

УДК 577.152

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИГИТОНИНА И ЕГО АНАЛОГОВ С КЛЕТКАМИ НЕК293 БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

Г.Ю. Ломакина^{1,2}, А.Д. Фомина¹, Н.Н. Угарова^{1*}

(¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; ²МГТУ имени Э.Н. Баумана; *e-mail:nugarova@gmail.com)

Дигитонин (монодесмоидный сапонин) образует комплексы с холестерином клеточных мембран, что приводит к дезинтеграции структуры мембран, образованию пор и высвобождению внутриклеточных компонентов в реакционную среду. Для изучения кинетики начального этапа взаимодействия мембран клеток с дигитонином были использованы клетки линии НЕК293, транзистентно трансфицированные плазмидой рсDNALuc, экспрессирующей люциферазу светляков. Разработана методика непрерывного слежения за данным процессом биолюминесцентным методом, которая позволяет в режиме реального времени регистрировать кинетические кривые накопления во внеклеточном пространстве люциферазы и АТФ в присутствии дигитонина. Показано, что эффект влияния дигитонина на клеточные мембраны определяется его концентрацией в реакционной среде. При концентрации менее 0,02 мМ наблюдается длительный период индукции, в течение которого белок не вытекает из клеток и образуются небольшие поры, проницаемые для низкомолекулярных соединений (АТФ). При повышении концентрации дигитонина до 0,05 мМ индукционный период сокращается и быстро возрастает концентрация высвобождаемой люциферазы, что свидетельствует об образовании крупных пор. Дигитонин наиболее токсичен для клеток при концентрации 0,08 мМ и более, когда в течение нескольких десятков секунд достигается максимальная концентрация высвобождаемых белков, а на кинетических кривых исчезает период индукции. Таким образом, биолюминесцентный метод позволяет изучать *in situ* изменения проницаемости клеточных мембран под действием мембранно-активных эффекторов на ранних стадиях процесса лизиса клеток.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза светляков, клетки НЕК293, дигитонин, сапонины, цитотоксичность, проницаемость клеточных мембран.

Использованные в статье сокращения: АТФ – аденозин-5'-фосфат, Fluc – люцифераза светляков, а.о. – аминокислотные остатки, RLU – относительные световые единицы (relative light unit).

Сапонины – природные гликозиды, широко распространенные в растительном мире, а также в некоторых морских организмах [1]. Сапонины разделяются на моно- и бидесмозиды в зависимости от того, содержат их молекулы одну или две углеводных цепи. Монодесмозиды обладают сильной мембранной активностью благодаря их амфифильной структуре, включающей липофильный агликон (сапогенин) и боковую гидрофильную углеводную группу, состоящую из одной или нескольких молекул сахаров.

Два класса сапонинов различаются по типу агликона: стероидные (или стероидальные) и тритерпеновые (или тритерпеноидные). Стероидные сапонины содержат стероидальный агликон (C₂₇), состоящий из шестичленных циклов, а тритерпеноидные сапонины – тритерпеноидный

агликон (C₃₀), состоящий из пятичленных циклов [1, 2]. Сапонины обладают разнообразной биологической и фармакологической активностью: противовоспалительной, антигрибковой, антираковой и др. Они снижают уровень холестерина и проявляют себя как хорошие адьюванты [3, 4]. Особый интерес представляет способность стероидальных сапонинов увеличивать проницаемость клеточных мембран, а при высокой концентрации вызывать лизис и гибель клеток [5–7].

Высокой литической активностью обладает стероидальный сапонин – дигитонин. Уменьшение числа углеводных остатков в структуре аналогов дигитонина приводит к снижению их литической активности [8]. При исследовании взаимодействия дигитонина с липосомами было показано, что дигитонин взаимодействует только

с теми липосомами, в состав которых входит холестерин. Дигитонин образует комплексы с холестерином состава 1:1, независимо от содержания холестерина в липосомах, но значительные повреждения в липосомальной мембране наблюдаются только тогда, когда молярное соотношение холестерина и фосфолипида превышает 0,2. Образование комплекса дигитонина и холестерина приводит к возникновению в мембране полостей, не содержащих холестерина [8]. Механизм взаимодействия дигитонина с модельными клеточными мембранами исследовали с помощью разных физико-химических методов [9]. Показано, что фосфолипидная мембрана, не содержащая холестерина, не изменяет свои физико-химические свойства и структуру даже в присутствии 0,05 мМ дигитонина (эта концентрация обычно используется при гемолизе эритроцитов и других эукариотических клеток). При низком содержании холестерина в мембране (5%) молекулы дигитонина связываются с молекулами холестерина. Образование агрегатов холестерин-агликон не вызывает какой-либо значительной деструкции мембраны, тем не менее, молекулы холестерина удаляются из ее гидрофобной полости. Стерические затруднения между углеводными остатками в этих агрегатах могут индуцировать изменения в кривизне внешней оболочки мембраны, что приводит к увеличению проницаемости последней. При содержании 20% холестерина дигитонин сильно изменяет физико-химические свойства и структуру мембраны, ее внешняя поверхность становится неровной из-за удаления значительного количества холестерина из оболочки мембраны [9].

К аналогичным результатам пришли и авторы работы [10] при изучении молекулярного механизма взаимодействия дигитонина с природными и искусственными мембранами. Было показано, что гемолитическое воздействие дигитонина на эритроциты зависит от концентрации дигитонина. При концентрации дигитонина менее 0,01 мМ лизиса эритроцитов не наблюдается, а при 0,015 мМ дигитонина доля лизированных клеток составляет 50%. Для изучения специфических взаимодействий дигитонина с фосфолипидами и холестерином использовали искусственные липидные везикулы, содержащие флуоресцентный маркер – кальцеин. Высвобождение кальцеина из везикул, состоящих из различных фосфолипидов и холестерина, наблюдали в интервале концентраций дигитонина от 0 до 0,01 мМ. Для везикул, не содержащих холесте-

рина, не наблюдалось высвобождения кальцеина, а при содержании холестерина 20% наблюдали высвобождение маркера уже при концентрации дигитонина менее 0,001 мМ. При этом уровень высвобождения кальцеина зависит не только от содержания холестерина в мембране, но и от фосфолипидного состава везикул [10]. Хотя эти результаты были получены для искусственных мембран, они могут быть полезны при изучении взаимодействия дигитонина с природными клеточными мембранами. Дигитонин часто используют в фармакологии для усиления терапевтического действия различных лекарственных препаратов за счет повышения дигитонином проницаемости клеточных мембран [11–14]. Тем не менее, в литературе имеются лишь единичные работы по исследованию взаимодействия дигитонина и его аналогов с культурами клеток. Так, есть информация, что аналоги дигитонина (диосцин [15] и его фуру-аналог протодиосцин [16]) также вызывают разрушение клеток, причем в низкой концентрации эти индукторы способны вызывать апоптоз.

В 2018 г был предложен биолюминесцентный метод (названный авторами «Матадор») определения цитотоксичности дигитонина [17], основанный на использовании различных люцифераз (нескольких вариантов генетически модифицированных люцифераз из морских организмов и люцифераз светляков). Метод включает экспрессию в раковых клетках-мишенях люциферазы, которая удерживается внутри живых клеток, но вытекает из мертвых или умирающих клеток. Различные раковые клетки транзигентно трансфицировали векторами, содержащими ген люциферазы, затем к суспензии клеток добавляли дигитонин до концентрации 0,024 мМ и инкубировали в течение 90 мин. Для клеток, содержащих ген Fluc, наблюдали увеличение активности в супернатанте в 26 и 230 раз для векторов pRetroQ-Fluc и pLenti-Fluc соответственно. Измерение свечения в супернатанте и в суспензии клеток приводило к идентичным результатам, поэтому авторы использовали одностадийный метод регистрации свечения в суспензии клеток, что значительно упростило эксперимент [17]. Авторы [17] основное внимание уделили констатации факта о возможности использования высокочувствительного биолюминесцентного метода на базе морских люцифераз для оценки влияния дигитонина на жизнеспособность различных линий клеток. Они довольно скептически отнеслись к использованию люциферазы светляков, основываясь на результатах работы [18], авторы которой использо-

вали биолюминесцентный метод для измерения цитолитической активности Т-лимфоцитов по отношению к раковым клеткам-мишеням, трансфицированным плазмидой, которая экспрессирует люциферазу светляков. При инкубации клеток-киллеров с раковыми клетками не наблюдали высвобождения внутриклеточной люциферазы, хотя уменьшение активности люциферазы внутри клеток хорошо коррелировало со снижением жизнеспособности клеток-мишеней. Это указывает на отсутствие связи между механизмом лизиса клеток-мишеней под действием клеток-киллеров и образованием больших пор в клеточной мембране, как это происходит при действии дигитонина на клетки. Действительно, в литературе показано, что при действии клеток-киллеров на клетки-мишени реализуется более сложный рецептор-зависимый механизм эндоцитоза макромолекул [19]. Этот факт следует учитывать при изучении действия различных литических агентов на клетки.

Обычно при изучении взаимодействия дигитонина с эукариотическими клетками измеряют сигналы биолюминесценции только в двух точках (до и после инкубации клеток в присутствии дигитонина), причем длительность инкубации выбирается авторами произвольно (от 30 до 90 мин).

Кинетические аспекты взаимодействия клеток с дигитонином практически не изучены, хотя они необходимы для оптимизации состава терапевтических препаратов, содержащих дигитонин. Нами разработана методика непрерывного мониторинга биолюминесценции в суспензии клеток НЕК293, транзигентно трансфицированных плазмидой, несущей ген люциферазы светляков. Анализ кинетики высвобождения внутриклеточных компонентов (люциферазы и АТФ) при разной концентрации дигитонина позволил выявить особенности взаимодействия дигитонина с клетками на ранних стадиях (в секундном и минутном интервалах времени) лизиса клеток.

Материалы и методы

Конструирование экспрессионного вектора *pcDNALuc* на основе люциферазы светляков. Плазмиду pGL3 («Promega», США), несущую ген модифицированной люциферазы светляков, обрабатывали рестриктазами HindIII и XbaI в буфере Tango («ThermoFisher Scientific» (США)). Фрагмент, кодирующий люциферазу, выделяли, очищали электрофоретически и лигировали по тем же сайтам с помощью Т4 ДНК-лигазы с вектором pcDNA3.1(+) («Invitrogen», США), который пред-

назначен для экспрессии белков в эукариотических клетках.

Использованные реагенты. В работе использовали дигитонин («PanReas AppliChem», Италия), диосцин и протодиосцин («PhytoLab», Германия); динатриевую соль АТФ, NERES («Sigma», США), люциферин светляков, АТФ-реагент и АТФ-контроль («Люмтек», Россия). Другие реагенты имели аналитическую чистоту. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду («Labconco WaterPro Plus», США).

Приготовление растворов сапонинов. Исходные растворы дигитонина и диосцина готовили в воде (10 мг/мл). Растворы нужной концентрации готовили последовательным разведением физиологическим раствором. Для приготовления исходного раствора протодиосцина 1 мг сапонины добавляли к 50 мкл воды и тщательно перемешивали. К 10 мкл полученной тонкой суспензии добавляли 20 мкл этилового спирта, получая раствор с концентрацией протодиосцина ~6 мг/мл в ~60%-м водном растворе спирта.

Использованная аппаратура. Измерение биолюминесцентного сигнала проводили на люцинометрах FB12 («ZyLux», США) и ЛЮМ-1 («Люмтек», Россия). Микробиологические эксперименты выполняли под ламинаром GS («Babcock», Германия). Работу с эукариотическими клетками вели в культуральном блоке, оснащенном CO₂-инкубатором («ThermoFisher Scientific», США) и ламинарным шкафом «БМБ-II-Ламинар С» («Lamsystems», Россия).

Культивирование клеток НЕК293 проводили, используя среду DMEM («ПанЭко», Россия) с содержанием 4,5 г/л глюкозы («Gibco», США), 10%-й фетальной сыворотки крови, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Культуру клеток инкубировали при 37 °С в инкубаторе (5%-й CO₂). Клетки росли в культуральных флаконах («SPL Lifesciences», Корея) на площади 75 см². Оценку конфлюэнтности проводили, используя световой микроскоп. По достижении нужной конфлюэнтности клетки открепляли от дна флакона с помощью скребка («SPL Lifesciences», Корея) и переносили в свежую среду при соотношении клеточной суспензии и среды, равном 1:6.

Трансфекция клеток НЕК293 плазмидой *DNALuc*. Для трансфекции клеток использовали липофектамин 2000 («Invitrogen», США). Для определения в реакционной среде оптимального содержания липофектамина, достаточного для результативной трансфекции, но не слишком

токсичного для клеток, в лунки шестилуночного планшета («Costar», США) помещали по 3 мл культуры клеток. В отдельных пробирках готовили растворы липофектамина, смешивая 150 мкл среды Opti-Mem с 0, 6, 9, 12 или 15 мкл липофектамина. В отдельной пробирке готовили разбавленный раствор ДНК, смешивая 700 мкл среды Opti-Mem с рассчитанным количеством ДНК (14 мкг ДНК на 3 мл культуры), к которому добавляли 12 мкл PLUS Reagent («Invitrogen», США). Готовый раствор ДНК (150 мкл) добавляли к 150 мкл разбавленного раствора липофектамина и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем по 250 мкл полученного ДНК-липидного комплекса добавляли по каплям к клеткам в 6-луночном планшете, слегка перемешивали и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С в течение 24 ч. Конечное содержание липофектамина в лунках планшета составляло 0; 5; 7,5; 10; 12,5 мкл соответственно. На следующий день среду заменяли на новую и измеряли содержание АТФ и активность люциферазы в супернатанте и в лизате клеток по методикам, описанным ниже. В дальнейших экспериментах использовали 10 мкл липофектамина на 3 мл культуры клеток.

Лизис клеток НЕК293. К 50 мкл суспензии клеток добавляли 50 мкл лизирующего буфера, содержащего 0,1% неонла, 10 мМ ЭДТА, 0,15 М NaCl в 0,05 М Трис-ацетатном буфере (рН 7,8). Смесь инкубировали в течение 1 мин, после чего отбирали 50 мкл лизата для измерения сигнала биолюминесценции.

Измерение биолюминесцентного сигнала для люциферазы проводили с использованием субстратной смеси, содержащей 0,3 мМ люциферин, 4 мМ АТФ, 10 мг/мл альбумин, 150 мг/мл трегалозу, 2 мМ ЭДТА, 50 мкМ пиррофосфат натрия, 20 мМ сульфат магния, в 0,05 М Na-фосфатном буфере (рН 7,8). К 50 мкл образца, содержащего люциферазу, добавляли 50 мкл субстратной смеси, быстро перемешивали, регистрировали сигнал биолюминесценции на люминометре «ЛЮМ-1». Величину сигнала измеряли в условных световых единицах (RLU). Одна RLU соответствует 10⁹ квант/с.

Измерение биолюминесцентного сигнала для АТФ проводили с использованием АТФ-реагента [20], содержащего люциферин, люциферазу и все другие компоненты, необходимые для генерирования биолюминесценции (кроме АТФ). К 50 мкл образца добавляли 50 мкл раствора

АТФ-реагента, быстро перемешивали и регистрировали сигнал биолюминесценции на люминометре «ЛЮМ-1», как описано выше.

Непрерывную регистрацию сигнала биолюминесценции в присутствии эффектора (дигитонина или его аналогов) в разной концентрации проводили на люминометре «FB12» («Zulux Corp.», США). В микрокювету помещали 10 мкл суспензии клеток, добавляли 40 мкл физиологического раствора, перемешивали, добавляли 50 мкл субстратной смеси и регистрировали фоновый сигнал. Через три минуты в кювету добавляли 5 мкл раствора дигитонина, тщательно перемешивали, кюветное отделение закрывали и продолжали регистрировать сигнал биолюминесценции.

Обработку результатов измерений проводили с помощью программ Microsoft® Office, OriginPro 8.6 и Excel 2003 SPI.

Результаты и их обсуждение

Разработка состава лизирующего буфера для клеток НЕК 293. Если в суспензии люцифераза и АТФ находятся внутри клеток, они не могут взаимодействовать с реагентами, что делает невозможным определение их концентрации. Чтобы определить в суспензии общую концентрацию клеток как АТФ, так и люциферазы перед измерением их обрабатывают лизирующим буфером, который должен быстро разрушать клеточную мембрану, но не ингибировать биолюминесцентный сигнал. Правильное измерение сигнала биолюминесценции в лизате клеток возможно лишь в том случае, если этот сигнал будет достаточно стабилен. Мы сравнили состав лизирующего буфера, рекомендованного фирмой «Promega» (№ 1), и буфера, разработанного нами (№ 2) (табл. 1). Показано, что при использовании лизирующего буфера № 1 сигнал падает более чем на 10% за 10 с, в то время как для лизирующего буфера № 2 падение сигнала за то же время составляет всего 4%. Сигнал в этом случае на 22% превышает сигнал, полученный при использовании буфера № 1. В дальнейшем мы использовали лизирующий буфер № 2.

Нормировка общего числа клеток НЕК293 по АТФ. Для определения общего числа клеток НЕК293 в пробе по содержанию АТФ была построена зависимость концентрации АТФ в лизатах клеток от числа клеток, измеренного подсчетом в камере Горяева с окрашиванием клеток трипановым синим. Для разбавления суспензии клеток использовали физиологический раствор. К 50 мкл лизата клеток добавляли 50 мкл АТФ-

Составы лизирующих буферов для клеток НЕК 293

Номер буфера	Состав лизирующего буфера	Скорость падения сигнала (%) за 10 с
№ 1	2 мМ Tris-фосфат; 2 мМ дитиотреитол; 2 мМ ЭДТА; 10% глицерин; 1% Тритон X-100 (pH 7,8)	$17,0 \pm 2,0$
№ 2	0,05 М Tris-ацетат; 0,1% неонол; 10 мМ ЭДТА; 0,15 М NaCl (pH 7,8)	$4,0 \pm 0,5$

реагента, быстро перемешивали, измеряли сигнал биолюминесценции на люминометре ЛЮМ-1 и рассчитывали содержание АТФ в клетках НЕК293, используя АТФ-контроль. Показано, что зависимость содержания АТФ от содержания клеток НЕК293 описывается линейным уравнением вплоть до $5 \cdot 10^7$ кл/мл с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9916$. Для расчета концентрации клеток в образце по содержанию АТФ была использована следующая формула:

$$([\text{НЕК293}], \text{ кл/мл}) = 10^{15} ([\text{АТФ}], \text{ моль/мл}).$$

Содержание люциферазы на клетку НЕК293.

Был измерен сигнал биолюминесценции для люциферазы в суспензии клеток, лизированных дигитонином. Для 1800 клеток максимальный сигнал составил 1500 тыс. или 830 RLU на клетку. На основании зависимости сигнала биолюминесценции от концентрации люциферазы в растворе в отдельном эксперименте было показано, что сигнал, генерируемый одной молекулой фермента, составляет $\sim 7 \cdot 10^{-5}$ RLU. Следовательно, одна клетка НЕК293 содержит $\sim 1,2 \cdot 10^7$ молекул люциферазы. Хотя эти расчеты имеют ориентировочный характер, тем не менее они указывают на высокий уровень экспрессии люциферазы в клетках НЕК293, в частности, благодаря сильному CMV-промотору в векторе pсDNA3.1, использованном для транзientной трансфекции клеток НЕК293.

Влияние дигитонина на активность люциферазы в растворе. Проверено влияние рабочей концентрации дигитонина на активность люциферазы светляков. Для моделирования поведения фермента в цитоплазме клеток использовали АТФ-реагент, в состав которого помимо люциферазы входит бычий сывороточный альбумин в концентрации, близкой к суммарной концентрации внутриклеточных белков. К 50 мкл АТФ-реагента, содержащего 16 мкМ люциферазы, добавляли 5 мкл раствора дигитонина с концентрацией 1 мг/мл до конечной концентрации в реакционной среде, равной 0,08 мМ, и инкубировали

при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем добавляли 50 мкл раствора АТФ в физиологическом растворе (75 нМ) и измеряли сигнал биолюминесценции. Оказалось, что после 30 мин инкубации значительного изменения активности люциферазы не происходит.

Влияние дигитонина на клетки НЕК293.

Ранее [17] было показано, что люцифераза светляков, экспрессируемая в цитозоле транзientно трансфицированных 293FT клеток, вытекает из клеток при их инкубировании в течение 90 мин в присутствии 0,02 мМ дигитонина. Однако не были исследованы временные и концентрационные зависимости для этого процесса. Для клеток НЕК293 мы изучили зависимость литического эффекта дигитонина от концентрации дигитонина и от длительности инкубации. При этом представляло интерес проанализировать именно начальный период этого процесса, поскольку взаимодействие дигитонина с клетками происходит достаточно быстро [10].

Через сутки после трансфекции по 1 мл суспензии клеток ($7,5 \cdot 10^6$ кл/мл) переносили в пробирки на 2 мл, добавляли по 50 мкл раствора дигитонина с концентрацией 0; 0,25; 0,5 и 1,0 мг/мл. В реакционной смеси содержание клеток составляло $7,1 \cdot 10^6$ кл/мл, а концентрация дигитонина равнялась 0; 0,01; 0,02 и 0,04 мМ. Смесь инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Каждые 10 мин отбирали по 100 мкл суспензии клеток, в которой измеряли биолюминесцентные сигналы для люциферазы и АТФ. Для клеток НЕК293 на рис. 1 представлена зависимость отношения сигналов (%) в присутствии и в отсутствие дигитонина соответствующей концентрации от длительности инкубации.

В отсутствие дигитонина наблюдался небольшой фоновый сигнал биолюминесценции, который не изменялся в течение 1 ч. Следовательно, в этих условиях не происходит высвобождения ни люциферазы, ни АТФ во внеклеточное пространство, что подтверждает результаты, полученные

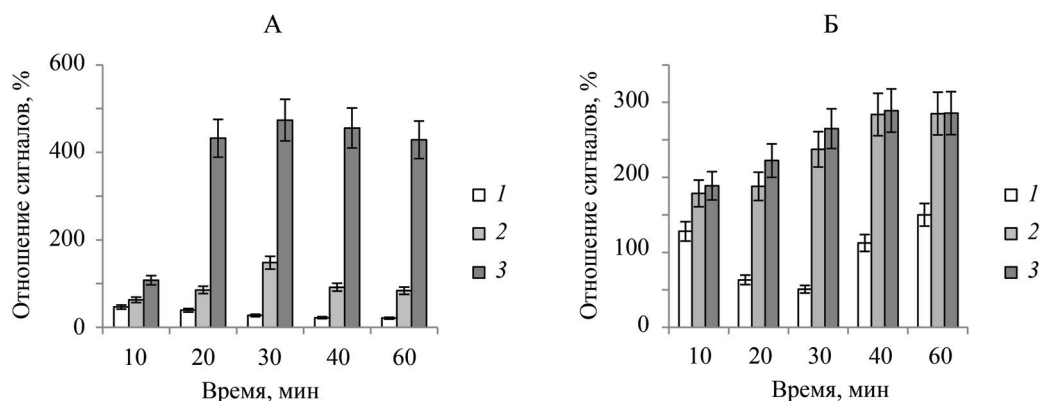


Рис. 1. Зависимость отношения биоломинесцентных сигналов (%) для люциферазы (А) и АТФ (Б) в суспензии клеток НЕК293 в присутствии и в отсутствие дигитонина от длительности инкубации. Состав реакционной среды: содержание клеток $7,1 \cdot 10^6$ кл/мл; концентрации дигитонина, мМ: 1 – 0,01; 2 – 0,02; 3 – 0,04

в работе [17]. Из диаграмм, представленных на рис. 1 видно, что при концентрации дигитонина 0,04 мМ происходит быстрое высвобождение люциферазы из клеток. В течение первых 20 мин сигнал возрастает в 4 раза и далее не изменяется. Вероятно, за это время при данной концентрации дигитонина происходит полный лизис клеток. При меньшей концентрации значительного высвобождения люциферазы не происходит, однако наблюдается рост сигнала для АТФ при концентрации дигитонина 0,02 мМ. Это свидетельствует об увеличении проницаемости клеточной мембраны для таких небольших молекул, как АТФ. О глобальном повреждении мембраны можно судить по увеличению в суспензии клеток люциферазной активности, когда в клеточной стенке образуются поры, через которые могут свободно перемещаться макромолекулы белка. Эти эксперименты показали, что с увеличением концентрации дигитонина растет степень лизиса клеток. Так как лизис клеток происходит очень быстро, важно было изучить кинетику высвобождения люциферазы из клеток в начальный период, сразу после добавления дигитонина к суспензии, поскольку подобные эксперименты не описаны в литературе, но могут дать новую информацию о кинетике повреждения клеточной мембраны и высвобождения люциферазы из клеток в окружающую среду.

Непрерывная регистрация сигнала биоломинесценции для люциферазы разработана для изучения лизиса клеток НЕК293. В кювету вносили 10 мкл суспензии клеток ($4,4 \cdot 10^5$ кл/мл) люминометра, добавляли 40 мкл физиологического раствора, перемешивали, добавляли 50 мкл субстратной смеси для люциферазы и начинали регистрировать фоновый сигнал биоломинесценции. Полученная реакционная смесь содержала $4,4 \cdot 10^4$

кл/мл. Через 3 мин открывали кюветное отделение, быстро вводили в реакционную смесь 5 мкл раствора дигитонина и продолжали регистрацию сигнала биоломинесценции. Получены кинетические кривые, описывающие зависимость биоломинесцентного сигнала от времени при разной концентрации дигитонина в реакционной среде (0,02; 0,04; 0,05; 0,08 и 0,20 мМ) (рис. 2).

Как показано на рис. 2, на величину и форму полученных зависимостей сигнала биоломинесценции от времени очень сильно влияет концентрация дигитонина в реакционной смеси. Неровности на кинетических кривых объясняются тем, что в суспензии имеются как отдельные клетки, так и конгломераты клеток. При постепенном разрушении конгломератов возрастает число мембран клеток, доступных для контакта с молекулами дигитонина. Образуются дополнительные поры, что приводит к ступенчатому повышению сигнала биоломинесценции. В присутствии 0,02 мМ дигитонина сигнал биоломинесценции близок к сигналу фона (рис. 2, кривая 1), как и в экспериментах, результаты которых представлены на рис. 1. При концентрации дигитонина 0,04 мМ наблюдается некоторый период индукции (~60 с), после которого биоломинесцентный сигнал постепенно возрастает и достигает максимума через ~280 с (рис. 2, кривая 2). Увеличение концентрации дигитонина до 0,05 мМ приводит к сильному сокращению периода индукции (рис. 2, кривая 3), а при высокой концентрации дигитонина (0,08 и 0,20 мМ) сигнал достигает максимального значения за ~60 с. Причем максимальная величина пика оказывается практически равной ~1500 тыс. RLU. Наблюдаемый рост биоломинесцентных сигналов обусловлен ростом числа пор в

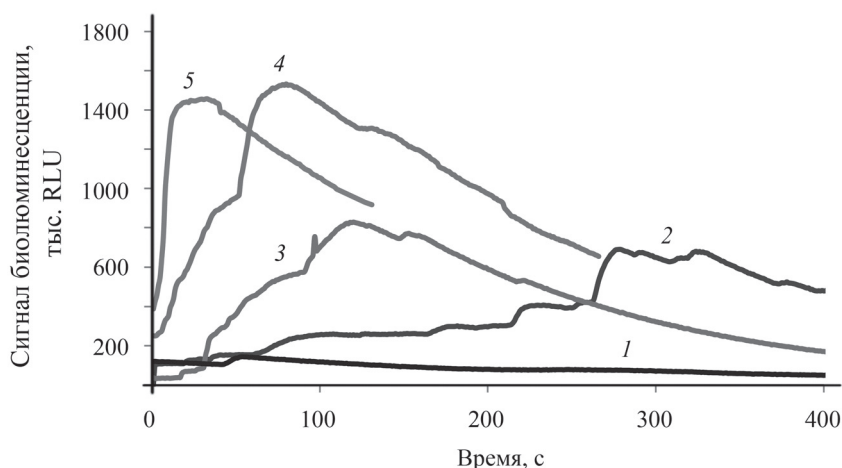


Рис. 2. Кинетические кривые зависимости сигнала биолюминесценции для люциферазы при лизисе клеток НЕК293 ($4,4 \cdot 10^4$ кл/мл) в присутствии дигитонина в разной концентрации, мМ: 1 – 0,02; 2 – 0,04; 3 – 0,05; 4 – 0,08; 5 – 0,20

мембранах клеток НЕК293, и чем выше концентрация дигитонина, тем большее число пор для высвобождения внутриклеточной люциферазы образуется в клеточных мембранах. Значения скорости роста сигналов биолюминесценции, определяемой тангенсом угла наклона начального участка полученных зависимостей, а также максимальные значения сигналов биолюминесценции, которые наблюдаются при разной концентрации дигитонина, представлены в табл. 2. Видно, что с ростом концентрации дигитонина наблюдается значительный нелинейный рост сигнала, который характеризует рост скорости высвобождения люциферазы из клеток. При увеличении концентрации дигитонина в 5 раз (от 0,04 до 0,20 мМ) скорость высвобождения люциферазы увеличивается в 64 раза. Снижение биолюминесцентных сигналов после достижения максимума (рис. 2) обусловлено, вероятно,

уменьшением концентрации неповрежденных клеток в реакционной смеси.

Известно, что сигнал биолюминесценции характеризует скорость биолюминесцентной реакции (число испускаемых квантов в единицу времени), а его величина пропорциональна концентрации люциферазы в реакционной смеси в данный момент. Общее содержание люциферазы, высвобождаемой из лизированных клеток при разной концентрации дигитонина за определенный период инкубации, определяется путем интегрирования площади под зависимостями, показанными на рис. 2. Мы рассчитали площади под кривыми на рис. 2, за исключением кривой, полученной при концентрации дигитонина 0,02 мМ, когда лизиса клеток практически не наблюдается. Были построены кинетические зависимости интегрированного сигнала биолюминесценции, пропорционального концентрации высвобождаемой люциферазы, при

Т а б л и ц а 2

Скорость роста и максимальные значения сигналов биолюминесценции при разной концентрации дигитонина ($n = 3$)

Концентрация дигитонина в реакционной смеси, мМ	Скорость роста сигнала биолюминесценции, тыс. RLU/с	Время достижения максимального сигнала, с	Высота максимального пика, тыс. RLU	% от максимального пика
0,02	–	–	–	0
0,04	$1,65 \pm 0,05$	282 ± 2	592	38,6
0,05	$8,22 \pm 0,19$	121 ± 2	828	54,1
0,08	$17,13 \pm 0,50$	75 ± 2	1532	100,0
0,20	$105,93 \pm 5,90$	23 ± 1	1457	95,1

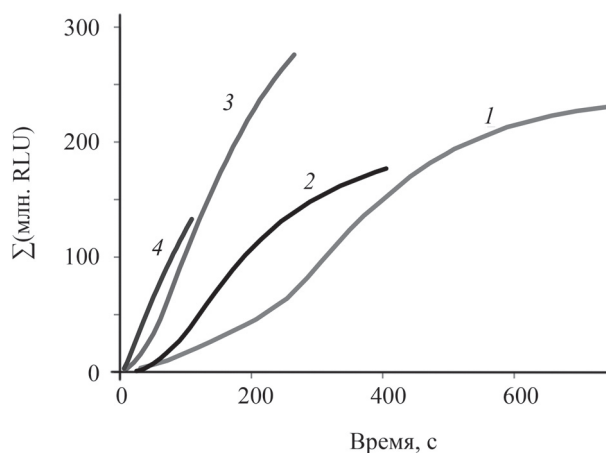


Рис. 3. Зависимость интегрированного сигнала биолюминесценции для высвобождаемой люциферазы от времени в присутствии дигитонина в разной концентрации (условия см. на рис. 2)

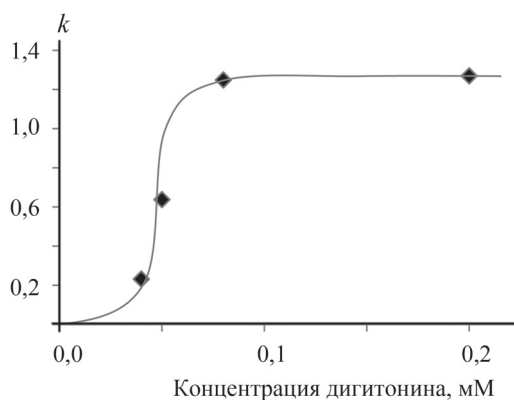


Рис. 4. Зависимость константы скорости высвобождения люциферазы из клеток НЕК293 от концентрации дигитонина, $k = \Sigma(\text{млн RLU})/c$ (условия см. на рис. 2)

разной концентрации дигитонина (рис. 3). Начальные участки кривых на рис. 3 описываются линейными зависимостями, параметры которых с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,99$ показаны в табл. 3. Тангенс наклона этих зависимостей характеризует константу скорости высвобождения люциферазы из клетки (k) как $\Sigma(\text{млн RLU})/c$.

На рис. 4 показано, что с ростом концентрации дигитонина константа скорости высвобождения люциферазы (k) из клеток растет, достигает мак-

симума при концентрации дигитонина 0,08 мМ и далее почти не изменяется. Причем константа скорости возрастает в 5,4 раза при увеличении концентрации дигитонина всего в 2 раза (от 0,04 до 0,08 мМ).

По аналогичной схеме было изучено влияние различных сапонинов на жизнеспособность клеток НЕК293. При концентрации клеток в реакционной среде $1,7 \cdot 10^4$ кл/мл были использованы достаточно высокие концентрации сапонинов: 0,1 мг/мл дигитонина и диосцина, а также 1 мг/мл протодиосцина. Результаты представлены на рис. 5.

На рис. 5 показано, что действие трех сапонинов различно. Дигитонин разрушает клетки очень быстро (в течение нескольких первых минут). Диосцин, взятый в той же концентрации, начинает действовать значительно позже, и биолюминесцентный сигнал появляется через 30 мин. Ступенчатое протекание лизиса можно объяснить наличием конгломератов клеток, как это было отмечено выше. Протодиосцин практически не оказывает действия на клетки НЕК293.

Сравнение структур трех сапонинов (рис. 6) показывает, что диосцин содержит менее объемную углеводную часть молекулы по сравнению с дигитонином. Ранее [8] было показано, что уменьшение числа углеводных циклов в молекуле дигитонина приводит к снижению его литической активности. Что касается протодиосцина, то наличие объемного заместителя в агликоновой части его молекулы препятствует связыванию стероидальной составляющей с мембраной. Под действием дигитонина это специфическое связывание приводит к модификации и образованию пор в клеточной мембране.

Полученные в данной работе кинетические данные по взаимодействию дигитонина и его аналогов с клетками НЕК293, а также литературные данные по взаимодействию дигитонина с различными типами клеток [17], приводят к выводу, что в зависимости от концентрации дигитонина его литический эффект воздействия на клетки проявляется различно. При этом рабочий диапазон

Таблица 3

Параметры линейных зависимостей с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,99$

Концентрация дигитонина, мМ	0,04	0,05	0,08	0,20
Уравнение зависимости	$y = 0,23x - 5,00$	$y = 0,64x - 22,88$	$y = 1,25x - 22,42$	$y = 1,27x - 1,76$
$k, \Sigma(\text{млн RLU})/c$	0,23	0,64	1,25	1,27

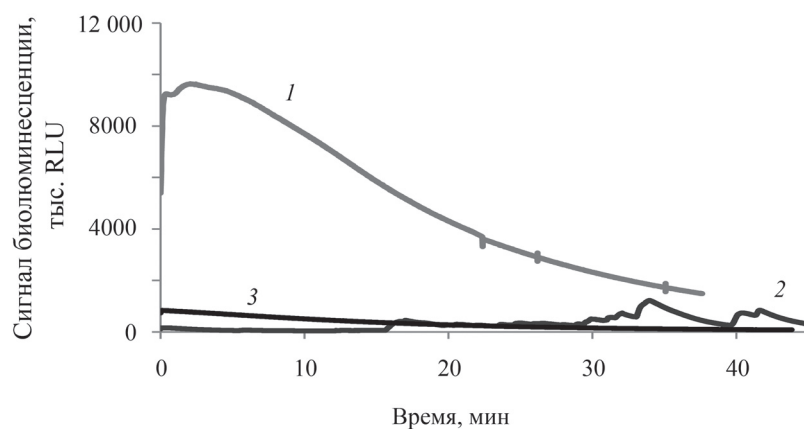


Рис. 5. Кинетические кривые зависимости сигнала биолюминесценции для люциферазы при лизисе клеток НЕК293 ($1,7 \cdot 10^4$ кл/мл) в присутствии различных сапонинов: 1 – 0,1 мг/мл дигитонина; 2 – 0,1 мг/мл диосцина; 3 – 1 мг/мл протодиосцина

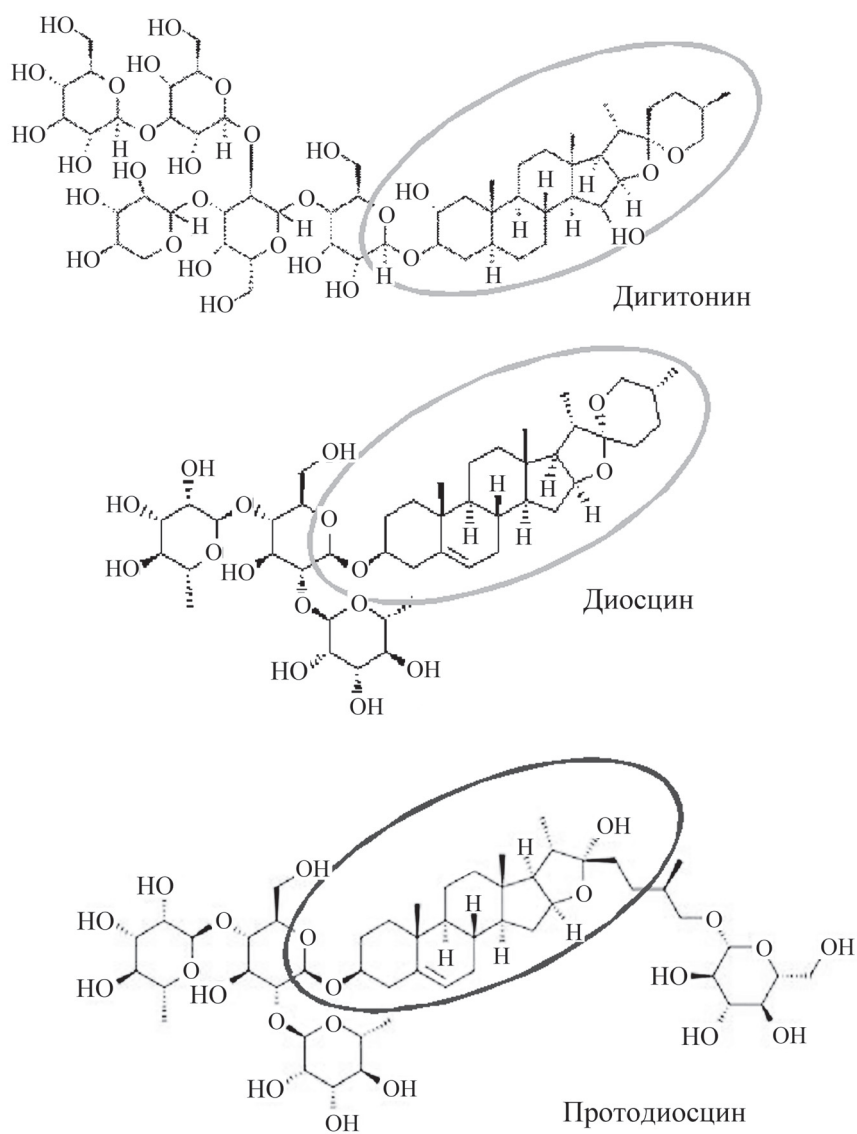


Рис. 6. Структура сапонинов, использованных в данной работе

концентраций сапонины довольно узок – от 0,02 до 0,2 мМ. При концентрации менее 0,02 мМ наблюдается довольно длительный период индукции, в течение которого не происходит вытекания белков в межклеточное пространство (рис. 1, А). На этом этапе (вероятно, при взаимодействии дигитонина с холестерином в мембране) происходят небольшие перестройки, образуются небольшие поры [8, 9], через которые могут проникать только небольшие молекулы. Например, в нашем случае при 0,02 мМ дигитонина наблюдается высвобождение АТФ в межклеточное пространство через 10 мин (рис. 1, Б). Для диосцина (аналога дигитонина) период индукции составляет около 30 мин (рис. 6). Чем выше концентрация дигитонина, тем короче период индукции. Дигитонин в низкой концентрации обычно используют для приготовления лекарственных композиций в целях увеличения их проницаемости внутрь патогенных клеток [6]. При повышении концентрации дигитонина период индукции постепенно сокращается (рис. 2) и интервал концентраций от ~0,04 до ~0,08 мМ уже достаточно токсичен для клеток. Концентрация высвобождаемого фермента быстро возрастает, что свидетельствует о формировании крупных пор в клеточных мембранах. В то же время предельная величина высвобождаемых белков не достигает максимума. Наиболее токсичен для клеток дигитонин в концентрации $\geq 0,08$ мМ. Уже в течение несколь-

ких десятков секунд достигается максимальная концентрация высвобождаемой люциферазы, а на кинетических кривых исчезает период индукции (рис. 2). Следует заметить, что в литературе, как правило, действие дигитонина на клетки оценивается по двум точкам: перед добавлением дигитонина и после инкубации с фиксированной концентрацией дигитонина в течение фиксированного времени [17]. Выбор этих двух факторов (концентрация дигитонина и длительность инкубирования) должен проводиться с учетом особенностей кинетики взаимодействия дигитонина с мембранами клеток, однако эти величины не всегда приводят в публикациях [10], что затрудняет сопоставление результатов разных авторов. Использование биолюминесцентного метода позволяет наблюдать в условиях *in situ* за изменениями проницаемости клеточных мембран под действием такого мембранно-активного эффектора, как дигитонин, на самых ранних стадиях процесса лизиса клеток.

Авторы выражают благодарность докт. хим. наук И.Г. Газарян за предоставление плазмид pGL3 и pcDNA3.1(+) и канд. хим. наук А.Н. Ставрианиди за предоставление препаратов диосцина и протодиосцина.

Работа выполнена в рамках государственной темы МГУ имени М.В. Ломоносова № АААА-А16-116052010081-5.

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hostettmann K., Marston A. // Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins; Cambridge, 2005.
2. Vincken P.J., Heng L., Groot A., Gruppen H. // Phytochemistry. 2007. Vol. 68. № 3. P. 275.
3. Sparg S.G., Light M.E., van Staden J. // J. Ethnopharmacol. 2004. Vol. 94. P. 219.
4. Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S. // Phytochemistry. 2011. Vol. 72. P. 435.
5. Fuchs H., Bachran D., Panjideh H., Schellmann N., Weng A., Melzig M., Sutherland M., Bachran C. // Curr. Drug Targets. 2009. Vol. 10. P. 140.
6. Herrmann F., Wink M. // Phytomedicine. 2011. Vol. 18. P. 1191.
7. Gaidi G., Correia M., Chauffert B., Beltramo J.L., Wagner H., Lacaille-Dubois M.A. // Planta Med. 2002. Vol. 68. P. 70.
8. Nishikawa M., Nojima S., Akiyama T., Sankawa U., Inoue K. // J. Biochem. 1984. Vol. 96. P. 1231.
9. Frenkel N., Makky A., Sudji I.R., Wink M., Tanaka M. // J. Phys. Chem. B. 2014. Vol. 50. P. 14632.
10. Sudji I.R., Subburaj Y., Frenkel N., García-Sáez A.J., Wink M. // Molecules. 2015. Vol. 20. P. 20146.
11. Hellmann J.K., Munter S., Wink M., Frischknecht F. // PLoS ONE. 2010. Vol. 5. P. e8682.
12. Jekunen A.P., Shalinsky D.R., Hom D.K., Albright K.D., Heath D., Howell S.B. // Biochem. Pharmacol. 1993. Vol. 45. P. 2079.
13. Eid S.Y., El-Readi M.Z., Wink M. // Phytomedicine. 2012. Vol. 19. P. 1307.
14. Tanaka T., Kaneda Y., Li T.S., Matsuoka T., Zempo N., Esato K. // Ann. Thorac. Surg. 2001. Vol. 72. P. 1173.
15. Васильева И. С., Пасешиченко В. А. // Усп. биол. химии. 2000. Т. 40, С. 153.
16. Hibasami H., Moteki H., Ishikawa K., Katsuzaki H., Imai K., Yoshioka K., Komiya T. // Intern. J. Mol. Med. 2003. Vol. 11. P. 23.
17. Matta H., Gopalakrishnan R., Choi S., Prakash R., Natarajan V., Prins R., Gong S., Chitnis S.D., Kahn M., Han X., Chaudhary V., Soni A., Sernas J., Khan P. Wang D., Chaudhary P.M. // Scientific Reports. 2018. Vol. 8. P. 199.
18. Fu X., Tao L., Rivera A., Williamson S., Song X.-T. et al. // PLoS ONE. 2010. Vol. 5. P. e11867.
19. Karimi M.A., Lee E., Bachmann M.H., Salicioni A.M., Behrens E.M., et al. // PLoS ONE. 2014. Vol. 9. P. e89357.
20. Пат. РФ. № 2420594. Б.И. 2011. № 16.

Поступила в редакцию 10.01.2020

Получена после доработки 12.01.2020

Принята к публикации 20.01.2020

KINETICS OF INTERACTION OF DIGITONIN AND ITS ANALOGUES WITH HEK293 CELLS STUDIED BY BIOLUMINESCENT METHOD

G.Yu. Lomakina^{1,2}, A.D. Fomina¹, N.N. Ugarova^{1*}

(¹ Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University; ² Bauman Moscow State Technical University; * e-mail: nugarova@gmail.com)

Digitonin – monodesmoid saponine – forms complexes with cholesterol of cell membranes, which leads to the disintegration of membrane structure, pores formation and release of intracellular components into the extracellular environment. Cells of the HEK293 line, transiently transfected by pcDNALuc plasmide, expressing the firefly luciferase, were used to study the kinetics of the initial stage of cell membrane interaction with digitonin. A method of continuous monitoring of this process by bioluminescent method was developed, which allowed the real-time registration of kinetic curves for accumulations in the extracellular environment of luciferase and ATP in the presence of digitonin. It is shown that the effect of digitonin on the cell membranes is determined by its concentration in the reactionary media. At concentrations of less than 0.02 mM there is a long period of induction, during which there is no release of luciferase from the cells, but small pores are formed, permeable to low-molecular substance (ATP). As the digitonin concentration increases to 0.05 mM, the induction period is reduced, the concentration of extracellular luciferase is rapidly increasing, that indicates on the formation of large pores. The most toxic for cells are the digitonin concentrations of 0.08 mM and more, when within a few tens of seconds the maximum concentration of the luciferase released is reached, and the induction period disappears on the kinetic curves. Thus, the bioluminescent method allows to study *in situ* the changes in permeability of cell membranes under the influence of membrane-active effectors in the early stages of the process of cell lysis.

Key words: bioluminescence, firefly luciferase, HEK293 cells, digitonin, saponins, cytotoxicity, cellular membrane permeability.

Сведения об авторах: Ломакина Галина Юрьевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (lomakinagalina@yahoo.com); Фомина Анастасия Дмитриевна – выпускница кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (adf@yemail.com); Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (nugarova@gmail.com).