

1
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Оренбургская область
Саракташский район
Валиева Ж.А.



2023

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Е.А. Щуплова, 2023

УДК 543.424.2:579.22

Е.А. Щуплова

ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ ФОСФОЛИПИДОВ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург, Россия

Цель. Выявить конформационные изменения в фосфолипидах мембраны эритроцитов под действием микроорганизмов.

Материалы и методы. В исследовании применили модель «бактерии-эритроциты». Использовали штаммы микроорганизмов разных видов из сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их консорциумов ИКВС УрО РАН и эритроциты крови здорового донора. Для изучения изменений фосфолипидов мембраны эритроцитов под действием микроорганизмов применяли метод спектроскопии комбинационного рассеяния.

Результаты. При взаимодействии нетуберкулезных микобактерий (*M. iranicum*, *M. rutilum*) с эритроцитами наблюдали интенсивные пики в диапазоне, характерном для симметричного растяжения связи С-Н. В диапазоне, характерном для асимметричного колебания алкильной цепи липидов, пики наблюдали в спектре, присущим *E. coli* и *M. iranicum*. Под действием других бактерий значения спектров не отличались от контрольных показателей. В диапазоне, характерном для колебания группы CH_2 , наблюдали пики в спектрах, присущих *M. iranicum* и *S. aureus*.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии микроорганизмов на степень неупорядоченности жирных кислот в фосфолипидах мембраны эритроцитов, то есть микроорганизмы оказывают влияние на межмолекулярную цепь, нарушая состав связей в липидах мембраны, приводя к текучести липидного бислоя.

Ключевые слова: *Mycobacterium rutilum*, *M. iranicum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium amycolatum*, эритроциты, фосфолипиды мембраны.

Е.А. Shchuplova

CHANGES IN THE CONFORMATION OF PHOSPHOLIPIDS OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANE UNDER THE INFLUENCE OF MICROORGANISMS

Orenburg Federal Research Center, UB RAS (Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, UB RAS), Orenburg, Russia

Aim. Identify conformational changes in phospholipids of the erythrocyte membrane under the influence of microorganisms.

Materials and methods. The study used the bacteria-erythrocyte model. We used strains of microorganisms of different species from the network collection of symbiont microorganisms and their consortia IKVS Ural Branch RAS and erythrocytes from a healthy donor. Raman spectroscopy was used to study changes in erythrocyte membrane phospholipids under the action of microorganisms.

Results. During the interaction of non-tuberculous mycobacteria (*M. iranicum*, *M. rutilum*) with erythrocytes, intense peaks were observed in the range characteristic of symmetric stretching of the C-H bond. In the range characteristic of asymmetric vibration of the alkyl chain of lipids, peaks were observed in the spectrum characteristic of *E. coli* and *M. iranicum*. Under the influence of other microorganisms, the spectral values did not differ from the control indicators. Peaks in the spectra characteristic of *M. iranicum* and *S. aureus* were observed in the range

characteristic of the vibration of the CH₂ group.

Conclusion. The results obtained indicate the influence of microorganisms on the degree of disorder of fatty acids in the phospholipids of the erythrocyte membrane, i.e. microorganisms influence the intermolecular chain, disrupting the composition of bonds in membrane lipids, leading to the fluidity of the lipid bilayer.

Key words: *Mycobacterium rutilum*, *M. iranicum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium amycolatum*, erythrocytes, membrane phospholipids.

Введение

При взаимодействии бактерий с эритроцитами первоначально образуется связь клеточной стенки микроорганизма (адгезины) с поверхностью мембраны эритроцита (рецепторы). Мембрана эритроцитов представляет собой пластичную молекулярную мозаику из белков, липо- и гликопротеинов и, возможно, чисто липидных участков [1]. Клеточную мембрану эритроцита условно разделяют на три слоя. Наружный слой образован гликопротеинами и включает комплексы концевых отделов антигенов. Средний слой клеточной мембраны эритроцита состоит из липидного бислоя, а внутренний слой мембраны содержит белки, с которыми связаны молекулы гликолитических ферментов, гемоглобина и белков, формирующих цитоскелет [1].

Мембрана эукариот – динамическое образование, в котором липиды расположены перпендикулярно плоскости мембраны и способны диффундировать как параллельно (продольно) поверхности мембраны, так и из одного монослоя в другой [2]. Каждая молекула фосфолипида состоит из полярной головки (гидрофильная часть молекулы) и двух хвостов (остатков жирных кислот) [1]. При нарушении определенной организации липидов эритроцитарной мембраны клетка теряет способность регулировать ионный и антиоксидантный гомеостаз, что ведет к нарушению активности метаболизма, в следствии чего происходят необратимые изменения структуры и физиологических функций эритроцита [2, 3].

На сегодняшний день малоизученным остается вопрос о влиянии микроорганизмов на конформацию фосфолипидов в мембране эритроцитов.

Цель данной работы – изучить конформационные изменения фосфолипидов в мембране эритроцитов под действием микроорганизмов.

Материалы и методы

В данной работе использовали штаммы микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium amycolatum*, *Mycobacterium rutilum* и *M. iranicum*) из сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их кон-

сорциумов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург, Россия). Идентификация была проведена по последовательности гена 16S рРНК в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург, Россия). Полученные последовательности сравнивали с гомологичными последовательностями гена 16S рРНК в базе данных BLAST U.S. National Library of Medicine NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Изменения в конформации фосфолипидов мембраны эритроцитов под действием микроорганизмов изучали на модели «бактерии-эритроциты».

Эритроциты получали путем забора крови от здорового донора из локтевой вены стандартным клиническим методом, используя в качестве антикоагулянта цитрат натрия. Для отделения эритроцитов от других форменных элементов и плазмы брали 2 мл крови и к ней добавляли 8 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (рН=7.4) трехкратно отмывали центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин и доводили эритроциты до концентрации 10^6 эр/мл.

Смешивали подготовленные эритроциты в объеме 0,5 мл с 1 мл микробной взвеси исследуемых микроорганизмов (в концентрации $\sim 10^9$ КОЕ/мл) и 0,5 мл питательной среды RPMI – 1640 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. Затем 1 мл клеточной суспензии осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин. В опытных и контрольных образцах изучали спектральные характеристики фосфолипидов мембраны эритроцитов под влиянием микроорганизмов.

Для определения фосфолипидов мембраны эритроцитов с применением метода комбинационного рассеяния (КР) получали КР-спектры мембран эритроцитов, в том числе после их взаимодействия с микроорганизмами. Исследуемые образцы наносили тонким слоем на предметное стекло и помещали на столик микроскопа. КР-спектры снимали с помощью микроскопа *in Via Raman Microscope* (Renishaw, Англия), используя лазер с длиной волны излучения 532 нм, мощность излучения 5 мВт, объектив х5.

Для характеристики спектров фосфолипидов мембраны эритроцитов, учитывали пики в области $2740-3050\text{ см}^{-1}$, характеризующие растяжение С-Н цепей, и пики в области $2800-2885\text{ см}^{-1}$, отражающие симметричные и асимметричные колебания алкильной цепи липидов. Также для спектрального анализа использовали отношение интенсивностей при 2885 см^{-1} и 2845 см^{-1} ,

которое показывает меру чувствительности к количеству гош перегибов в алкильных цепях и сопутствующие уменьшения латеральных взаимодействий цепь-цепь (то есть их текучесть) [4, 5]. В области 2900-2950 см^{-1} оценивали повышение интенсивности поглощения колебанием группы – CH_2 . Полученные спектры обрабатывали с помощью программы OriginPro 8.1.

Все описанные опыты проводились в трех повторностях. Полученные данные были обработаны с помощью программы STATISTICA 10.0. Значения $p \leq 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

При изучении конформационного состояния жирных кислот липидов были зарегистрированы спектры комбинационного рассеяния (КР) мембраны эритроцитов при их взаимодействии с микроорганизмами.

В результате проведенных исследований выявлены изменения конформационных свойств жирных кислот в мембране эритроцитов при их взаимодействии с микроорганизмами (рис. 1).

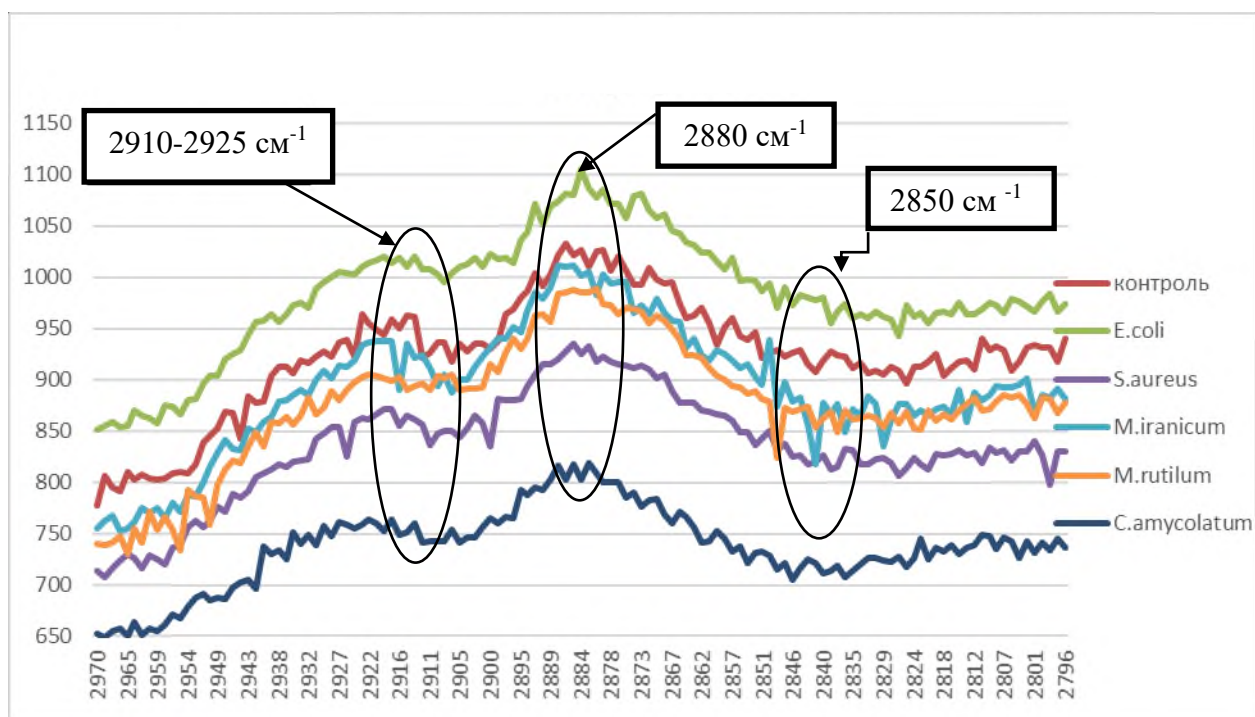


Рис. 1. Спектры фосфолипидов мембраны эритроцитов под действием микроорганизмов.

На рисунке 1 можно видеть, что микроорганизмы влияют на растяжение связей С-Н цепей в фосфолипидах мембраны эритроцитов, о чем свидетельствуют пики в диапазоне 2790-2970 см^{-1} . В диапазоне длины волны 2850 см^{-1} ,

характерной для симметричного растяжения связи С-Н, интенсивные пики наблюдали у нетуберкулезных микобактерий (*M. iranicum*, *M. rutilum*) относительно контрольных значений. Под действием других бактерий на спектрах имеются пики, но не значительные, не отличающиеся от значений спектра контрольного образца. В диапазоне 2880 см^{-1} , характерном для асимметричного колебания алкильной цепи липидов, пики наблюдали в спектре, присущем *E. coli* и *M. iranicum*. Под действием других микроорганизмов, значения спектров не отличались от контрольных показателей. В диапазоне $2910\text{-}2925\text{ см}^{-1}$, характерном для колебания группы CH_2 , наблюдали пики в спектрах, присущих *M. iranicum* и *S. aureus*, относительно контрольных значений. Необходимо отметить, что спектр, присущий *C. amycolatum* ICIS 53, в отличии от спектров других бактерий, не имел значимых пиков и практически не отличался от спектра значений в контроле.

Для анализа изменения текучести мембраны эритроцитов под действием микроорганизмов использовали отношение интенсивностей при 2885 см^{-1} и 2845 см^{-1} , так как оно показывает меру чувствительности к количеству гош-перегибов в алкильных цепях и сопутствующее уменьшение латеральных взаимодействий цепь-цепь (то есть их текучесть) [5, 6]. Под действием микроорганизмов значение отношения интенсивностей при 2885 см^{-1} и 2845 см^{-1} отличалось от контрольных значений. На 5,5% превышало значение отношения интенсивностей под действием *C. amycolatum* ICIS 53 относительно контроля. Минимальную разницу значений отношений от контрольного образца наблюдали у *E. coli*, что составило 0,9%. Под действием *S. aureus* и нетуберкулезных микобактерий происходило повышение значений отношения интенсивностей в среднем на 3,6% относительно контроля.

Под действием бактерий значение отношения интенсивностей при 2885 см^{-1} и 2845 см^{-1} отличалось от контрольных значений. На 5,5% превышало значение отношения интенсивностей под действием *C. amycolatum* ICIS 53 относительно контроля. Минимальную разницу значений отношений от контрольного образца наблюдали у *E. coli*, что составило 0,9%. Под действием *S. aureus* и нетуберкулезных микобактерий происходило повышение значений отношения интенсивностей в среднем на 3,6% относительно контроля.

Соотношение I_{2930} / I_{2885} отражает степень неупорядоченности углеводородной цепи жирных кислот в мембране эритроцитов, которая указывает

на нарушения межмолекулярных связей в составе липидов. Под действием *S. amycolatum* ICIS 53 значение отношения интенсивностей при 2930 см^{-1} и 2885 см^{-1} на 2,2% превышало значение в контроле, а под действием *M. rutilum*, напротив, на 3,3% наблюдали понижение значений отношений интенсивностей относительно результатов в контрольной пробе. Под действием *S. aureus* изменений отношений интенсивностей при 2930 см^{-1} и 2885 см^{-1} относительно контроля не обнаружено.

Полученные данные свидетельствовали, что воздействие микроорганизмов приводило к изменению конформации молекул фосфолипидов мембраны эритроцитов и соответственно к изменению её свойств и функций. Микроорганизмы увеличивают количество гош-перегибов в алкильных цепях, тем самым дестабилизируют С-Н связь, вследствие чего происходят изменения в свойствах мембраны, изменяются латеральные взаимодействия цепь-цепь, а именно текучесть липидного бислоя.

Полученные результаты подтверждаются данными литературы, где описывают изменения в подвижности углеродных атомов в углеродной цепи, появление гош-конфигураций, изменение степени насыщенности жирных кислот, приводящее к нарушению микровязкости мембраны, то есть её текучести [3]. Изменение вязкости мембраны эритроцитов наблюдали у крыс с постишемической реперфузии в отличие от крыс с ишемией мозга [7]. Авторы работы отметили, что изменение вязкости мембраны может быть одним из факторов увеличения её ригидности и уменьшения деформируемости эритроцитов, что может приводить к нарушению кровотока в капиллярах. Другие авторы отмечают изменения жирнокислотного состава фосфолипидов мембраны эритроцитов под действием гипотермии, причем степень изменений зависит от длительности воздействия исследуемого фактора [8]. Данные изменения в структуре мембраны приводят соответственно к нарушению физиологических функций эритроцита. При увеличении степени изменений в мембране эритроцитов, увеличивается степень деформируемости клетки, приводящее к уменьшению скорости транспорта кислорода к клеткам организма и развитию гипоксии [3, 4].

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при взаимодействии бактерий разных видов с эритроцитами изменяется степень неупорядоченности жирных кислот в фосфолипидах мембраны эритроцитов, оказыва-

ющая влияние на межмолекулярную цепь, нарушающая состав связей в фосфолипидах мембраны и приводящая к текучести липидного бислоя. Необходимо отметить, что мембрана эритроцитов становится более уязвимой, поскольку в её составе содержится большое количество легко окисляемых фосфолипидов. Конформационные изменения фосфолипидов способствуют нарушению функциональности как самой мембраны, так и всей клетки в целом, что может привести к уменьшению продолжительность жизни эритроцитов и к увеличению количества поврежденных и стареющих клеток.

Таким образом, при взаимодействии бактерий с эритроцитами мембраны последних становятся конкретной мишенью для патогенных факторов микроорганизмов, вовлекаясь в патологический процесс. В них инициируются универсальные механизмы повреждения клетки (недостаток энергопродукции, усиление процессов свободнорадикального окисления, активация фосфолипаз, протеаз, нарушение ионного гомеостаза и др.), что может наблюдаться при бактериемии и сепсисе.

Благодарность:

Автор выражает искреннюю признательность за техническую помощь в проведении исследований коллегам из Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва, д.б.н., проф. В.В. Ревину, к.б.н. С.И. Пиняеву, а также к.м.н. Гладышевой И.В. (ИКВС УрО РАН) и к.б.н. Гоголевой О.А. (Казанский научный центр РАН) за предоставленные штаммы коринебактерий и нетуберкулезных микобактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мороз В. В., Голубев А. М., Афанасьев А. В., Кузовлев А. Н. и др. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2012. VIII (1): 52-60.
2. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б. и др. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и её изменения при патологиях разного генеза. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2010. 3(73): 334-354.
3. Мухомедзянова С.В., Пивоваров Ю.И., Богданова О.В., Дмитриева Л.А., Шулунов А.А. Липиды биологических мембран в норме и патологии (обзор литературы). *Acta bio-medica scientifica*. 2017. 2 (5): 43-49.
4. Срубилин Д.В., Еникеев Д.А., Исаков И.Д. Структурно-функциональные нарушения эритроцитов и их коррекция низкоинтенсивным лазерным излучением при субхронической интоксикации дихлорэтаном. *Вестник новых медицинских технологий*. 2012. XIX (4): 105-108.
5. Rinia H.A., Buger N.J. Koert, Bonn M. Quantitative label – free imaging of lipid composition and packing of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy. *Biophysical Journal*. 2008. 95: 4908-4914
6. Fu Y. Paranodal myelin retraction in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis visualized by coherent antiStokes Raman scattering microscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2011. 16. (10): 1-10.
7. Лунева О.Г., Браже Н.А., Фадюкова О.Е., Ахалая М.Я. и др. Изменения вязкости плаз-

- матической мембраны и конформации гемопорфирина гемоглобина эритроцитов при ишемии и реперфузии мозга крыс. Доклады Академии наук. 2005. 405. (6): 834-836.
8. Раджабова З.Г., Забелинский С.А., Чеботарев М.А., Шуколокова Е.П. и др. Влияние умеренной гипотермии на фосфолипидный и жирнокислотный состав мембран эритроцитов крыс. Биологические мембраны. 2020. 37. (2): 134-148.

Поступила 27.03.2023 г.

(Контактная информация: **Щуплова Елена Алексеевна** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экологии микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8 (3532) 77-54-17, e-mail: Khanina83@yandex.ru)

REFERENCES

1. Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V., Kuzovlev A.N. et al. Structure and function of the erythrocyte in normal conditions and in critical conditions. General resuscitation. 2012. VIII (1): 52-60.
2. Borovskaya M.K., Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Koryakina L.B. et al. Structural and functional characteristics of the erythrocyte membrane and its changes in pathologies of various origins. Bulletin of the All-Russian Scientific Center SB RAMS. 2010. 3(73): 334-354.
3. Mukhomedzyanova S.V., Pivovarov Yu.I., Bogdanova O.V., Dmitrieva L.A., Shulunov A.A. Lipids of biological membranes in normal and pathological conditions (literature review). Acta biomedica scientifica. 2017. 2 (5): 43-49.
4. Srubilin D.V., Enikeev D.A., Isakov I.D. Structural and functional disorders of erythrocytes and their correction by low-intensity laser radiation during subchronic intoxication with dichloroethane. Bulletin of new medical technologies. 2012. XIX (4): 105-108.
5. Rinia H.A., Buger N.J. Koert, Bonn M. Quantitative label – free imaging of lipid composition and packing of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy. Biophysical Journal. 2008. 95: 4908-4914.
6. Fu Y. Paranodal myelin retraction in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis visualized by coherent antiStokes Raman scattering microscopy. Journal of Biomedical Optics. 2011. 16. (10): 1-10.
7. Luneva O.G., Brazhe N.A., Fadyukova O.E., Ahalaya M.YA. et al. Changes in plasma membrane viscosity and hemoporphyrin conformation of erythrocyte hemoglobin during ischemia and reperfusion of the rat brain. Reports of the Academy of Sciences. 2005. 405. (6): 834-836.
8. Radzhabova Z.G., Zabelinsky S.A., Chebotarev M.A., Shukolyukova E.P. et al. The influence of moderate hypothermia on the phospholipid and fatty acid composition of rat erythrocyte membranes. Biological membranes. 2020. 37. (2): 134-148.

Образец ссылки на статью:

Щуплова Е.А. Изменения конформации фосфолипидов мембраны эритроцитов под действием микроорганизмов. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2023. 1: 8 с. [Электр. ресурс] (URL: [http:// elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-1/Articles/SEA-2023-1.pdf](http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-1/Articles/SEA-2023-1.pdf)) DOI: 10.24411/2304-9081-2023-11006.