концентрации и усиливается при ее повышении. И сангвинарин, и Украин индуцируют *in vitro* полимеризацию глобулярного актина из мышц кролика. Обсуждается модулирующая роль сангвинарина и Украина при взаимодействиях внутриклеточных везикулярных мембран в СЛФ, а также в процессах полимеризации актина и реорганизации цитоскелета. Предполагается, что эти агенты могут влиять на процессы мембранного транспорта веществ в клетках.

Ключевые слова: слияние лизосом с фагосомами, цитоскелет, Г-актин, Ф-актин, полимеризация, сангвинарин, Украин.

Широкое развитие исследований механизмов различных этапов эндоцитоза, подробная характеристика свойств компартментов клетки, вовлеченных в этот процесс, создают основу для методов направленного введения в клетку ряда биологически активных соединений (БАС) и лекарственных препаратов, а также трансфекции генов и их последующей экспрессии при лечении ряда наследственных и приобретенных заболеваний. Эндоцитоз необходим также для деградации эндонуклеиновых кислот и белков в лизосомах, при апоптозе и в других процессах катаболизма (Valenti et al., 1999; Freire-de-Lima et al., 2000; Nuzzo et al., 2000; Reddien, Horwitz, 2000; Cossart, Sansonetti, 2004; Smith, Helenius, 2004).

Слияние мембран является важнейшим процессом при взаимодействии компартментов клетки, входящих в состав вакуолярного аппарата. Исследования эндо- и экзоцитоза позволяют предполагать, что в основе процесса слияния внутриклеточных мембран лежит общий механизм.

Слияние лизосом с фагосомами (СЛФ) является ключевым этапом эндоцитоза (фагоцитоза); образующиеся при этом фаголизосомы осуществляют деградацию содержащихся в эндосомах мембран и макромолекул, а также микроорганизмов и вирусов (Cossart, Sansonetti, 2004; Sibley, 2004; Smith, Helenius, 2004; Walburger et al., 2004). Однако до сих пор мало изучены механизмы влияния на процесс слияния различных БАС и участие элементов цитоскелета в СЛФ. Изменение со-

стояния клеточных мембран при формировании реакций клеток на действие БАС отмечены многими исследователями. В ряде случаев изменение микровязкости в липидном бислое клеточных мембран является промежуточным этапом в формировании клеточной реакции (Kielian, Cohn, 1980, 1982; Klappe et al., 1986; Lucy, 1987). Цитоскелет также играет важную роль в эндоцитозе (Durbach et al., 1996; Riezman et al., 1996; Jahraus et al., 1998; Zhang et al., 2002; Cossart, Sansonetti, 2004; Kjekken et al., 2004; Lanzetti et al., 2004; Sibley, 2004). По нашим данным, ряд химических соединений стимулирует СЛФ в макрофагах и полимеризацию Г-актина *in vitro*. Напротив, агенты, ингибирующие СЛФ, снижают содержание Ф-актина в клетке (Булычев, Моженок, 1996). В настоящем исследовании изучали влияние растительного бензофенантридинового алкалоида сангвинарина и лекарства Украин, полученного на основе этого и родственных алкалоидов, на СЛФ, а также на содержание Ф-актина в перитонеальных макрофагах мыши и полимеризацию мышечного актина кролика.

Бензо[с]фенантридиновый алкалоид сангвинарин обладает значительной биологической и малигнотоксической активностью. Было показано, что катионы сангвинарина способны: 1) интеркалировать в двухспиральные ДНК и РНК и ингибировать при этом реакции, протекающие на ДНК и РНК, в качестве матрицы или субстрата; 2) нарушать синтез АТФ в митохондриях благодаря нейтрализации отрицательных зарядов внешней стороны внутренних мембран митохондрий, возникающих при их

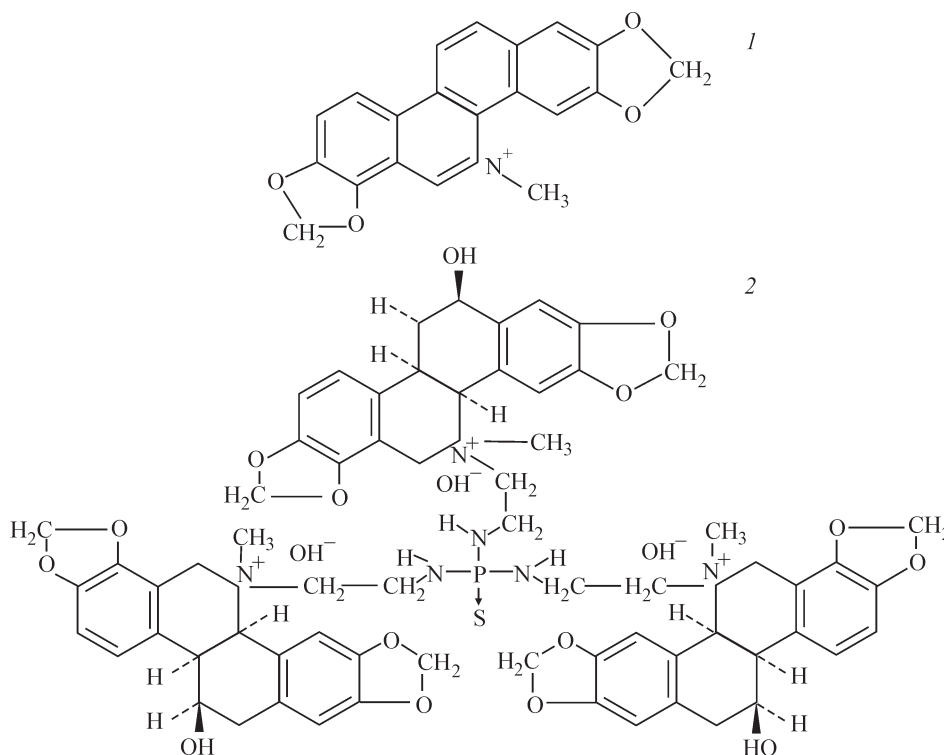


Рис. 1. Структурные формулы сангвинарина (1) и Украина (2).

Fig. 1. Structural formulas of sanguinarine (1) and Ukrain (2).

энергизации; 3) модифицировать тиоловые группы органических соединений, включая ферменты и другие белки, благодаря реакции нуклеофильного замещения при взаимодействии тиоловых групп органических соединений с иминной группой четвертичного катиона сангвинарина (Фаддеева, Беляева, 1997). Что касается ферментов лизосом, то было показано, что тиолзависимые кислая фосфатаза, β -галактозидаза и N-ацетил- β ,D-глюкозаминидаза дозозависимо ингибируются сангвинарином. Кроме того, установлено, что сангвинарин накапливается в лизосомной фракции клеток LSM (Belyaeva et al., 2003).

Лекарственный препарат Украин ($C_{66}H_{75}N_6O_{18}PS \cdot 6HCl$) представляет собой конъюгат суммы алкалоидов, выделенных из чистотела большого *Chelidonium majus* L., с тиофосфорной кислотой (Nowicky, 1990; Liepins, Nowicky, 1996). Этот полусинтетический препарат получен в кристаллической форме Я. В. Новицки. Используется его водный раствор (Liepins et al., 1996). Было показано, что Украин обладает значительным малигнотоксическим действием. Препарат был изучен *in vitro* в Национальном раковом институте (NCI) в США на 60 различных клеточных линиях малигнизированных клеток, представляющих собой 8 основных разновидностей опухолей человека. Для всех изученных клеточных линий препарат показал значительный цитотоксический эффект. При этом в концентрациях, вызывающих 100%-ное ингибирование роста этих клеток, Украин не оказывал повреждающего влияния на рост и жизнеспособность нормальных эпителиальных клеток пупочной вены и фибробластов человека *in vitro* (Новицки, 1993; Nowicky et al., 1993). Основными механизмами, вызывающими подобное действие Украина, являются, по-видимому, индукция апоптоза малигнизированных клеток

при действии этого агента (Liepins et al., 1996), а также модуляция цитолитической активности иммунных эффекторных клеток (Liepins, Nowicky, 1996). Структурные формулы сангвинарина и Украина приведены на рис. 1. Формула препарата Украин приводится из: Susak et al., 1996.

В работе будет выявлено влияние описанных агентов на слияние везикулярных мембран и состояние актинового цитоскелета.

Материал и методика

СЛФ изучали в макрофагах из перитонеальной жидкости мышей линии СС57 Black/6. Подробно методика наблюдения и количественной оценки СЛФ описана в нашей предыдущей работе (Моженко и др., 1991).

Содержание Ф-актина в перитонеальных макрофагах определяли по известной методике (Foulstich, Zobeley, 1988), используя фаллоидин-ФИТЦ, который специфически связывается с Ф-актином. Интенсивность флуоресценции фаллоидин-ФИТЦ измеряли на инвертированном микроскопе ICM (Opton). Флуоресценцию возбуждали светом ртутной лампы НВО-100 в области 450—490 нм и регистрировали в области 520 нм. Достоверность различий средних величин количества фаголизосом и Ф-актина в макрофагах оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Г-актин получали из мышц кролика по модифицированному методу Штрауба (Katz, Hall, 1963). Всю препаративную работу проводили при 2—4 °С. Раствор актина готовили каждый раз в день опыта. Навеску ацетонового порошка заливали 20-кратным количеством буферного раствора, содержащего 3 мМ цистеина, 0,05 мМ АТФ,

1 мМ Трис-буфера, pH 8.0. Смесь размешивали в течение 30 мин, фильтровали через пористый фильтр и полученный раствор разбавляли буфером до содержания белка 0.8—1.2 мг/мл. Полимеризацию Г-актина вызывали добавлением к раствору белка КС1 до конечной концентрации 0.1 М. В опытах с сангвинарином и Украином их вводили в раствор белка за 20 мин до внесения КС1. За ходом полимеризации следили по увеличению вязкости раствора. Относительную вязкость определяли с помощью вискозиметра типа Оствальда емкостью 1.72 мл при 22 °С. Измерения вязкости проводили каждые 5 мин. Содержание белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

В работе использовали следующие химические агенты: ФИТЦ-фаллоидин, АТФ, цистеин и Трис-(оксиметил)-аминометан (Sigma, США); сангвинарин (Aldrich, США); Украин (Nowicky Pharma, Австрия).

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены данные о влиянии сангвинарина и Украина на количество фаголизосом, образовавшихся в макрофагах в результате слияния мембран лизосом и фагосом. Из этих данных отчетливо видно, что сангвинарин и Украин оказывают стимулирующий эффект, причем величина этого эффекта зависит от концентрации агентов. Наиболее сильное влияние на СЛФ оказывают сангвинарин в концентрации 10 мкМ и Украин в концентрации 5 мкМ. Среди выявленных к настоящему времени факторов, влияющих на СЛФ, большую роль играют целостность лизосомной мембраны, величина и знаки зарядов на поверхности мембран органоидов после их взаимодействия с агентами, текучесть мембранных липидов и состояние компонентов цитоскелета (Лусу, 1987; Булычев, Моженко, 1996; Durbach et al.,

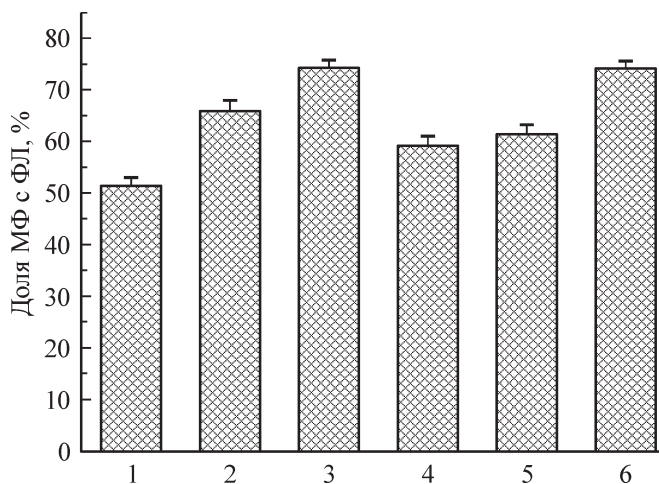


Рис. 2. Влияние сангвинарина и Украина на СЛФ в перитонеальных макрофагах мыши.

1 — контроль, 2 — сангвинарин (5 мкМ), 3 — сангвинарин (10 мкМ), 4 — Украин (1 мкМ), 5 — Украин (2.5 мкМ), 6 — Украин (5 мкМ). МФ — макрофаги, ФЛ — фаголизосомы.

Fig. 2. Effects of sanguinarine and Ukrain on lysosome-phagosome fusion in mouse peritoneal macrophages.

1 — control, 2 — sanguinarine (5 μM), 3 — sanguinarine (10 μM), 4 — Ukrain (1 μM), 5 — Ukrain (2.5 μM), 6 — Ukrain (5 μM). МФ — macrophages, ФЛ — phagolysosomes.

1996; Fujimoto et al., 2000; Dermine et al., 2001; Lanzetti et al., 2004; Sasaki et al., 2004).

Умеренно гидрофобные катионы сангвинарина растворяются и в воде, и в липидах, что способствует их проникновению в клетки. Будучи слабым катионом в водных растворах ($pK_a \sim 8$ при физиологических условиях), сангвинарин представляется типичным лизосомотропным агентом и накапливается в лизосомах (Belyaeva et al., 2003). При этом он ингибирует ферментативную активность многих катаболических лизосомных ферментов. Катионы сангвинарина могут изменять заряд лизосомной мембраны. Молекулы сангвинарина в нейтральной форме также взаимодействуют с мембранами. Было показано, что незаряженная форма сангвинарина образует каналы в липидных бислоях мембран эритроцитов человека (Cala et al., 1982). В таких мембранных органеллах, как митохондрии, катионы сангвинарина накапливаются на внешней стороне энергизованных внутренних мембран и нейтрализуют отрицательные заряды, которые появляются при энергизации, препятствуя тем самым синтезу АТФ (Беляева, Фаддеева, 1995). Способность иминной группы катиона сангвинарина к реакции нуклеофильного замещения с такими нуклеофилами, как тиоловые группы многих органических соединений, включая ферменты и другие белки, приводит к ингибированию сангвинарином ферментативной активности многих тиолзависимых мембрано-связанных АТФаз, включая катион-транспортные АТФазы (Фаддеева, Беляева, 1988, 1997). Наблюдаемая нами в настоящей работе модификация СЛФ в макрофагах может объясняться с учетом приведенных выше активностей сангвинарина. По-видимому, под его воздействием изменяются заряды везикулярных мембран, увеличивается текучесть липидов и меняется активность мембранных АТФаз, участвующих в СЛФ. Украин оказывает на СЛФ эффект, подобный сангвинарину.

Процесс слияния лизосом с фагосомами играет большую роль в процессах эндоцитоза. При этом важным оказывается также состояние цитоскелета, которое определяет, куда будет направлено внутриклеточное везикулярное движение. Методами флуоресцентной и электронной микроскопии Сайто и соавторами (Saito et al., 1994) было показано, например, значение полимеризации актина в фагоцитозе с использованием деполимеризующего агента микололида В (морской токсин). Обнаружено, что в альвеолярных макрофагах мыши различные элементы цитоскелета принимают участие в транспорте фагосом разного размера: малые фагосомы (0.9 мкм) двигаются с помощью микротрубочек; большие фагосомы — с помощью актиновых филаментов, и они часто окружены тонкой сетью актиновых филаментов (Araki, Ogawa, 1988). Во многих исследованиях с применением различных модулирующих агентов указывается на важную роль актина во взаимодействии фагосом с органеллами эндоцитоза (Defacque et al., 2000; Jahgaus et al., 2001; Southwick et al., 2003). В лаборатории М. Дежардена (Dermine et al., 2001) на макрофагах линии J774 методами биохимии и иммунной флуоресценции выявлено, что фагосомы сливаются и двигаются в клетке вдоль актиновых филаментов и микротрубочек и что в определенных местах (lipid raft domains) на мембранах этих органелл происходит аккумуляция актина и его полимеризация. Было интересно поэтому выяснить, как влияют сангвинарин и Украин на содержание Ф-актина в макрофагах.

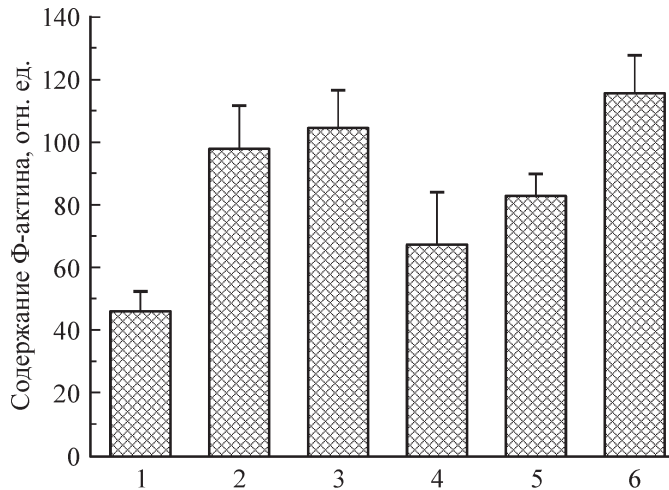


Рис. 3. Влияние сангвинарина и Украина на содержание Ф-актина в перитонеальных макрофагах мыши.

1 — контроль, 2 — сангвинарин (5 мкМ), 3 — сангвинарин (10 мкМ), 4 — Украин (1 мкМ), 5 — Украин (2.5 мкМ), 6 — Украин (5 мкМ).

Fig. 3. Effects of sanguinarine and Ukrain on F-actin content in mouse peritoneal macrophages.

1 — control, 2 — sanguinarine (5 μM), 3 — sanguinarine (10 μM), 4 — Ukrain (1 μM), 5 — Ukrain (2.5 μM), 6 — Ukrain (5 μM).

На рис. 3 представлены данные, показывающие увеличение содержания фибриллярного, полимеризованного актина в макрофагах при действии на них сангвинарина и Украина. Как видно на рис. 3, этот эффект является дозозависимым. Содержание Ф-актина в макрофагах повышается более чем в 2 раза. Одним из объяснений этого влияния на актиновый цитоскелет может быть тот факт, что процессы полимеризации компонентов цитоскелета (актина в фибриллы и тубулина в микротрубочки) взаимосвязаны. Так, было показано, что ингибитор полимеризации тубулина колцемид вызывает распад микротрубочек и одновременное увеличение содержания Ф-актина в 3 раза в единичных ХТН-2 клетках (Karl, Vegeiter-Nahn, 1998). Колхицин разрушает микротрубочки и увеличивает содержание Ф-актина в Swiss 3T3 фибробластах, причем это действие зависит от дозы и времени действия колхицина на клетки. Многие другие агенты, разрушающие микротрубочки, действуют подобно колхицину. В то же время агент таксол, стабилизирующий микротрубочки, ингибирует полимеризацию Г-актина, вызванную агентами, разрушающими микротрубочки (Jung et al., 1997). Что касается сангвинарина, то он в качестве антимиотического агента был известен еще до открытия тубулина. Далее было показано, что сангвинарин и его близкий химический аналог алкалоид хелеритрин являются ингибиторами (не очень активными) образования ансамбля микротрубочек. Эти агенты ингибируют процесс добавления тубулиновых димеров к растущему концу микротрубочек за счет образования комплексов этих алкалоидов с тубулином. Видимо, такие комплексы образуются за счет тиоловых групп тубулина (димер тубулина содержит 18 тиоловых групп) и иминной группы в катионах этих алкалоидов (Wolff, Knipling, 1993). Увеличение содержания Ф-актина в макрофагах можно поэтому объяснить тем, что, вызывая распад микротрубочек подобно колхицину, колцемиду и другим агентам, дестабилизирующим микротрубочки и ингибирующим полимеризацию Г-актина, сангвинарин может

индуцировать переход Г-актина в полимерное состояние. Как видно на рис. 3, Украин оказывает подобный эффект. Интересно отметить, что дигидропроизводное сангвинарина — алкалоид хелидонин, также входящий в состав сока чистотела, — ингибирует полимеризацию тубулина и образование микротрубочек (Panzer et al., 2001).

Что касается влияния сангвинарина и Украина на полимеризацию Г-актина *in vitro* (рис. 4, 5), то видно, что вязкость раствора Г-актина под влиянием этих агентов увеличивается еще до введения в раствор KCl. Как известно, катионы K^+ катализируют реакцию полимеризации Г-актина, как и многие другие моно- и двухвалентные катионы (Colombo et al., 1991). По-видимому, сангвинарин способен к взаимодействию с молекулами мономерного актина, в частности с тиоловыми группами актина. Очищенный актин имеет шесть остатков цистеина (Wang et al., 2001), причем особенно реактивна тиоловая группа Cys-374. Этот цистеиновый остаток расположен в маленьком узком кармане актиновой молекулы вблизи ее С-конца (Sasaki et al., 1994). По-видимому, взаимодействие сангвинарина с актином приводит к конформационным изменениям в молекуле актина, способствующим активации молекул актина (нуклеации) и дальнейшей их полимеризации. Как видно на рис. 5, Украин оказывает действие, подобное сангвинарину.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что сангвинарин и Украин стимулируют СЛФ, повышают содержание Ф-актина в перитонеальных макрофагах мыши и индуцируют полимеризацию Г-актина, выделенного из мышц кролика. Можно предположить, что эти вещества могут стимулировать эндоцитоз. На-

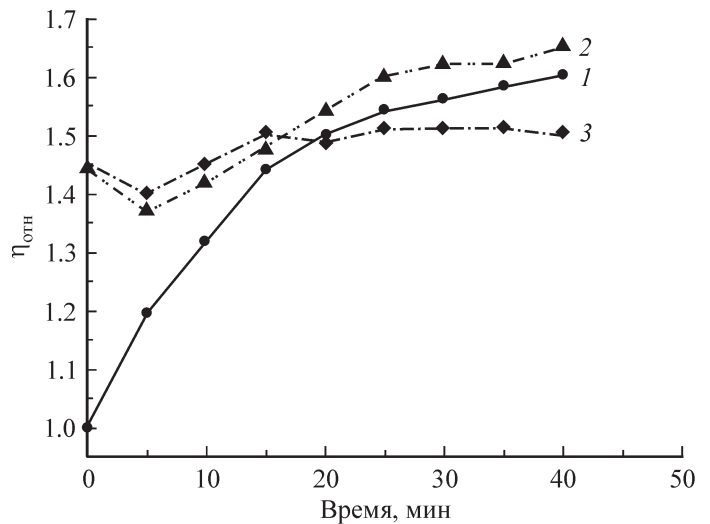


Рис. 4. Влияние сангвинарина на относительную вязкость раствора актина после добавления KCl и сангвинарина.

1 — KCl (100 мМ; контроль), 2 — сангвинарин (5 мкМ) и KCl (100 мМ), 3 — сангвинарин (10 мкМ) и KCl (100 мМ). Перед добавлением KCl раствор Г-актина в буфере выдерживали с сангвинарином в течение 20 мин. $\eta_{отн}$ — относительная вязкость. Каждая точка — среднее значение из 5—7 определений.

Fig. 4. The influence of sanguinarine on relative viscosity of actin solution after addition of KCl and sanguinarine.

1 — KCl (100 mM; control), 2 — sanguinarine (5 μM) and KCl (100 mM), 3 — sanguinarine (10 μM) and KCl (100 mM). G-actin solution in buffer was kept with sanguinarine for 20 min before KCl was added to G-actin solution. $\eta_{отн}$ — relative viscosity. Every point shows the mean quantity from 5—7 assays.

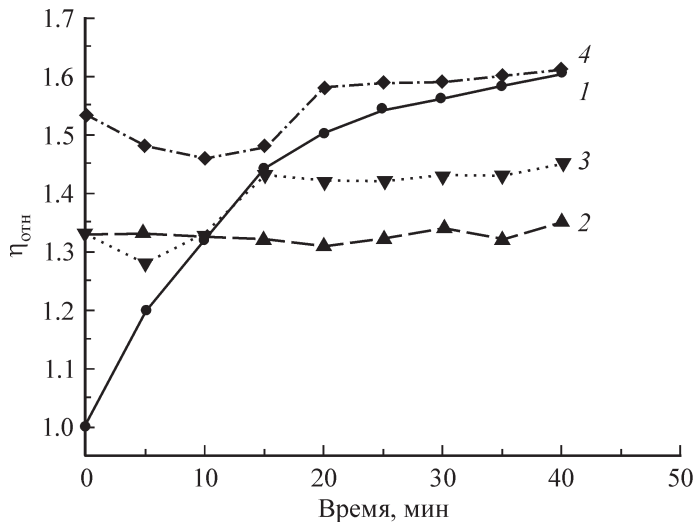


Рис. 5. Влияние Украина на относительную вязкость раствора актина после добавления KCl и Украина.

1 — KCl (100 мМ; контроль), 2 — Украин (1 мкМ) и KCl (100 мМ), 3 — Украин (2.5 мкМ) и KCl (100 мМ), 4 — Украин (5 мкМ) и KCl (100 мМ). Перед добавлением KCl раствор Г-актина в буфере выдерживали с Украином в течение 20 мин. $\eta_{отн.}$ — относительная вязкость. Каждая точка — среднее значение из 5—7 определений.

Fig. 5. The influence of Ukrain on relative viscosity of actin solution after addition of KCl and Ukrain.

1 — KCl (100 mM; control), 2 — Ukrain (1 μ M) and KCl (100 mM), 3 — Ukrain (2.5 μ M) and KCl (100 mM), 4 — Ukrain (5 μ M) and KCl (100 mM). G-actin solution in buffer was kept with Ukrain for 20 min before KCl was added to G-actin solution. $\eta_{отн.}$ — relative viscosity. Every point shows the mean quantity from 5—7 assays.

пример, есть данные о том, что природные полиамины (спермин, спермидин и путресцин) значительно индуцируют полимеризацию актина в опытах *in vitro* (Oriol-Audit, 1978), стимулируют СЛФ и повышают содержание Ф-актина в перитонеальных макрофагах мыши (Моженок и др., 1990). Также показана положительная корреляция между содержанием полиаминов и интенсивностью эндоцитоза в этих клетках (Schuber, 1989). Напротив, агенты, которые вызывают реорганизацию микрофиламентов или препятствуют полимеризации актина, ингибируют эндоцитоз (Бульчев, Моженок, 1996). Например, латранкулин А (токсин красной морской губки) препятствует полимеризации актина и ингибирует эндоцитоз (De Oliveira, Mantovani, 1988). Подобные исследования продолжаются и в последнее время (Sasaki et al., 2004). Можно полагать, что сангвинарин и Украин, модифицируя везикулярные мембраны, степень полимеризации актина и стимулируя СЛФ, могут влиять на процессы мембранного транспорта в клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49394а) и программы С.-Петербургского научного центра РАН на 2004 г.

Список литературы

Беляева Т. Н., Фаддеева М. Д. 1995. Нарушение процессов превращения энергии в митохондриях печени крыс под действием сангвинарина и АФМА. Цитология. 37 (3) : 237—248.

Бульчев А. Г., Моженок Т. П. 1996. Вакуолярный аппарат и слияние мембран в клетке. Цитология. 38 (10) : 1001—1035.

Моженок Т. П., Браун А. Д., Бульчев А. М. 1990. Влияние полиаминов на слияние лизосом с фагосомами в перитонеальных макрофагах мышей. Цитология. 32 (9) : 882—887.

Моженок Т. П., Бульчев А. Г., Браун А. Д. 1991. Действие некоторых полианионов, катионных и анионных красителей, неэлектролитов на слияние лизосом с фагосомами в перитонеальных макрофагах мышей. Цитология. 33 (4) : 65—69.

Новицкий Я. В. 1993. Биологические свойства Украина в экспериментальных и клинических условиях. Междунар. мед. обзоры. 1 (1) : 5—10.

Фаддеева М. Д., Беляева Т. Н. 1988. Ингибирование активности мембранно-связанной Ca^{2+} -АТФазы фрагментов саркоплазматического ретикулама скелетных мышц кролика алкалоидом сангвинарином. Цитология. 30 (6) : 685—690.

Фаддеева М. Д., Беляева Т. Н. 1997. Сангвинарин и эллиптицин: цитотоксические алкалоиды, выделенные из известных противоопухолевых растений, и внутриклеточные мишени их действия. Цитология. 39 (2/3) : 181—208.

Araki N., Ogawa K. 1988. Regulatory mechanism of lysosomal transformation of nematodolysosomes and wrapping lysosomes by cytoskeleton. J. Histochem. Cytochem. 36 : 863—871.

Belyaeva T., Leontieva E., Shpakov A., Mozhonok T., Faddejeva M. 2003. Sensitivity of lysosomal enzymes to the plant alkaloid sanguinarine: comparison with other SH-specific agents. Cell Biol. Int. 27 : 887—895.

Cala P. M., Norby J. C., Tosteson D. C. 1982. Effects of the plant alkaloid sanguinarine on cation transport by human red blood cells and lipid bilayer membranes. J. Membr. Biol. 64 : 23—31.

Colombo R., Milzani A., Donne I. D. 1991. Lithium increases actin polymerization rates by enhancing the nucleation step. J. Mol. Biol. 217 : 401—404.

Cossart P., Sansonetti P. J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science. 304 : 242—248.

Defacque H., Edeberg M., Antzberger A., Ansoerge W., Way M., Griffiths G. 2000. Actin assembly induced by polylysine beads or purified phagosomes: quantitation by a new flow cytometry assay. Cytometry. 41 : 46—54.

De Oliveira C. A., Mantovani B. 1988. Latrunculin A is a potent inhibitor of phagocytosis by macrophages. Life Sci. 43 : 1825—1830.

Dermine J.-F., Duclos S., Garin J., St-Louis F., Rea S., Parton R. G., Desjardins M. 2001. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. J. Biol. Chem. 276 : 18 507—18 512.

Durbach A., Louvard D., Coudrier N. 1996. Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. J. Cell Sci. 109 : 457—465.

Faulstich H., Zobeley S. 1988. Fluorescent phallotoxins as probes for filamentous actin. J. Muscle Res. Cell Motil. 9 : 370—383.

Freire-de-Lima C., Nascimento D., Soares M., Bozza P., Castro-Faria-Neto H., de Mello F., Dos Reis G., Lopes M. 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of pathogenic trypanosome in macrophages. Nature. 403 : 199—203.

Fujimoto L. M., Roth R., Heuser J. E., Schmid S. L. 2000. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. Traffic. 1 : 161—171.

Jahraus A., Egeberg M., Hinner B., Habermann A., Sackmann E., Pralle A., Faulstich H., Rybin V., Defacque H., Griffiths G. 2001. ATP-dependent membrane assembly of F-actin facilitates membrane fusion. Mol. Biol. Cell. 12 : 155—170.

Jahraus A., Tjelle T. E., Berg T., Habermann A., Storrie B., Ullrich O., Griffiths G. 1998. *In vitro* fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. J. Biol. Chem. 273 : 30 379—30 390.

Jung H. I., Shin I., Park Y. M., Kang K. W., Ha K. S. 1997. Colchicine activates actin polymerization by microtubule depolymerization. Mol. Cells. 7 : 431—437.

Karl I., Bereiter-Hahn J. 1998. Cell contraction caused by microtubule disruption is accompanied by shape changes and incre-

ased elasticity measured by scanning acoustic microscopy. *Cell Biochem. Biophys.* 29 : 225—241.

Katz A., Hall E. 1963. Actin from heart muscle: isolation, purification and physicochemical properties. *Circulat. Res.* 13 : 187—198.

Kielian M., Cohn Z. A. 1980. Phagosome-lysosome fusion. Characterization of intracellular membrane fusion in mouse macrophages. *J. Cell Biol.* 85 : 754—765.

Kielian M., Cohn Z. A. 1982. Intralysosomal accumulation of polyanions. II. Polyanion internalization and its influence on lysosomal pH and membrane fluidity. *J. Cell Biol.* 93 : 875—882.

Kjeken R., Egeberg M., Habermann A., Kuehnel M., Peyron P., Floetenmeyer M., Waltner P. et al. 2004. Fusion between phagosomes, early and late endosomes: a role for actin in fusion between late, not early endocytic organelles. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 345—358.

Klappe K., Wilschut J., Nir S. H., Hoekstra D. 1986. Parameters affecting fusion between Sendai virus and lysosomes. Role of viral proteins, liposomal composition and pH. *Biochemistry.* 25 : 8252—8260.

Lanzetti L., Palamidessi A., Areces L., Scita G., Di Fiore P. P. 2004. Rab 5 is a signaling GTPase involved in actin remodeling by receptor tyrosine kinases. *Nature.* 429 : 309—314.

Liepins A., Nowicky J. W. 1996. Modulation of immune effector cell cytotoxic activity and tumour growth inhibition *in vivo* by ukrain (NSC 631570). *Drugs Exp. Clin. Res.* 22 (Suppl.) : 31—41.

Liepins A., Nowicky J. W., Bustamante J. O., Lam E. 1996. Induction of programmed cell death in malignant cells by the derivative ukrain (NSC-631570). *Drugs Exp. Clin. Res.* 22 (Suppl.) : 1—7.

Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265—275.

Lucy J. A. 1987. Fusion-fusion reaction in biological membranes and in phospholipid bilayers. In: *Biomembrane and receptor mechanism.* Berlin: Springer Verlag. 163—176.

Nowicky J. W., Nowicky W., Liepins A. 1993. Cytostatic and cytotoxic effects of ukrain on malignant cells. *J. Chemother.* 5 (Suppl. 1) : 797—800.

Nowicky W. 1990. Unated States Patent: 4, 970, 212 USA.

Nuzzo M. R., Sanges A., Folgore C., Carratelli R. 2000. Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 27 : 235—240.

Oriol-Audit C. 1978. Polyamine-induced actin polymerization. *J. Biochem.* 87 : 371—376.

Panzer A., Joubert A. M., Bianchi P. C., Hamel E., Seevers J. C. 2001. The effects of chelidonine on tubulin polymerization, cell cycle progression and selected signal transmission pathways. *Eur. J. Cell Biol.* 80 : 111—118.

Reddien P. W., Horwitz R. H. 2000. CED-2/Crk II and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biol.* 2 : 131—136.

Riezman H., Munn A., Geli M. L., Hicke L. 1996. Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis. *Experientia.* 52 : 1033—1041.

Saito S., Watanabe S., Ozaki H., Fusetani N., Karaki H. 1994. Mycalolide B, a novel actin depolymerizing agent. *J. Biol. Chem.* 269 : 29 710—29 714.

Sasaki H., Ozaki H., Karaki H., Nonomura Y. 2004. Actin filaments play an essential role for transport of nascent HIV-1 proteins in host cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 : 588—593.

Sasaki Y., Tsunomori F., Yamashita T., Horie K., Ushiki H., Ishikawa R., Kohama K. 1994. Local environmental change from the G- to F-form of the actin molecule detected on anisotropy decay measurement. *J. Biochem. (Tokyo).* 116 : 236—238.

Schuber F. 1989. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem. J.* 260 : 1—10.

Sibley L. D. 2004. Intracellular parasite invasion strategies. *Science.* 304 : 248—253.

Smith A. E., Helenius A. 2004. How viruses enter animal cells. *Science.* 304 : 237—241.

Southwick F. S., Li W., Zhang F., Zeile W. L., Purich D. L. 2003. Actin-based endosome and phagosome rocketing in macrophages: activation by the secretagogue antagonists lanthanum and zinc. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 54 : 41—55.

Susak Y. M., Zemskov V. S., Yaremchuk O. Y., Kravchenko O. B., Yatsyk I. M., Korsh O. B. 1996. Comparison of chemotherapy and X-ray therapy with ukrain monotherapy for colorectal cancer. *Drugs Exp. Clin. Res.* 22 (Suppl.) : 43—50.

Valenti P., Greco R., Pitari G., Rossi P., Ajello M., Malino G., Antonioni G. 1999. Apoptosis of Caco-2 intestinal cells invaded by *Listeria monocytogenes*: protective effect of lactoferrin. *Exp. Cell Res.* 250 : 197—202.

Walburger A., Koul A., Ferrari G., Nguyen L., Prescianotto-Baschong C., Huygen K., Klebl B., Thompson C., Bacher G., PETERS J. 2004. Protein kinase C from pathogenic Mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science.* 304 : 1800—1804.

Wang J., Boja E. S., Tan W., Tekle E., Fales H. M. et al. 2001. Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J. Biol. Chem.* 276 : 47 763—47 766.

Wolff J., Knipling L. 1993. Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry.* 32 : 13 334—13 339.

Zhang F., Soutwick F. S., Purich D. L. 2002. Actin-based phagosome motility. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 53 : 81—88.

Поступила 21 III 2005

MODULATION OF VESICULAR MEMBRANE FUSION AND OF ACTIN CYTOSKELETON IN MOUSE MACROPHAGES INDUCING BY ALKALOID SANGUINARINE AND A DERIVATIVE DRUG UKRAIN

T. P. Mozhenok, T. N. Belyaeva, E. A. Leontieva, M. D. Faddejeva

Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg;
e-mail: mozhenok@mail.cytspb.rssi.ru

A study was made of modulations of lysosome-phagosome fusion process and of fibrillar actin content in mouse peritoneal macrophages by an antitumor alkaloid sanguinarine and a derivative drug Ukrain. In addition, effects of these substances on *in vitro* polymerization of monomeric globular actin from rabbit muscle were investigated. Sanguinarine and Ukrain stimulated lysosome-phagosome fusion and increased the content of polymerized fibrillar form of actin in mouse macrophages. Effects of these substances were enhanced at their higher concentrations. Both sanguinarine and Ukrain induced *in vitro* polymerization of globular actin from rabbit muscle. A possible role of sanguinarine and Ukrain in changing vesicular membrane states during intracellular membrane interaction in lysosome-phagosome fusion process was discussed. The influence of these substances on actin polymerization and actin cytoskeleton rearrangement was evaluated. It could be supposed that sanguinarine and Ukrain may alter intracellular membrane transport.