

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА

**ПИРШЕВ КИРИЛО ОЛЕКСАНДРОВИЧ**



УДК: 57.085.23:577.115.7:577.352.336:57.012.5:57.033

**ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ЛІПІДІВ  
ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЗА АПОПТОЗУ ТА ЕРИПТОЗУ**

Спеціальність 03.00.04 – Біохімія

Автореферат дисертації  
на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

КИЇВ-2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник.  
**Демченко Олександр Петрович**

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Стойка Ростислав Стефанович**  
завідувач відділу регуляції проліферації клітин і  
апоптозу Інституту біології клітини НАН України

доктор біологічних наук, професор  
**Білан Павло Володимирович**  
завідувач відділу молекулярної біофізики  
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Захист дисертації відбудеться "25" березня 2019 р. о 16<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою:  
01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9

Автореферат розіслано "21" лютого 2019 р.

Вчений секретар  
Спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук



Карлова Н.П.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми дослідження.** Завдяки особливому складу та властивостям ліпідні мембрани слугують для просторового розподілу біохімічних реакцій в клітині (Van Meer et al., 2008). Системні дослідження їх структури впродовж останніх десятиліть призвели до створення теорії ліпідних рафтів, або мікродоменів (Levental and Veatch, 2016; Lingwood and Simons, 2010; Simons and Ikonen, 1997), яка полягає у особливій супрамолекулярній будові плазматичної мембрани клітин. В такій моделі більш щільна Lo (Liquid-ordered; рідинно-впорядкована) фаза, яка складається з холестеролу та фосфоліпідів з насиченими ацильними ланцюгами, знаходиться в оточенні фосфоліпідів з ненасиченими ацильними ланцюгами — Ld (Liquid-disordered; рідинно-невпорядкована) фази. Структурні елементи плазматичної мембрани та їх динаміка мають суттєве значення для регуляції процесів, пов'язаних із топологією деяких мембранних протеїнів (Bogdanov et al., 2014), взаємодією із цитоскелетом (Gorbatyuk et al., 2006; Mohandas and Gallagher, 2008), участю у клітинному сигналінгу (Chang and Liou, 2016; Gajate and Mollinedo, 2015; Kay and Grinstein, 2013), тощо.

Апоптоз, або запрограмована загибель клітини, –глибоко консервативний еволюційний біологічний процес (Gulbins et al., 2000; Su et al., 2015). Дані літератури свідчать, що за апоптозу відбувається значний перерозподіл ліпідних мікродоменів між мембранними компонентами, зокрема, внаслідок гідролізу сфінгомієліну та перерозподілу холестеролу. Ериптоз (запрограмована загибель еритроцитів), який забезпечує усунення старіючих (Ghashghaie et al., 2012) або пошкоджених червоних клітин крові, розглядається як подібний до апоптозу процес, що залучає схожий рецепторний шлях активації (Lu et al., 2008; Mohandas and Gallagher, 2008). Подібно до апоптозу, ериптоз залучений до різноманітних патофізіологічних станів, зокрема, діабету (Maellaro et al., 2011), патологій нирок (Polak-Jonkisz et al., 2013), хвороб Паркінсона (Pretorius et al., 2014) й Альцгеймера (Johansson et al., 2014) та інших.

Таким чином, розподіл індивідуальних ліпідів та ліпідних фаз має значення для відображення структурних та функціональних взаємодій в клітинах. З огляду на наявні літературні дані, не можна створити картину взаємозв'язку між структурними, біохімічними та морфологічними властивостями плазматичної мембрани у формуванні її супрамолекулярної організації за клітинної загибелі. Тому актуальними є біохімічні та медико-біологічні дослідження, заплановані у дисертаційній роботі.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами лабораторії.** Робота виконана в рамках наукових тем лабораторії нанобіотехнологій відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ: “Розробка оптичних біосенсорів на основі сучасних нанотехнологій” (№ держреєстрації 0110U002699, 2010-2012 рр.);

“Дослідження флуоресцентних наноконструкцій і їх взаємодія з клітинними мембранами” (№ держреєстрації 0113U003202, 2013-2015 pp); Страсбурзький Університет, CNRS та ANR JCJC (ANR-11-JS07-014-01); SCOPES 2012-2014 (SNF grant 2-77280-11); короткотривала стипендія EMBO (ATSF 461-2015); Fulbright Research and Development Program (ПЕ Грант ID E0579608).

**Мета та задачі дослідження.** Метою дослідження є вивчення структурної організації ліпідів мембран еритроцитів та ядерних клітин за умов їх запрограмованої загибелі.

Відповідно до мети, у роботі вирішували такі завдання:

1. Вивчити характер змін ліпідних фаз у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу клітин HeLa.
2. Визначити взаємозв'язок між активацією каспази-3 та втратою трансмембранної асиметрії фосфатидилсерину (phosphatidylserine, PS) і зниженням вмісту Lo фази в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани ядерних клітин HeLa за апоптозу.
3. Дослідити порушення трансмембранної асиметрії PS та фосфатидилетаноламіну (phosphatidylethanolamine, PE) у плазматичній мембрані за апоптозу клітин Jurkat та ериптозу, а також зміни вмісту Lo фази в її зовнішньому моношарі.
4. Охарактеризувати гетерогенність змін розподілу ліпідних фаз у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу клітин HeLa та Jurkat та ериптозу.
5. Провести порівняльний аналіз впливу клітинних органел на вміст ліпідних мікродоменів в моношарах плазматичної мембрани ядерних (HeLa, Jurkat) та без'ядерних (еритроцитів) клітин за умов запрограмованої загибелі.
6. Визначити зміни щільності упаковки ліпідів та проникності плазматичної мембрани за апоптозу клітин HeLa та Jurkat та ериптозу.

**Об'єкт дослідження.** Плазматична мембрана клітин HeLa, Jurkat та еритроцитів людини.

**Предмет дослідження.** Організація супрамолекулярної структури плазматичної мембрани еритроцитів та ядерних клітин в інтактному стані та за умов запрограмованої загибелі.

**Методи дослідження:** культивування клітин, кінетика кислотного гемолізу, спектрофлуориметрія, конфокальна мікроскопія, протокова цитометрія, тонкошарова хроматографія, визначення активності каспази-3 за хромогенним субстратом, комп'ютерна обробка мікроскопічних зображень та даних протокової цитометрії, статистичні методи.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше доведено суттєву різницю між процесами, що визначають структурно-функціональні властивості плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу. Встановлено зв'язок між сигнальним шляхом, пов'язаним з активністю каспази-3 та зниженням вмісту Lo фази ліпідів у зовнішньому моношарі плазматичних мембран на ранніх

етапах запрограмованої загибелі клітин. Вперше встановлено порушення асиметрії розподілу PE у плазматичній мембрані клітин за апоптозу та ериптозу, яке відбувається одночасно із екстерналізацією PS. Вперше досліджено властивості супрамолекулярної організації ліпідів апоптотичних тілець та везикул за апоптозу та ериптозу. Вперше показано, що на склад ліпідних фаз обох моношарів плазматичної мембрани ядерних клітин можуть впливати мембрани їх органел, змінюючи тим самим вміст холестеролу та Lo фази за апоптозу. Вперше продемонстровано ущільнення упаковки ліпідів плазматичної мембрани еритроцитів за ериптозу, що підвищує їх стійкість до гемолізу.

**Практичне значення.** Для вивчення зміни біохімічних та біофізичних властивостей мембран запропоновано: використання TNBS (тринітробензенсульфонова кислота, барвник) у протоковій цитометрії для вивчення асиметрії розподілу PE між шарами плазматичної мембрани. Створено аналітичну FRET-систему із нових мембранних флуоресцентних зондів для дослідження структурно-механічних властивостей ліпідних фаз зовнішнього моношару мембран. Використано гасій флуоресценції та сольватохромних барвників для вивчення везикуляції плазматичної мембрани за запрограмованої загибелі клітин і застосовано карбонові точки для вивчення проникності плазматичної мембрани.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є завершеним дослідженням, виконаним відповідно до індивідуального навчального плану аспіранта протягом 2011-2014 років. Автор самостійно підібрав та провів аналіз наукової літератури за темою дисертації, одноособово виконав експериментальні дослідження, здійснив інтерпретацію результатів та статистичну обробку даних. Головна ідея та завдання досліджень були сформульовані спільно з науковим керівником – д.б.н. Демченком О.П. та к.х.н. Клімченком А.С. (співробітник відділу біофотоніки та фармакології Страсбурзького Університету, Директор *CNRS*, Страсбург, Франція). Карбонові точки для вивчення проникності плазматичної мембрани за апоптозу були надані М.О. Декалюк, к.б.н., н.с. відділу нейрохімії Інституту біохімії О.В. Палладіна НАНУ. Зразки великих та гігантських одношарових везикул надано співробітниками лабораторії Клімченка А.С., зокрема к.х.н. Кредер Р. Унікальні сольватохромні барвники були розроблені та люб'язно надані лабораторією Клімченка А.С. (к.х.н. Кучерак О.А. – NR12S, к.х.н. Ніко Й. – PA, к.х.н. Кредер Р. – bNR10S, bQ10S та F2N12SM). Разом із професором, к.б.н. Богдановим М.В. (співробітник відділу біохімії та молекулярної біології медичної школи імені МакГоверна, Г'юстон, Техас, США) розроблено метод реєстрації асиметрії PS/PE методом тонкошарової хроматографії та протокової цитометрії. Дослідження методом мікроскопії було виконано під керівництвом завідувача відділу світлової мікроскопії та скринінгу Вищої інженерної школи Цюріху, д.т.н. Г. Чутчем. Разом із науковим керівником проаналізовано отримані

результати, сформульовано й обґрунтовано висновки. Усі розділи дисертації написано здобувачем особисто.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати та окремі положення дисертаційної роботи були представлені на Міжнародній конференції “Actual Problems of Cryobiology and Cryomedicine” (Харків, Україна, 2012 р.), конференції-конкурсі молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології” (Київ, Україна, 2013, 2014, 2015, 2016 рр.), Зимовій школі поглибленого вивчення мікроскопії. Практичні курси: “Live cell imaging” та “Superresolution microscopy” (Цюрих, Швейцарія, 2013, 2016 рр.), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014 р.), практичному курсі “Advanced biophysical methods” (Печ, Угорщина, 2014 р.), Міжнародній конференції молодих науковців CYS (Київ, Україна, 2015 р.), X конференції імені Парнаса (Вроцлав, Польща, 2016 р.), XI науковій конференції “The Bridges in Life Sciences” (Прага, Чехія, 2016 р.), 41 FEBS конгресі (тези опубліковані в онлайн версії конгресу, 2016 р.), X міжнародній конференції GDRI “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies” (Львів, Україна 2016 р.), EMBO-FEBS поглибленому лекційному курсі “Molecular Architecture, Dynamics and Function of Biomembranes” (Корсика, Франція, 2017 р.).

Експериментальні результати доповідалися та обговорювалися на наукових семінарах відділу молекулярної імунології та засіданнях Вченої ради Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2011–2018 рр.), а також на наукових семінарах лабораторії біофотоніки та фармакології Страсбурзького Університету (Франція, Ількірх, 2013 р. та 2018р.), Інституту сцинтиляційних матеріалів НАНУ (Україна, Харків 2014 р.), Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ (Україна, Київ 2015 р.), лабораторії структурної та функціональної візуалізації тканин, Інституту експериментальної біології ім. Ненського (Польща, Варшава, 2016 р.), відділу Біохімії та Молекулярної біології, Медичної Школи ім. МакГоверна, Техаського медичного Університету (США, Г'юстон 2017–2018 рр.).

**Публікації.** Основні результати дисертації опубліковані у 20 наукових працях; з них - 5 статей у іноземних фахових рейтингових наукових журналах, що включені до міжнародних наукометричних баз даних (Web of Science, PubMed, SCOPUS – SJR Q1) та 15 тезах доповідей наукових конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається з анотації, переліку публікацій, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, розділу результатів обговорення власних досліджень, підсумку й узагальнення результатів дослідження, висновків. Робота викладена на 156 сторінках. Перелік посилань налічує 260 найменувань. Робота проілюстрована 54 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У цьому розділі розглянуто та проаналізовано літературні дані щодо розподілу ліпідів в асиметричних мембранах, а також їхньої ролі у формуванні структурних та функціональних взаємодій у клітинах. Незважаючи на численні дослідження мембранних структур, актуальним залишається вивчення впливу індивідуальних ліпідів та ліпідних фаз на властивості плазматичної мембрани за різних функціональних станів клітин. З'ясовано, що для досягнення поставленої мети та вивчення біохімічних процесів на рівні плазматичної мембрани доцільно застосовувати флуоресцентну спектроскопію, оскільки вона характеризується мінімальною інвазивністю з можливістю наблизити експериментальні умови до фізіологічних.

### РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Еритроцити ізолювали з периферійної крові здорових донорів. До 9 частин крові додавали 1 частину натрію цитрату (3.8%  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) в еквівалентному об'ємі 0.9% NaCl. Еритроцити відмивали в 0.9% NaCl шляхом осадження суспензії в процесі трьох центрифугувань у 1,5 мл пластикових пробірках в центрифугі Eppendorf MiniSpin (400 g, 450 g, 500 g відповідно). Надосадову рідину вилучали після кожного центрифугування.

Гомогенність суспензії еритроцитів перевіряли методом протокової цитофлуориметрії відповідно до показників прямого і бічного розсіювання. Відсоток відмитих клітин становив  $96.59 \pm 1.23$  %. Надалі еритроцити були ресуспендували в розчині Рінгера та інкубували за гематокриту 0.4%, при 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  з високим рівнем вологості.

T-лімфоцитарні клітини гістоцитарної лімфоми людини (Jurkat) культивували в АТСС-модифікованому середовищі RPMI 1640 (Gibco) з 10 % інактивованої теплом ендотеліальної телячої сироватки (FBS, Gibco), 1 % розчином антибіотику (пеніцилін-стрептоміцин, Nycloze) в термостатованому інкубаторі з високим рівнем зволоженості з 5%  $\text{CO}_2$  та температурою 37 °C.

Епітеліальні клітини аденокарциноми людини (HeLa) культивували в середовищі DMEM (Gibco) з 10 % інактивованою теплом ендотеліальною телячою сироваткою (FBS, Lonza), 1 % розчином антибіотику (пеніцилін-стрептоміцин, Gibco-Invitrogen) в термостатованому інкубаторі з високим рівнем зволоженості з 5%  $\text{CO}_2$  та температурою 37 °C.

Виснаження холестеролу виконували із метил- $\beta$ -циклодекстрином (M $\beta$ CD, Sigma-Aldrich) для індукції прямих змін в порядкуванні ліпідів плазматичної мембрани (Zidovetzki and Levitan, 2007).

Висока афінність M $\beta$ CD до холестеролу (Chol, Sigma-Aldrich) використовували для збагачення ним плазматичної мембрани клітин завдяки комплексу Chol:M $\beta$ CD (1:20) (Zidovetzki and Levitan, 2007).

Насичення плазматичної мембрани 7-кетохолестеролом призводить до дестабілізації впорядкованої фази та порушення властивостей плазматичної мембрани (Schieffer et al., 2014). Збагачення 7-кетохолестеролом (7KChol, Sigma-Aldrich) проводили, використовуючи комплекс 7KChol:M $\beta$ CD (1:20).

Гідроліз сфінгомієліну, залученого до формування ліпідних рафтів, проводили з використанням сфінгомієлінази (SMаза, Sigma-Aldrich).

Для індукції апоптозу використовували п'ять різних сполук: IPA-3 (1,1'-Disulfanediylldinaphthalen-2-ol, Sigma-Aldrich), що є аллостеричним інгібітором Pak1 (p21-активованої кінази) III (Ong et al., 2011); камптотецин (Sigma-Aldrich) – інгібітор ДНК топоізомерази I (Hsiang et al., 1985); іономіцин (Sigma-Aldrich), що є іонофором, який призводить до утворення пор, через які Ca<sup>2+</sup> накопичується в цитоплазмі клітин та призводить до розвитку Ca<sup>2+</sup>-залежної клітинної загибелі (Abed et al., 2012; Gil-Parrado et al., 2002); сфінгозин – стимулює вхід Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму (Qadri et al., 2011); куркумін, що спричиняє надходження Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму та сприяє утворенню цераміду (Bentzen et al., 2007). Для інгібування каспази-3 застосовувався пептид Z-DEVD-FMK (BioVision).

Для дослідження структурно-функціональних властивостей плазматичної мембрани еритроцитів застосовували метод кислотних еритрограм (Терсков and Гительзон, 1957). Для реєстрації зміни оптичної щільності при 670 нм використовувався спектрофотометр LambdaBio+.

Для характеристики вмісту Ca<sup>2+</sup>, активації каспази-3 та властивостей плазматичної мембрани використовували як комерційні барвники, так і ті, які були розроблені в співпраці із колегами з факультету фармації Страсбурзького університету.

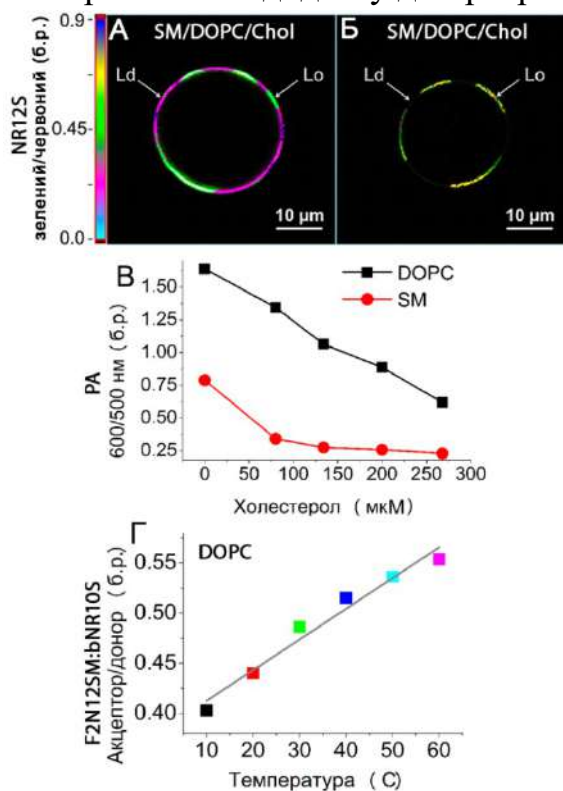
Спектри флуоресценції барвників NR12S, PA (або F2N12SM:bNR10S) та карбонових точок реєстрували спектрофлуориметром РТІ Quanta Master40 із збудженням 488 нм, 405 нм та 360 нм, відповідно, за кімнатної температури. Всі спектри нормалізували відповідно сигналу суспензії клітин без барвника. Для статистичного аналізу сигналу барвників дані були розраховані як співвідношення 560/610 нм (NR12S), 600/500 нм (PA) та 625/475 нм (“акцептор”/“донор”, F2N12SM:bNR10S) ліній інтенсивності за допомогою програмного забезпечення OriginPro.

Клітини, забарвлені поодинокими барвниками, досліджували на протокових цитометрах BD LSR II та Beckman Coulter Epics XL. Реєстрація сигналу GFP-міченого Анексину 5, Fluo-4, FITC-DEVD-FMK відбувалася при збудженні аргонним лазером із довжиною хвилі 488 нм. Для реєстрації сигналу був задіяний канал емісії FL1. Для збудження молекули NR12S використовували аргонний лазер із довжиною хвилі 488 нм, в свою чергу сигнал флуоресценції реєструвався у двох фотофільтрах: жовтому (FL2, PE) – “зелений” канал та червоному (FL3, PE-Texas Red) – “червоний” канал.



Для реєстрації сигналу одночасно від двох барвників використовували протоковий цитофлуориметр BeckmanCoulter Gallios. Реєстрація сигналу TNBS (та NR12S) відбувалась при збудженні 488 нм в каналі FL6 (або каналах FL2/FL3), а реєстрація Тихоокеанського синього (Pacific blue) Анексину 5 – при збудженні 405 нм в каналі FL9. Всі забарвлені клітини аналізували за допомогою прямого та бічного розсіювання протокового цитометра. Для кожного зразку реєстрували 30,000 подій для отримання ефективного сигналу. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення FCS express V3.

Для візуалізації клітин із зондом NR12S застосовували збудження аргонним лазером довжиною хвилі 488 нм. Сигнал емісії був розділений на два канали: “зелений” (550–580 нм) та “червоний” (590–620 нм). Для візуалізації із барвником PA та FRET системою на основі F2N12SM-bNR10S використовували збудження довжиною хвилі 405 нм. Сигнал емісії був розділений на два канали: “синій” (або “донор”) - (450-540 нм) та “червоний” (або “акцептор”) (550-650 нм). Ратіометричну відповідь розраховували як співвідношення інтенсивностей по кожному пікселю в двох каналах емісії (“зелений”/“червоний”, “червоний”/“синій” або “акцептор”/“донор”) з використанням додатку до програми ImageJ, “Ratio\_Intensity\_color Version 2.5”.



*Рис.1 Залежність сигналів флуоресцентних барвників NR12S (A) та NR12S+bQ10S (B); PA (B); F2N12SM:bNR10S (Г) від складу модельних мембран та змін температури.*

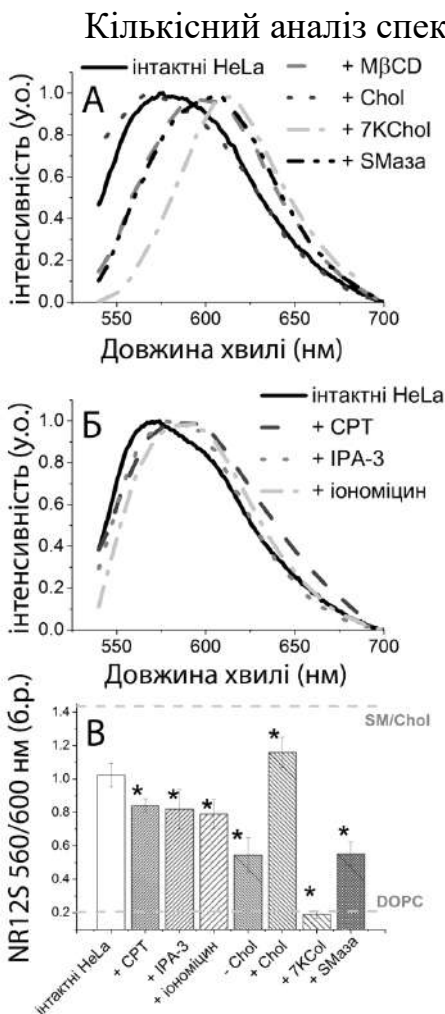
Експерименти конфокальної мікроскопії проводили за допомогою приладу ZEISS LSM 780-FCS із 63x/1.4 об'єктивом із масляною імерсією за 37°C, 5% CO<sub>2</sub> та високої вологості.

Ефективність барвників для виявлення змін властивостей ліпідних мембран показали за допомогою досліджень на модельних мембранах, що складаються з сфінгомієліну (SM), диолеїлфосфатиділхоліну (DOPC) та холестеролу (Chol) (Рис.1). Показано, що гігантські ліпосоми, які складаються з SM/DOPC/Chol отримані за допомогою електроформації мають розділені ліпідні фази Lo та Ld при візуалізації за допомогою барвника NR12S (Рис. 1A). Це підтверджується при додаванні до забарвлених NR12S ліпосом гасія bQ10S селективного для фази Ld (Рис. 1B). В свою чергу, чутливість барвника PA до вмісту холестеролу, показана на малих ліпосомах отриманих за допомогою

ультразвуку, які складаються з DOPC та SM (Рис. 1В). FRET (Флуоресцентне резонансне перенесення енергії)-система, яка складається з донора – F2N12SM та акцептора – bNR10S, створена для визначення щільності упаковки ліпідів в мембранах. Показано, що при нагріванні малих ліпосом на основі DOPC підвищується сигнал акцептору внаслідок зниження щільності упаковки ліпідів (Рис. 1Г).

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Визначення взаємозв'язку між активацією каспази-3 та зміною властивостей плазматичної мембрани ядерних клітин HeLa за апоптозу.* Показано, що за насичення плазматичної мембрани клітин HeLa 7KChol відбувається червоний зсув максимуму емісії NR12S (зменшення вмісту Lo фази), в свою чергу ефекти впливу SMази, M $\beta$ CD (виснаження холестеролу) були значними, але менш вираженими. Насичення плазматичної мембрани клітин на Chol призвело до синього зсуву емісії барвника (збільшення вмісту Lo-подібної фази, рис.2А). Відповідно до описаних контролів, інкубація клітин з апоптоз-індукуючими агентами, такими як ІРА-3, іономіцин та камптотецин, призвела до зменшення вмісту фази Lo в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани клітин HeLa (Рис.2Б).



підтвердив ці спостереження (Рис.2В). Це означає, що зміни властивостей плазматичної мембрани за апоптозу можуть бути пов'язані з перерозподілом холестеролу в її зовнішньому моношарі, що впливає на супрамолекулярну організацію фосфоліпідів і сфінголіпідів.

*Рис.2. Зміни вмісту рідинно-впорядкованої фази в зовнішньому моношарі клітин HeLa за апоптозу.* (А) Спектри емісії барвника NR12S в клітинах, оброблених M $\beta$ CD (5 мМ, 2 год.), Chol:M $\beta$ CD (1:20, 5 мМ M $\beta$ CD, 3 год.), 7KChol:M $\beta$ CD (1:20, 5 мМ M $\beta$ CD, 3 год.), сфінгомеліназою (SMаза, 0.2 мОд, 2 год.). (Б) Спектри емісії барвника NR12S в клітинах, оброблених апоптоз-індукуючими агентами камптотецином (CPT, 5мкг/мл, 18 год.), ІРА-3 (25 мкМ, 40 год.) та іономіцином (8мкМ, 6 годин). (В) Для кількісного аналізу дані розраховувалися як співвідношення інтенсивностей 560/600 нм. Дані представлені як середні арифметичні значення співвідношень  $\pm$  СП ( $n = 4$ ).

\*  $P < 0.05$  відносно значень контрольної групи (ANOVA)

Клітини з більшим вмістом активованої каспази-3 мали подібну частотність у субпопуляції порівняно з клітинами зі зміненою асиметрією PS та вмістом  $L_o$  фази в плазматичній мембрані протягом всього часу інкубації з камптотецином (Рис. 3Г). Коефіцієнт кореляції Пірсона між даними для NR12S та FITC-DEVD-FMK склав 0,9731, між GFP-Анексином 5 та FITC-DEVD-FMK – 0,9568, між NR12S та GFP-Анексином 5 – 0,9940. Таким чином, дані потокової цитометрії свідчать про виражену кореляцію між активацією каспази-3, загальним перерозподілом ліпідів та експозицією PS за весь часовий діапазон (0-24 год). Незважаючи на це, популяція клітин з вищою активністю каспази-3 з'явилася швидше, ніж було виявлено при змінах трансмембранної ліпідної асиметрії. Спільне введення IPA-3 (або камптотецину) з інгібітором каспази-3, Z-DEVD-FMK, призвело до зменшення апоптотичної субпопуляції за всіма вимірюваними параметрами. Таким чином, кількісний аналіз даних проточної цитометрії (Рис.3Д) вперше виявив, що зміна кількості клітин із більшим вмістом фази  $L_d$  у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу корелює із кількістю клітин з активованою каспазою-3 та порушеною асиметрією PS для ядерних клітин HeLa.

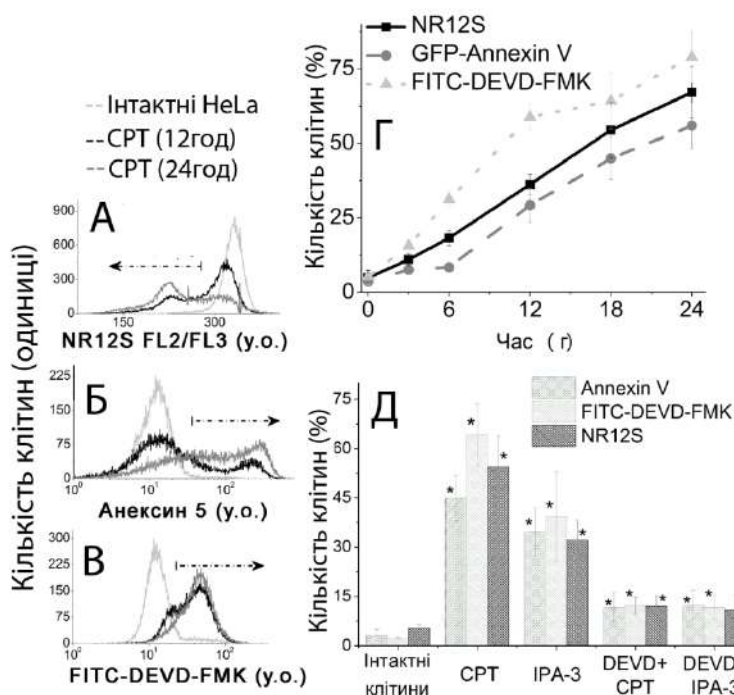
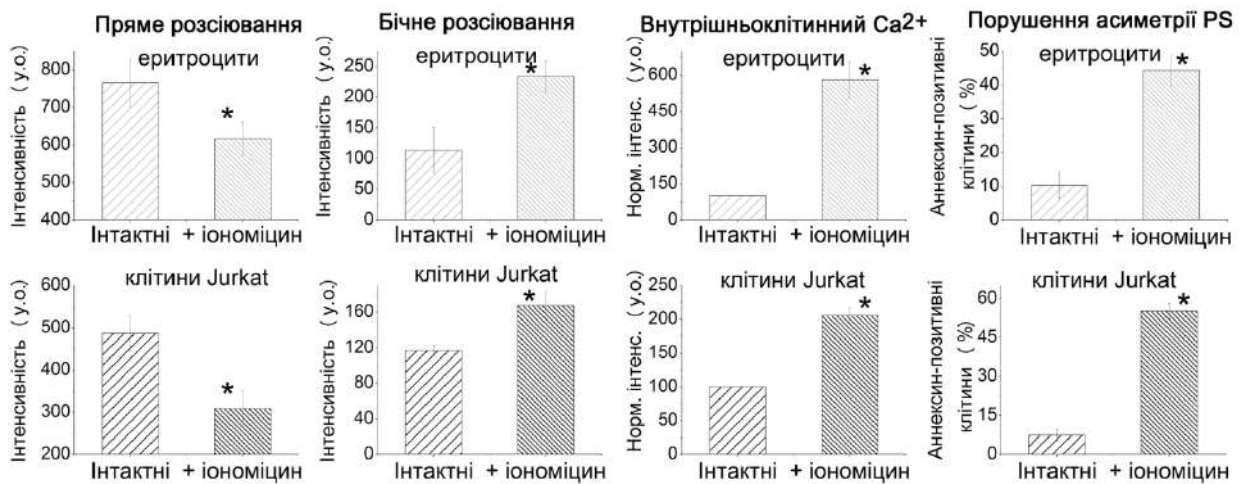


Рис.3. Активація каспази-3 за апоптозу корелює зі зміною властивостей плазматичної мембрани клітин HeLa. Гістограми клітин, забарвлених NR12S (А), GFP-міченим Анексином 5 (Б) та FITC-DEVD-FMK (В). (Г) Кількісний аналіз даних проточної цитометрії. “Апоптоз-позитивні” клітини були вибрані як такі, що мають більш високу інтенсивність флуоресценції для GFP-мічених Анексином 5 та FITC-DEVD-FMK. Для NR12S вибір був

застосований для субпопуляцій з меншим зеленим/червоним (FL2/FL3) співвідношенням інтенсивностей порівняно з відповідним контролем. (Д) Кількісний аналіз сигналу відповідних барвників за впливу інгібування CPT та IPA-3-активованого апоптозу на властивості плазматичної мембрани клітин HeLa. Дані представлені як середні арифметичні значення відсотку “позитивних за ознакою” клітин  $\pm$  СП ( $n = 4$ ). \*  $P < 0.05$  відносно значень відповідної контрольної групи (ANOVA)

*Характеристика клітин за апоптозу та ериптозу.* Клітинна загибель у клітинах Jurkat та еритроцитах була індукована іономіцином, що збільшує внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  і тим самим активує  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні етапи процесу загибелі. Показано закономірне зменшення розміру обох типів клітин та збільшення їх гранулярності за запрограмованої загибелі (Рис. 4). За допомогою Fluo-4 у протоковій цитометрії показано характерне збільшення рівнів  $\text{Ca}^{2+}$  за іономіцин-індукованої клітинної загибелі. Експозиція PS на зовнішній моношар плазматичної мембрани досліджувалася із застосуванням GFP-міченого Анексину 5, за допомогою якого було виявлено кількісне збільшення клітин з високим вмістом PS в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу (Рис. 4), це свідчить про аналогічну реакцію ядерних клітин Jurkat та еритроцитів за цих процесів.



*Рис.4. Характеристика клітин Jurkat та еритроцитів за іономіцин-індукованого апоптозу (8 мкМ, 4 год) та ериптозу (2 мкМ, 2 год) в протоковій цитометрії. Зліва направо наведені дані щодо прямого (відносний розмір) та бічного (відносна гранульованість) розсіювання, вміст внутрішньоклітинного кальцію (розрахована відносно групи без індукції) та порушення асиметрії PS в клітинах (відсоток субпопуляції клітин, позитивних на Анексин 5). Дані представлені як середні арифметичні значення  $\pm$  СП ( $n > 4$ ).*

*\*  $P < 0.05$  відносно значень відповідної контрольної групи (ANOVA).*

Поглиблений аналіз порушення трансмембранної асиметрії проводили із застосуванням барвника тринітробензенсульфонової кислоти (TNBS), який ковалентно зв'язується із первинним аміном PE. Однак, первинний амін, доступний для TNBS, також присутній в молекулі PS. Мічення і розділення синтетичних PE та PS методом тонкошарової хроматографії представлені на рис. 5А. Щоб заблокувати взаємодію TNBS із PS клітини преінкубувалися з забарвленим Тихоокеанським синім Анексином 5 (для спектрального розділення двох молекул) у спеціальному кальцієвому буфері із рН=7.8 для кращої взаємодії із TNBS. Як і в попередніх експериментах, запрограмована загибель еритроцитів та клітин Jurkat була викликана іономіцином. Показано,

що в обох типах клітин порушується асиметрія PE під час запрограмованої загибелі (Рис. 5 Б, В). Однак, на відміну від клітин Jurkat, в еритроцитах за ериптозу клітин із експонованим PS в 2-3 рази більше за ті, що мають на поверхні PS та PE (Рис. 5 Г). Варто відзначити, що клітин, позитивних лише на PE, в ході досліджень не виявлено.

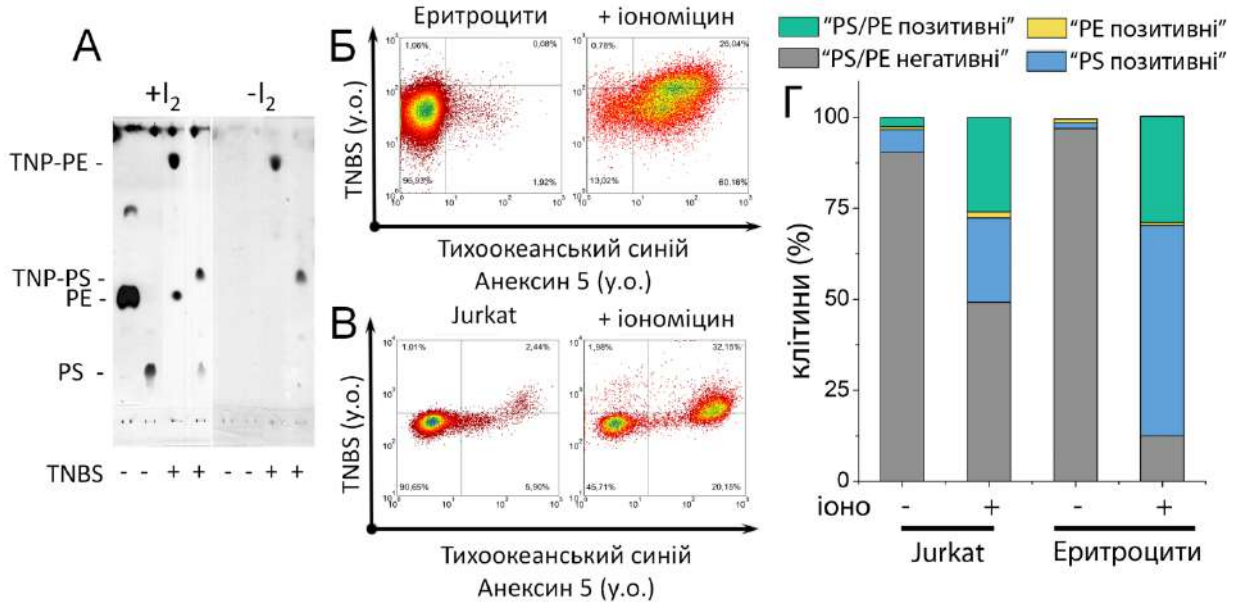


Рис.5. Трансмембранна асиметрія PE та PS за апоптозу та ериптозу. (А) Хроматограма мічених (TNP-PE, TNP-PS) та немічених (PE, PS) фосфоліпідів за допомогою TNBS із йодним контрастом та без нього. Вміст PE та PS в зовнішньому моношарі еритроцитів (Б) та клітин Jurkat (В) до та після інкубації з іоніміцином протягом 2 год (Jurkat 8 мкМ, еритроцити 2 мкМ), мічених із TNBS та Тихоокеанським синім Анексином 5. (Г) Кількісний аналіз представлений середніми значеннями відсотку "позитивних за ознакою" клітин ( $n = 3$ ).

Подібно до клітин HeLa, для клітин Jurkat сигнал Анексину 5 корелює з низьким співвідношенням зеленого/червоного каналів інтенсивності NR12S (Рис. 6 А), тоді як для еритроцитів ця кореляція слабо виражена (Рис. 6 В). В клітинах Jurkat спостерігається видима кореляція між вимірюваними показниками (критерій Пірсона 0.98) (Рис. 6 Б). На відміну від цього, еритроцити характеризуються іншою поведінкою (критерій Пірсона 0.31), яка вказує на те, що динаміка PS та PE не є ключовою у зниженні вмісту Ло-подібної фази в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани (Рис. 6 Г) за клітинної загибелі.

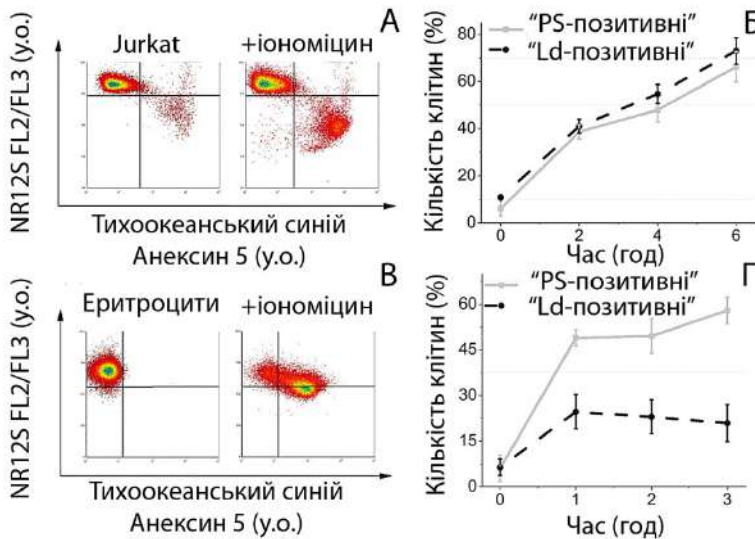


Рис. 6. Трансмембранна асиметрія PS та вміст Lo-подібної фази в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани в клітинах Jurkat (A) та еритроцитах (B), інкубованих з іономіцином протягом 2 год (Jurkat 8 мкМ, еритроцити 2 мкМ) і забарвлених одночасно з NR12S FL2/FL3 і Тихоокеанським синім Анексином 5 (FL9).

Кількісний аналіз сигналу відповідних барвників за апоптозу (B) та ериптозу (Г). Дані представлені як середні арифметичні значення відсотку “позитивних за ознакою” клітин  $\pm$  СП ( $n = 4$ ).

Візуалізація вмісту Lo-подібної фази в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу. Подібно до спостережень протокової цитометрії, дані мікроскопії виявили суттєві зміни морфології при індукції клітинної загибелі іономіцином в клітинах Jurkat та еритроцитах (Рис. 7). В клітинах Jurkat та еритроцитах, оброблених 5 мМ М $\beta$ CD впродовж 2 та 1 год, відповідно, (Рис. 7), зменшення співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції зонду NR12S очевидне, що свідчить про зменшення вмісту Lo фази. Для глибшого аналізу змін, яких зазнають клітини за запрограмованої загибелі, додатково був застосований індуктор клітинної загибелі IPA-3 (Jurkat – 25 мкМ та еритроцити – 5 мкМ впродовж 48 годин). У клітинах Jurkat, оброблених іономіцином та IPA-3 (Рис. 7), спостерігається також зменшення вмісту Lo фази подібно до виснажених на холестерол клітин, що відповідає очікуваному червоному зсуву спектру NR12S. В еритроцитах, незважаючи на суттєві зміни морфології, лише зменшення вмісту Lo фази в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за виснаження холестеролу призвело до візуально помітних змін у відповіді зонду (Рис. 7).

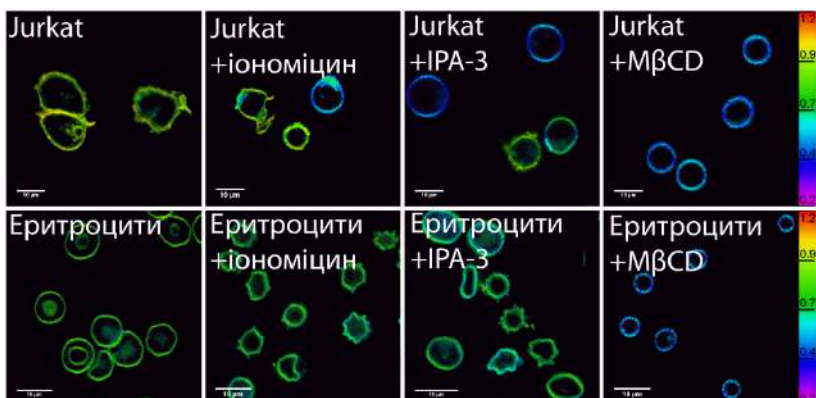


Рис. 7. Флуоресцентні ратіометричні зображення клітин Jurkat та еритроцитів забарвлених зондом NR12S (псевдоколір визначає співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного

каналів флуоресценції). Шкала розміру складає 10 мкм.

В свою чергу, кількісний аналіз даних мікроскопії підтвердив описані спостереження щодо клітин Jurkat (Рис. 8 А, В). Однак, еритроцити, які інкубувалися із іономіцином та IPA-3, демонструють статистично достовірні, хоча і набагато менші зміни вмісту Lo фази (Рис. 8 Б, В).

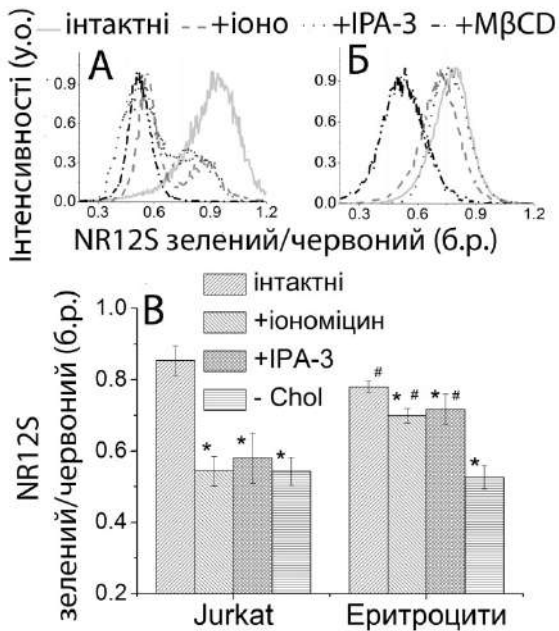


Рис. 8. Ратіометрична відповідь зонду NR12S (співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції) у клітинах Jurkat (А) та еритроцитах (Б) на модифікацію ліпідного складу в плазматичній мембрані та індукції запрограмованої загибелі клітин. (В) Кількісний аналіз співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S в клітинних мембранах на основі даних мікроскопії. Дані представлені як середні арифметичні значення  $\pm$  СП ( $n > 6$ ).

\*  $P < 0.05$  відносно значень відповідної контрольної групи (ANOVA)

#  $P < 0.05$  відносно значень відповідної групи клітин Jurkat (ANOVA)

Дані мікроскопії дозволяють спостерігати зморщування клітинної мембрани за запрограмованої загибелі з появою характерних ознак – апоптотичних тілець. При цьому везикули, утворені на поверхні плазматичних мембран клітин Jurkat (не показано), HeLa (Рис. 9 А) та еритроцитів (Рис. 9 Б), під час процесу везикуляції переважно демонструють нижчий вміст Lo фази.

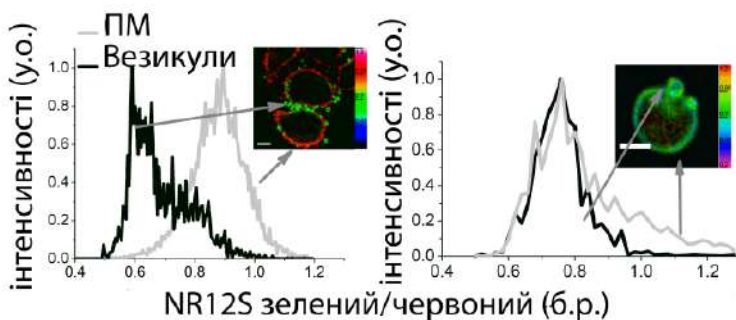


Рис. 9. Зниження вмісту Lo фази в зовнішньому моношарі апоптотичних тілець клітин HeLa (А) та еритроцитів (Б) за IPA-3-індукованої загибелі. Ратіометричні зображення та відповідна гістограма

співвідношень інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S. ПМ – плазматична мембрана.

Варто зазначити, що мембранний зонд NR12S має в 10 разів вищу афінність до Ld фази, тому інтенсивність флуоресценції в ній має бути суттєво вищою. Саме такий ефект спостерігається в апоптотичних тільцях, де інтенсивність флуоресценції вища за інші ділянки плазматичної мембрани клітин HeLa (Рис. 10 А) та еритроцитах (Рис. 10 Б). Додавання гасія

флуоресценції bQ10S, специфічного виключно до Ld-подібної фази, призвело до зниження інтенсивності сигналу в апоптотичних тільцях на порядок для клітин HeLa (Рис. 10 В) та майже в 4 рази для еритроцитів (Рис. 10 Г). В свою чергу, інтенсивність флуоресценції решти зовнішнього моношару плазматичної мембрани клітин залишилась без суттєвих змін. Таким чином, виявлено значний вміст Ld-подібної фази в зовнішньому моношарі апоптотичних тілець, хоча, везикули еритроцитів помітно більш упорядковані.

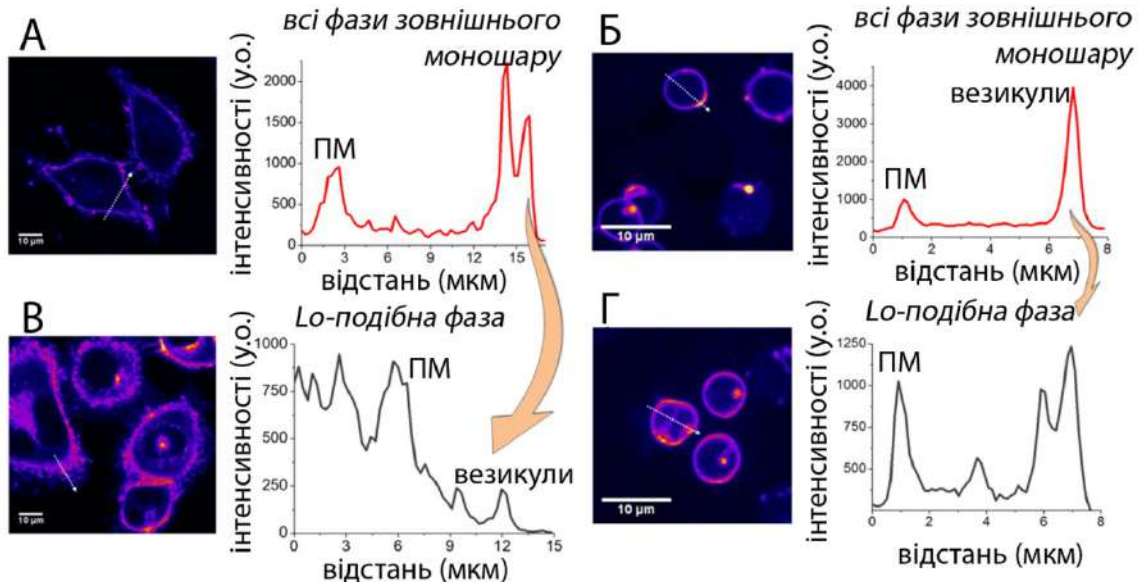


Рис. 10. Вміст Ld фази в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за IPA-3-індукованої клітинної загибелі клітин HeLa (А, В) та еритроцитів (Б, Г). Дані представлені як зображення мікроскопії із шкалою інтенсивності у псевдокольорі та гістограмою розподілу інтенсивності на відрізьку мембрани клітини. (А, Б) Забарвлені всі фази зовнішнього моношару плазматичної мембрани. (В, Г) Дослідження вмісту Ld фази за рахунок гасіння флуоресценції в Ld фази. Шкала розміру 10 мкм. ПМ – плазматична мембрана.

Дослідження супрамолекулярної організації ліпідів плазматичної та мембран клітинних органел. За допомогою ратіометричного зонду РА, на моделях клітин Jurkat (Рис. 11 А) та HeLa (Рис. 11 Б) виявлено суттєву різницю між ліпідними структурами в клітині, яка полягає в нижчому вмісті холестеролу та Ld-подібної фази в мембранах органел у порівнянні із плазматичною мембраною (Рис. 11 В).

На додачу, для описаних клітинних ліній виявилась характерною наявність ліпідних крапель в цитоплазмі (білі крапки на Рис. 11 А, Б), візуалізованих зондом РА. Варто відзначити, що ліпідні краплі на зображеннях зникали тільки за умови виснаження холестеролу (Pyrshv et al., 2018). Оскільки ці ділянки складаються з пікселів, які вище межі чутливості приладу, їх значення не враховувались для подальшого кількісного аналізу.



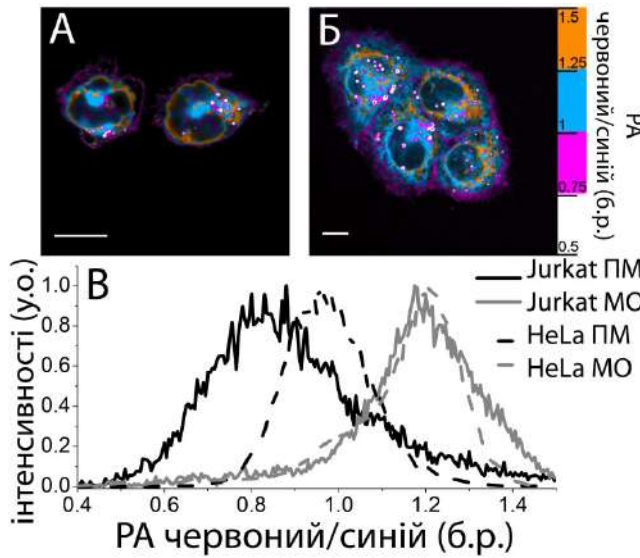


Рис. 11. Мембрани клітин Jurkat (А) та HeLa (Б), забарвлені зондом РА (псевдоколір визначає співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції РА). Менші значення співвідношення свідчать про більший вміст холестеролу та фази Lo. (В) Ратіометричні гістограми співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції зонду РА в ПМ (плазматична мембрана) та МО (мембрани органел). Шкала розміру складає 10 мкм.

Як було зазначено, індукція апоптозу іономіцином в клітинах Jurkat (Рис. 12 А) і HeLa (Рис. 12 Б) на ранніх етапах призводить до утворення везикул. Асоційовані із плазматичними мембранами везикули демонструють забарвлені зондом РА демонструють значення, що відповідають вищому вмісту холестеролу та Lo-подібної фази, яке подібне до решти плазматичної мембрани (оскільки зонд не є специфічним до моношарів, спостереження відрізняють від тих, що описані в експериментах із зондом NR12S). Тобто, незважаючи на зниження асиметрії між моношарами плазматичної мембрани та зниження вмісту Lo фази в її зовнішньому моношарі (внаслідок порушення асиметрії), загальний склад обох моношарів залишається незмінним. На відміну від цього, ліпідні структури, зафіксовані всередині деяких везикул, мають значно нижчий вміст холестеролу та Lo-подібної фази в цілому для обох моношарів (Рис. 12 В).

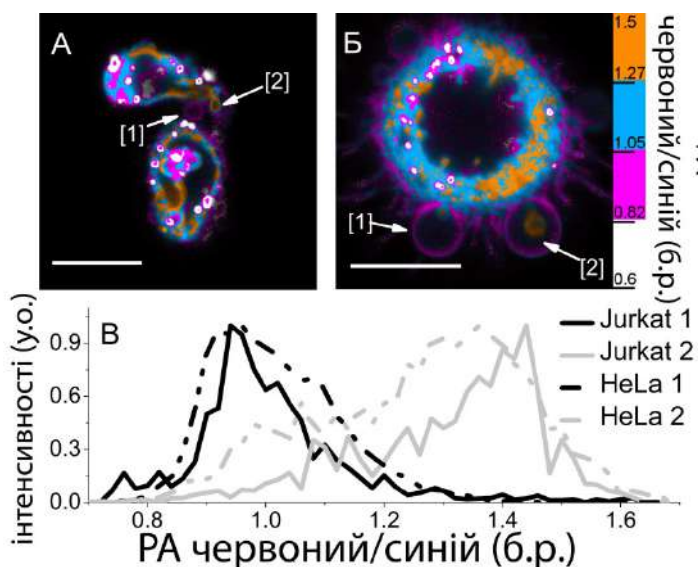


Рис. 12. Мембрани іономіцин-індукованих клітин Jurkat (А) та HeLa (Б), досліджених за допомогою зонду РА (псевдоколір визначає співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції РА). Стрілки вказують на везикули, представлені у вигляді гістограм співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції (В). Шкала розміру складає 10 мкм.

Як вже зазначено вище, аналіз плазматичної та мембран клітинних органел виявив суттєву різницю між властивостями цих структур в клітинах Jurkat (Рис. 13 Б, В). Важливо, що після індукції апоптозу відмінності між вмістом холестеролу та Lo-подібної фази у плазматичній та мембранах клітинних органел стають менш вираженими порівняно з інтактними клітинами (Рис. 13 Д). Ці спостереження дозволяють припустити, що крім обміну ліпідами між моношарами плазматичної мембрани за допомогою скрамблази, може мати місце обмін ліпідними компонентами між плазматичною та мембранами клітинних органел за апоптозу. Натомість, еритроцитні червоні клітини крові, які не мають внутрішньоклітинних мембран, демонструють співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції РА аналогічне тому, що спостерігається в інтактних клітинах (Рис. 13 Г, Д). Оскільки зниження вмісту холестеролу та Lo-подібної фази не може відбуватися одночасно в двох моношарах зафіксовані зміни сигналу РА пов'язані зі структурно-механічними властивостями мембрани.

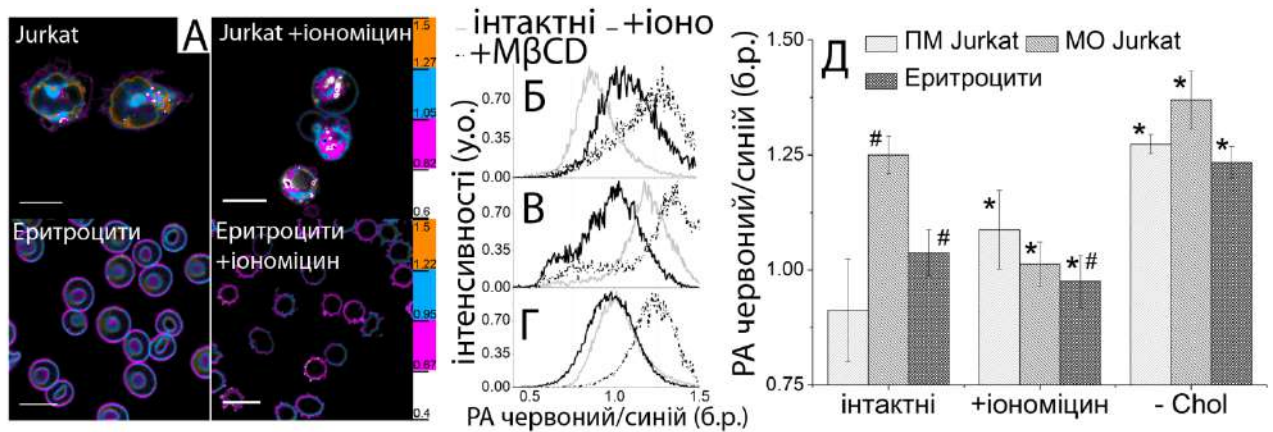


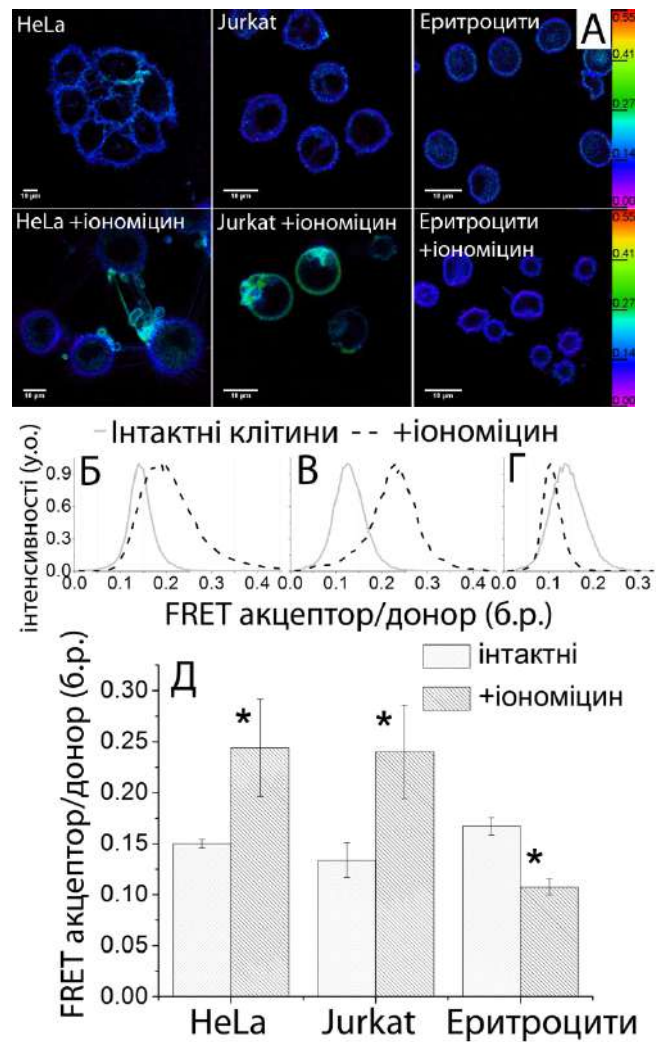
Рис. 13. (А) Ратіометричні зображення мембран клітин Jurkat та еритроцитів, забарвлених зондом РА (псевдоколір визначає співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції РА). Шкала розміру – 10мкм. Гістограми співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції зонду РА у плазматичній мембрані (Б) та мембранах органел (В) клітин Jurkat, а також еритроцитів (Г) на іономіцин-індуковану клітинну загибелі та екстракцію холестеролу. (Д) Кількісний аналіз ратіометричних зображень. Дані представлені у вигляді середньоарифметичної величини середніх геометричних значень гістограм  $\pm$  СП ( $n > 5$ ). ПМ – плазматична мембрана, МО – мембрани органел.

\*  $P < 0.05$  відносно значень відповідної контрольної групи (ANOVA); #  $P < 0.05$  відносно значень ПМ відповідної групи клітин Jurkat (ANOVA)

Дослідження структурно-механічних властивостей мембрани. Подібно до всіх попередніх спостережень, при візуалізації FRET-системою, зміни морфології за запрограмованої загибелі клітин HeLa, Jurkat та еритроцитів є очевидними (Рис. 14 А). З'ясовано, що клітини Jurkat та HeLa мають нижчу

ефективність перенесення енергії донора на акцептор (Рис. 14 Б, В, Д), що, ймовірно, є наслідком зменшення щільності упаковки ліпідів за апоптозу порівняно з інтактними клітинами. Натомість еритроцити мають суттєве збільшення щільності упаковки ліпідів (Рис. 14 Г, Д). Ймовірно, як і у випадку мембранного зонду RA, результати, що спостерігаються, є наслідком зміни співвідношення площі поверхні мембрани еритроциту (яка залишається сталою) до його об'єму (який знижується). Також цей феномен може бути пов'язаним із втратою функції циклу Лендса, активацією фосфоліпази А2 (Lang and Qadri, 2012) та збільшенням складу лізофосфоліпідів, що також впливають на зміну механічних властивостей мембран.

Рис. 14. Флуоресцентні ратіометричні зображення мембран клітин HeLa, Jurkat та еритроцитів, забарвлених FRET-сенсорною системою на базі барвників F2N12SM та bNR10S (псевдоколір визначає співвідношення інтенсивностей акцептора/донора). Шкала розміру – 10мкм. Гістограми співвідношення інтенсивностей акцептора/донора FRET-сенсорної системи в клітинах HeLa (А), Jurkat (Б) та еритроцитах (В). (Г) Кількісний аналіз даних співвідношення інтенсивностей флуоресценції акцептора/донора F2N12SM:bNR10S, базуючись на даних мікроскопії. Дані представлені у вигляді середньоарифметичної величини геометричних середніх значень гістограм  $\pm$  СП ( $n > 4$ ). \*  $P < 0.05$  відносно значень відповідної контрольної групи (ANOVA)



Для підтвердження зміни структурно-механічних властивостей мембран клітин за апоптозу та еритроптозу, досліджено проникність плазматичної мембрани за допомогою нанорозмірних водорозчинних частинок – карбонових точок. Клітини до та після індукції запрограмованої загибелі інкубували з «блакитними» карбоновими точками (Demchenko and Dekaliuk, 2016) впродовж 30 хв, після чого відмивали в буферному розчині кілька разів та записували спектри флуоресценції. Оскільки карбонові точки є гідрофільними, тільки ті, що проникли до цитоплазми, залишаються після відмивання, а їхня

флуоресценція є ознакою проникності плазматичної мембрани. Очікувано, що клітини HeLa мають вищу інтенсивність флуоресценції після індукції апоптозу (Рис. 15 А, В), в той час як еритроцити за ериптозу мають значення подібні до інтактних клітин (Рис. 15 Б, В).

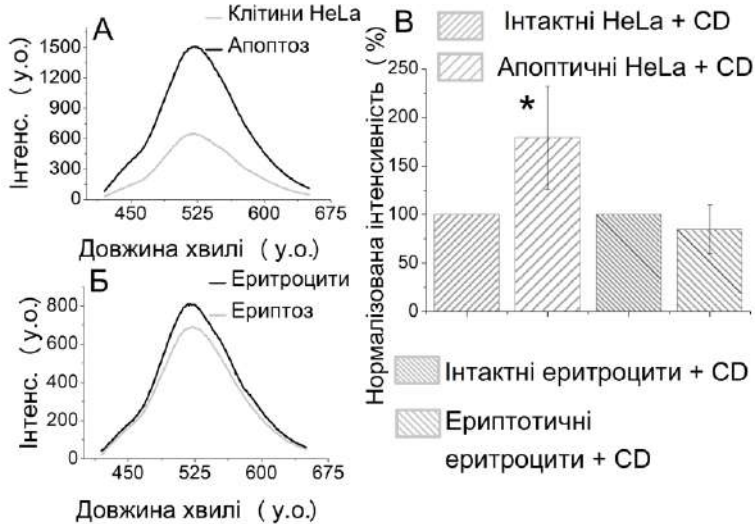


Рис. 15. Спектри флуоресценції карбонівих точок в інтактних та інкубованих з іономіцином клітинах HeLa (А) та еритроцитах (Б). (В) Кількісний аналіз представлений як середні арифметичні значення нормалізованого сигналу флуоресценції карбонівих точок, нормованого до контрольної групи без індукції

$\pm$  СП ( $n = 3$ ). \*  $P < 0.05$  відносно значень відповідної контрольної групи (ANOVA)

Гіпотезу ущільнення організації ліпідів плазматичної мембрани еритроцитів за ериптозу було підтверджено за допомогою методу кислотних еритрограм, розробленим раніше (Герсков and Гительзон, 1957). Подібно до попередніх даних щодо структурно-механічних властивостей, індукція ериптозу призводить до сповільнення кислотного гемолізу внаслідок ущільнення супрамолекулярної організації ліпідів плазматичної мембрани (Рис. 16).

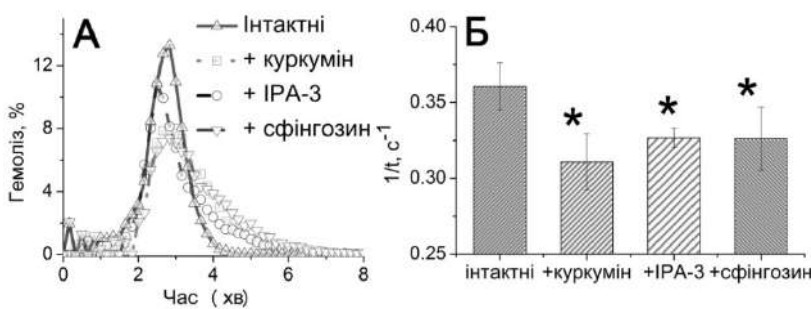


Рис. 16. Вплив ериптозу на швидкість кислотного гемолізу. (А) Гістограма розподілу гемолізу в часі. (Б) Кількісний аналіз представлений середніми арифметичними

значеннями максимальної швидкості гемолізу  $\pm$  СП ( $n > 4$ ).

\*  $P < 0.05$  відносно значень відповідної контрольної групи (ANOVA)

## ВИСНОВКИ

Розроблені та вперше застосовані методи для вивчення зміни біохімічних та біофізичних властивостей мембран, зокрема: а) використання барвників тринітробензенсульфонової кислоти та флуоресцентно-міченого Анексином 5 у протоковій цитометрії для одночасного визначення асиметрії фосфатидилетаноламіну та фосфатидилсерину; б) аналітична FRET-система із

нових мембранних зондів для дослідження структурно-механічних властивостей ліпідних фаз зовнішнього моношару мембран; в) адаптовані підходи із використанням гасія флуоресценції та сольватохромних барвників для вивчення везикуляції плазматичної мембрани; г) застосування карбонових точок для дослідження проникності плазматичної мембрани за запрограмованої загибелі.

1. Вміст рідинно-впорядкованої ліпідної фази у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани клітин HeLa за апоптозу знижується подібно до значень при зниженні вмісту холестеролу, збагаченні 7-кетохолестеролом або за гідролізу сфінгомієліну.

2. Вперше показано, що зниження вмісту рідинно-впорядкованої фази у зовнішньому моношарі плазматичних мембран клітин HeLa відбувається в клітинах із активованою каспазою-3.

3. Вперше встановлено, що вміст фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну збільшується в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу клітин Jurkat та ериптозу (із меншими значеннями для еритроцитів). Відповідно до даних мікроскопії, на відміну від ядерних клітин Jurkat та HeLa, в еритроцитах не виявлено значного зниження вмісту рідинно-впорядкованої фази у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за ериптозу.

4. Вперше показано статистично достовірне підвищення вмісту рідинно-невпорядкованої фази в зовнішньому моношарі апоптотичних тілець клітин HeLa, Jurkat та еритроцитів порівняно з іншими ділянками плазматичної мембрани цих клітин (більш впорядкованими на ранніх етапах запрограмованої загибелі).

5. Продемонстровано достовірну різницю у вмісті холестеролу та рідинно-впорядкованої фази між мембранами органел та плазматичною мембраною в нативних клітинах HeLa та Jurkat. Відповідно до даних флуоресцентної мікроскопії, вперше показано, що після індукції апоптозу ця різниця зменшується, в той час як в еритроцитах таких змін не спостерігалось.

6. Вперше встановлено, що еритроцити за клітинної загибелі мають статистично більшу щільність упаковки ліпідів плазматичної мембрани порівняно з ядерними клітинами HeLa та Jurkat. Показано, що за запрограмованої загибелі еритроцити мають подібну проникність плазматичної мембрани по відношенню до контролю, на відміну від клітин HeLa, де проникність збільшується. Виявлено збільшення стійкості плазматичної мембрани до гемолізу за ериптозу порівняно з інтактними клітинами.

#### ПУБЛІКАЦІЇ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Kreder R., Pyrshev K. A., Darwich Z., Kucherak O. A., Mély Y. and Klymchenko A. S. (2015) Solvatochromic Nile Red Probes with FRET Quencher

- Reveal Lipid Order Heterogeneity in Living and Apoptotic Cells *ACS Chemical Biology*. 10(6), 1435-1442. Doi: 10.1021/cb500922m
2. Dekaliuk M., **Pyrshchak K.A.**, Demchenko A. (2015) Visualization and detection of live and apoptotic cells with fluorescent carbon nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology* 13(1), 86. Doi:10.1186/s12951-015-0148-7
  3. Kreder, R. Oncul S., Kucherak O. A., **Pyrshchak K. A.**, Real E., Mely Y. and Klymchenko A. S. (2015) Blue fluorogenic probes for cell plasma membranes fill the gap in multicolour imaging *RSC Advances*. 5(29), 22899-22905. Doi 10.1039/c4ra16225k,
  4. **Pyrshchak K.A.**, Yesylevskyy S., Mely Y., Demchenko A., Klymchenko A. (2017) Caspase-3 activation decreases lipid order in the outer plasma membrane leaflet during apoptosis: A fluorescent probe study *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1989(10), 2123-2132 Doi: 10.1016/j.bbamem.2017.08.002
  5. **Pyrshchak K. A.**, Klymchenko A. S., Csúcs G., Demchenko A. P. (2018). Apoptosis and eryptosis: Striking differences on biomembrane level. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(6), 1362-1371. Doi: 10.1016/j.bbamem.2018.03.019
  6. **Pyrshchak K.A.**, Guzyk M. M., Manoilo K. Y. (2012 September) Red-shifted probe for apoptosis detection prospective for cryobiology - International conference “Actual Problems of Cryobiology and Cryomedicine”, Kharkiv, Ukraine, (Опубл. журнал Проблеми Кріобіології – Т.22, №3, 2012 – С.332)
  7. **Pyrshchak K.A.** (2013 червень) Нові методи детекції запрограмованої загибелі червоних клітин – в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т.85, № 4, С. 145, 2013)
  8. **Pyrshchak K. A.**, Demchenko A. P. (2014 May) Lipid redistribution in the outer plasma membrane leaflet during suicidal death of erythrocytes and HeLa cells - в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, С. 34
  9. **Pyrshchak K. A.**, Csúcs G., Demchenko A. P. (2014 October) Plasma membrane lipid order on apoptosis and eryptosis - в Матеріалах XI Українського біохімічного конгресу, Київ, 2014, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т. 86, № 5 (Suppl. 1.), С. 111, 2014) - ISSN 0201-8470
  10. Dekaliuk M. O., **Pyrshchak K. A.**, Demchenko A. P. (2014 October) C-dots application in living cells experiments - в Матеріалах XI Українського біохімічного конгресу, Київ, 2014, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т. 86, № 5 (Suppl. 2.), С. 185-186, 2014) - ISSN 0201-8470
  11. **Pyrshchak K. A.**, Demchenko A. P. (2015 April) Lipids dynamics in plasma membrane on live and apoptotic cells - в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т.87, № 4, С. 115, 2015)

12. **Pyrshchak K. A.**, Bugera A., Pivovarenko V.G., Demchenko A. P. (2015 June) Coupling of cytoplasmic and biomembrane mechanisms on suicidal cell death. International Conference of the Young Scientist (CYS-2015), Kyiv, Abstract book. - 2015. - P. 163 – best oral talk award
13. Dekaliuk M., **Pyrshchak K.**, Demchenko A. (2015 October) Carbon nanoparticles as fluorescent probes for apoptosis detection - 4-th International Conference NANOBIOPHYSICS 2015: fundamental and applied aspects, Kyiv. Book of abstracts. - 2015. - P. 93
14. **Pyrshchak K.A.**, Yesylevskyy S.O., Klymchenko A.S., Csucs G., Demchenko A.P. (2016 April) The lipids distribution and their dynamics in plasma membranes of living and apoptotic cells - International workshop “Asymmetry of biological membranes: physical, biological and biomedical aspects” (Université de Franche-Comté, Laboratoire ChronoEnvironnement CNRS UMR 6249 Besançon, France), Abstract book. - 2016. - P. 12
15. Dekaliuk M., **Pyrshchak K.A.**, Demchenko A. (2016 April) S, N – containing carbon dots: fluorescent properties and application in cell experiments. - RECOOP HST Association. Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference Prague, Czech Republic. Український біохімічний журнал. - 2016. – Т. 88, Special Issue - С. 41. - ISSN 0201-8470
16. **Pyrshchak K.A.** (2016 May) Динаміка розподілу ліпідів в мембранах ядерних клітин та еритроцитів Conference - в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ (До 110-річчя з дня народження В.О. Беліцера) - С. 42 – 3<sup>rd</sup> place oral talk award
17. **Pyrshchak K.A.**, Yesylevskyy S.O., Klymchenko A.S., Csucs G., Demchenko A.P. (2016, July) The lipids distribution and their dynamics in plasma membranes of living and apoptotic cells – in Abstract book of X Parnas Conference. Young Scientist Forum „Molecules in Living Cells and in Innovative Medicine”, Wroclaw, Poland, 2016, (Published in *Acta Biochemica Polonica*, V. 63, Suppl. 1/2016, P. 24). – best poster award
18. Dekaliuk M., **Pyrshchak K.A.**, Demchenko A.P. (2016, September) New approach for cell imaging with fluorescent carbon nanoparticles. FEBS Journal. - 2016. - Vol. 283, Issue Supplement S1: Special Issue: 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life, Ephesus/Kuşadasi, Turkey, September 3-8, 2016. - С. P-07.01.3-004. - P. 313.
19. **Pyrshchak K.A.**, Yesylevskyy S.O., Klymchenko A.S., Demchenko A.P. (2016 September) Apoptosis and eryptosis influence differently on plasma membrane lipid phases. - X International GDRI meeting “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies” (Lviv), Biopolymers and Cell. 2016. Vol. 32. N 4. P 316 - ISSN 0233-7657
20. **Pyrshchak K.A.**, Klymchenko A.S., Csucs G., Demchenko A.P. (2017 June) Fusion of the membranes influences plasma membrane lipid order on apoptosis.

EMBO-FEBS Advanced Lecture Course “Molecular Architecture, Dynamics and Function of Biomembranes”- The book of Abstracts. – P. 119.

### АНОТАЦІЯ

**Пиршев К.О. Особливості структурної організації ліпідів плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу. –Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 “біохімія”. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.

Робота присвячена дослідженню динаміки та супрамолекулярної структури ліпідів плазматичної мембрани клітин HeLa, Jurkat та еритроцитів за запрограмованої загибелі. Показано, що залучення клітин HeLa до апоптозу призводить до значного зниження вмісту рідинно-впорядкованої ліпідної фази зовнішнього моношару плазматичної мембрани в клітинах із активованою каспазою-3.

Вперше встановлено, що вміст фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну збільшується в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу клітин Jurkat та ериптозу, із меншими значеннями для еритроцитів. На відміну від ядерних клітин Jurkat та HeLa, в еритроцитах не виявлено значного зниження вмісту рідинно-впорядкованої фази у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за ериптозу. Однак, в усіх досліджених типах клітин вперше показано статистично достовірне підвищення вмісту рідинно-невпорядкованої фази в зовнішньому моношарі апоптотичних тілець порівняно з іншими ділянками плазматичної мембрани.

Продемонстрована статистично достовірна різниця у вмісті холестеролу та рідинно-впорядкованої фази між мембранами органел та плазматичною мембраною в нативних клітинах HeLa та Jurkat. Вперше показано, що після індукції апоптозу ця різниця стає статистично менш вираженою та охоплює обидва моношари всіх мембран ядерних клітин, але в еритроцитах не було виявлено таких змін.

Вперше встановлено, що еритроцити за клітинної загибелі мають статистично більшу щільність упаковки ліпідів плазматичної мембрани порівняно з ядерними клітинами HeLa та Jurkat. Такі властивості плазматичної мембрани еритроцитів призвели до її стійкості до гемолізу та проникності наночасточок за ериптозу у порівнянні з інтактними клітинами.

Таким чином, відповідно до поставленої мети, були вирішені наукові завдання щодо вивчення особливостей структурної організації плазматичної мембрани за клітинної загибелі, а саме: виявлено вплив ліпідів мембран органел клітин HeLa та Jurkat на формування властивостей їх плазматичної мембрани за апоптозу, а також високу щільність упаковки ліпідів плазматичної мембрани еритроцитів внаслідок їх низької динаміки за ериптозу.



**Ключові слова:** апоптоз, ериптоз, плазматична мембрана, ліпідні мікродомени, трансмембранна асиметрія

## ABSTRACT

**Pyrshch K.A. Structural features of plasma membrane lipid organization on apoptosis and eryptosis. – The manuscript.**

Thesis for Ph.D. degree by speciality – 03.00.04 “Biochemistry”. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

Current Ph.D. thesis is dedicated to the investigation of the composition and properties of supramolecular structures and biochemical processes on the level of plasma membrane on apoptosis and eryptosis.

Changes in plasma membrane lipid order on apoptosis are similar to one caused by the cholesterol extraction, 7-ketocholesterol enrichment, and sphingomyelin hydrolysis, which signifies the essential plasma membrane reorganization on programmed cell death of nucleated cells.

For the first time, the link between caspase-3 activation and the decrease of the Lo-phase in outer plasma membrane leaflet on the early steps of apoptosis in HeLa cells was shown.

It was shown that in Jurkat cells and in human erythrocytes the exposure of both PS and PE to outer plasma membrane leaflet takes place on programmed cell death, with lower values of PE dynamics on eryptosis. Nevertheless, despite the strong visual similarities of apoptosis and eryptosis, the red blood cells share smaller decrease of Lo-phase in outer plasma membrane leaflet.

The morphological features of plasma membrane supramolecular organization during its vesiculation on apoptosis and eryptosis were investigated. In all studied cells (HeLa, Jurkat, human erythrocytes), in contrast to the main area of the plasma membrane, the significant amount of Ld-phase in outer vesicles leaflet was observed. However, it is worth to mention, that the erythrocytes' vesicles are more ordered.

The difference in lipid order between plasma and membranes of organelles in nucleated HeLa and Jurkat cells was shown. It is important that after apoptosis induction the difference in Lo-phase and cholesterol content between these membranous structures becomes negligible. In a strong contrast to nucleated cells, red blood cells did not share this dynamics. Moreover, the increase of the lipid order for both monolayers of the plasma membrane was observed on eryptosis.

For the first time it was shown that in a strong contrast to nucleated cells, where the lipid packing density decreases on apoptosis (particularly, in the regions of apoptotic bodies), the red blood cells on eryptosis appear with denser lipid organization of the plasma membrane.

Erythrocytes share similar plasma membrane penetration ability for nanoparticles on eryptosis in comparison to intact cells, while HeLa cells accumulate their higher amount even on early steps of apoptosis. The increase of lateral and

integral plasma membrane lipid packing density on eryptosis is confirmed additionally by the decrease of the acid hemolysis velocity.

In summary, according to the aim and tasks of the research, the structural-functional properties of the plasma membrane on apoptosis and eryptosis were studied and the significant difference was found. Thus, in contrast to apoptosis in nucleated cells, on eryptosis, the loss of lipid order in biomembranes is almost negligible. We suggest that in nucleated cells the additional lipid exchange between the plasma and intracellular membranes, possessing much lower lipid order and cholesterol content, may contribute to such dramatic changes. Consequently, the apoptotic vesicles appear of different origin, being derived from different membrane structures. By contrast, erythrocytes are devoid of intracellular membranes and their relatively high level of lipid order is retained on eryptosis.

**Key words:** apoptosis, eryptosis, plasma membrane, lipid microdomains, transmembrane asymmetry.

**ДЛЯ НОТАТОК**