

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ РАЗЛИЧИЙ ДЕТЕРГЕНТ-УСТОЙЧИВЫХ МЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РАЗНЫХ КЛЕТОК И ИССЛЕДОВАННЫХ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© С. Н. Плескова,^{1,2,*} Е. Н. Айбек,¹ Э. Бурило,¹ Э. Лесниевска¹

¹Лаборатория Карно междисциплинарных исследований в Бургундии
Бургундского университета, Дижон, Франция, 21000, и

²Научно-образовательный центр «Физика твердотельных наноструктур»

Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950;

* электронный адрес: pleskova@mail.ru

Планарные рафты и кавеолы являются специфическими мембранными кластерами, которые содержат высокие концентрации холестерина и липидов, состоящих из насыщенных жирных кислот. Эти кластеры устойчивы к детергентам и обозначаются как детергент-устойчивые мембранные домены (ДМД). Их морфология и размеры были изучены методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Размер планарных рафтов, экстрагированных либолом WX из моноцитов здоровых доноров, составляет 150.6 ± 68.6 нм в диаметре и 5.7 ± 2.9 нм в высоту, размер кавеол — 87.3 ± 46.1 нм в диаметре и 9.4 ± 5.4 нм в высоту. Были найдены значительные различия по величине и морфологии между ДМД, изолированными из моноцитов здоровых доноров и пациентов, страдающих инфарктом миокарда, а также между ДМД моноцитов и эндотелиальных клеток. Динамика морфологии выделенных планарных рафтов и кавеол свидетельствует о том, что они достаточно быстро агрегируют при хранении, поэтому для оценки реального размера и морфологии ДМД их необходимо исследовать сразу после выделения.

Ключевые слова: планарные рафты, кавеолы, морфология, размеры, атомно-силовая микроскопия.

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, ДМД — детергент-устойчивые мембранные домены, ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ИМ — инфаркт миокарда, ЭКПВЧ — эндотелиальные клетки пупочной вены человека.

Асимметрия мембран играет ключевую роль в сохранении и поддержании клеточного гомеостаза. Функциональные реакции клеток во многом обусловлены рафтами (микродоменами) — высокодинамичными структурами липидного бислоя мембран, которые характеризуются особым липидным и белковым составом с преобладанием холестерина, сфинголипидов и специфических трансмембранных белков (Kogade, Kenworthy, 2008). Показано участие рафтов в таких процессах, как сборка сигнальных молекул (Sheets et al., 1999; Drevot et al., 2002; Gohlke et al., 2010), регуляция ионных каналов и передача импульсов в нервной системе (Dart, 2010; Levitan et al., 2010), текучесть мембраны и скорость движения мембранных белков (Melser et al., 2011). Кроме того, рафты регулируют физиологические и патофизиологические процессы на клеточном уровне. В ряде случаев они способствуют реализации защитных механизмов (Marin et al., 2012), в других, напротив, повышают чувствительность клеток к инвазии (Huang et al., 2011). На рафтовых платформах могут собираться сигнальные комплексы, которые, связываясь со специфическими лигандами, вызывают пролиферацию клеток (Scuderi et al., 2011; Sowa, 2011), в других случаях в рафтах концентрируются комп-

лексы белков, чувствительных к проапоптотической активации (Gajate et al., 2009; Gajate, Mollinedo, 2011).

Выделяют два варианта рафтов: планарные липидные рафты, которые еще обозначают как «некавеолярные структуры», и рафты, известные как кавеолы (Плескова, Пудовкина, 2013). Планарные рафты имеют специфические морфологические особенности и не образуют инвагинаций (Staubach, Hanisch, 2011), в то время как кавеолы формируются благодаря полимеризации кавеолина — шпилькоподобного пальмитоилированного интегрального мембранного белка, который прочно и стабильно связывается с холестерином (Smart et al., 1999).

Применение детергентов для экстракции рафтов и исследования их *in vitro* является удобной и широко используемой процедурой, позволяющей анализировать структурные и функциональные особенности ДМД. Кроме того, сочетание зонального центрифугирования через градиент сахарозы (после обработки клеток детергентом) с Вестерн-блотингом полезно использовать для определения белков, которые являются специфическими маркерами микродоменов. Такая комбинация методов позволяет анализировать различия между планарными рафтами и кавеолами с высокой точностью (Salvary et al., 2012).

В частности, показано, что использование в качестве детергента либрола WX позволяет максимально сохранить холестерин и сфингомиелин в составе липидных рафтов в отличие от Тритона X-100 и карбоната натрия (Salvary et al., 2012). А использование градиента сахарозы позволяет четко вычленить фракции планарных рафтов и кавеол, обогащенных холестерином и сфингомиелином.

Однако анализ липидов и Вестерн-блоттинг позволяют оценивать лишь биохимический состав ДМД, но не дают представления о морфологии выделенных планарных рафтов и кавеол. Для оценки морфологии ДМД мы использовали метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), который позволяет не только наблюдать клеточные и субклеточные структуры (в том числе рафты) в буфере (в максимально физиологических условиях), но и проводить морфометрию с высокой точностью (Плескова, 2011).

Основной принцип метода АСМ — оценка в процессе сканирования сил межатомных взаимодействий между зондом и образцом. Зонд жестко закреплен на кантилере — упругой балке, отклонения которой регистрируются оптической системой микроскопа. Основными физическими характеристиками кантилеров являются жесткость — k и резонансная частота — f_0 . При прохождении зонда над поверхностью ДМД его взаимодействие с биологическим образцом вызывает изгибание кантилера, которое соответствует топографии исследуемой поверхности. Изгиб или кручение кантилера регистрируется оптической системой микроскопа (лазер, отраженный от кончика кантилера в центр четырехсекционного фотодиода). Этот сигнал регистрируется и корректируется в системе обратной связи. Информация, полученная при прохождении зонда над поверхностью сканируемого объекта, записывается в виде массива, который легко трансформируется в реальное 3D-изображение исследуемого объекта. Поскольку при исследовании поверхности зонд взаимодействует со всеми структурами, конечным результатом сканирования является точная морфология исследуемого объекта. Основным преимуществом АСМ является то, что при разрешении, не уступающем сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, она позволяет изучать клетки и субклеточные структуры в нативной среде (буферах, средах) и таким образом отслеживать живые клетки (либо выделенные субклеточные структуры) и изменение их морфологии в ответ на различные воздействия в режиме реального времени.

В настоящей работе стояли три основные задачи: 1) выявить морфологические различия между планарными рафтами и кавеолами; 2) найти морфологические особенности ДМД моноцитов пациентов, страдающих инфарктом миокарда (ИМ); 3) изучить морфологические особенности планарных рафтов и кавеол, изолированных из разных клеток. Поскольку многие исследователи изучают морфологию ДМД не только в день изоляции, но и спустя 2—3 сут, мы поставили дополнительную методическую задачу проследить изменения морфологии планарных рафтов и кавеол в течение 5—7 сут после выделения при стандартном хранении аликвот при 4 °С.

Материал и методика

Выделение клеток. Моноциты выделяли из венозной крови здоровых доноров в градиенте фикола-гипака (Pharmacia, Швеция), после чего клетки четырёх-

ды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS), добиваясь удаления тромбоцитов. Фракцию моноцитов CD14⁺/CD16⁺ концентрировали с помощью специального набора моноклональных антител (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Германия). Аналогично выделяли моноциты из венозной крови больных ИМ. Использовали кровь пациентов младше 75 лет, у которых впервые диагностировали острый ИМ. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (ЭКПВЧ) выделяли из пуповины обработкой коллагеназой (Roche, Швейцария). Сначала вены отмывали от крови в 150 мл PBS, после чего их наполняли 0.1%-ным раствором коллагеназы (Roche, Швейцария). После инкубации (15 мин, 37 °С) клетки собирали центрифугированием (200 g, 10 мин). Клеточный осадок ресуспендировали в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), содержащей 20 % эмбриональной телячьей сыворотки (Lonza, Verviers, Бельгия), 15 ммоль/л HEPES (Termo Fisher Scientific, США), 2 ммоль/л l-глутамин (Termo Fisher Scientific, США), 100 мг/мл стрептомицин (Invitrogen, США), и переносили на чашки Петри. После формирования равномерного клеточного слоя (при 37 °С и 5 % CO₂) клетки снимали смесь трипсина (Sigma-Aldrich, США) и ЭДТА (1 : 1) и рассевали снова для получения 2-го пассажа. Во всех экспериментах клетки каждого из двух пассажей использовали отдельно.

Выделение ДМД. Планарные рафты и кавеолы выделяли из клеток, находящихся в MBS-буфере (1 мл), с помощью детергента 0.1%-ного либрола — Lubrol WX (Serva, Франция), который вносили в буфер с клетками на льду. Время инкубации 30 мин. После этого проводили гомогенизацию лизата с помощью гомогенизатора (Dounce homogenizer, Sigma-Aldrich, США) и смешивали гомогенизированный лизат с 90%-ным раствором сахарозы до получения конечной концентрации 45 %. После этого проводили зональное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы 45—5 % (20 ч, 39 000 g, SW41, Beckman Coulter, США). В результате центрифугирования было получено 12 фракций, из которых наиболее обогащенными холестерином и сфингомиелином оказались фракции 2 и 5 (см. раздел «Результаты»).

Липидный анализ. Для экстракции липидов к 2 мл полученных рафтов было добавлено 5 мл метанола и 2.5 мл хлороформа, в результате чего сформирована одна фаза. Смесь выдерживали при комнатной температуре с периодическим встряхиванием. Затем для разделения фаз добавляли 7.5 мл хлороформа и 1.75 мл KCl до конечной концентрации 0.2 М. После перемешивания образцы центрифугировали (600 g, 10 мин). Нижнюю фазу хлороформа, содержащую липиды, выпаривали, а осадок повторно растворяли в смеси метанола и хлороформа, после чего анализировали методом тонкослойной хроматографии. Для определения содержания фосфолипидов использовали тиоцианат железа (Enzymatic colorimetric kit, Wako Chemicals, Германия). Для количественного определения холестерина использовали набор Amplex red cholesterol assay kit (Invitrogen, США).

Вестерн-блот-анализ использовали для определения белков в выделенных фракциях. По 6 мкл каждой фракции смешивали с 4× буфером Лэммли для образцов и кипятили (5 мин). Белки разделяли электрофоретически в 12%-ном полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфатнатрия, после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Whatman, США). После блокирования неспецифического связывания (60 мин) 5%-ным сухим молоком в PBS, содержащем 0.1 % тви-

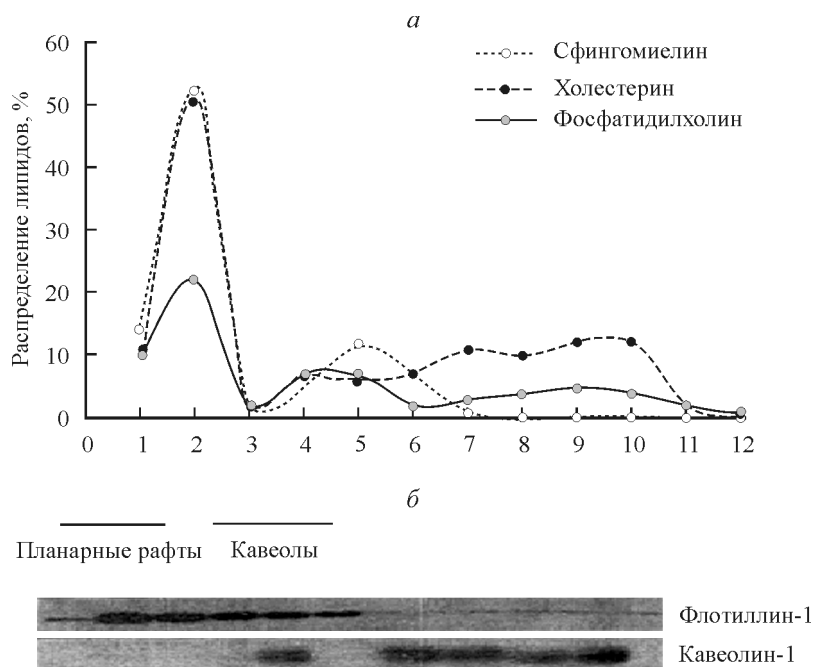


Рис. 1. Распределение сфингомиелина, холестерина и фосфатидилхолина в сепарированных на градиенте сахарозы липидных фракциях (1—12), экстрагированных либролом WX из мембран моноцитов (а), и параллельная оценка содержания флотиллина-1 и кавеолина-1 в этих же фракциях, произведенная методом Вестерн-блоттинга (б).

Соотношение сфингомиелин/фосфатидилхолин максимально во фракциях 2 и 5, для фракции 2 характерно присутствие флотиллина-1, для фракции 5 — кавеолина-1. Фракции 1—3 содержат планарные рафты, фракции 4—6 — кавеолы.

на-20, мембраны инкубировали (18 ч, 4 °С) с моноклональными антителами к флотиллину-1 (Santa Cruz, США) и кавеолину-1 (разведение 1 : 600) (Transduction Laboratories, США), дважды отмывали PBS с твином и инкубировали (60 мин, 4 °С) со вторичными, антимишными или антикроличьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 : 5000) (Santa Cruz, США). Мембрану дважды отмывали PB с твином, после чего проводили иммунодетекцию с помощью ECL detection kit (Amersham, США).

Метод АСМ. Фракции ДМД 2 и 5 (по 20 мкл в PBS) помещали на свежие сколы слюды (RIBM mica, Япония), отделяли верхний слой слюды с помощью скотча. После седиментации и самопроизвольной адсорбции ДМД к слюде (20 мин, 24 °С) исследовали их морфологию с помощью мультимодального АСМ (Nanoscope multimode 8, Bruker). Использовали кантилеверы с характеристиками, максимально удовлетворяющими исследованию ДМД: DNP-S (Bruker) с резонансной частотой $f_0 = 40-75$ кГц и жесткостью $k = 0.4-12$ Н/м.

Статистический анализ. Сравнение дисперсий средних значений контроля и эксперимента проводили с использованием критерия Стьюдента для независимых выборок. Различия между двумя выборками считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Предварительно определяли границы нормального распределения количественных показателей с использованием критерия Шапиро—Уилка. Для статистического анализа использовали программу Origin Pro 8.

Результаты

В результате выделения ДМД при обработке клеток детергентом на льду и последующем зональном центрифугировании было получено 12 фракций. Результаты ис-

следования липидного состава и маркерных белков выделенных фракций представлены на рис. 1. Согласно данным липидного анализа, наиболее обогащенные холестерином и сфингомиелином оказались фракции 2 и 5, кроме того, для фракции 2 соотношения сфингомиелин/фосфатидилхолин и холестерин/фосфатидилхолин были максимальными, что характерно для жидкостноупорядоченных фаз, в частности для рафтов (De Almeda et al., 2003). Для фракции 5 лишь соотношение сфингомиелин/фосфатидилхолин смещалось в сторону сфингомиелина, в то время как содержание холестерина и фосфатидилхолина было одинаковым. Таким образом, при выделении ДМД либролом WX, согласно данным липидного анализа, были получены планарные рафты (фракции 1—3), кавеолы (фракции 4—6) и нерафтовые фракции (с 7-й по 12-ю).

Во всех экспериментах в качестве источника планарных рафтов использовали фракцию 2, а в качестве источника кавеол — фракцию 5, поскольку именно в них обнаружено максимальное соотношение сфингомиелина и фосфатидилхолина, характерное для рафтов. Кроме того, во фракции 2 выявлено максимальное содержание флотиллина-1 (маркерного белка планарных рафтов), а во фракции 5 — максимальное содержание кавеолина-1 (основного маркера кавеол) (рис. 1). Отдельные образцы фракций 2 и 5 наносили на поверхность свежесколотой слюды. Происходила адсорбция ДМД на подложке, однако положение на поверхности различалось для планарных рафтов и кавеол.

Морфология планарных рафтов и кавеол представлена на рис. 2. Для планарных рафтов вследствие плоской структуры было характерно равномерное взаимодействие всех точек их нижней поверхности со слюдой (рис. 2, а), поэтому располагаясь на подложке, они сохраняли плоскую морфологию (рис. 2, а'), однако уже в первый день

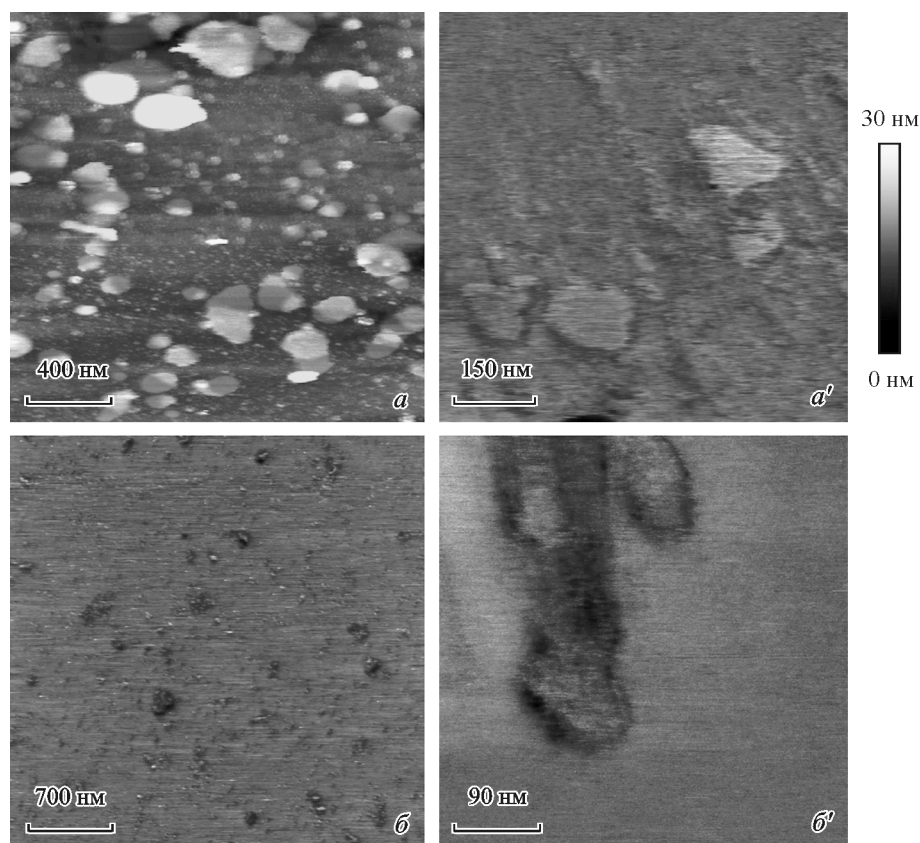


Рис. 2. Морфология планарных рафтов (*a, a'*) и кавеол (*б, б'*) в первый день после выделения из моноцитов.

a, б — большее поле сканирования; *a', б'* — соответственно увеличенное изображение планарных рафтов (плоская форма) и кавеол (колбообразная форма). Скан получен на поверхности слюды методом атомно-силовой микроскопии (Bruker). Шкала высот показывает высоту объектов: более светлые оттенки соответствуют более высоким объектам.

исследования могла наблюдаться некоторая агрегация планарных рафтов (рис. 2, *a*). В случае кавеол присутствие кавеолина-1 обуславливало сохранение колбообразной структуры. Поэтому кавеолы адсорбировались на слюде в двух вариантах: либо опускались боком, формируя морфологию «колбы» (рис. 2, *б'*), либо связывались со слюдой верхней частью, открытой на клетке, формируя морфологию «купола» (см. рис. 4, *в*). В первом случае сканировалась боковая часть кавеолы, во втором — нижняя (инвагинированная в клетку).

Кроме того, проводили морфометрическое исследование ДМД. Определяли два основных параметра — высоту и диаметр. Для определения высоты строили профиль поверхности, ориентированный по направлению сканирования (рис. 3, *a*). В качестве нижней точки («0» по оси *OY*) использовали уровень слюды, в качестве верхней — самую высокую точку ДМД. В случае исследования высоты кавеол для избегания артефактов исследовали высоту только «куполообразных» структур. Для определения диаметра ДМД направление измерения выбирали произвольно, а отсекающие плоскости располагали на полувысоте (рис. 3, *б*) для нивелирования эффекта конволюции.

Морфологически планарные рафты существенно отличаются от кавеол. Во-первых, форма и размеры планарных рафтов варьируют в широком диапазоне, в то время как морфология кавеол достаточно однообразна. Коэффициенты вариации диаметра составляют 0.47 и 0.21 для планарных рафтов и кавеол соответственно. Во-вторых,

средний диаметр планарных рафтов больше, чем у кавеол, в то время как кавеолы выше планарных рафтов (см. таблицу). В-третьих, на увеличенных сканах очевидны морфологические различия между планарными рафтами (рис. 2, *a'*), имеющими плоскую форму, и кавеолами, образующими колбообразные структуры (рис. 2, *б'*).

Сравнение формы и размеров планарных рафтов и кавеол, выделенных из моноцитов здоровых доноров и пациентов, страдающих ИМ, показано на рис. 4. Планарные рафты, выделенные из моноцитов людей, страдающих ИМ, имеют ту же высоту, что и выделенные из моноцитов здоровых доноров: 5.8 ± 1.7 нм ($n = 18, p > 0.05$), но их диаметр существенно меньше: 63 ± 8.2 нм ($n = 18, p < 0.05$) (результаты морфометрии планарных рафтов здоровых доноров представлены в таблице). Достаточно легко определяемы морфологические различия: если у рафтов, изолированных из клеток здоровых доноров, очевидна классическая форма в виде плотов или островков, то у пациентов, перенесших ИМ, преобладают планарные рафты с формой разомкнутого кольца (рис. 4, *б*). Уменьшение размеров в случае ИМ характерно и для кавеол: их высота снижается по сравнению с кавеолами, изолированными из моноцитов здоровых доноров, и составляет 6.6 ± 2.6 нм ($n = 81, p < 0.05$). Для диаметра наблюдается лишь тенденция к снижению — 81.9 ± 37.6 нм ($n = 81, p > 0.05$) (результаты морфометрии кавеол здоровых доноров представлены в таблице). Кавеолы, изолированные из моноцитов пациентов, страдающих ИМ, обнаруживают выраженную тенденцию к агрегации (рис. 4, *з*). Кроме

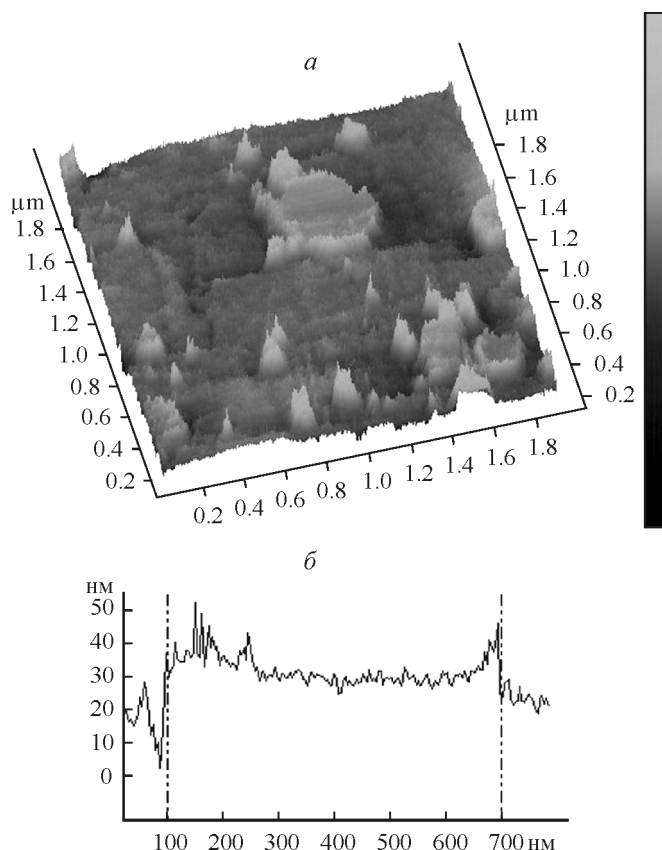


Рис. 3. Морфометрия планарных рафтов: АСМ-скан планарных рафтов на 5-е сут исследования (а) и профиль планарного рафта, в котором сечение ориентировано по направлению сканирования (б).

Отсекающие плоскости обозначены *штриховой линией*. В данном случае они показывают, что диаметр исследуемого планарного рафта составляет 600 нм (б).

того, они вообще могли формировать монослой на поверхности слюды (рис. 4, д).

Не менее существенные различия существуют между ДМД, изолированными из разных клеток. На рис. 5 представлены планарные рафты и кавеолы, выделенные из других клеток человека (ЭКПВЧ). Из сравнения рис. 2, а (морфология планарных рафтов моноцитов) с рис. 5, а (морфология планарных рафтов ЭКПВЧ), а также рис. 2, б и 4, в (морфология кавеол моноцитов) с рис. 5, б (морфология кавеол ЭКПВЧ) следует, что аналогичные структуры существенно различаются у разных типов клеток. Результаты демонстрируют, что планарные рафты, изо-

лированные из ЭКПВЧ, образуют крупные сливающиеся структуры, имеющие сложную морфологию. В этом случае некорректно говорить о диаметре крупных платформ, скорее, можно определять их поперечный размер. Поперечный размер планарных рафтов, выделенных из ЭКПВЧ, составляет 200 ± 61.7 нм против 150.6 ± 68.6 у моноцитов ($n = 38, p < 0.05$), кроме того, их высота больше аналогичных структур, выделенных из моноцитов, и составляет 7 ± 2.3 нм против 5.7 ± 2.9 у моноцитов ($n = 38, p < 0.05$). Для кавеол ЭКПВЧ, напротив, обнаружено значительное уменьшение размеров по сравнению с ДМД, изолированными из моноцитов. В частности, средний диаметр кавеол ЭКПВЧ составляет 45.1 ± 7.1 нм против 87.3 ± 46.1 у моноцитов ($n = 22, p < 0.05$), средняя высота — 7.8 ± 2.8 нм против 9.4 ± 5.4 у моноцитов ($n = 22, p < 0.05$).

Динамика основных параметров планарных рафтов и кавеол (диаметра и высоты) представлены в таблице. Фракции 2 и 5, изолированные из моноцитов здоровых доноров, сохранялись в виде аликвот в холодильнике. Для ежедневных наблюдений использовали 2–3 аликвоты. Уже на 2-е сут отмечается существенное увеличение размеров вследствие агрегации. Максимальную высоту ДМД (как планарных рафтов, так и кавеол) регистрировали на 5-е сут наблюдения, а максимальный диаметр — на 3-и сут для планарных рафтов и на 7-е сут для кавеол (см. таблицу).

Обсуждение

Обращает на себя внимание крайний полиморфизм планарных рафтов. Очевидно, он определяется их эволюцией, поскольку сначала образуются нанодомены, затем в процессе латеральной миграции — микродомены и крупные кластеры или платформы (Quinn, Wolf, 2009). Таким образом, при использовании детергентов в экстрагируемых фракциях могут оказаться ДМД, находящиеся на разной стадии своей эволюции, что и проявляется в разной морфологии планарных рафтов на подложке. Толщина липидного бислоя, по приблизительным оценкам, составляет 4 нм. Высота рафтов превышает высоту окружающего бислоя. В нашем случае измеренная высота планарных рафтов также несколько превышает 4 нм.

Показано (Salvary et al., 2012), что использование либрола WX в качестве детергента способствует максимальному сохранению в составе ДМД холестерина, сфингомиелина и кавеолина-1 — маркерного белка кавеол. Наши результаты показывают, что именно максимальная сохранность кавеолина, по-видимому, приводит к сохра-

Динамика основных морфологических параметров ДМД, изолированных из моноцитов здоровых доноров

Параметр	Размер, нм						
	планарные рафты				кавеолы		
	время, сут				время, сут		
	1 (контроль, n = 74)	2 (n = 68)	3 (n = 61)	5 (n = 11)	1 (n = 61)	5 (n = 10)	7 (n = 45)
Высота	5.7 ± 2.9	13.0 ± 1.9^a	5.9 ± 2.2^a	30.2 ± 4.3^a	9.4 ± 5.4	43.7 ± 25.2^a	10.4 ± 4.8^a
Диаметр	150.6 ± 68.6	158.4 ± 95.2^a	263.9 ± 168.9^a	245.0 ± 170.0^a	87.3 ± 46.1	93.9 ± 54.4^a	98.4 ± 53.8^a

^a $p < 0.05$ — достоверность различия с данными для 1 сут; n — число измерений.

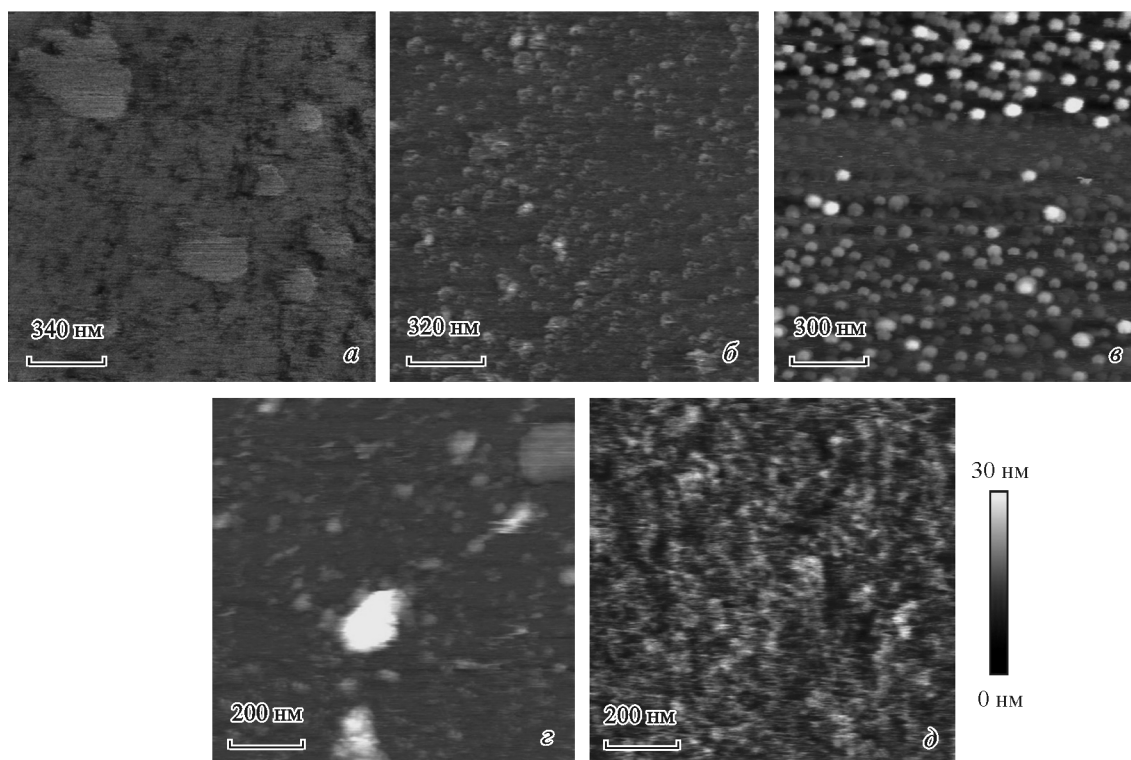


Рис. 4. Морфология detergent-устойчивых мембранных доменов, изолированных из моноцитов здоровых доноров (а, в) и пациента, страдающего инфарктом миокарда (ИМ) (б, з, д).

а, б — планарные рафты соответственно здорового и при ИМ; в, з — кавеолы соответственно здорового и при ИМ; д — кавеолы при ИМ формируют монослой на поверхности слюды. Шкала высот показывает высоту объектов: более светлые оттенки соответствуют более высоким объектам.

нению кавеолами колбообразной формы (рис. 2, б; 4, в). Высота экстрагированных кавеол существенно больше, чем высота изолированных планарных рафтов. Как показывают результаты Вестерн-блоттинга, либрол WX не удаляет основные маркерные белки (Salvary et al., 2012) — ни флотиллин-1 планарных рафтов, ни кавеолин-1 кавеол. В то же время при использовании этого detergentа ДМД свободны от элементов цитоскелета, как показывают данные АСМ. Таким образом, различия в высоте обу-

словлены, по всей вероятности, именно полимеризацией кавеолина.

Интересным фактом является выявление существенных различий в морфологии и размерах планарных рафтов и кавеол, выделенных из моноцитов здоровых людей и людей, перенесших ИМ. Моноцитоз является широко известным фактом при атеросклерозе и ИМ. Моноциты рекрутируются из костного мозга и благодаря диапедезу мигрируют в интиму, процесс сопровождается активаци-

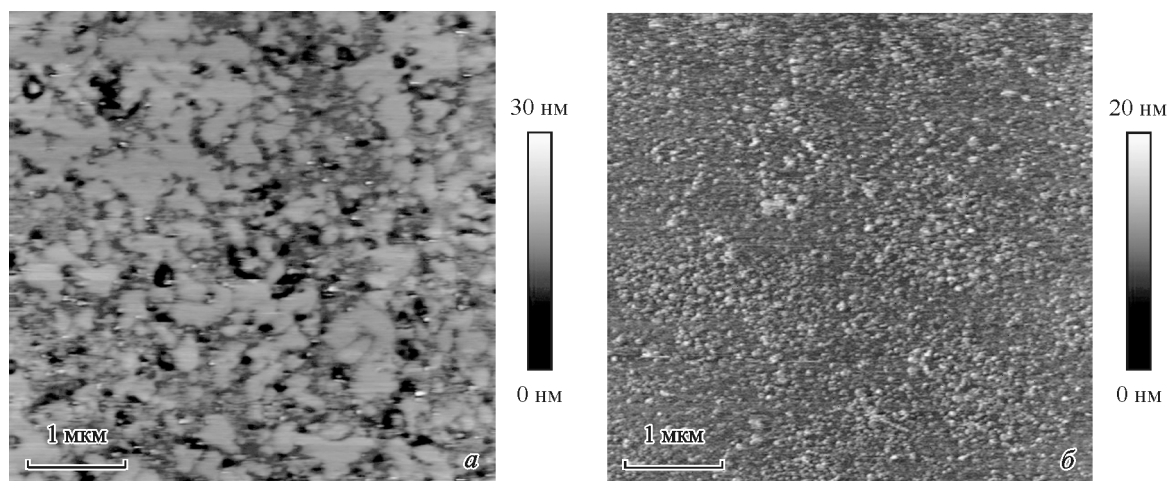


Рис. 5. Морфология detergent-устойчивых мембранных доменов, изолированных из эндотелиальных клеток пупочной вены человека.

Скан получен на поверхности слюды методом атомно-силовой микроскопии (Bruker). а — планарные рафты; б — кавеолы. Шкала высот показывает высоту объектов: более светлые оттенки соответствуют более высоким объектам.

цией клеток и их дифференцировкой в тканевые макрофаги (Tall et al., 2012). Макрофаги захватывают окисленные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) благодаря работе рецепторов-мусорщиков (scavenger receptor), в результате чего образуются пенистые клетки (Moore, Tabas, 2011). Это один из основных процессов в механизме формирования атеросклеротических бляшек. Изменения в холестериневом гомеостазе моноцитов оказывает непосредственное влияние на процесс формирования микродоменов и на их функции (Wolf et al., 2007). Важным фактом является и то, что при запуске *in vivo* атерогенной липопротеиновой активации у пациентов, страдающих ИМ, изменяются не только размеры и морфология ДМД. Как показано (Wolf et al., 2007), солюбилизовать детергентом (Тритоном X-100) большинство основных Fc γ -рецепторов (CD16, CD32 и CD64, некоторые из которых вовлечены в атерогенный липопротеиновый клиренс), рецепторов-мусорщиков (CD36, CD91 и CD163, вовлеченных в захват модифицированных ЛПНП), интегринов (CD11a, CD11b и CD18) и заякоренных через гликозилфосфатидилинозитол белков (CD14, CD47 и CD55) значительно труднее при ИМ по сравнению с контролем. Это означает, что и биохимическая структура рафтов в случае ИМ также значительно изменяется. Эти данные полностью подтверждаются исследованиями (Salvary et al., 2012), которые обнаружили, что содержание холестерина выше в планарных рафтах здоровых доноров ($63 \pm 3\%$) по сравнению с планарными рафтами, выделенными из моноцитов пациентов, страдающих ИМ ($41 \pm 2\%$). Таким образом, существенное уменьшение размеров планарных рафтов при ИМ может быть обусловлено нарушением холестеринного метаболизма моноцитов, которое сопровождается уменьшением содержания холестерина в рафтах. В этом случае снижение солюбилизации в детергентах основных рецепторов моноцитов, по-видимому, является компенсаторной реакцией клеток, которые пытаются поддерживать свои физиологические функции в условиях дефицита холестерина и малых размеров рафтов.

Другая ситуация наблюдается с кавеолами. Согласно полученным нами данным, происходит статистически значимое уменьшение высоты кавеол и незначительное уменьшение их диаметра в случае их экстрагирования из моноцитов пациентов, страдающих ИМ. Другие авторы (Salvary et al., 2012) показали, что содержание холестерина меньше в кавеолярной фракции здоровых доноров ($13 \pm 1\%$), чем у пациентов, страдающих ИМ ($34 \pm 2\%$). Полученные данные не противоречат друг другу, если принять во внимание факт, показанный на рис. 4. Кавеолы при ИМ (рис. 4, з, д) меньше, чем кавеолы здоровых доноров (рис. 4, в), но очевидно, что кавеолы больных обнаруживают тенденцию к значительной агрегации (рис. 4, з) и фактически образуют монослой на поверхности слюды (рис. 4, д). Таким образом, суммарная площадь, занимаемая кавеолами, выделенными из моноцитов пациентов, страдающих ИМ, оказывается больше площади, занимаемой кавеолами, изолированными из моноцитов здоровых доноров, а следовательно, логично предположить, что и суммарное количество холестерина будет значительно больше. Таким образом, здесь, как и в случае с планарными рафтами, альтерация морфологии субмембранных структур отражает нарушение их биохимии.

Планарные рафты и кавеолы выделены из ЭКПВЧ тем же методом, что ДМД моноцитов. Тем не менее они

значительно различаются по размерам и морфологии. Есть два возможных объяснения развитой и нерегулярной структуры планарных рафтов ЭКПВЧ. Либо мы наблюдаем агрегацию планарных рафтов при выделении их из ЭКПВЧ, либо развитые структуры на поверхности слюды отражают реальную морфологию планарных рафтов на поверхности живых клеток. Наиболее вероятно второе объяснение, поскольку АСМ-исследование планарных рафтов проводилось немедленно после выделения. Кроме того, концентрация планарных рафтов оказалась очень высокой: они практически полностью покрывают поверхность слюды. Показано (Rinia et al., 2001), что высокая концентрация холестерина в рафтах приводит к формированию более крупных и нерегулярных структур. В наших экспериментах планарные рафты, изолированные из ЭКПВЧ, имели сложную, крупную, нерегулярную форму, а исследование в режиме микротвердости и создание карт эластичности (результаты не показаны) продемонстрировали наличие высокой ригидности данных структур, т. е. они, по всей вероятности, содержат больше холестерина по сравнению с планарными рафтами моноцитов. Можно предположить, что морфологические различия обусловлены функциональными различиями клеток. Моноциты являются высокоподвижными клетками; они постоянно формируют, реорганизуют, объединяют и разбирают рафты. В то же время эндотелиальные клетки стационарны и более стабильны, они практически являются постоянной функциональной платформой для всех физиологических внутрисосудистых процессов. Как следствие, они формируют крупные и более развитые структуры ДМД.

Значительные функциональные различия клеток объясняют и значительные различия морфологии кавеол: кавеолы моноцитов участвуют во внутриклеточном кавеолзависимом транспорте, тогда как кавеолы эндотелиальных клеток в большей степени вовлечены в трансцитоз.

Методическая часть работы ясно показала, что и планарные рафты, и кавеолы увеличивают размеры уже на второй день хранения (см. таблицу). Быстрая агрегация структур отмечалась во всех случаях. В нашей предыдущей работе методом высокоскоростной АСМ продемонстрировано, что в течение 50 мин динамического наблюдения (режим видео) происходило увеличение суммарной поверхности планарных рафтов в 1.1 раза (в среднем с 91 000 до 102 000 нм²) (Pleskova et al., 2012). Избыток свободной энергии на границе раздела фаз является движущей силой слияния нанометровых рафтов в более крупные структуры. Поэтому основной методический вывод заключается в том, что информацию о реальных размерах и форме планарных рафтов и кавеол необходимо получать немедленно после выделения, иначе возникают неизбежные ошибки в оценке и размера, и формы ДМД.

Таким образом, мы продемонстрировали быструю агрегацию планарных рафтов и кавеол. Для структур, исследованных в первый день выделения, показаны следующие факты: 1) планарные рафты, содержащие в качестве основного маркера флотиллин-1, и кавеолы, содержащие маркер кавеолин-1, имеют разные морфологию и размеры; 2) ДМД, выделенные из моноцитов здоровых доноров, отличаются от аналогичных структур пациентов, страдающих ИМ; 3) планарные рафты и кавеолы, выделенные из разных клеток (моноцитов и эндотелиальных клеток), различаются морфологически и метрически.

Авторы выражают благодарность д-ру Р. Филоменко (R. Filomenko) и д-ру Т. Сальвари (T. Salvary) за консультативную помощь и техническую поддержку при выделении и биохимическом анализе планарных рафтов и кавеол.

Работа выполнена при финансовой поддержке регионального совета Бургундии и программы «Labex Action Integrated Smart System».

Список литературы

- Плескова С. Н.* 2011. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Долгопрудный: Интеллект. 184 с. (*Pleskova S. N.* Atomic-force microscopy in biology and medicine. Dolgoprudnii: Intellect. 184 p.)
- Плескова С. Н., Пудовкина Е. Е.* 2013. Морфологическая и структурная характеристика рафтов. Цитология. 55 (8): 586—592. (*Pleskova S. N., Pudovkina E. E.* 2013. Morphology and structural properties of rafts. Cell Tissue Biol. 7 (6): 497—503.)
- Dart C.* 2010. Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. J. Physiol. 588: 3169—3178.
- De Almieda R. F. M., Fedorov A., Prieto M.* 2003. Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. Biophys. J. 85: 2406—2416.
- Drevot Ph., Langlet C., Guo X.-J., Bernard A.-M., Colard O., Chauvin J.-P., Lasserre R., He H.-T.* 2002. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. EMBO J. 21: 1899—1908.
- Gajate C., Gonzalez-Camacho F., Mollinedo F.* 2009. Lipid raft connection between extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. Biochem. Biophys. Res. Commun. 380: 780—784.
- Gajate C., Mollinedo F.* 2011. Lipid rafts and Fas/CD95 signaling in cancer chemotherapy. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery. 6: 274—283.
- Gohlke A., Triola G., Waldmann H., Winter R.* 2010. Influence of the lipid anchor motif of N-Ras on the interaction with lipid membranes: a surface plasmon resonance study. Biophys. J. 98: 2226—2235.
- Huang L., Zhang Y., Yu Y., Sun M., Li Ch., Chen P., Mao X.* 2011. Role of lipid rafts in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in MARC—145 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 414: 545—550.
- Korade Z., Kenworthy A. K.* 2008. Lipid rafts, cholesterol and the brain. Neuropharmacology. 55: 1265—1273.
- Levitani I., Fang Y., Rosenhouse-Dantsker A., Romanenko V.* 2010. Cholesterol and ion channels. Subcell. Biochem. 51: 109—549.
- Marin R., Marrero-Alonso J., Fernandez C., Cury D., Diaz M.* 2012. Estrogen receptors in lipid raft signalling complexes for neuroprotection. Frontiers Biosci. 4: 1420—1433.
- Melser S., Molino D., Batailler B., Peypelut M., Laloi M., Watelet-Boyer V., Bellec Y., Faure J.-D., Moreau P.* 2011. Links between lipid homeostasis, organelle morphodynamics and protein trafficking in eukaryotic and plant secretory pathways. Plant Cell Reports. 30: 177—193.
- Moore K. J., Tabas I.* 2011. The cellular biology of macrophages in atherosclerosis. Cell. 145: 341—355.
- Pleskova S. N., Aybeke E. N., Pudovkina E. E., Bourillot E., Lesniewska E.* 2012. The study of monocytes and their submembrane structures by atomic force microscopy. J. Biol. Phys. Chem. 12: 168—173.
- Quinn P. J., Wolf C.* 2009. The liquid-ordered phase in membranes. Biochim. biophys. acta. 1788: 33—46.
- Rinia H. A., Snel M. M. E., van der Eerden J. P. J. M., de Kruij B.* 2001. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. FEBS Lett. 501: 92—96.
- Salvary T., Gambert-Nicot S., Brindisi M. C., Meneveau N., Schiele F., Sèronde M. F., Lorgis L., Zeller M., Cottin Y., Kante-lip J. P., Gambert P., Davani S.* 2012. Pravastatin reverses the membrane cholesterol reorganization induced by myocardial infarction within lipid rafts in CD14(+)/CD16(–) circulating monocytes. Biochim. biophys. acta. 1821: 1287—1294.
- Scuderi M. R., Cantarella G., Scollo M., Lempereur L., Palumbo M., Sacconi-Jotti G., Bernardini R.* 2011. The antimutagenic effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on human melanoma cells is mediated by the membrane lipid raft. Cancer Lett. 310: 240—249.
- Sheets E. D., Holowka D., Baird B.* 1999. Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcεRI and their association with detergent-resistant membranes. J. Cell Biol. 145: 877 — 887.
- Smart E. J., Graf G. A., McNiven M. A., Sessa W. C., Engelman J. A., Scherer P. E., Okamoto T., Lisanti M. P.* 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol. Cell Biol. 19: 7289—7304.
- Sowa G.* 2011. Novel Insights into the role of caveolin-2 in cell- and tissue-specific signaling and function. Biochem. Res. Int. 809259. doi: 10.1155/2011/809259.
- Staubach S., Hanisch F.-G.* 2011. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. Expert Rev. Proteomics. 8: 263—277.
- Tall A.R., Yvan-Charvet L., Westerterp M., Murphy A.J.* 2012. Cholesterol efflux a novel regulator of myelopoiesis and atherogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32: 2547—2552.
- Wolf Z., Orso E., Werner T., Klünemann H. H., Schmitz G.* 2007. Monocyte cholesterol homeostasis correlates with the presence of detergent resistant membrane microdomains. Cytometry. 71A: 486—494.

Поступила 23 IX 2015

CHARACTERIZATION OF THE DIFFERENCE IN THE MORPHOLOGY OF DETERGENT RESISTANT MEMBRANES DOMAINS ISOLATED FROM DIFFERENT CELL TYPES BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

S. N. Pleskova^{1,2,*}, *E. N. Aybeke*¹, *E. Bourillot*¹, *E. Lesniewska*¹

¹ Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, University de Bourgogne, Dijon, France, 21000, and ² N. I. Lobashevsky State University of Nizhny Novgorod, Research and Education Center «Physics of Solid State Nanostructure», Nizhny Novgorod, Russia, 603950;

* e-mail: pleskova@mail.ru

Planar raft and caveolae are specific membrane clusters with high concentration of cholesterol and lipids with saturated fatty acid. These clusters are resistant to detergents and are denoted as detergent resistant membranes domains (DRMs). Their morphology and size have been studied by atomic force microscopy. The size of planar rafts isolated by Librol from monocytes of healthy volunteers was 150.6 ± 68.6 nm — diameters and

5.7 ± 2.9 nm — height, the size of caveolae was 87.3 ± 46.1 nm — diameters and 9.4 ± 5.4 nm — height. Significant difference have been found morphology and size of DRMs isolated from monocytes of healthy volunteers and patients suffering from myocardial infarction as well as between DRMs isolated from endothelial cells. The study of time-dependent changes in the morphology of isolated planar rafts and caveolae has shown that they quickly aggregate during keeping. Therefore, to asses the actual size and morphology of the DRMS, they should be investigated immediately after isolation.

Key words: planar raft, caveolae, morphology, size, atomic force microscopy.
