Institute Of Theoretical And Experimental Biophysics Of Russian Academy Of Sciences

Laboratory of pharmacological regulation of cell resistance

2th International Conference of young Scientists

«MITOCHONDRIAL PORES AND CHANNELS AS PHARMACOLOGICAL TARGETS»

November 2-3, 2016

Abstract book

Pushchino
2016

УДК 577.3
ББК 28.07

ISBN 978-5-91874-047-7

Ministry of Education and Science of the Russian Federation / Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences / Laboratory of pharmacological regulation of cell resistance

«Mitochondrial pores and channels as pharmacological targets'16» – Abstract book, Pushchino:SynhroBook, 2016.

2th International conference of young scientists «MITOCHONDRIAL PORES AND CHANNELS AS PHARMACOLOGICAL TARGETS» was scheduled from November 02, to November, 03, 2016 in Pushchino at the Institute of Theoretical And Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences.

The conference highlighted the current understanding of the role of mitochondria in the regulation of intracellular processes and the development of pathologies. The conference was organized in accordance with the implementation of the project «Drug discovery targeting mitochondrial pores and channels for cancer, heart and liver diseases», supported by a grant from the Government of the Russian Federation (contract №14.Z50.31.0028) in the framework of the decree of the Government of the Russian Federation from April 9, 2010 № 220 on measures to attract leading scientists in the Russian educational institution of higher professional education and scientific institutions of the state academies of Sciences and state research centers of the Russian Federation.

The conference included lectures by leading Russian and foreign scientists, plenary meetings, poster sessions.

© Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 2016

НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ IL-10, АКТИВАТОРОВ PI3-КИНАЗЫ, АГОНИСТОВ АЛЬФА-2 РЕЦЕПТОРА И АНТИОКСИДАНТОВ

Зинченко В.П., Гайдин С.Г., Долгачева Л.П., Туровский Е.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия

vpz@mail.ru

Инсульт мозга очень скоротечный процесс. При прекращении кровотока в сосудах головного мозга уже через 15с происходит изменение биоэлектрической активности нейронов. А через 4–5 мин возникают необратимые повреждения нейронов в зоне инсульта [1]. Ключевую роль в гибели нейронов играют ионы Ca^{2+}. Повышение $[Ca^{2+}]_i$, секреция глутамата, активация AMPA, каинатных и NMDA-рецепторов приводит к деполяризации, которая опять же активирует вход Ca^{2+} через потенциал-зависимые Ca^{2+}-каналы [2].

Ранее показано, что противовоспалительный цитокин IL-10 защищает нейроны мозга от гипервозбуждения и гибели при гипоксии/ишемии *in vitro* и *in vivo* [3,4]. В экспериментах на нейронах в культуре показано, что защитный эффект IL-10 отменяется ингибиторами PI3-киназы [4]. Из этих экспериментов следовало, что нейропротекторное действие IL-10 при ишемии в основном определяется активацией PI3-киназа-зависимого сигнального пути выживания клеток. Таким образом, активация PI3-киназного сигнального пути, приводящего к активации PKB- и PKG-зависимого фосфорилирования белков-мишеней и экспрессии противовоспалительных генов [5] может быть стратегией защиты нейронов от гибели при ишемическом инсульте. Известно, что защитный PI3-киназный путь, стимулируемый IL-10, активируется и другими рецепторами, в частности, рецепторами, сопряженными с G_i белками. Таким образом, можно прогнозировать нейропротекторное действие агонистов этой группы рецепторов.

Известно, что ишемический инсульт сопровождается воспалением и генерацией активных форм кислорода [6]. Поэтому применение антиоксидантов в качестве нейропротекторов часто также имеет положительный эффект [7].

В настоящей работе с целью выяснения механизмов усиления защиты клеток мозга от гибели при ишемии сравнивали влияние противоспалительного цитокина IL-10, активаторов защитного сигнального PI3-киназного пути, антиоксидантов и агонистов альфа2-адренорецепторов на импульсную активность нейронов, на глобальный рост Ca^{2+} и гибель клеток при непрерывной ишемии в культуре клеток гиппокампа крысы 12-14 DIV. В качестве нейропротекторов в экспериментах использовали цитокин IL-10, активатор PI3-киназы 740Y-P, агонист альфа-2 адренорецептора, гуанфацин, антиоксидант пероксиредоксин 6.

На рисунке 1А приведены суммарные данные из параллельных экспериментов по сравнению эффектов ишемии на нейроны гиппокампа в культуре 12 DIV в контроле (1), в присутствии агониста альфа-2 рецепторов гуанфацина (2), антиоксиданта пероксиредоксина 6 (Prx6) (3), активатора PI3киназы (4) и IL-10 (5) при инкубации с последними 40 мин и 24 часа. Показано, что реакция клеток на ишемию развивается в контроле двухфазно (Рис.1). Ишемия вызывала резкое повышение $[Ca^{2+}]_i$, которое после небольшого понижения сменялось дальнейшим, более медленным, глобальным повышением $[Ca^{2+}]_i$.

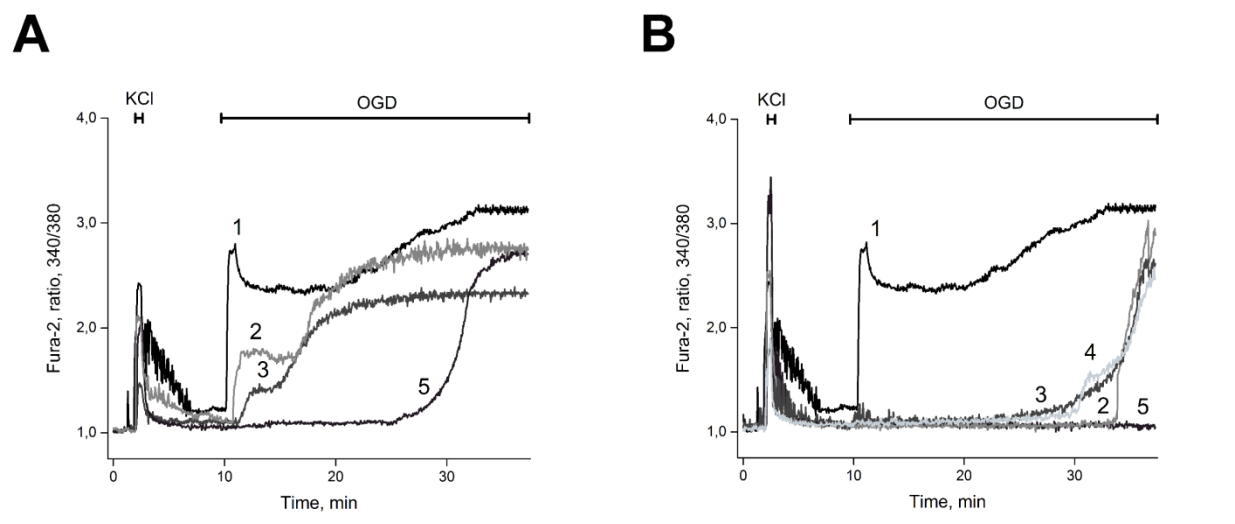


Рис.1А – Усредненные по 50 клеткам кривые изменения [Ca2+]i в нейронах при добавлении 35 mM KCl и во время ишемии в контроле (1), и после 40 мин инкубации с гуанфацином, 1 μM (2), антиоксидантом 10μg/ml Prx6 (3), активатором PI3киназы 1 μM 740Y-P (4) и 1ng/ml, IL-10 (5). Рис.1В. Усредненные по 50 клеткам кривые изменения [Ca2+]i в нейронах при добавлении 35 mM KCl и во время ишемии в контроле (1), и после 24 часов инкубации с гуанфацином, 1 μM (2), антиоксидантом Prx6, 10 μg/ml (3), активатором PI3киназы 740Y-P, 1 μM (4) и, IL-10, 1ng/ml (5). 35 mM KCl

В течение часа после ишемии в контроле наблюдалась массовая гибель клеток. После инкубации с нейропротекторами в течение 40 мин время до индукции начального повышения $[Ca^{2+}]_i$ увеличивалось значительно только для IL-10. Во всех случаях наблюдалось ингибирование в первой быстрой фазы повышения $[Ca^{2+}]_i$. При действии IL-10 быстрая фаза вообще отсутствовала (рис.1А). Однако глобальное повышение $[Ca^{2+}]_i$, хотя и сильно отсроченное, происходило.

После 24 часов инкубации клеток с нейропротекторами во всех случаях время до момента глобального повышения $[Ca^{2+}]_i$ во время ишемии увеличивалось значительно, а после инкубации с IL-10 повышения $[Ca^{2+}]_i$ за время регистрации не наблюдалось вообще (рис.1В). Быстрая фаза повышения $[Ca^{2+}]_i$ практически исчезла после 24 часовой инкубации клеток с IL-10 и с Prx6 (рис.1В). При действии 740Y-P и гуанфацина быстрая фаза повышения $[Ca^{2+}]_i$ сохранялась. При предварительной инкубации клеток 24 час в присутствии 1nM IL-10 после ишемии гибли лишь одиночные клетки.

Таким образом, мы показали, что как антиоксиданты, так и агонисты альфа2 рецепторов и активаторы PI3 киназы и IL-10 защищали клетки от гибели при ишемии. Наиболее эффективным нейропротектером является IL-10. Эффект защиты усиливался при увеличении времени предварительной инкубации клеток с протекторами с 40 мин до 24 часов. Полное подавление увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках и их гибели при длительной инкубации с IL-10, по сравнению с 40 мин инкубацией, указывает на важность экспрессии противовоспалительных белков для полной защиты клеток от гибели при ишемии.

Рецептор IL-10 активирует несколько путей передачи сигнала, среди которых PI3-киназаный имеет наибольшее значение. Прямое включение этого пути активатором PI3-киназы или опосредованное агонистом альфа-2 адренорецепторов вызывали сходный эффект как при кратковременной аппликации, так и после длительной 24 часовой инкубации. Несмотря на то, что нейропротекторное действие противовоспалительного цитокина IL-10 определяется активацией PI3 киназного сигнального пути, защитное действие IL-10 превышает действие прямого активаторов PI3-киназы, и агонистов альфа-2 рецепторов, активирующих PI3-киназу через G_i белок.

Работа поддержана грантом Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение №14.616.21.0039).

Литература:

1. Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Trends Neurosci. 22 (9), 391–397.
2. Ehling, P., Göb, E., et al. 2013. Exp Transl Stroke Med 5, 16.
3. Turovsky, E.A., Turovskaya, M.V., et al. 2013. Exp Neurol. 250, 1–7.
4. Turovskaya, M.V., Turovsky, E. A., et al. 2014. Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol. 8 (1), 125–135.
5. Ha, K.S., Kim, K.M., et al. 2003. FASEB J. 17, 1036–1047.
6. Halladin, N. L., 2015. Dan Med J. 62(4), 5054.
7. Belousova, M.A., Korsakova, et al. 2014. Eksp Klin Farmakol. 77 (11), 36–44.

НЕЙРОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МУТАНТНОГО АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА

Долгачева Л.П., Федотова Е.И., Абрамов А.Ю., Бережнов А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия

g_56@rambler.ru

Болезнь Паркинсона (БП) является нейродегенеративным, многофакторным расстройством движения и характеризуется потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции и наличием телец Леви в выживающих нейронах [1]. На поздних стадиях заболевания наблюдаются когнитивные и психические расстройства, а нейродегенерация охватывает различные отделы мозга. Существующие методы терапии БП носят симптоматический характер и малоэффективны. БП – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание после болезни Альцгеймера. Риск развития БП катастрофически увеличивается после 60 лет. Учитывая старение населения всего мира, расходы на содержание больных БП постоянно увеличиваются, что наносит серьезный ущерб для общества в целом. Также распространены и ранние формы заболевания. В течение прошлого десятилетия были выявлены мутации в разных генах, обуславливающие проявление наследственных форм БП.

Накопление альфа-синуклеина. Характерным признаком БП, а также ряда заболеваний, называемых синуклеинопатиями, является накопление высоких концентраций белка альфа-синуклеина (а-син) во включениях, известных как тельца Леви, внутри нейронов [2]. Распространение телец Леви затрагивает нейроны ЦНС, в том числе

дофаминергические нейроны нигростриатной системы. Потеря нейронов в среднем мозге и наличие телец Леви в оставшихся нейронах являются отличительными чертами патологии, наблюдаемой на финальных стадиях заболевания [2, 3]. Основным элементом телец Леви являются агрегированный а-син, а также нейрофиламенты, убиквитин и другие белки [4]. Наиболее вероятно, что образование телец Леви является способом детоксикации агрегатов а-син в нейроне [5].

Физиологическая и патологическая роль альфа-синуклеина в нейронах. а-Син участвует в контроле биогенеза, может модулировать экспрессию, субклеточное распределение, функционирование многочисленных белков синапса и компонентов цитоскелета [6-8]. а-Син участвует в контроле секреции нейротрансмиттера, синаптической пластичности, модулирует выживание нейронов [9]. Гипотеза, согласно которой причиной массовой гибели нейронов, наблюдающейся при БП, может быть передающееся от одной нервной клетки к другой вещество, распространилась в 2008 году. В ходе исследований было доказано, что а-син с нарушенной укладкой (misfolding) может передаваться от одного нейрона к другому и способен вызывать гибель клеток. Распространение такого а-син между нейронами может происходить по прион-подобному механизму [10]. При этом белок с нарушенной укладкой, проникая в другие нейроны, инициирует переход из «правильной» конформации в «неправильную».

Агрегация альфа-синуклеина. При БП обнаружены разные конформации а-син: мономеры без определенной структуры или в виде альфа-спиралей и бета-складчатых структур, димеры, олигомеры, фибриллы и конечный этап агрегации белка – тельца Леви. Известно, что скорость агрегации может быть увеличена (присутствие металлов, пестицидов, липидов, низких pH). Ряд авторов считают, что одной из причин агрегации а-син являются нарушения в функционировании сети протеостаза (или белкового гомеостаза) в поддержании белка в биологически активной, нетоксичной форме [11]. К ключевым компонентам сети протеостаза относят молекулярные шапероны, среди которых sHsps являются первой линией защиты клетки от агрегации белков [12]. Также было показано, что продукты окисления дофамина, содержание которого велико в дофаминергических нейронах, ингибируют переход из олигомеров и протофибрилл в фибриллы а-син, что приводит к накоплению токсичных форм белка. При этом

добавление антиоксидантов приводит к снижению содержания фибрилл [13].

Дисфункция митохондрий. Локализация а-син не ограничивается цитозолем, он показан также во внутренней мембране митохондрий дофаминергических нейронов. Связываясь с мембраной митохондрий, а-син запускает выход цитохрома с в цитоплазму, что приводит к запуску апоптоза. Показано, что в трансгенных мышах с избыточной экспрессией а-син дикого типа, происходит фрагментация митохондрий, предрасполагая к нейродегенерации [14].

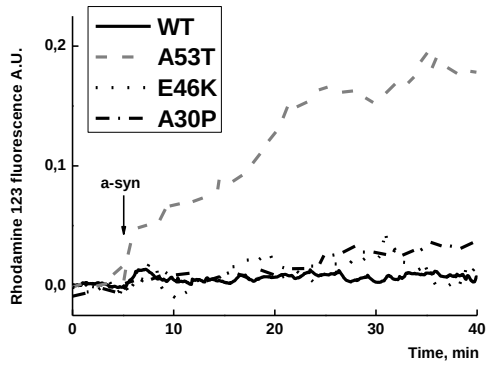
Целью данной работы было сравнить влияние мономерного а-син дикого типа и его мутантных форм A53T, A30P и E46K на митохондрии первичной культуры клеток мозга и выживаемость клеток.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы образцы человеческого а-син (в мономерной форме), любезно предоставленного проф. А.Ю. Абрамовым (Институт неврологии Университетского колледжа Лондона). Эксперименты проводили на первичных культурах клеток коры мозга, полученных от новорожденных крысят линии Wistar методами флуоресцентной микроскопии. Перед экспериментом клетки культивировали в течение 8-11 дней на круглых покровных стеклах, покрытых поли-D-лизином в среде Neurobasal A, содержащей 2% супплемента B27, 1X Glutamax и Пенициллин-стрептомицин. Уровень митохондриального потенциала измеряли с помощью Rhodamine 123 (10 мкМ, 15 мин, с отмывкой). Уровень цитозольного кальция оценивали с помощью Fura-2 (4 мкМ, 40 мин), Уровень NADH измеряли по аутофлуоресценции. Выживаемость клеток под действием а-син оценивали с помощью двойной прокраски Hoechst 33342 + Propidium Iodide.

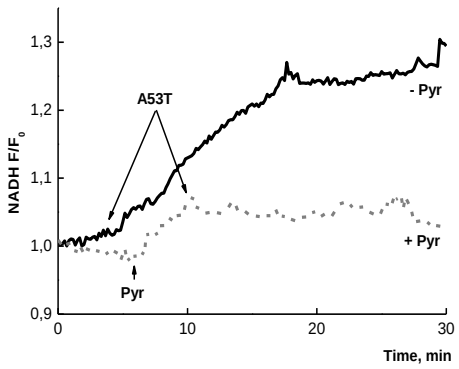
Результаты. В эксперименте было показано, что мономерный а-син A53T, но не а-син дикого типа (WT), A30P или E46K, в концентрации 200 нМ вызывает деполяризацию нейронов и астроцитов в течение 25-30 мин (рис. 1А). Амплитуда деполяризации составила: для нейронов - 13.1+/-6.5%, для глиальных клеток – 9.5+/-3.8%. Этот эффект а-син (A53T) предотвращался в присутствии субстратов пирувата (5 мМ), диметилсукцината (20 мМ), а также в присутствии циклоспорина А.

При измерении уровня NADH было показано, что A53T, но не другие типы мономерного а-син, вызывает увеличение аутофлуоресценции NADH в нейронах и глиальных клетках в течение 15-20 мин. Это увеличение NADH также предотвращалось в присутствии субстратов – пирувата (рис. 1Б) и диметилсукцината.

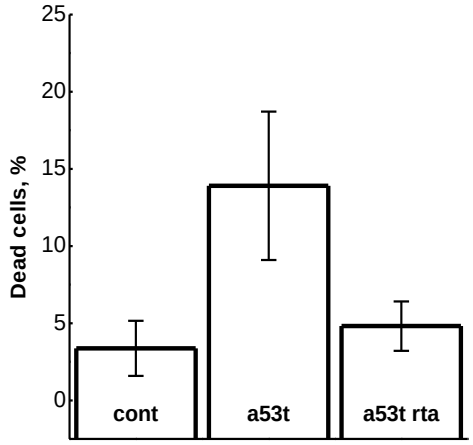
Далее мы попытались оценить влияние моно-а-син на выживаемость нервных клеток в культуре. Для этого инкубировали клетки 24 часа с 200 нМ мономерного а-син (дикий тип и мунтантные формы). Было показано, что A53T увеличивает количество мертвых клеток с 3.37+/-1.78% до 13.9+/-4,81% (Рис. 1В). При этом а-син дикого типа и мутантые формы E46K и A30P не влияют на жизнеспособность клеток. Интересно, что 24-часовая прединкубация культуры с 30 нМ активатора Nrf2 RTA 408 защищала клетки от токсического действия A53T, при этом доля мертвых клеток снижалась до 4,81+/-1,6%.



А



Б



В

Рис. 1А – Влияние мономерного а-син (200 нМ) на митохондриальный потенциал в клетках мозга крысы (представлено среднее со всей культуры). Исходный уровень флуоресценции Rhodamine 123 принят за 0, а максимальная флуоресценция после добавления 1 мкМ FCCP – за 1. Б. Влияние пирувата (Pyr) на индуцированное 200 нМ A53T увеличение аутофлуоресценции NADH. В. Влияние активатора Nrf2 RTA 408 на A53T-индуцированную гибель нейронов. Сначала клетки инкубировались 24 часа с 30 нМ RTA408, затем был добавлен а-син 200 нМ. Оценку жизнеспособности проводили через 24 часа после добавления а-син

Таким образом мономерный а-син, в особенности его мутантная форма (A53T), вызывает гибель клеток мозга крысы через активацию

подавление NADPH-оксидазы и снижение энергетики митохондрий. Эти эффекты предотвращаются в присутствии избытка субстратов или при активации защитных эндогенных антиоксидантных систем клеток.

Работа поддержана Минобрнауки РФ (Соглашение №11.616.21.0054).

Литература:

1. Forno L.S. Neuropathology of Parkinson's disease // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 1996. – V. 55. – P. 259–272.

2. Ren W.Q., Tian Z.M., Yin F., Sun J.Z., Zhang J.N. Extracellular alpha-synuclein – a possible initiator of inflammation in Parkinson's disease. // Pharmazie. – 2016. – V. 71. – N. 2. – P. 51–55.

3. Schulz-Schaeffer W.J. The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson'sdisease and Parkinson's disease dementia. // Acta Neuropathol. – 2010. – V. 120. N. 2. – P. 131–143.

4. Olanow C.W., Brundin P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? // Mov. Disord. – 2013. – V. 28. – N. 1. – P. 31–40.

5. Schulz-Schaeffer W.J. Neurodegeneration in Parkinson disease: Moving Lewy bodies out of focus. // Neurology. – 2012. – V. 79. – P. 2298–2299.

6. Burre J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Sudhof, T.C. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. // Science. – 2010. – V. 329. – P. 1663–1667.

7. Darios F., Ruiperez V., Lopez I., Villanueva J., Gutierrez L.M., Davletov B. Alpha-synuclein sequesters arachidonic acid to modulate SNARE-mediated exocytosis. // EMBO Rep. – 2010. – V. 11. – P. 528–533.

8. Scott D.A., Tabarean I., Tang Y., Cartier A., Masliah E., Roy S. A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration. // J. Neurosci. – 2010. – V. 30. – N. 24. – P. 8083–8095.

9. Nemani V.M., Lu W., Berge V., Nakamura K., Onoa B., Lee M.K., Chaudhry F.A., Nicoll R.A., Edwards R.H. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. // Neuron. – 2010. – V. 65. P. 66–79.

10. Dehay B. Alpha-synuclein, a prion-like protein. // Mov. Disord. – 2011. – V. 26. – N. 5. – P. 774.

11. Cox D., Carver J.A., Ecroyd H. Preventing alpha-synuclein aggregation: the role of the small heat-shock molecular chaperone proteins. // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1842. – N. 9. – P. 1830–1843.

12. Ebrahimi-Fakhari D., Saidi L.J., Wahlster L. Molecular chaperones and protein folding as therapeutic targets in Parkinson's disease and other synucleinopathies. // Acta Neuropathol. Commun. – 2013. – V. 5. – N. 1. – P. 79.

13. Chinta S.J., Andersen J.K. Redox imbalance in Parkinson’s disease. // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – V. 1780. – P. 1362–1367.

14. Kamp F., Exner N., Lutz A.K., Wender N., Hegermann J., Brunner B., Nuscher B., Bartels T., Giese A., Beyer K., Eimer S., Winklhofer K.F., Haass C. Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. // EMBO J. – 2010. – V. 29. – N. 20. – P. 3571–3589.

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕТИ ГАМКЕРГИЧЕСКИМИ НЕЙРОНАМИ

Зинченко В.П., Гайдин С.Г., Теплов И.Ю, Косенков А.М.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия
vpz@mail.ru

Колебания уровня кальция в цитозоле являются важным параметром клеточной сигнализации, который запускает и регулирует секрецию межклеточных трансмиттеров и активирует экспрессию специфичных генов [1]. В 1987 году Ogura и др. [2] впервые описали возникновение синхронных кальциевых транзитных сигналов в культуре гиппокампальных нейронов.

Синхронная спонтанная активность (ССА) отражает синхронную работу отдельных нейронов в сети и позволяет исследовать механизмы передачи сигнала между нейронами и переключение информационных потоков в нейрональной сети. ССА нейронов наблюдается повсюду в мозге и играет ключевую роль в обработке нейрональной информации. Считается, что ССА играет решающую роль в развитии мозга и при синаптогенезе [3], связана с функцией памяти [4] определяет ментальность человека, сон и бодрствование [5]. Специфические типы нейронных осцилляций появляются в патологических ситуациях, таких как болезнь Паркинсона и эпилепсия [6, 7]. Несмотря на многочисленные экспериментальные исследования, указывающие на корреляцию определенных параметров осцилляций с вышеуказанными функциями, молекулярные механизмы регуляции ССА не установлены, и выяснение этих механизмов является актуальной задачей. Сложность задачи состоит в том, что в генерации ССА принимают участие множество синаптических рецепторов и ионных каналов с различными механизмами регуляции.

Используя систему анализа изображения, конфокальную микроскопию, петч-клямп и иммуногистохимию мы визуализировали в культуре клеток гиппокампа (по форме Ca^{2+} сигнала и параметрами пачечной активности потенциалов действия) минорную популяцию нейронов, обладающих уникальными свойствами в регуляции ССА. КА- и глутамат-зависимое повышение Ca^{2+} в нейронах этой популяции останавливало ССА в сети [8] (рис.1). Мы предположили, что эта популяция представляет подтип ГАМКергических нейронов, которые подавляют ССА при гипервозбуждении нейрональной сети за счет

усиления входа Ca^{2+} через канал пресинаптических КА рецепторов и усиления Ca^{2+}-зависимой секреции тормозного нейротрансмиттера ГАМК.

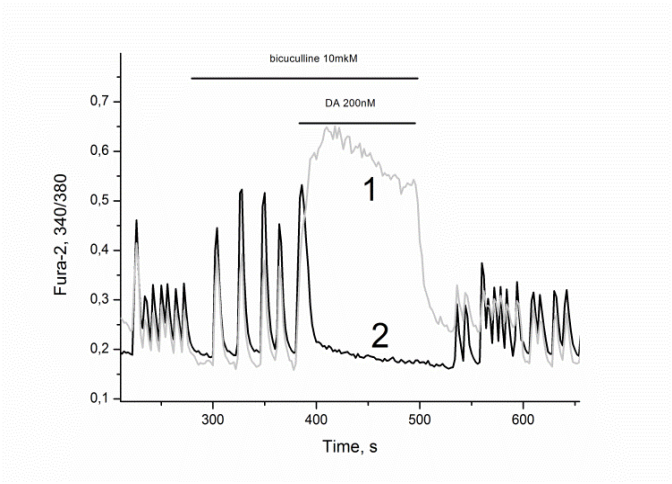


Рис. 1 – Агонист КА-рецепторов домоевая кислота (DA) подавляет ССА. Агонист вызывает повышение концентрации Ca^{2+} в отдельных интернейронах (1) и понижает концентрацию Ca^{2+} в других нейронах (2). Антагонист GABA(A)-рецептора бикукуллин уменьшает частоту и увеличивает амплитуду кальциевых колебаний, но не оказывает влияния на эффект подавления колебаний DA. Концентрации DA – 200нМ, Бикукуллин – 10мкМ.

Анализ экспериментальных данных показал, что эти нейроны являются популяцией легко-возбудимых, быстро-отвечающих ГАМКергических нейронов, Ca^{2+}-проводящие каинатные (КА) рецепторы которых содержат GluR5/GLUK1 субъединицу [5] и локализованы в пресинаптической мембране. Эти нейроны генерируют Ca2+-сигнал без десенситизации в ответ на глутамат и другие агонисты КА рецепторов [8], что может вызвать повышенную секрецию тормозного нейротрансмиттера ГАМК. Форма Ca^{2+} сигнала, генерируемая данной популяцией интернейронов указывает на отсутствие в них Ca^{2+}-связывающих белков в буферных концентрациях и ГАМК-зависимого торможения.

С другой стороны, длительное повышение амплитуды глутамат-зависимых Ca^{2+} ответов, незначительная десенситизация рецепторов и отсутствие Ca^{2+}-связывающих белков в буферных концентрациях дают основание предполагать высокую чувствительность данных нейронов к Ca^{2+}-повышающим воздействиям, включая увеличение частоты ССА и ишемию. Действительно, проведенные эксперименты показали, что длительная активация механизма быстрого, высокоамплитудного повышения Ca^{2+}, необходимого для усиленной секреции тормозного нейротрансмиттера ГАМК в этих нейронах, может быть причиной их селективной гибели при высокой частоте ССА.

Вторым механизмом повышения тормозной активности ГАМКэргических нейронов этой популяции является инвертирование градиент ионов Cl- в этих клетках при высоких частотах ССА, что приводит к превращению тормозного нейротрансмиттера ГАМК в возбуждающий для этой популяции нейронов (рис.2), что также может представлять механизм экстренного торможения ССА при гипервозбуждении.

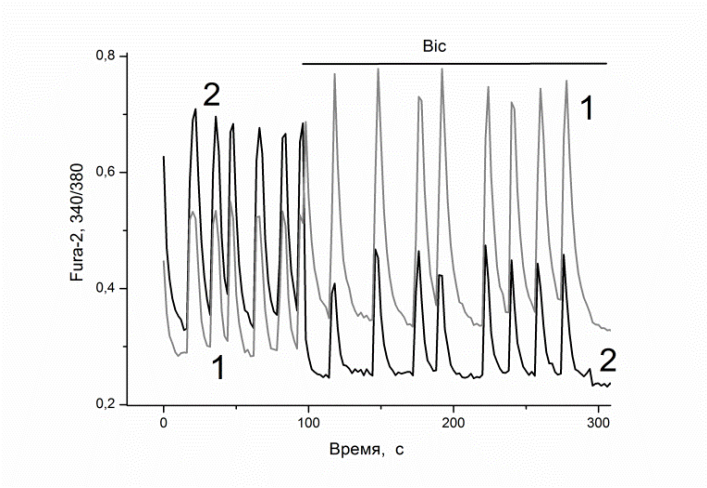


Рис. 2 – Ингибитор ГАМКА рецепторов бикукуллин (10 мкМ) возбуждает нейрон (1) и тормозит ГАМКергический нейрон (2) с инвертированным градиентом ионов Cl-.

Таким образом, пресинаптические Ca^{2+}-проводящие, GluR5-содержащие КА рецепторы популяции ГАМКергических нейронов, осуществляют отрицательную обратную связь при гиперактивации глутаматом, усиливая секрецию ГАМК за счет повышения концентрации Ca^{2+} в цитозоле и ингибируя, таким образом, ССА в принципиальных нейронах при гиперактивации глутаматом. Показано, что данный механизм может функционировать для торможения гиперактивности определенной популяции нейронов при повышении частоты ССА в нейрональной сети и при ишемии.

Повышенная чувствительность интернейронов данного подтипа к повреждающему действию ишемии обусловлена дефицитом PI3K сигнального пути. Активаторы PI3K защищали нейроны от глобального повышения Ca2+ в цитоплазме этих клеток и последующей гибели при ишемии (не показано). Очевидно, что селективная гибель тормозных интернейронов может привести к гипервозбудимости определенных структур мозга и приступам эпилепсии.

Таким образом, в работе установлены два механизма участия популяции ГАМКергических нейронов в развитии торможения при

гипервозбуждении нейрональной сети в условиях ишемии или повышении частоты ССА. Первый обусловлен активацией Ca2+-проводящих КА рецепторов пресинаптической мембраны ГАМКергичнских нейронов, а второй, - инверсией градиента ионов Cl- в этих нейронах.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (Соглашение №14-14-00989).

Литература:

1. Dolmetsch R.E. et al. // Nature (1998) 392: 933– 936.
2. Ogura A., Iijima T., Amano T., Kudo Y. // Neurosci Lett. (1987) 78(1):69-74.
3. Spitzer N.C., Olson E. X. // J. Neurobiol. (1995) 26: 316–324.
4. Womelsdorf T, Schoffelen J-M., et al. // Science (2007) 316 (5831): 1609–1612.
5. Lerma J. 2003. // Nat Rev Neurosci. 4(6), 481-495.
6. Levy R., Hutchison W.D., Lozano A.M. & Dostrovsky J.O. //The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience (2000) 20(20): 7766–7775.
7. Lopes da Silva F.H., Blanes W., et al. //IEEE transactions on bio-medical engineering (2003). 50(5): 540–548.
8. Кононов А.В., Баль Н.В., Зинченко В.П. //Биологические мембраны, 2012, том 29, № 1, стр. 133–138.

УЧАСТИЕ ПОРЫ, ИНДУЦИРУЕМОЙ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ И Sr^{2+}, В МЕХАНИЗМЕ Sr^{2+}/ВАЛИНОМИЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫХ ОСЦИЛЛЯЦИЙ ИОННЫХ ПОТОКОВ В МИТОХОНДРИЯХ В УСЛОВИЯХ ГИПОТОНИИ

Белослудцева Н.В.[1,2], Горячева Н.А.[1,2], Белослудцев К.Н.[1,3], Миронова Г.Д.[1,2]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино;
[2]Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;
[3]Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия
nata.imagination@gmail.com

Считается, что колебательные процессы транспорта ионов в митохондриях могут лежать в основе распространения в клетке так называемых «кальциевых волн». Однако физиологическое значение и точный механизм таких обратимых изменений проницаемости митохондриальной мембраны для двухвалентных металлов до сих пор

остается неясным. В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение молекулярного механизма осцилляций ионных потоков и других функциональных параметров митохондрий, запускаемых импульсной добавкой ионов стронция.

На рис. 1 (А, Б, В) показана одновременная запись изменений концентрации ионов Sr^{2+}, K^{+}, $ТФФ^{+}$, а также скорости митохондриального дыхания (рис. 1Г) после добавления Sr^{2+} к суспензии митохондрий печени крысы в присутствии калиевого ионофора валиномицина в гипотонической среде инкубации. Как следует из рисунка, добавление Sr^{2+} запускает спонтанные обратимые изменения скорости митохондриального дыхания (состояние V_2) (рис. 1Г), которые сопровождаются соответствующими обратимыми изменениями в мембранном потенциале (рис. 1Б) и движением ионов через мембрану (рис. 1А и В). Подобные изменения происходят также и в объеме митохондриального матрикса, оцениваемого путем регистрации оптической плотности суспензии органелл. Амплитуда и количество таких Sr^{2+}-индуцированных колебаний меняется в зависимости от концентрации добавленного Sr^{2+}. Эти колебания не ингибируются селективным блокатором митохондриальной МРТ поры – циклоспорином А (ЦсА).

Обнаруженные обратимые Sr^{2+}-индуцированные изменения не являются специфичными только для митохондрий печени. Подобные ЦсА-нечувствительные Sr^{2+}-индуцированные ионные осцилляции наблюдались также и в митохондриях сердца крыс.

Таким образом, в работе были экспериментально подобраны условия, которые позволяют получать длительные (в течении 30 минут) колебания ионных потоков и других функциональных параметров митохондрий. Колебательные процессы индуцировались добавлением ионов Sr^{2+} в невысоких концентрациях (40-50 нмоль/мг белка); в этом случае удавалось получить 3-5 «циклов» спонтанных колебаний ионных потоков. Необходимым условием для возникновения колебаний являлось наличие в среде небольшого количества калиевого ионофора валиномицина (1 нг/мг белка), а также пониженная тоничность среды инкубации.

Известно, что в гипотонических условиях наблюдается активация эндогенной фосфолипазы A_2 ($ФлА_2$) и накопление свободных жирных кислот в митохондриях [1]. Мы полагаем, что механизм выброса ионов в этих условиях связан с образованием во внутренней мембране митохондрий обнаруженной нами ранее пальмитат/Ca^{2+}-ндуцированной

поры. Было показано, что образование этой поры происходит в митохондриях и искусственных мембранах (липосомы и БЛМ) при связывании анионов длинноцепочечных насыщенных жирных кислот (в основном, пальмитиновой, ПК) с Ca^{2+}, и сопряжено со способностью этих кислот связывать Ca^{2+} с высоким сродством при pH 7,4 [2-5]. Механизм образования ПК/Ca^{2+}-поры, по нашим данным, заключается в изменении фазового состояния липидного бислоя в результате сегрегации ПК/Ca^{2+}-комплексов в отдельные твердокристаллические мембранные домены [4, 5]. Стоит отметить, что образующиеся липидные поры обладают способностью самопроизвольно закрываться, в результате чего сохраняется функциональная интактность органелл [3, 6]. Такие быстрозатекающие поры могут быть вовлечены в процессы длительной рециклизации ионов в митохондриях.

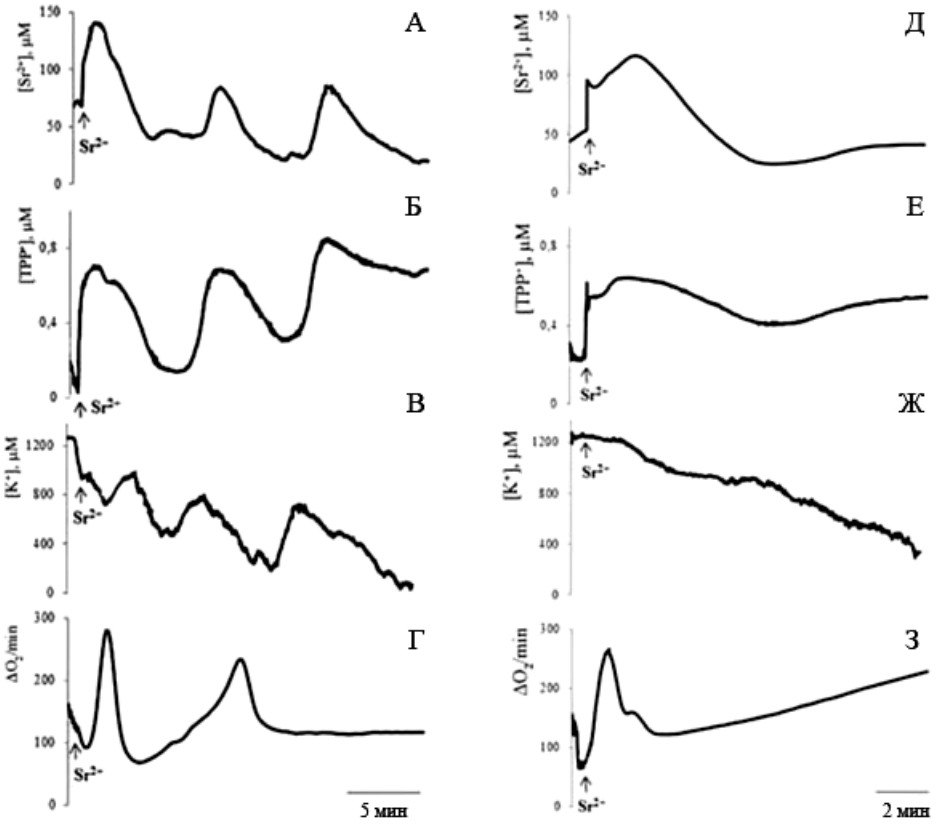


Рис. 1 – Sr^{2+}/валиномицин-индуцированные циклические изменения во внешней концентрации ионов Sr^{2+}, TPP^{+}, K^{+} и скорости дыхания (состояние V_2) митохондрий печени крысы в отсутствие (А, Б, В, Г) и в присутствии (Д, Е, Ж, З) ингибитора Ca^{2+}-зависимой фосфолипазы A_2 - аристолохиевой кислоты (25мкМ). Добавки: 47 нмоль $SrCl_2$/мг митохондриального белка, 25 мкМ аристолоховая кислота (Д, Е, Ж, З). Среда инкубации содержала 20 мМ сахарозу, 1 мМ KCl, 5 мМ янтарную кислоту, 1 мкМ циклоспорин А, 1 нг/мг белка валиномицина, 12 мМ Tris (pH 7,4). Концентрация митохондриального белка в кювете составляла 2 мг/мл. Представлены типичные кривые (n = 5).

Для того, чтобы выяснить возможную роль пальмитат-индуцированной поры в механизме осцилляций, мы исследовали влияние ряда ингибиторов Ca^{2+}-зависимых и Ca^{2+}-независимых $ФлА_2$.

Как можно видеть из рис. 1 (Д, Е, Ж, З), добавление ингибитора Ca^{2+}-зависимой $ФлА_2$, аристолоховой кислоты (25 мкМ) подавляет все спонтанные Sr^{2+}-индуцированные циклические изменения транспорта ионов в митохондриях. Подобным образом действовали и другие ингибиторы Ca^{2+}-зависимой $ФлА_2$: трифторперазин (10 мкМ), арахидонилтрифторметил кетон $AACOCF_3$ (15 мкМ), 4-(4-октадецилфенил)-4-оксобутановая кислота OBAA (1 мкМ), бромофеноцил бромид (40 мкМ), броменоллактон (15 мкМ)) (Табл.1). В тоже время, добавление к митохондриальной суспензии бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл), способного связывать и удалять эндогенные свободные жирные кислоты только с внешней стороны мембраны, не снимало появление спонтанных Sr^{2+}-индуцированных циклических изменений функциональных параметров митохондрий в исследуемых условиях.

Таблица 1 – Способность различных ингибиторов фосфолипазы A_2 проявлять блокирующий эффект на возникновение валиномицин/Sr^{2+}-индуцированных осцилляций ионных потоков в митохондриях печени крысы

Ингибитор фосфолипазы A_2	Действующая концентрация	Блокирующий эффект
Аристолохиевая кислота (Sigma)	25 мкМ	+
Трифторперазин(Sigma)	10 мкМ	+
$AACOCF_3$ (Tocris)	15 мкМ	+
OBAA(Tocris)	1 мкМ	+
Броменоллактон(Sigma)	15 мкМ	+
Бромофеноцил бромид(Sigma)	40 мкМ	+
$PACOCF_3$ (Tocris)	20 мкМ	–

Таким образом, представленные результаты подтверждают участие фосфолипазы A_2 и свободных жирных кислот в циклическом транспорте ионов через митохондриальную мембрану. Быстрое поглощение двухвалентных ионов через Ca^{2+}-унипортер может приводить к активации фосфолипазы A_2 и появлению жирных кислот (в том числе, пальмитиновой), которые, накапливаясь на матриксной стороне внутренней митохондриальной мембраны, могут формировать комплексы с Ca^{2+} (Sr^{2+}). В результате происходит образование

короткоживущих липидных пор. Такая временная пермабилизация митохондриальной мембраны может лежать в основе колебаний ионных потоков в митохондриях в гипотонических условиях.

Работа поддержана РФФИ (грант № 15-04-03081-а), РНФ (грант № 16-15-00157) и Правительством РФ (договор № 14.Z50.31.0028).

Литература:

1. Kargapolov A.V. Biochemistry (*Russian*) 44(2) (1979) 293-296.
2. Mironova G.D., Gateau-Roesch O., Levrat C., Gritsenko E., Pavlov E., Lazareva A.V., Limarenko E., Rey P., Louisot P. and Saris N.-E.L. (2001) *J. Bioenerg. Biomembr.*, 33, 319-331.
3. Mironova G.D., Gritsenko E., Gateau-Roesch O., Levrat C., Agafonov A., Belosludtsev K., Prigent A.F., Muntean D., Dubois M. and Ovize M. (2004) *J. Bioenerg. Biomembr.*, 36, 2,171-178.
4. Agafonov A., Gritsenko E., Belosludtsev K., Kovalev A., Gateau-Roesch O., Saris N.-E.L. and Mironova G.D. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, 1609, 2, 153-160.
5. Agafonov A.V., Gritsenko E.N., Shlyapnikova E.N., Kharakoz D.P., Belosludtseva N.V., Lezhnev E.I., Saris Nils-Erik L., Mironova G.D. (2007) *J. Membr. Biol.,* **215** (1), 57-68.
6. Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. (2005) *Биохимия*, 70, 7, 987-994.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ОБРАЗОВАНИЯ Ca^{2+}-ЗАВИСИМОЙ ЦИКЛОСПОРИН А-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ПАЛЬМИТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА И МАССЫ ТЕЛА ЖИВОТНОГО

Белослудцева Н.В.[1,2], Седельникова Э.А.[1], Белослудцев К.Н.[1,3]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино;
[2]Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;
[3]Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия
nata.imagination@gmail.com

Известно, что биоэнергетические показатели клетки и липидный состав мембран митохондрий существенно варьируют у взрослых млекопитающих, имеющих разную массу тела (мышь, крыса, суслик), а также различаются у особей противоположного пола (самцы и самки).

Эти физиологические различия, в свою очередь, могут обуславливать изменения проницаемости мембран митохондрий, и в частности оказывать влияние на процессы образования в них неселективных пор, участвующих в выбросе различных веществ и ионов в цитоплазму клетки.

Показано, что образование таких пор во внутренней мембране митохондрий может индуцироваться длинноцепочечными насыщенными жирными кислотами (в основном, пальмитиновой) в присутствии ионов Ca^{2+} [1-3]. Установлено, что поры такого типа открываются также в искусственных липидных мембранах – БЛМ и липосомах, и не модулируются селективным ингибитором “классической” митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore – MPT) - циклоспорином А (ЦсА) [2-5]. В связи с этим, было предположено, что ЦсА-нечувствительная пальмитат/Ca^{2+}-индуцированная пора имеет липидную природу. В основе механизма образования такой поры может лежать способность анионов насыщенных жирных кислот образовывать прочные комплексы с Ca^{2+} в липидном бислое с последующей их сегрегацией в твердокристаллические мембранные домены и появлением гидрофильных липидных пор [4]. Важно отметить, что регуляция этой поры может осуществляться либо изменением физико-химических свойств мембран, либо модификацией липидного окружения бислоя.

На сегодняшний день недостаточно данных по исследованию функционирования и регуляции митохондриальной липидной поры при различных физиологических и метаболических состояниях организма. При этом концентрации требуемых для ее образования индукторов близки к таковым при физиологических условиях и некоторых патологиях [6], и существенно ниже концентраций, требуемых для образования MPT поры. В тоже время, изменение функционирования митохондрий и физико-химических свойств их мембран в зависимости от массы тела и пола животного может оказывать существенное влияние на процессы образования пор в липидном бислое, и, в частности, изменять чувствительность органелл к индукторам ЦсА-нечувствительной поры – пальмитиновой кислоте и Ca^{2+}.

В связи с этим, в настоящей работе было проведено сравнение параметров образования митохондриальной циклоспорин А-нечувствительной поры в митохондриях, выделенных из печени половозрелых самцов и самок крыс в возрасте 3 месяцев (рис. 1). Образование поры в митохондриях, приводящее к высокоамплитудному

набуханию органелл, оценивали спектрофотометрически путем регистрации изменения оптической плотности суспензии органелл. Открытие поры в митохондриях индуцировали добавлением пальмитиновой кислоты в концентрациях 5 – 30 мкМ и Ca^{2+} (30 мкМ) в присутствии 1 мкМ циклоспорина А в среде инкубации.

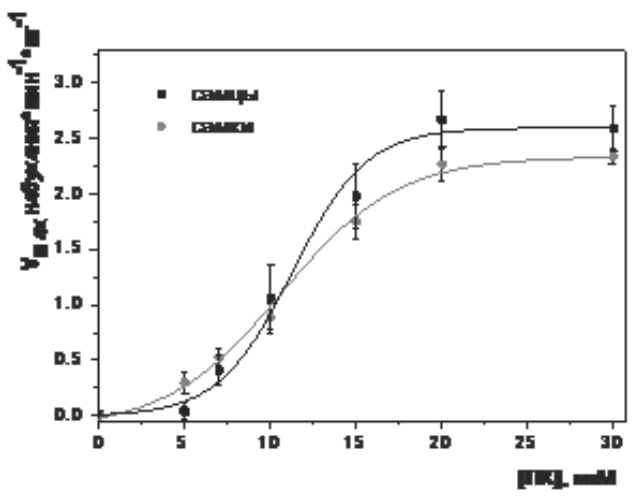


Рис. 1 – Сравнение параметров образования пальмитат/Ca^{2+}-индуцированной поры в митохондриях печени крыс разного пола. Набухание индуцировалось пальмитиновой кислотой в концентрации от 2 мкМ до 30 мкМ и 30 мкМ $CaCl_2$. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 4).

Как видно из рис. 1, скорость набухания митохондрий печени самцов и самок крыс, индуцируемого пальмитиновой кислотой и Ca^{2+} в исследуемых концентрациях, достоверно не отличаются. Таким образом, митохондрии печени крыс обоих полов имеют одинаковую резистентность к индукторам ЦсА-нечувствительной поры. Полученные данные говорят о том, что пол животного (и в частности, гормональный статус) если и влияет на липидный состав мембран, то это влияние не оказывает эффекта на образование в митохондриях кальций-зависимой липидной поры, индуцированной пальмитиновой кислотой.

В работе было проведено также сравнительное исследование скоростей ЦсА-нечувствительного набухания митохондрий, выделенных из печени взрослых млекопитающих с разной массой тела: мышей (средняя масса тела 30 г), крыс (210 г), и длиннохвостых сусликов в состоянии активного бодрствования (400 г) (рис. 2). Набухание митохондрий индуцировалось пальмитиновой кислоты в концентрациях 5 – 30 мкМ и Ca^{2+} (30 мкМ) в присутствии 1 мкМ циклоспорина А в среде инкубации.

Установлено, что скорости пальмитат/Ca^{2+}-индуцированного набухания митохондрий возрастают в ряду мышь/крыса – суслик. Таким

образом, образование ЦсА-нечувствительной поры в митохондриях происходит легче по мере увеличения массы тела животных.

Полученные результаты могут быть связаны с разной интенсивностью сукцинат-зависимого дыхания митохондрий разных животных, которое определяет скорость входа ионов Ca^{2+} в митохондрии [7]; причем окисление сукцината может дополнительно стимулироваться Ca^{2+}. Ранее было показано, что транспорт ионов кальция внутрь митохондрий необходим для образования пальмитат-индуцированной поры, тогда как селективный ингибитор кальциевого унипортера – рутений красный полностью блокирует её открытие в митохондриях [8]. В связи с этим, в настоящей работе проводилось сравнение скоростей дыхания митохондрий печени мышей, крыс и активных сусликов в различных функциональных состояниях. Исследование показало небольшое уменьшение скорости V_2, а также увеличение скорости разобщенного дыхания при увеличении массы тела животных.

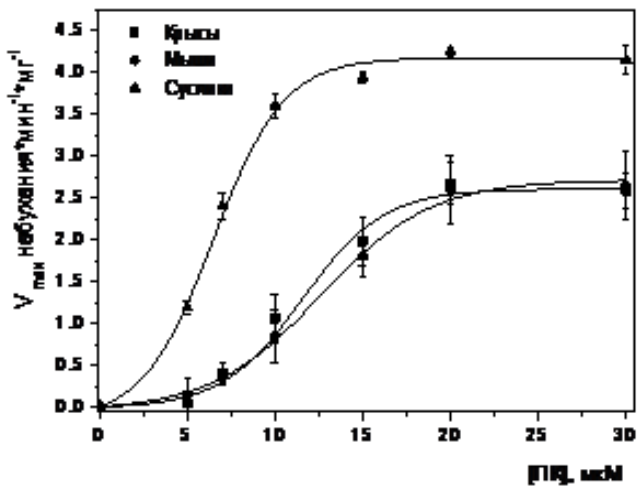


Рис. 2 – Сравнение параметров образования пальмитат/Ca^{2+}-индуцированной поры в митохондриях печени крысы, мыши и суслика. Набухание митохондрий индуцировалось пальмитиновой кислотой в концентрации от 2 мкМ до 30 мкМ и $CaCl_2$ в концентрации 30 мкМ. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 6).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о возможности физиологической регуляции образования в митохондриях пальмитат/Ca^{2+}-индуцируемой поры, однако механизмы этой регуляции требуют дальнейших исследований. В тоже время, открытие митохондриальной пальмитат/Ca^{2+}-индуцированной поры может играть важную роль в ряде физиологических процессов. С одной стороны, пальмитат/Ca^{2+}-индуцированная пора может являться неспецифической системой выброса ионов Ca^{2+} из митохондрий и, таким образом, участвует в рециклизации Ca^{2+} через внутреннюю митохондриальную

мембрану [8]. С другой стороны, при ее открытии происходит выброс из митохондрий проапоптотических белков – цитохрома с и апоптоз-индуцирующего фактора [9]. Кроме того, как было показано недавно, открытие этой поры, вероятно происходит при деградации нервных клеток, когда при перегрузке нейронов глутаматом происходит избыточное поступление ионов Ca^{2+} в клетку через NMDA рецепторы [10].

Работа поддержана РФФИ (грант № 15-04-03081-а), РНФ (грант № 16-15-00157) и Правительством РФ (договор №14.Z50.31.0028).

Литература:

1. Sultan A. and Sokolove P. (2001a) *Arch. Biochem. Biophys.*, 386, 31-51.

2. Mironova G.D., Gateau-Roesch O., Levrat C., Gritsenko E., Pavlov E., Lazareva A.V., Limarenko E., Rey P., Louisot P. and Saris N.-E.L. (2001) *J. Bioenerg. Biomembr.*, 33, 319-331.

3. Mironova G.D., Gritsenko E., Gateau-Roesch O., Levrat C., Agafonov A., Belosludtsev K., Prigent A.F., Muntean D., Dubois M. and Ovize M. (2004) *J. Bioenerg. Biomembr.*, 36, 2,171-178.

4. Agafonov A., Gritsenko E., Belosludtsev K., Kovalev A., Gateau-Roesch O., Saris N.-E.L. and Mironova G.D. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, 1609, 2, 153-160.

5. Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. (2005) *Биохимия*, 70, 7, 987-994.

6. Leˆ-Quoˆc and Leˆ-Quoˆc (1989) *Arch Biochem Biophys*. 273(2), 466-78.

7. Kondrashova M.N.,Gogvadze V.G., Medvedev B.I., Babsky A.M. (1982) *Biochem Biophys Res Commun*. 109(2), 376-81.

8. Mironova G.D., Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Gritsenko E.N., Khodorov B.I., Saris N.-E.L. (2007) *J. Bioenerg. Biomembr.*, 39(2), 167-174.

9. Belosludtsev K. N., Saris N.-E.L., Belosludtseva N.V., Trudovishnikov A.S., Lukyanova L.D., Mironova G.D. (2009) *J. Bioenerg. Biomembr.*, V41(4):395-401.

10. Миронова Г.Д., Белослудцев К.Н., Сурин А.М., Трудовишников А.С., Белослудцева Н.В., Пинелис В.Г. Красильникова И.А. Ходоров Б.И. (2011) *Биологические мембраны*, 28(6), 483-494.

ОСОБЕННОСТИ ИНДУКЦИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ УЖА ОБЫКНОВЕННОГО (*NATRIX NATRIX L.*)

Дубинин М.В.[1], Теньков К.С.[1], Ведерников А.А.[1], Белослудцев М.Н.[2], Старинец В.С.[1], Свинин А.О.[1], Белослудцев К.Н.[1], Самарцев В.Н.[1]

[1]Марийский государственный университет, Йошкар-Ола; [2]ГБОУ ВПО Кировская ГМА Минздрава России, Киров, Россия

dubinin1989@gmail.com

Феномен «перехода проницаемости митохондриальной мембраны» (открытие МРТ поры) к настоящему времени достаточно хорошо изучен. Сегодня под этим понятием понимается резкое циклоспорин А (ЦсА)-чувствительное увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий для соединений с молекулярной массой до 1.5 кДа. Известно, что размер поры может достигать 3 нм в диаметре, проводимость около 1.3 нСм, а процесс ее закрытия и открытия регулируется целым рядом физиологических модуляторов [1]. Идентифицировано несколько белков внутренней митохондриальной мембраны, способных выполнять роль основного компонента ЦсА-чувствительной поры, среди которых ADP/ATP-антипортер, переносчик фосфата и F_0F_1-ATP-синтаза. В то же время молекулярная природа этой поры до сих пор является предметом дискуссии, и мнение большинства исследователей сходится лишь в том, что важную регулирующую роль выполняет циклофилин D – белок, являющийся мишенью ЦсА [2].

Следует отметить, что в подавляющем большинстве исследований в качестве лабораторных животных использовались гомойотермные животные, в частности, млекопитающие разных видов [3]. Кроме того, существование неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий характерно и для птиц [4,5].

Исследования показывают, что неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий характерна и для пойкилотермных животных - рыб и амфибий [3], а также беспозвоночных [3]. Однако можно полагать, что этот феномен претерпевает изменения в процессе эволюции. Так для многих пойкилотермных животных отмечается десенсибилизация митохондриальной поры к ионам кальция, и, следовательно, для ее индукции требуются значительные концентрации этого иона [6]. Возможно, это связано с характерной для большинства

пойкилотермных животных сезонной изменчивостью метаболической активности, которая характеризуется наличием, в частности, метаболической депрессии, наблюдаемой в зимний период [7].

Целью настоящей работы было исследование особенностей индукции Ca^{2+}-зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени пойкилотермных животных на примере ужа обыкновенного (*Natrix natrix* L.).

Митохондрии из печени животных выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования [4]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS-Tris (pH 7,4). Набухание митохондрий определяли по изменению оптической плотности суспензии митохондрий (А) при длине волны 540 нм. Проницаемость внутренней мембраны митохондрий для ионов кальция и кальциевую емкость митохондрий определяли с помощью Ca^{2+}-селективного электрода. Трансмембранный электрический потенциал ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катиона тетрафенилфосфония ($ТФФ^+$) через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали с помощью $ТФФ^+$-чувствительного электрода при 25°С. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ Kcl, 5 мМ янтарную кислоту, 20 мкМ EGTA, 10 мМ MOPS-Tris (pH 7,4). В качестве контрольных данных использовали результаты, полученные на митохондриях печени крысы.

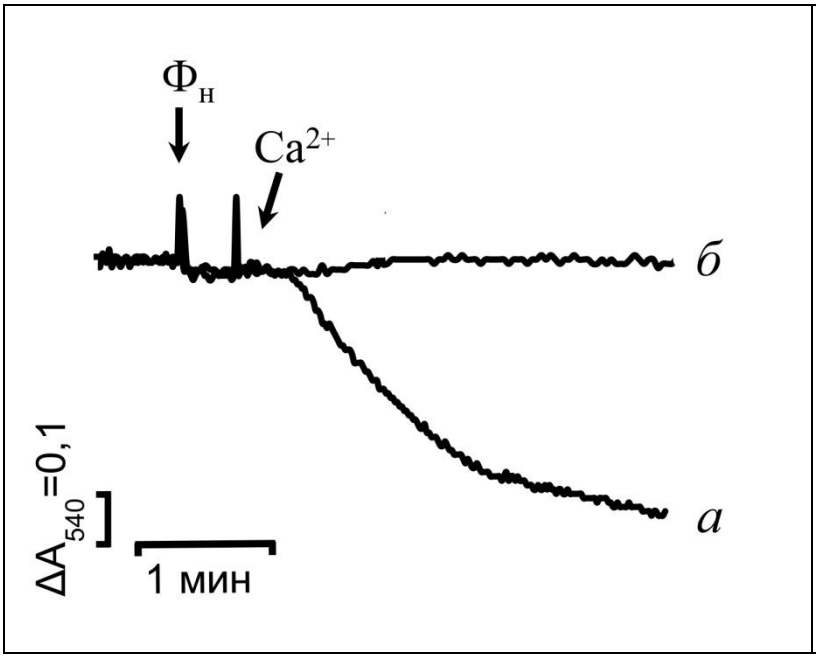


Рис. 1 – Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени крысы (*а*) и ужа (*б*), инкубируемых в присутствии 1 мМ $Ф_н$, при добавлении 125 нмоль на 1 мг белка $CaCl_2$ (Ca^{2+}).

Известно, что в энергизованных митохондриях печени, инкубируемых в сахарозной среде, появление неспецифической

проницаемости внутренней мембраны для растворимых в воде ионов и веществ с молекулярной массой до 1500 Да приводит к высокоамплитудному набуханию органелл [4, 6]. Набухание митохондрий приводит к уменьшению рассеивания проходящего через суспензию света, и это может быть зарегистрировано как снижение оптической плотности суспензии этих органелл [4, 6]. Как видно из рис. 1 (кривая *а*), добавление $CaCl_2$ (125 нмоль на 1 мг белка) к митохондриям печени крыс, инкубируемых в сахарозной среде с неорганическим фосфатом (1 мМ) и энергизованных путем окисления сукцината, приводит к существенному снижению оптической плотности суспензии, в то время как в присутствии ЦсА (1 мкМ) такого эффекта не наблюдается (не показано). Такое $Ca^{2+}/Ф_н$ – зависимое ЦсА-чувствительное высокоамплитудное набухание органелл сопровождается снижением мембранного потенциала и выходом Ca^{2+} из матрикса органелл (не показано).

В то же время, как показано в настоящей работе, добавление 125 нмоль $CaCl_2$ на 1 мг белка к митохондриям печени ужа в присутствии 1 мМ $Ф_н$ не приводит к изменению оптической плотности суспензии органелл (рис.1, *б*). Для индукции набухания митохондрий печени ужа необходимо добавление порядка 500 нмоль $CaCl_2$ на 1 мг белка (рис.2, *б*). Такое набухание органелл сопровождается снижением мембранного потенциала и выходом Ca^{2+} из матрикса органелл (не показано). ЦсА, в этом случае, также ингибирует описанные процессы (рис.2, *в*). При этих условиях предварительная инкубация митохондрий печени ужа с окисляющим агентом *трет*-бутилгидропероксидом (ТБГ) в отсутствие ЦсА увеличивает скорость набухания органелл (рис.2, *г*). В то же время, необходимо отметить, что даже в этих условиях наблюдаемое набухание митохондрий печени ужа не является высокоамплитудным, в отличие от митохондрий печени крыс (рис. 1, *а*).

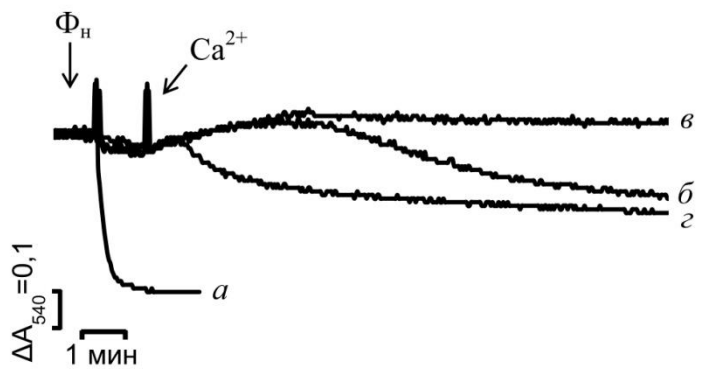


Рис. 2 – Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени ужа при добавлении 500 нмоль на 1 мг белка $CaCl_2$ (Ca^{2+}) в отсутствии (*б*) и присутствии (*в*) 1 мкМ ЦсА, а также в присутствии 200 мкМ ТБГ (*г*). Кривая *а* – в качестве контроля к суспензии митохондрий печени ужа добавлен каналообразующий агент аламетицин (5 мкг/мл).

Способность ионов Ca^{2+} индуцировать открытие поры в митохондриях можно выразить количественно как кальциевая емкость митохондрий (КЕМ), т.е. то максимальное количество Ca^{2+}, которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры [4, 6]. Проведенные исследования показали, что КЕМ печени ужа составляет около 400 нмоль $CaCl_2$ на 1 мг белка, что более чем в 5 раз превышает КЕМ печени крыс [6].

Таким образом, данные предварительных экспериментов свидетельствуют о том, что митохондрии печени обыкновенного ужа обладают существенно большей резистентностью к действию Ca^{2+} как индуктору ЦсА-чувствительной поры, чем митохондрии печени млекопитающих, и сравнимы по этому показателю с митохондриями печени некоторых видов птиц [6].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-00688-а, 16-34-00435 мол_а, 15-04-03081-а) и Министерства образования и науки РФ (в рамках государственного задания № 1365).

Литература:

1. Bernardi P. (2013) *Front. Physiol.,* 4(95), 1-12.

2. Halestrap A.P., Richardson A.P. (2015) *J. Mol. Cell Cardiol.*, 78, 129-141.

3. Azzolin L., von Stockum S., Basso E., Petronilli V., Forte M. A., Bernardi P. (2010) *FEBS Lett.*, 584(12), 2504–2509.

4. Vedernikov A. A., Dubinin M. V., Zabiakin V. A., Samartsev V. N. (2015) *J. Bioenerg. Biomembr.*, 47(3), 235-242.

5. Дубинин М.В., Ведерников А.А., Хорошавина Е.И., Адакеева С.И., Самарцев В.Н. (2015) *Биологические мембраны*, 32(5–6), 328-337.

6. Galli G.L., Richards J.G. (2014) *J. Comp. Physiol. B*, 184, 285-302.

7. Emelianova L.V., Savina M.V., Beliaeva E.A., Braĭlovskaia I.V. (2007) *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 43(6), 564-572.

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕН-СОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ДНФ-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ВХОД ИОНОВ КАЛИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС

Мащенко А.В.[2], Аль-Мугхраби Я.М.[2], Мосенцов А.А.,[2] Хмиль Н.В.[1,2], Овсянникова Т.Н.[2], Дяченко В.Д.[3], Миронова Г.Д.[1]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия;
[2]Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина, Харьков, Украина; [3]Луганский национальный университет им. Т.Г.Шевченко, Луганск, Украина
mironova40@mail.ru

Известно, что различные селенорганические соединения способны проявлять антитоксическую, антибактериальную, антиоксидантную, анантивирусную, антиаритмическую и фунгицидную активность. На протяжении последних лет в ряде лабораторий проводится синтез органических форм селена в целях профилактики селенодефицита и ряда других заболеваний. В Луганском национальном университете им. Т.Г.Шевченко в последнюю декаду было синтезировано несколько селен-содержащих соединений [1-3]. Показано, что некоторые из синтезированных соединений обладают выраженным антиоксидантным эффектом [4, 5]. В проведенных нами ранее исследованиях было изучено влияние шести вновь синтезированных селенсодержащих веществ на параметры сопряженного дыхания митохондрий и способность этих органелл снижать перекисное окисление липидов [6].. Показано, что только два из них (DVD7 и DVD10) изменяют эти параметры. Установлено, что вещество DVD 7 снижает скорость образования перекисей липидов в митохондриях, а вещество DVD 10, обладает свойствами слабого разобщителя дыхательной цепи. Это указывает на возможность в дальнейшем их использования в качестве потенциальных кардиопротекторов. Полученные эффекты позволяют прогнозировать влияние этих веществ на работу калиевых каналов, активаторы которых, как известно, обладают кардиопротекторным действием [7].

В связи с этим, несомненный интерес представляет исследование влияние селен-содержащих соединений (DVD7 и DVD10) на транспорт калия в митохондриях.

Целью данной работы было изучение влияния вновь синтезированных селен-содержащих соединений на АТФ-зависимый ДНФ-стимулированный транспорт калия в митохондриях печени крыс.

Материалы и методы: В работе были проведены исследования по изучению двух вновь синтезированных селен-содержащих соединений, кодовые обозначения которых были DVD 10 и DVD 7. Структурные формулы представлены на рис. 1.

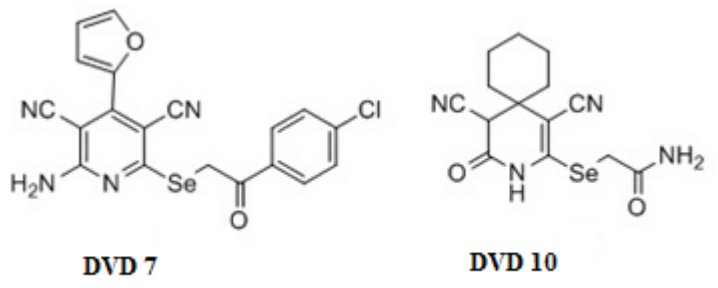


Рис. 1 – Структурные формулы исследованных в работе селен-содержащих соединений DVD 7 и DVD 10.

Функционирование митохондриального АТФ-чувствительного K^+ канала (митоК$_{АТФ}$) оценивали по скорости АТФ-зависимого выхода калия из митохондрий, инициированного разобщителем окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом (ДНФ). Данный метод позволяет регистрировать работу митоК$_{АТФ}$ в обратном направлении, независимо от энергетического состояния митохондрий. Кинетику выхода калия регистрировали с помощью разработанного в лаборатории оригинального электрометрического усилителя, соединенного с компьютером через контроллер L-153. Среда инкубации митохондрий содержала: 180 мМ сахарозы, 70 мМ D-маннитола, 5 мМ Na_2HPO_4, 10 мМ Трис-HCl (pH 7.4). Выход K^+ из митохондрий индуцировали добавлением в среду инкубации 50 мкМ 2,4-динитрофенола. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0,5-1 мг/мл. Измерения производились при постоянном перемешивании и термостатировании при 26°С.

Из рис. 2 видно, что преинкубация митохондрий в течении 1 минуты с селенсодержащим веществом DVD 10 в концентрациях 14,5 или 28,5 мкМ активирует ДНФ-индуцированый выход ионов калия среднем на 20% и 40% соответственно. Подобный эффект также наблюдался при добавлении вещества DVD 7.

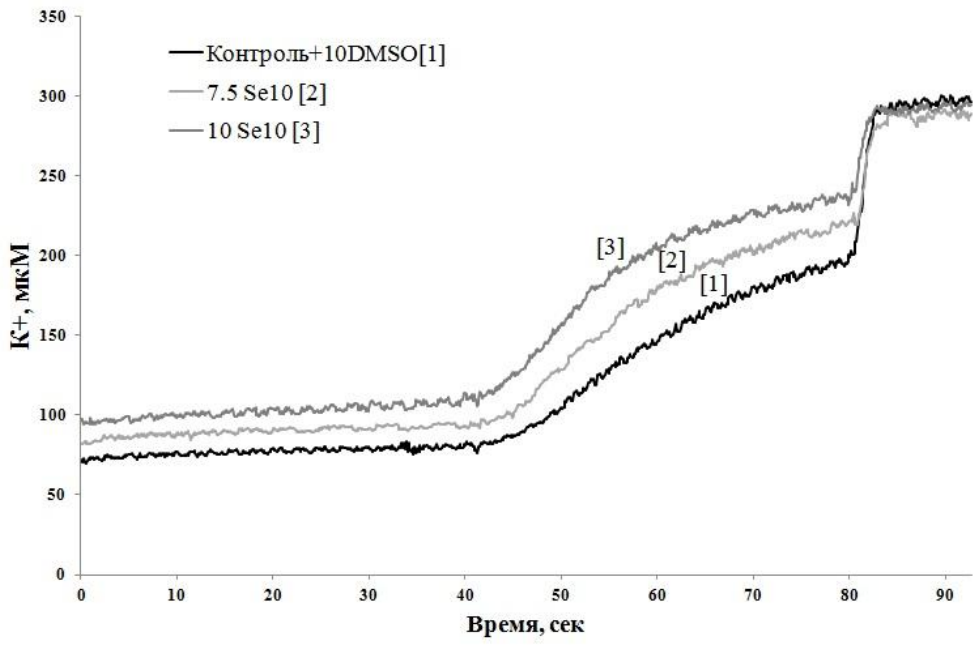


Рис. 2 – Влияние DVD 10 (28,6 мкМ) на скорость ДНФ-индуцированного выхода ионов калия из митохондрий, которую оценивали по начальной скорости выхода иона.. при добавлении 2,4-динитрофенола (ДНФ, 50 мкМ)всередине измерения. Раствор селена в объеме 7,5 или 10 мкл (14,3 и 28,6 мкМ соответственно) вносился в кювету за 1 мин до начала измерений.

Таким образом, в работе установлено, что оба вещества (DVD 7 и DVD 10) активируют ДНФ-индуцированый выход ионов калия, возможно, усиливая, таким образом, работу митоК-АТФ, то есть выступают в роли активаторов канала. Как известно активация этого канала предупреждает развитие окислительного стресса и приводя к снижению скорости образования в митохондриях печени АФК [8].

Работа поддержана грантом Правительства РФ № 14.Z50.31.0028, грантом РНФ № 16-15-00157 и грантом РФФИ 16-04-00692А.

Литература:

1. Литвинов В.П., Дяченко В.Д. (1997), Усп. хим., 66(11), 1025–1053.
2. Дяченко И.В., Дяченко В.Д. (2015), Российский журнал общей химии, 85 (7), 1673-1676.
3. Дяченко В.Д., Битюкова О.С., Дяченко А.Д. (2010), Химия гетероциклических соединений, 8 (518), 1162-1164.
4. Овсянникова Т.Н., Дяченко В.Д., Коваленко А.А., Бирюков Д.Ю. (2014), Украинский биохим. журнал, 86(5), 209.

5. Овсянников С.Е., Дяченко В.Д., Ткачев Р.П., Никишин А.А., Красников Д.А., Овсянникова Т.Н. (2008), Вестник Луганского национального университета им. Тараса Шевченко. Биологические науки, 2(141), 61-71.

6. Khmil N.V., Mosencov A.A., Ovsyannikova T.N., Dyachenko V.D., Kolomytkin O.V., Mironova G.D. (2016), Biologikal motility, 96-100.

7. Миронова Г.Д., Качаева Е.В., Крылова И.Б., Родионова О.М., Балина М.И[1]., Евдокимова Н.Р. , Копылов А.Т., Сапронов Н.С..(2007) Вестник Российской АМН №2, 44-49.

8. Venediktova N., Shigaeva M., Belova S., Belisludseva K., Belisludseva N., Gorbachova O., Leznev E., Lukyanova L., Mironova G. (2013). Mol.Cell Biochem., V 383, P..261-269.

НОВЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА МОРФОЛОГИЮ МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ

Овченкова А.П., Голева Т.Н., Рогов А.Г., Звягильская Р.А.
Федеральный научный центр «Фундаментальные проблемы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, факультативные анаэробы, легко переходящие с окислительного типа обмена на гликолитический и наоборот, в зависимости от доступности кислорода, традиционно использовались и используются для выявления роли митохондрий в общем клеточном обмене, при изучении генетических и молекулярных аспектов старения клеток и их гибели [1, 2]. Однако клетки *S. cerevisiae* не могут считаться наилучшей моделью для изучения фрагментации митохондрий, обычно предшествующей митофагии (процессу удаления поврежденных митохондрий) и апоптозу, поскольку они содержат немногочисленные слабоструктурированные митохондрии малого размера.

Мы предлагаем новые перспективные модели для такого рода исследований. Это, прежде всего, дрожжи *Dipodascus magnusii*, представляющие собой гигантские по своим размерам клетки (*magnusii* означает «гигантские») с многочисленными хорошо структурированными митохондриями, образующими разветвленный митохондриальный ретикулум [3]. Дыхательная цепь *D. magnusii* напоминает дыхательную цепь млекопитающих и содержит все три

пункта энергетического сопряжения, независимо от используемого для роста субстрата [4].

Второй столь же перспективной моделью являются дрожжи *Yarrowia lipolytica*, облигатный аэроб, хорошо изученный генетически [см. 5], способный при определенном способе выращивания [6] образовывать длинные клетки, мицелий.

В «норме» клетки *D. magnus*ii и *Y. lipolytica* содержали митохондрии в форме длинных филамент. Визуализацию митохондрий осуществляли с помощью флуоресцентного красителя MitoTracker Green FM, который связывается с митохондриями независимо от мембранного потенциала; окрашенные клетки просматривали под флуоресцентным микроскопом. Инкубация дрожжевых клеток с прооксидантом *терт*-бутилпероксидом вызывала дозо-зависимый окислительный стресс, детектируемый методом проточной цитометрии с флуоресцентными зондами MitoSOX Red (индикатором митохондриальных супероксид-анион-радикалов) или DCF (индикатором пероксида водорода). Окислительный стресс индуцировал в дрожжах интенсивную фрагментацию митохондрий. Фрагментация митохондрий в дрожжах *D. magnusii* могла быть вызвана и нарушениями в системе окислительного фосфорилирования.

Увеличение концентрации *терт*-бутилпероксида или длительности инкубации клеток с ним приводило к гибели части популяции. Согласно предварительным исследованиям, клеточная гибель проходила по механизму апоптоза.

Окислительный стресс, обусловленный действием *терт*-бутилпероксидом, а также

вызываемые им фрагментация митохондрий и клеточная смерть частично или полностью предотвращались SkQ1, митохондриально-направленным (т.е. транспортирующимся преимущественно, если не исключительно в митохондрии) катионным антиоксидантом.

Таким образом, нам удалось показать не только возможность использования новых моделей, но и их очевидное преимущество перед дрожжами *S. cerevisiae* при изучении фрагментации митохондрий. Полагаем, что использование этих новых культур позволит получить новую информацию, касающуюся взаимосвязи фрагментации митохондрий с митохондриальной дисфункцией, структурой дыхательной цепи, старением и клеточной смертью.

Работа поддержана Программой РАН по клеточной и молекулярной биологии, Российским фондом фундаментальных исследований (гранты

16-04-01040 and 16-34-01732) и Российским научным фондом (грант 14-24-00107).

Литература:

1. A. Ruetenik, A. Barrientos. Biochim. Biophys. Acta. 1847(11) (2015) 1434-1447.
2. Е.И. Суханова, Ф.Г. Рогов, Ф.Ф. Северин, Р.А. Звягильская. Биохимия 77(7) (2012) 761-775.
3. L. Adamíková, P. Griac, L. Tomáska, J. Nosek. Yeast. 14(9) (1998) 805-812.
4. А.В. Котельникова и Р.А. Звягильская. «Биохимия дрожжевых митохондрий» (монография, (1973). Наука, Москва, 239 сс.
5. R. Zvyagilskaya, E. Andreishcheva, M.I. Soares, I. Khozin, A. Berhe, B.L. Persson, J. Basic. Microbiol. 41(5) (2001) 289-303.
6. J. Ruiz-Herrera, R. Sentandreu. Arch Microbiol. 178 (2002) 477–483.

ИЗМЕНЕНИЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ КРОВИ И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ТКАНЕЙ ЛЕГКИХ И СЕРДЦА ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НИТРИТА НАТРИЯ

Розова Е.В.[1], Сидоряк Н.Г.[2]

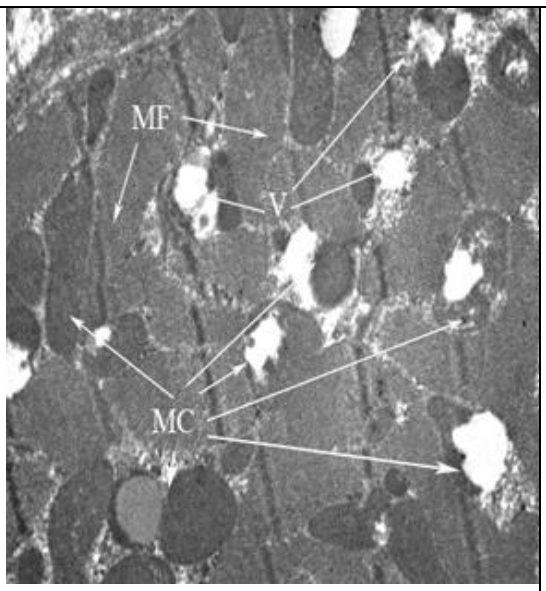
[1]Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев, Украина; [2]Мелитопольский государственный педагогический университет им. Богдана Хмельницкого, Мелитополь, Украина

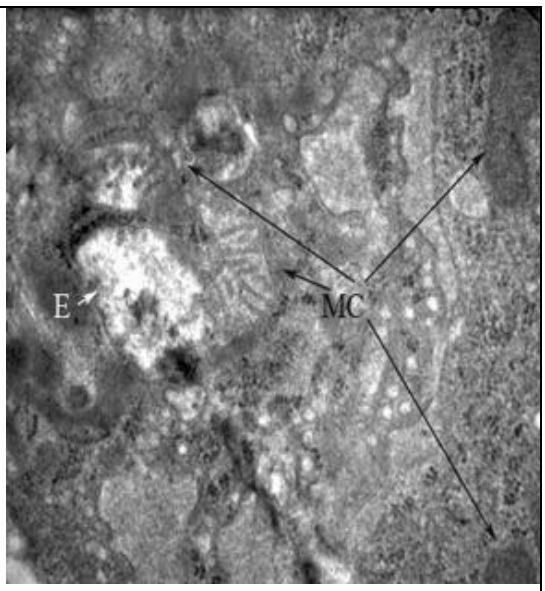
В настоящее время проблема изучения механизмов воздействия экзогенных и эндогенных источников азотсодержащих соединений на живые организмы является крайне актуальной вследствие интенсивного применения в хозяйственной деятельности человека нитросоединений, которые в процессе биотрансформации становятся источниками активных форм азота [1,2]. Как показывают клинические данные и результаты экспериментальных исследований, организмы, испытывающие повышенную нитритную нагрузку, имеют целый ряд метаболических нарушений [3]. Основным проявлением токсического действия указанных соединений является метгемоглобинемия, уровень которой коррелирует со степенью интоксикации. На этом фоне формируются сложные механизмы развития так называемой гемической гипоксии – гипоксического состояния при метгемоглобинемии, которая сопровождается развитием каскада

патологических процессов. Однако, несмотря на интенсивные исследования, благодаря мультифакторности воздействия на организм метгемоглобинообразователей, до настоящего времени нет четкой концепции развития гипоксического состояния при нитритной метгемоглобинемии, в частности, в отношении формирования тканевой гипоксии, что усложняет поиск эффективных путей коррекции гипоксических повреждений.

Целью настоящего исследования явилось изучение изменений кислотно-основного состояния крови, а также морфофункционального состояния тканей легких и сердца при метгемоглобинемии, вызванной нитритом натрия.

При экспериментальной метгемоглобинемии, вызванной у 80 половозрелых крыс-самцов линии Вистар 5-ти дневным введением нитрита натрия в дозе 5 мг/100 г массы тела, изучено формирование гипоксического состояния. Показано, что уменьшение концентрации гемоглобина, способного к оксигенации, сопровождалось падением кислородной емкости крови, напряжения кислорода и pH в артериальной и смешанной венозной крови, изменениями содержания и соотношения буферных оснований и бикарбонатов. Подобные изменения можно рассматривать как развитие декомпенсированного метаболического ацидоза, однако, без формирования вторичной тканевой гипоксии благодаря поддержанию соотношения доставки кислорода кровью и скорости его потребления на уровне >3. Выявленные изменения на тканевом уровне, также как и в системах дыхания и кровообращения [2], носят органоспецифичный характер. В ткани легких формируется выраженная митохондриальная дисфункция с развитием первичной тканевой гипоксии (Рис 1б), а в миокарде наблюдаются признаки митохондриальной дисфункции (о чем свидетельствуют морфо- и стереометрические характеристики митохондрий в ткани легких и миокарде животных (Табл. 1)) при отсутствии существенных гистотоксических повреждений ткани сердца (Рис. 1а).





а – Ультраструктура миокарда через 5 дней введения $NaNO_2$: образование вакуолей (V) между неизмененными миофибриллами (MF); частично либо полностью вакуолизованные и деструктурированные, а также нативные митохондрии (MC). х 9600

б – Ультраструктура ткани легких через 5 дней введения $NaNO_2$: развитие отека (E); частично либо полностью вакуолизованные и деструктурированные митохондрии (MC); незначительное количество нативных органелл. х 9600

Рис. 1 – Влияние метгемоглобинообразователя нитрита натрия на ультраструктуру миокарда (а) и ткани легкого (б).

Таблица 1 - Влияние метгемоглобинообразователя на морфо- и стереометрические параметры митохондрий в миокарде и ткани легких (M±m)

Условия эксперимента	Общее количество митохондрий, ед./мкм²		Количество структурно измененных митохондрий, %		Средний диаметр митохондрий, мкм		Сумма поверхностей митохондрий в единице объема ткани, мкм²	
	Миокард							
	СС	ИМФ	СС	ИМФ	СС	ИМФ	СС	ИМФ
Контроль (а=150)	12,5 ±1,6	8,4 ±1,1	4,1 ±0,6	2,7 ±0,4	0,50 ±0,04	0,76 ±0,07	8,3 ±0,8	6,8 ±0,9
Метгемоглобинемия (а=140)	23,8 ±3,7**	17,1 ±2,2**	12,8 ±5,7**	11,6 ±4,3**	0,67 ±0,08*	1,03 ±0,10*	13,7 ±1,5*	8,9 ±0,7*
Ткань легкого								
Контроль (а=150)	9,6±0,2		4,6±0,5		0,39±0,01		5,7±0,5	
Метгемоглобинемия (а=140)	10,1±0,7		9,7±0,7**		0,63±0,03**		6,8±0,7	

* - различия достоверны относительно контрольных величин ($p < 0,05$); ** - различия достоверны относительно контрольных величин ($p < 0,01$); а - количество случайно выбранных для расчетов участков; СС МС – субсарколемальная

субпопуляция митохондрий; ИМФ МС интрамиофибриллярная субпопуляция митохондрий

Полученные результаты необходимо учитывать при разработке современных путей коррекции гипоксических повреждений, развивающихся при метгемоглобинемии.

Литература:

1. Azhipa J.I. Ecological and biomedical aspects of environmental pollution by nitrates and nitrites / J.I. Azhipa, V.P. Reutov, L.P. Kayushin // Reports of the USSR Academy of Sciences. – 1990. – V. 16, N 3. – P. 131-148.
2. Розова К. В. Механізми змін мікроциркуляції у щурів при гострій метгемоглобінемії / К. В. Розова, Н. Г. Сидоряк // Фізіологічний журнал. – 2014. – Т. 60, № 5. – С. 43-51.
3. Functional Modification of Cytochrome C by Peroxynitrite in an Electron Transfer Reaction / D. Nakagawa, Y. Ohshima, M. Takusagawa [et al.] // Chem. Pharm. Bull. – 2001. – V. 12, N 12. – P. 1547-1554.

СРАВНЕНИЕ ЭЛЕКТРО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АТФ – ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИТОХОНДРИЙ И МИКРОСОМ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Таланов Е.Ю.[1], Мосенцов А.А.[1,2], Берест В.П.[2]
[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия;
[2]Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина, Украина.
evg-talanov@yandex.ru

Несмотря на большое физиологическое и функциональное значение митохондриального -АТФ зависимого калиевого канала его структура до сих пор не ясна. Полученные ранее в нашей лаборатории данные MALDI – анализа и иммунохимических исследований [1, 2] указывают на то, что выделенный ранее из митохондрий белок с м.м 57 кДа., которому приписывались свойства селективного для калия АТФ-зависимого канала [3, 4, 5] относится к семейству кальретикулиновых белков, которые ранее были обнаружены в микросомах [6]. Полученные результаты, послужили основой для проведения сравнения электрофизиологических свойств, выделенного ранее из митохондрий

белка с м. м 57 кДа, с подобным белком, выделенным из микросом, при реконструкции их в бислойную липидную мембрану (БЛМ).

Оба белка были выделены из митохондрий и микросом аналогичным методом [4]. Минимальная проводимость белка выделенного из митохондрий при 100 mM KCl ссоставляла 10 пСм., что соответствовало данным, полученным методом пэч-кламп [7]. Проведенная работа по реконструкции микросомального белка в БЛМ, показала, что он также образует в мембране каналы с минимальной проводимостью 10 пСм. Оба белка, как микросомальный, так и митохондриальный, имеют пачечный характер активности, т. е. одиночные импульсы тока объединяются в серии (пачки) импульсов. Отсутствие различий проводимости одиночных каналов кальретикулин – подобного и митохондриального белков, является косвенным доказательством их структурного сходства.

В настоящей работе мы обнаружили, что оба белка-канала способны формировать каналы - кластеры с многоуровневой проводимостью. Проводимость кластеров, оказалась кратна величине проводимости одиночного канала. При реконструкции в БЛМ микросомального кальретикулин – подобного белка, формируются каналы с многоуровневой проводимостью. Величина проводимости кластеров кратна величине проводимости одиночного канала. Наши данные подтверждают ранее полученные результаты о способности митохондриального белка-канала формировать каналы с многоуровневой проводимостью [8, 9] . Эти данные согласуются с моделью кластерной организации каналов предложенной Гелетюком и Казаченко[10].

В работе проведено сравнение вольтамперных характеристик (ВАХ), обоих белков в диапазоне напряжения от -100 mV до 100 mV. Для кальретикулин – подобного белка показано, что при напряжении от 30 до 90 mV, а так же от -100 до –30 mV каналы находятся в открытом состоянии. Увеличение напряжения выше 50 mV в большинстве случаев приводит к образованию кластеров, тогда как при напряжении 25-35 mV чаще регистрируются одиночные или 2-3-х кратные каналы. Подобную картину мы наблюдаем и в отрицательном диапазоне напряжения. При увеличении напряжения выше 90 mV происходит снижение канальной активности. По сравнению с ВАХ микросомального белка, ВАХ митохондриального белка более линейна, что в свою очередь подтверждает ранее полученные в нашей лаборатории данные.

В наших исследования было так же обнаружено, что митохондриальный белок-канал является высокоселективным каналом по K^+. При создании на БЛМ 2-х кратного градиента концентрации возникает калий селективный потенциал, который уравновешивается подачей напряжения 24 mV, что сопоставимо с теоретическим значением потенциала Нернста для данных условий. При замене в растворе ионов калия на ионы натрия и создании 2-х кратного градиента NaCI (100mM:200mM) возникал натриевый потенциал, который уравновешивался 10 mV, что значительно отличается, при данных условиях, от теоретического значения потенциала Нернста, для одновалентных катионов. Эти результаты свидетельствует о высокой селективности изучаемого белка м. м. 57 кДа по K^+.

В процессе исследования селективности кальретикулин – подобного белка, выделенного из микросом, были получены следующие данные. Создание на БЛМ 2-х кратного градиента концентрации KCI (100mM:200mM), приводит к возникновению калиевого потенциала, который уравновешивается подачей напряжения 18 mV, что очень близко к теоретическому значению потенциала Нернста для данных условий. В случае, когда ионы калия были заменены на ионы натрия и создан 2-х кратный градиент концентрации NaCI (100mM:200mM), на мембране возникал натриевый потенциал, который уравновешивался также как и в экспериментах с калием напряжением - 18mV. Полученные данные свидетельствуют о том, что кальретикулин – подобный белок является селективным только по моновалентным катионам (K^+ и Na^+), что возможно связанно с местом его локализации и его участием в процессах опосредованных не только транспортом калия, но и других ионов. В последнее время появились работы о локализация K^+ - АТФ канала в эндоплазматическом ретикулуме и его участии в Ca^{2+} регуляции [11, 12, 13].

Работа поддержана грантами РФФИ № 16-34-00408 мол_а., грантом Правительства РФ № 14.Z50.31.0028, грантом РНФ № 16-15-00157.

Литература:

1. Скарга Ю.Ю. Система электрогенного транспорта ионов калия в митохондриях и ее участие в термогенезе бурой жировой ткани . // Дисс. канд.биол.наук.1994, с. 101.

2. Качаева Е.В. Митохондриальный АТФ – зависимый калиевый канал и его роль в адаптации организма к гипоксии..// Дисс.Канд.биол.наук.2007, с. 112.

3. Миронова Г.Д., Федотчева Н.И., Макаров П.Р., Проневич Л.А., Миронов Г.П. Белок из митохондрий сердца быка, инициирующий канальную калиевую проводимость бислойных липидных мембран. // Биофизика. 1981, 26(3): 451-457.

4. Миронова Г.Д., Скарга Ю.Ю., Григорьев С.М., Яров-Яровой В.М., Александров А.В., Коломыткин О.В. АТФ-зависимый калиевый канал митохондрий печени крысы. I. Выделение, очистка и реконструкция канала в БЛМ. // Биол. Мембр. 1996, т.13, № 4, с.396-404.

5. Mironova G.D., Skarga Yu., Grigoriev S., Negoda A., Kolomytkin O., Marinov B. Reconstitution of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel into bilayer lipid membrane. 1999, 31(2): 157-161.

6. Fliegel L.,. Burns K., MacLennan D., Reithmeier R., Michalak M. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.// J. Biol.Chem. 1989 264: 21522.

7. Inoue I., Nagase H., Kishi K., and Higuti T. ATP-sensitive K+ channel in the mitochondrial inner membrane. // Nature. 1991, 352: 244-247.

8. Миронова Г.Д., Григорьев С.М., СкаргаЮ.Ю., Негода А.Е., Коломыткин О.В. АТФ-зависимый калиевый канал митохондрий печени крысы. II. Ингибиторый анализ, кластеризация канала. // Биол. Мембр. 1996, т. 13, № 5,с. 537-544.

9. Mironova G, Negoda A, Marinov B, Paucek P, Costa A, Grigoriev S, et al. Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K+ channel (mitoKATP) and its inward rectifier subunit (mitoKIR). // J. Biol. Chem. 2004, 279(31): 32562-68.

10. Гелетюк В.И., Казаченко В.Н. Кластерная организация ионных каналов. М.: Наука. 1990, 223 с.

11. Zhou M., Tanaka O., Sekiguchi M., He H.J., Yasuoka Y., Itoh H., Kawahara K, Abe H. ATP-sensitive K^+-channel subunitson the mitochondria and endoplasmic reticulum of rat cardiomyocytes. // J Histochem Cytochem. 2005 53:1491–1500.

12. Ng K.E., SchwarzerS., Duchen M. R., Tinker A.The intracellular localization and function of the ATP-sensitive K+ channel subunit Kir6.1. //J Membr Biol. 2010, 234(2):137-

13. Salari S., Ghasemi M., Fahanik-Babaei J., Saghiri R., Sauve R., Eliassi A. Evidence for a KATP Channel in Rough Endoplasmic Reticulum (rerKATPChannel) of Rat Hepatocytes. // PLoS One. 2015, 10(5): e0125798.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Овсянникова Т.Н., Коваленко А.А., Забелина И.А., Маслов В.А., Левченко А.Н.
Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, Харьков, Украина
ta_ov10@mail.ru

Abstract – The paper considers effects of low intensity irradiation on the liver mitochondria of the rats. It is observed that respiration control of rat liver mitochondria was increased under the low intensity laser irradiation (λ 632.8 nm, 0,015 W) influence. The field of application of such effects can be, first of all, biotechnology, particularly, cultivation of cells and tissues.

Введение. Энергия внешних ресурсов: света (при фотосинтезе) и субстратов окисления (при дыхании) – освобождается в процессе переноса электронов по редокс-цепям, локализованных в сопрягающих мембранах. Первичные фотоакцепторы в клетках млекопитающих находятся, возможно, и в митохондриях. Один из вероятных механизмов воздействия света на клетку заключается в ускорении переноса электронов в дыхательной цепи благодаря изменению редокс-свойств ее компонентов, вызванных фотовозбуждением электронных состояний [1]. Также высказано предположение, что лазерное облучение может вызывать три различные фотохимические реакции: 1) фотоокисление липидов в клеточных мембранах; 2) фотореактивацию фермента супероксиддисмутазы(СОД), 3) фотолиз комплексов окиси азота (NO) [2]. В работе выясняется возможность эффективного воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения гелий-неонового лазера (длина волны – 632,8 нм) в режиме «он-лайн» на дыхательные характеристики митохондрий печени крыс.

Методы исследования. Исследование функциональных характеристик митохондрий проводилось по общепринятой методике полярографического определения скорости поглощения кислорода митохондриями [3].

В течение первых 5 минут фиксировали скорость потребления кислорода нефосфорилирующими митохондриями, следующие 5 минут (после внесения АДФ) – фосфорилирующими. Аналогичные процедуры мы повторяли на фоне экспозиции лазерного излучения: непосредственно в ячейку полярографа через отверстие для добавок

экспонировали пучок лазерного света (мощность 0,015 Вт, диаметр пучка 1,5 мм). Статистически результаты обрабатывали методом Стьюдента-Фишера.

Результаты. В таблице 1 приведены значения скоростей дыхания и коэффициентов дыхательного контроля митохондрий при добавлении в качестве субстрата сукцината.

Как показали результаты исследований, при воздействии на суспензию митохондрий низкоинтенсивного лазерного излучения увеличивается скорость дыхания в состояниях 3 и 4 по Чансу. Это согласуется с данными ряда авторов [4,5], предполагающих, что действие лазерного излучения в разных диапазонах влияет на работу определенных составляющих дыхательной цепи. Полагают, что первичным хромофором в митохондриях являются нитрозильные комплексы гемового железа цитохрома ***c*** и оксидазы цитохрома ***c***. Фотолиз этих комплексов приводит к восстановлению полной активности ферментов и как следствие - к усилению дыхания.

Таблица 1 – Влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на скорость дыхания митохондрий печени крыс, субстрат – сукцинат, X±Sx, n=7.

Группа	**Скорость дыхания (мкмоль кислорода на 1 мг белка за 1 мин)**		**Коэффициент дыхательного контроля**
	V_3	**V_4**	
Контроль	68,6±4,9	21,8±0,7	2,90±0,23
Лазер	82,5±5,0*	27,0±1,5*	3,05±0,30

* - достоверно относительно контроля, $p < 0,05$

Кроме того, первичными акцепторами при фотоактивации могут быть нитрозильные комплексы негемового железа Fe-S- центров и S-нитрозотиолы *NADH-Q*-оксидоредуктазы, так как:1) эти нитрозосоединения образуются в присутствии NO; 2) их образование вызывает снижение активности дыхания; 3) они подвержены фотолизу при облучении видимым светом, который реактивирует транспорт электронов митохондриальной цепью.

Таким образом, с помощью низкоинтенсивного лазерного излучения с определенными длинами волн, вероятно, можно регулировать активность дыхательной цепи в тех или иных звеньях. Областью применения подобных эффектов может быть, прежде всего, биотехнология, в частности, культивирование клеток и тканей. При использовании низкоинтенсивного лазерного излучения различных диапазонов, вероятно, можно наблюдать ускорение роста клеток в

культуре за счет интенсификации работы дыхательных цепей митохондрий и, возможно, микросом.

Выводы. При воздействии на суспензию митохондрий низкоинтенсивного лазерного излучения (мощность 0,015 Вт) увеличивается скорость дыхания нефосфорилирующих и фосфорилирующих митохондрий. С помощью низкоинтенсивного лазерного излучения с определенными длинами волн возможно регулировать активность дыхательной цепи в разных звеньях.

Литература:

1. Karu T.I. Photobiology of low-power laser effects//Health Phys.-1989.-Vol.56.-P. 691-704.

2. Чичук Т.В., Страшкевич И.А., Клебанов Г.И. Свободнорадикальные механизмы стимулирующего действия низкоинтенсивного лазерного излучения // Вестник российской академии мед. наук - 1999 - № 2 - с.27-32.

3. Северин С.Е.,Соловьева Г.А. Практикум по биохимии. /М.:Изд-во МГУ, 1989.-509 с.

4. Владимиров Ю.А. Нитрозильные комплексы цитохромов митохондриальной цепи- первичные хромофоры в механизме фотоактивации дыхания // Биологические мембраны, 2002.-378-390 с.

5. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration //Biochem. Biophys.Acta.-1999.-Vol.1411.-P.351-369.

ВЛИЯНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ (ВИМЕНТИНА И ДЕСМИНА) НА ТРАНСПОРТ ИОНОВ КАЛИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Хмиль Н.В.[1], Горбачева О.С.[1], Белослудцева Н.В.[1], Валуев Т., Минина Н.В.[2], Минин А.А.[2], Миронова Г.Д.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино; [2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Белка Российской академии наук, Пущино, Россия

nat-niig@yandex.ru

Введение. В последнее время большое внимание уделяется изучению структуры и функции цитоскелета в эукариотических клетках.

Одним из его компонентов являются промежуточные филаменты, к которым относятся: виментин и десмин.

Функции ПФ в настоящее время до конца не выясненf. Считается, что они обеспечивают механическую прочность клеток [1], участвуют в организации и функционировании белков, вовлеченных в клеточную адгезию, миграцию и передачу внутриклеточных сигналов, а также в передвижении органелл по клетке и транспорте липидов [2].

Результаты недавних исследований показывают, что ПФ могут играть важную роль в функционировании и нормальном распределении митохондрий [3, 4]. Нарушения внутриклеточного распределения митохондрий при тяжелой острой гипоксии различного происхождения приводят к развитию митохондриальной дисфункции. Известно, что при защите тканей от гипоксии важная роль отводится АТФ-зависимому транспорту калия в митохондриях, осуществляемому АТР-чувствительным калиевым каналом (митоК$_{АТР}$), модуляторы которого обладают выраженным кардиопротекторным действием [5–7].

Таким образом, целью настоящей работы было изучение влияния белков ПФ (виментина и десмина) на транспорт калия в митохондриях, который участвует в регуляции их объёма.

Материалы и методы. Поскольку белки ПФ образуют в растворах протяженные полимерные структуры, сильно увеличивающие вязкость растворов, мы использовали для удобства мутантные формы виментина (Y117L) и десмина (Y129L), у которых полимеризация останавливается на стадии протофиламентов – частиц, не влияющих на вязкость, но сохраняющих способность связываться с митохондриями и влиять на их свойства в клетках [8]. В качестве отрицательного контроля использовали двойной мутант виментина (Y117L, P56R), не способный связываться с митохондриями [9].

Вход ионов калия определялся по скорости набухания митохондрий в гипотонической среде, содержащей 50 мМ KCl, 5 мМ NaH_2PO_4, 0.1 мМ ЭГТА, 5 μМ цитохром *c*, 10 мМ HEPES-NaOH (pH 7.4). Кинетику набухания регистрировали на спектрофотометре UV-2450(PC) (Shimadzu, Япония) по изменению оптической плотности (OD) суспензии митохондрий при длине волны 520 нм при постоянном перемешивании и термостатировании при 26°С. Набухание митохондрий инициировали добавлением 5 мМ сукцината в присутствии 2 мкМ ротенона или 5мМ сукцинатом и 2,5мМ глутаматом без ротенона. Концентрация митохондриального белка в ячейке

составляла 0,2-0,3 мг/мл. Виментин или десмин добавляли в концентрации 30 мкг/мл.

Функционирование митоК$_{АТФ}$ канала также оценивали по скорости АТФ-зависимого выхода калия из митохондрий, инициированного разобщителем окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом (ДНФ). Кинетику выхода калия регистрировали с помощью разработанного в лаборатории оригинального электрометрического усилителя, соединенного с компьютером через контроллер L-153. Среда инкубации митохондрий содержала: 180 мМ сахарозы, 70 мМ D-маннитола, 5 мМ Na_2HPO_4, 10 мМ Трис-HCl (pH 7.4). Выход K^+ из митохондрий индуцировали добавлением в среду инкубации 50 мкМ 2,4-динитрофенола. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0,5-1 мг/мл. Измерения производились при постоянном перемешивании и термостатировании при 26°С.

Результаты. Изучение влияния виментина на энергозависимый вход калия в митохондриях показало, что добавка виментина, содержащего сайт связывания митохондрий (VimY117L), приводила к снижению (в среднем на 30-35%) скорости набухания митохондрий и, следовательно, ингибировала вход в них ионов калия. Добавка измененного виментина (Y117L, P56R), в котором замена пролина-56 на аргинин нарушает взаимодействие с митохондриями, не оказывала влияния на скорость набухания митохондрий. Подобно виментину действовал и другой изучаемый нами ПФ - десмин (Y129L), при добавлении которого также замедлялось набухание митохондрий (в среднем на 20-25%).

Функционирование митоК$_{АТФ}$ канала также оценивали по скорости АТФ-зависимого выхода калия из митохондрий. Показано, что преинкубация митохондрий в течении 1 минуты с белками ПФ (виментин или десмин) ингибирует ДНФ-индуцированый выход ионов калия. В то же время, добавка измененного виментина (Y117L, P56R), не оказывала влияния на скорость выхода калия из митохондрий. Добавление белков ПФ снижало скорость выхода K^+ из митохондрий в среднем на 20-25% (для десмина) и на 50-65% (для виментина). Полученный эффект ПФ на митохондрии имел концентрационную зависимость.

Выводы. Таким образом, при использовании двух различных методов определения АТФ-зависимого транспорта калия, показано, что виментин и десмин ингибируют этот транспорт, осуществляемый посредством работы митоК$_{АТФ}$. Известно, что одной из функций

митоК$_{АТФ}$ является регуляция объёма митохондрий и ингибирование транспорта калия, приводит к сокращению митохондрий [10].

Полученные в работе данные согласуются с результатами исследований проведенных на культуре клеток, где было показано, что в клетках лишенных десмина (knockout) или со сниженным содержанием виментина (knockdown) наблюдается выраженное набухание митохондрий [4, 11]. Можно предположить, что оба ПФ, связываясь с митохондриями, ингибируют работу митоК$_{АТФ}$ и держат митохондрии в сокращённом состоянии, т.е. регулируют объем митохондрий.

В работе показано, что измененный виментин, в котором замена всего одной аминокислоты (пролин-56 на аргинин), не позволяет ему как связываться с митохондриями [9], так и оказывать влияние на транспорт калия в митохондриях. Эти данные указывают на специфичность описанного действия ПФ.

Полученные результаты и литературные данные позволяют предположить, что эффекты ПФ на митохондрии, наблюдаемые в живых клетках [12] могут быть связаны с регуляцией калиевого обмена в митохондриях. Изменение этого обмена может влиять на нарушение морфологии (набухание) и внутренней локализации митохондрий, что было обнаружено в сердечных и скелетных мышцах мышей, лишенных десмина или со сниженным содержанием виментина [4,11]..

Работа поддержана РФФИ (грант № 16-04- 00692А) и Правительством РФ (договор № 14.Z50.31.0028). грантом РНФ № 16-15-00157

Литература:

1. Fuchs E., Weber K. Intermediate filaments: struc ture, dynamics, function, and disease. Annu. Rev. Bio chem. 1994, Vol. 63, P. 345–382.

2. Toivola D.M., Tao G.Z., Habtezion A., Liao J., Omary M.B. Cellular integrity plus: organelle related and protein targeting functions of intermediate filaments. Trends Cell Biol. 2005, Vol. 15, 608–617.

3. Wagner O.I., Lifshitz J., Janmey P.A., Linden M., McIntosh T.K., Leterrier J.F. Mechanisms of mitochondria neurofilament interactions. J. Neurosci. 2003, Vol. 23, P. 9046–9058.

4. Milner D.J., Mavroidis M., Weisleder N. and Capetanaki Y. Desmin Cytoskeleton Linked to Muscle Mitochondrial Distribution and Respiratory Function. J. CellBiol. 2000, Vol. 150, P. 1283–1298.

5. Розова Е.В., Маньковская И.Н., Миронова Г.Д. Структурно-динамические изменения в митохондриях миокарда крыс при острой гипоксической гипоксии: роль митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала. Биохимия. 2015. Т. 80(8). С. 1186-1194.

6. Krylova I.P., Kachaeva E.V., Rodionova O.M., Negoda A.E., Evdokimova N.R., Balina M.I., Sapronov N.S., and Mironova G.D. The cardioprotective effect of uridine and uridine5'monophosphate: The role of the mitochondrial ATPdependent potassium channel. Exp. Geront., 2006, Vol. 41, P. 697–703.

7. Mironova G.D., Shigaeva M.I., Gritsenko E.N., Murzaeva S.V., Gorbacheva O.S., Germanova E.L., and Lukyanova L.D. Functioning of the mitochondrial ATPdependent potassium channel in rats varying in their resistance to hypoxia. Involvement of the channel in the process of animal's adaptation to hypoxia, J. Bioenerg. Biomembr., 2010, Vol. 42, P. 473–481.

8. Meier, M., Padilla, G.P., Herrmann, H., Wedig, T., Hergt, M., Patel, T.R., Stetefeld, J., Aebi, U., Burkhard, P. Vimentin coil 1A-A molecular switch involved in the initianion of filament elongation, J. Mol. Biol., 2009, Vol. 390, P. 245-261.

9. Nekrasova, O.E., Mendez, M.G., Chernoivanenko, I.S., Tyurin-Kuzmin, P.A., Kuczmarski, E.R. Gelfand, V.I., Goldman, R.D., Minin, A.A. Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. Mol Biol Cell. 2011, Vol. 22(13), P. 2282-2289.

10. Garlid, K.D., Paucek, P. Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle. BBA, 2003, Vol. 1606, P. 23-41

11. Tang, H.L., Lung H.L., Wu K.C., Le A.H., Tang, H.M. and Fung, M.C.. Vimentin supports mitochondrial morphology and organization. Biochem. J., 2008, Vol. 410, P. 41–146.

12. Chernoivanenko I.S., Matveeva E.A. , Gelfand V.I., Goldman R.D., and Minin A.A. Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. FASEB J, 2015, Vol. 29(3), P. 820-827.

LIPOFUSCIN FORMATION IN RAT LIVER HOMOGENATES AND ISOLATED MITOCHONDRIA

Chaplygina A.V., Vekshin N.L., Braslavsky A.V.
Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia
shadowhao@yandex.ru

A cellular level ageing is a set of disorders of cellular and intercellular mechanisms of self-regulation, the accumulation of metabolic damage in cells and changes in the neuronhumoral regulation.

In a mammal, this could be seen very clearly in the extraordinary accumulation of special aging pigment – lipofuscin. It happens over the years in the specialized cells - liver, kidney, brain and heart. In living cells, the main source of lipofuscin granules is mitochondria. Damaged mitochondria are destroyed during ontogenesis. They either split by proteasomes or lysosomes

during mitophagy (selective autophagy), or may be converted directly into lipofuscin. The number of lipofuscin in cells increases during aging, as well as in pathologies organs and atrophy. The accumulation of lipofuscin in the tissues gives them a brown color (especially dramatically darken the heart and liver).

Previous modeling work, demonstrating the possibility of artificial production of lipofuscin in the mitochondrial suspension under the influence of prolonged heating (termolipofuscin) was carried out. The present job concerned with unexplored contribution of mitochondria in the process of formation of lipofuscin granules within the whole body.

The rat liver was used as a model object. Liver mitochondrial fraction was isolated by a standard method with some modifications. Organ was homogenized to break down the tissue and large particles. All samples were aligned to the protein content, the concentration of which was determined by UV-express method.

To activate the process of lipofuscin formation in mitochondria and homogenates of organs, a long-term heating was used: a diluted suspension was incubated at 50° C for 3 hours. Due to the fact that prolonged heating induces the mitochondria aggregation, leading to light scattering, the quantitative figures on the content of lipofuscin were obtained in the presence of detergent sodium dodecyl sulfate (SDS), which destroys only non-covalent aggregates. Determination of lipofuscin and protein (to evaluate the effect of protein denaturation during induced formation of lipofuscin) in homogenates of organs was carried out by the fluorescence method. One important lipofuscin property is fluorescence with characteristic band in the region of 460 nm with excitation in the near UV.

In our experiments, the intense appearance of lipofuscin fluorescence after extended heating of the mitochondrial suspension were observed. Analysis of lipofuscin fluorescence spectrum showed an increasing of fluorescence intensity at 45%, relative to the control (no incubating) samples. Wherein, the intensity of lipofuscin fluorescence of liver homogenate increased by 43% relative to the control samples. Approximately 80% of the total liver lipofuscin belongs to mitochondrial lipofuscin.

To clarify the nature of the lipofuscin's origin, the tryptophan and tyrosine protein fluorescence of homogenates has been studied at an excitation wavelength of 275 nm. The intensity of the protein fluorescence of the liver homogenate after heat incubation was decreased by 20%. Wherein the intensity of the protein fluorescence suspension of isolated mitochondria was reduced by 32% (relative to the control; all fluorescence measurements

made in the presence of SDS). Thus, we can say that about of a quarter of all proteins of both suspensions (homogenate and mitochondria) participates in formation of lipofuscin, which confirms the thesis that lipofuscin in cells is the product of aggregation and cross-linked denatured mitochondrial proteins.

THE CONTRIBUTION OF THE VOLTAGE-DEPENDENT ANION CHANNELS OF THE OUTER MEMBRANE OF MITOCHONDRIA IN THE DEVELOPMENT OF ALCOHOLIC HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Teplova V.V., Malkov A.E., Holmuhamedov E.L.
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia
tepver@rambler.ru

Hepatic encephalopathy – a multifactorial syndrome, in which the function of the central nervous system is broken as a result of the increased concentration of ammonia in the blood caused by the liver damage. In spite of the existing data and hypotheses about the mechanisms of development of hepatic encephalopathy they still remain unclear, and treatment of this disease do not have enough success. The reasons for mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcoholic hepatic encephalopathy are currently not well identified. We have previously shown that the oxidation of ethanol in hepatocytes inhibited the rate of uncoupled respiration and oxidative phosphorylation, the rate of urea synthesis, and the capacity of mitochondria to bind ammonia. In this case, the incubation of cells with ethanol decreased the accumulation of fluorescing dextran molecules in regions occupied by mitochondria, indicating the closing of the voltage-dependent anion channels (VDAC, porin) in the outer membrane of the mitochondria. In the present study the contribution of VDAC of the outer liver mitochondrial membrane in the induction and development of alcoholic hepatic encephalopathy was investigated. It was found that in chronic alcoholic rats, an increase in oxidative stress, a decrease in the level of reduced glutathione, and an enhancement in the intensity of peroxidation processes were observed. The ethanol oxidation products and compounds formed in lipid peroxidation processes induced the closing of porin channels.

Liver mitochondria isolated from chronic alcoholic rats showed a low rate of ATP synthesis and enhanced production of superoxide radicals due to the closing of porin channels, as indicated by our data on the effect of known porin channel inhibitors. The electroencephalographic studies were shown that the development of alcoholic intoxication is accompanied by morphofunctional changes in the hippocampus, which lead to a decrease in the excitability of this structure and the failure to adequately respond to external stimuli. The intensity of hippocampal oscillations substantially decreases, as in the cases of encephalopathy in humans, indicating a disturbance of the cognitive function of the hippocampus. The electric and sensory stimulation of the brain of chronic alcoholic rats induced the depression of the hippocampal activity. On hippocampal slices of rat subjected to alcohol intoxication, evidence for the changes in both background and stimulation-induced activity of pyramidal neurons was obtained. In addition, changes in the excitability threshold after the application of glutamate and picrotoxin were observed. In the hippocampus of rats with chronic alcohol intoxication, a decrease in the frequency of volley discharges of neurons and an increase in the latent period of responses to electrical stimulation were observed. It was found that brain neurons of alcoholic rats are more strongly activated by the action of glutamate. In all alcohol intoxication models, glutamate increased the latent period that was decreased significantly after GABA receptor blockade. It was conclude that the ethanol-induced closure of porin channels of the outer mitochondrial membrane and the limitation of the free exchange of substrates of oxidative phosphorylation and the urea cycle leads to oxidative stress, reduce the effectiveness of the ammonia binding, hyperammonemia and disturbance of functioning of nerve cells, characteristic for alcoholic hepatic encephalopathy. The data obtained demonstrate a crucially novel mechanism of the development of alcohol encephalopathy and can be used in the development of novel approaches to the treatment of alcohol encephalopathy, designed to selective pharmacological regulation of VDAC permeability of the outer mitochondrial membrane.

This work was supported by grant competition of the Government of the Russian Federation p220 (IV) agreement №14.Z50.31.0028.

ROLE OF GLUTAMATE IN INREASED OXIDATIVE STRESS IN CHRONIC ALCOHOLISM

Teplova V.V.[1], Kruglov A.G.[1], Kovalev L.I.[2], Fedotcheva N.I.[1]
[1]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino; [2]A.N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow, Russia
tepver@rambler.ru

The liver is the main organ responsible for the metabolism of alcohol, and the mitochondria play a central role in this process and are the main target of alcohol intoxication. It is known that chronic alcohol intoxication is associated with increased oxidative stress, however, the mechanisms by which ethanol triggers an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and the role of mitochondria in the development of oxidative stress has been insufficiently studied. The shift of the NADH/NAD balance to a more reduced state, presumably, may facilitate ROS production. However, the relation of mitochondrial NADH and ROS production through possible alcohol-induced changes in the activity of NAD/NADH-dependent dehydrogenases has not been established. Based on the data, that ethanol consumption causes a remarkable increase in the levels of glutamate, aspartate, and free ammonia, a glutamate oxidation product, in the liver can be assumed that glutamate contributes to oxidative stress induced by alcohol. To confirm this hypothesis in the present study the role of glutamate in enhancing ROS production in mitochondria and the development of systemic oxidative stress in chronic alcoholism was investigated.

It has been shown that chronic alcohol intoxication accompanied by the development of oxidative stress, wherein the rate of MDA formation increased by 15%, and the concentration of free SH-groups decreased by 35% in alcoholic liver tissues. The biochemical and proteomic data obtained in the present work allow concluding that one of the main causes of an increase in ROS generation is enhanced oxidation of glutamate in response to long-term alcohol exposure. In the course of glutamate oxidation, liver mitochondria from alcoholic rats generated more superoxide anion and hydrogen peroxide than in the presence of other substrates and more than control organelles. In these mitochondria, the rates of hydrogen peroxide production and NAD reduction in the presence of glutamate were almost twice higher than in the control. The proteomic study revealed a higher content of glutamate dehydrogenase in liver mitochondria of rats subjected to chronic alcohol exposure. Simultaneously, the content of mitochondrial catalase decreased

compared with the norm. The results obtained in the present work indicate that chronic ethanol consumption causes an increase in the activity of glutamate dehydrogenase, which is related to the increase in the amount of this enzyme in liver mitochondria. Together with the lower content of mitochondrial catalase, these factors promote disorders in the matrix systems of NADH reduction and oxidation, excessive ROS production, and systemic oxidative stress, which are the distinguishing features of alcohol intoxication.

This study was supported by grant from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Agreement № 14.Z50.31.0028

TWO PARALLEL RESPIRATORY CHAINS IN RAT LIVER MITOCHONDRIA

Lvov A.M., Vekshin N.L.
Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia
delinoro@gmail.com

Currently it is a common point of view that the electron transport chain of mitochondria is long and consistent (electron transfers from NADH to FMN, then to iron-sulfur clusters, then to ubiquinone, then to cytochrome B, then to cytochrome C and finally to cytochrome oxidase). Such chain was based on standard red-ox potentials, and also on the action of the chain inhibitors and un-couplers. Such long chain is quite vulnerable to inhibitors and other damaged factors.

Mitochondria were isolated from rat liver using the standard method with some modifications. As inhibitors of the mitochondrial respiratory chain well-known rotenone, antimycin A, and sodium azide ware taken in our study. To compare the respiration of suspensions of hepatic mitochondria, the polarographic method has been used. We used NADH or succinate sodium in hypotonic (water) or in isotonic solution at the presence or absence of adding rotenone, antimycin or sodium azide.

Concentrations of inhibitors were selected to overwhelm the succinate dependent oxygen up-take in isotonic media (NADH in isotonic solution hardly penetrates through the mitochondrial membrane and consequently does not cause consumption of oxygen, so such experiments were not conducted), and to inhibit the oxygen consumption with NADH or succinate

in the hypotonic solution. In our work, we confirmed the well-known fact that rotenone does not inhibit the succinate dependent mitochondrial oxygen consumption. Since rotenone is a compete analog of ubiquinone, the lack of inhibition leads to suggestion that electron transfer from the Complex II of the respiratory chain of mitochondria (Succinate dehydrogenase) further along the chain occurs without ubiquinone.

The rotenone's inhibition of the oxygen consumption in mitochondrial suspension at adding NADH in hypotonic medium occurred completely.

Inhibition of oxygen consumption by sodium azide or antimycin (separately) with NADH or succinate was incomplete even at high magnification in the inhibitor concentration. However, simultaneous addition of small concentrations of the both inhibitors leads to complete inhibition of oxygen consumption. This suggests that the electron transport chain of mitochondria is branched, rather than linear, and consists of at least of two parallel chains. This makes it less vulnerable.

RESPIRATORY SUBSTRATES MAINTAIN THE MEMBRANE POTENTIAL IN ISOLATED MITOCHONDRIA UNDER CHEMICAL HYPOXIA

Kruglov Alexey G.[1], Milyaev Evgeny V.[1,2], Kupriyanova Ekaterina S.[1], Nikiforova Anna B.[1]

[1]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino; [2]Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Russia

krugalex@rambler.ru

The maintenance of the mitochondrial transmembrane potential (ΔΨm) under ischemia/hypoxia is of critical importance for the postischemic survival and recovery of cells. It is widely accepted that anoxia/hypoxia inhibits the respiratory chain at the level of cytochrome *c* oxidase, which immediately decreases ΔΨm far below the values sufficient for ATP synthesis. The reversibility of ATP synthase reaction allows mitochondria to restore ΔΨm at the expense of cytosolic ATP. However, the conversion of mitochondria from the main cellular ATP producers to ATP consumers aggravates the intracellular ATP/ADP+AMP imbalance. This, in turn, rapidly disturbs the ionic homeostasis in the cytosol due to a decrease in the efficiency of ATP-

dependent K+, Na+, and Ca^{2+} pumps and exchangers. The elevation of cytosolic Ca^{2+} is considered to be the main reason for mitochondrial damage and dysfunction upon ischemia/reperfusion.

A growing body of evidence shows that intrinsic mitochondrial mechanisms may prevent the collapse of the mitochondrial transmembrane potential (ΔΨm) and hydrolysis of cytosolic ATP during hypoxia. It was reported that substrates of the Krebs cycle, mainly α-ketoglutarate and fumarate, can support ΔΨm under chemical or physical hypoxia/anoxia [1–6]. It was found that ATP is produced in the mitochondrial matrix during the oxidation of α-ketoglutarate to succinate by α-ketoglutarate dehydrogenase and succinyl-CoA synthetase and can be used for the creation of ΔΨm when ATPase is reversed [3, 4]. Another mechanism of ΔΨm generation in the presence of the Krebs cycle substrate fumarate implies the reversion of the succinate dehydrogenase reaction (fumarate reduction), which leads to the oxidation of coenzyme Q and subsequent activation of Complex I pump [2, 5].

Using a model of chemical hypoxia, we evaluated the efficiency of four mechanisms of ΔΨm maintenance: through a residual electron flow, substrate-level phosphorylation and ATP hydrolysis, the fumarate reductase reaction linked to complex I activation, and restriction of H+ leakage into the matrix (coupling). We found that the resistance of ΔΨm to hypoxia was strongly substrate-dependent (was maximum in the presence of malate plus pyruvate), slightly sensitive to the F_0F_1-ATPase inhibitor oligomycin in the presence of all substrates tested, and linked to oligomycin-sensitive ATP accumulation. In the presence of α-ketoglutarate and glutamate plus malate, oligomycin weakly precluded ATP exhaustion, indicating a low rate of substrate-level phosphorylation. The dissipation of ΔΨm by complex I–II inhibitors in the presence of fumarate confirmed that ΔΨm (-120 mV) can be maintained through the fumarate reductase reaction. Complex III inhibitors, which displace ubiquinol from its binding sites, increased ΔΨm to -150 mV, indicating that QH_2/Q deficit may suppress ΔΨm generation by complexes II/I. We concluded that the residual electron flow and the coupling are the most efficient mechanisms of ΔΨm maintenance during hypoxia. The mechanism that controls the coupling presumably involves F_0F_1-ATPase and differs from the mechanism controlling the permeability transition.

Acknowledgements. This study was supported by a grant to A.G. Kruglov from the Russian Foundation for Basic Research (# 14-04-01664a) and a grant to J.J. Lemasters from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Agreement #14.Z50.31.0028. We thank Dr. Raimo Mikkola from the Department of Food and Environmental Sciences

(Microbiology), Biocenter 1, Helsinki University (Finland) for a kind gift of acrebol, a novel complex III inhibitor.

References:

1. Chinopoulos C., et al, FASEB J. 24(7) (2010) 2405–2416.
2. Chouchani E.T., et al, Nature. 515(7527) (2014) 431–435.
3. Kiss G., et al, FASEB J. 28(4) (2014) 1682–1697.
4. Weinberg J.M., et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 97(6) (2000) 2826–2831.
5. Sanadi D.R., Fluharty A.L. Biochemistry. 2 (1963) 523–528.
6. Gronow G.H., Cohen J.J. Am J Physiol. 247(4 Pt 2) (1984) 618–631.

THE IMPACT OF VDAC ISOFORMS ON NADH-OXIDOREDUCTASE ACTIVITY AND ROS GENERATION IN MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS

Kupriyanova E.S.[1], Krestinina O.V.[1], Chekanov A.V.[1], Nikiforova A.B.[1], Solovieva M.E.[1], Sheiko T.V.[2], Kudriavtsev A.A.[1], Craigen W.J.[2], Kruglov A.G.[1]

[1]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia; [2]Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA.

Mitochondrial voltage dependent anion channels (VDAC) are the most abundant proteins in the outer mitochondrial membrane, which regulate the ion and metabolite fluxes between cytosol and mitochondria. In mammalian species VDAC is presented by three proteins coded by three genes (VDAC1, VDAC2, VDAC3). Several splice variants are also known for each VDAC protein. Several studies demonstrated the involvement of VDAC in the regulation of the level of reactive oxygen species (ROS) in cells. Authors of other studies claimed that VDAC1 possesses the NADH-oxidoreductase activity. The mechanisms of these effects are unclear, since VDAC1 is neither classical oxidoreductase nor antioxidant enzyme. We studied the impact of VDAC1/3 and VDAC2 isoforms on the redox processes in cells of mouse embryonic fibroblasts (MEF). It was demonstrated that VDAC isoforms knockout caused no decrease in total NADH-ferricyanide reductase activity. In VDAC1/3-null cells (MEF VDAC1/3-) it was almost identical to control (MEF wt), while in VDAC2-null cells (MEF VDAC2-) it was significantly higher. In the same time, the suppression of the known outer membrane

NADH oxidoreductase, Cyb5R3, caused measurable inhibition of ferricyanide reduction. With the use of the original dimethylbiacridene-based fluorescent assay for NAD(P)H-oxidoreductase activity it was shown that VDAC1/3 and VDAC2 knockout lead to the decrease in the activity of some non mitochondrial NADH-oxidoreductases, which, however, can be functionally associated with mitochondria. The intracellular and mitochondrial production of hydrogen peroxide and superoxide anion increased several fold in the range MEFwt < MEFVDAC1/3- < MEF VDAC2-. In the presence of redox-cycling compounds (menadione, lucigenin, nitrofurantoin), which are capable of receiving electrons from NAD(P)H dehydrogenases and transmit them to oxygen, the suppression of different VDAC isoforms also stimulated ROS production. This, at least in part, can be explained by the decrease in the radical scavenging efficiency of cytochrome c/cytochrome c oxidase system, because in isolated mitochondria, VDAC blockers inhibited the nitrofurantoin-dependent electron transport from external NADH-oxidoreductase to endogenous cytochrome c.

Thus VDAC isoforms render complex effect on the NAD(P)H oxidoreductase activity and on the level of ROS (free radicals) in cells and mitochondria. However, we were unable to reveal the own oxidoreductase activity of different VDAC isoforms.

The study was supported by a grant to J.J. Lemasters from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Agreement #14.Z50.31.0028 and a grant to A.G. Kruglov from the Russian Foundation for Basic Research (# 14-04-01664a).

THE EFFECT OF POLYDIHYDROXYPHENYLENETHIOSULFONATE SODIUM ON BIOENERGETIC PROCESSES IN MITOCHONDRIA

Lezhnev E.I., Lavrovskaya V.P., Popova I.I.
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy Science, Pushchino, Russia
iskra-p@rambler.ru

One of the issues concerning the identification of various medications affecting intracellular targets is shared by both clinical medicine and cell biology research. One of them is sodium polydihydroxyphenylthiosulfonate

(commercialized by OLIFEN as Hypoxen), a Russian anti-oxidant and antihypoxic synthetic drug with major electro anceptor properties directly affecting the respiratory mitochondrion circuit [1].

Hypoxen is used in pharmaceutical form in clinical medicine for the treatment of cardiovascular and bronchopulmonary illnesses, neuropathological, shock and post-hypoxic conditions, in sport and rehabilitation medicine.

The actual research covered Hypoxen's effects on subcellular targets in order to expand its therapeutic administration in the treatment of various ailments.

The subject of the research were isolated mitochondrion and cell cultures under normal oxygen conditions.

The first step was to assess Hypoxen's toxic effects on cells. Hypoxen's toxic effect on the proliferation of NIH 3T3 cells in the diapason of therapeutic concentrations (10-50 μg/ml) was not identified. A certain decline in growth was determined at concentrations of 60 μg/ml.

The respiratory rate of the energetic metabolism was determined by the Oxygraph-2 k (Austria).

Results. Hypoxen's effects on the respiratory function of cells was analyzed on NIH 3T3 cells (D.I. Ivanovsky Institute of Virology Russian Academy of Medical Sciences), on BALB/3T3 passaged culture cells and homological virus-transformed 3T3B-SV40 cells, fibroblast like BHK-21/13 cells and lymphoblastoid Raji cells (Institute of Cytology RAS, St. Petersburg).

The analysis of respiratory function was carried out by measuring and computing the partial rate of oxygen consumption by the cells: basic rate of oxygen consumption by cells under normal incubation conditions, rate of oxygen consumption by cells under an uncontrolled ATP synthesis system; rate of oxygen consumption of cells associated with ATP synthesis; maximum possible rate of oxygen consumption in the presence of an FCCP disconnector; respiratory reserve capacity [2].

The measurement was carried out with oligomycin as an ATP synthesis inhibitor (1 μg/ml Sigma medium, USA), and an FCCP (2.5 μm Sigma, USA) as a protonophore (uncoupler) for oxidative phosphorylation.

Measurement of oxygen consumption rate by cells was carried out in an incubation medium containing 10^6 cell/ml an one hour following addition of Hypoxen in a concentration of 30 μg/ml. and without the addition of Hypoxen.

It was demonstrated that in an incubation with Hypoxen, the partial rate of oxygen consumption for all cells for all respiratory parameters is reduced by 15-25% in comparison with an incubation without Hypoxen.

The level of decrease for 3T3B-SV40 cells is somewhat higher, which can be explained by a respiratory oppression by glycolysis. This is confirmed by a 30% decrease of glucose in the incubation medium as opposed to 4.6% in a medium with 3T3B cells, and a 20% increased amount of lactate produced at a lowered oxygen content over a period of 60 min.

The effect of Hypoxen in a concentration of 30 μg/ml on glycolytic and antioxidant enzymes in BHK-21/13 cells. It was demonstrated that Hypoxen lowers the impact of malate and glutamate dehydrogenase. The level of inhibition of enzymes fluctuates in accordance with the concentration of Hypoxen and the amount of cells in the examined sample.

The impact of Hypoxen on mitochondrion's bioenergetic processes related to respiration and generation of hydrogen peroxide was tested. A Hypoxen concentration in the diapason of 0.05 – 10 μg/ml containing 0.125-1 mg of mitochondrial protein extracted from the heart and lungs of Wistar rats. Hypoxen in mitochondria, upon oxidation of substrates glutamate+malate and succinate+rotenone in specific concentrations, stimulated the respiratory rate during the synthesis of the ATF and during disconnected breathing, which denotes the antihypoxic role of Hypoxen in the respiratory mitochondrial chain. In concentrations of 15 and 30 μg/ml, Hypoxen reliably lowered the respiratory rate in condition 3 and in a disconnected mitochondrial state under other invariable parameters of oxidative phosphorylation.

The present research demonstrates the expediency of developing future research on Hypoxen effects at the cellular level while taking into account the possible barrier impact of the cytoplasmic membrane upon introduction of Hypoxen in the cell and its involvement in the glycolysis process.

References:

1 Smirnoff V.S., Kouzmich M.K., *Hypoxen*, St. Petersburg – M, 2001, page 104.

2 Lezhnev E.I., Popova I.I., Lavrovskaya V.P., Evtodienko U.V. Correlation between the consumption of oxygen by minimally transformed BALB/3T3 cells and virus-transformed 3T3B-SV40 cells. //Biochemistry, 2013, volume 78, issue 8, pages 1151-1157.

THE ROLE OF THE MITOCHONDRIAL CYTOCHROME B5 REDUCTASE IN THE CYTOTOXIC EFFECT OF REDOX-CYCLING XENOBIOTICS

Nikiforova A.B., Kupriyanova E.S., Kruglov A.G.
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia
nikiforanna@yandex.ru

It was established that cytochrome b5 reductase isoform 3 (Cyb5R3) in cell is localized predominantly in the endoplasmic reticulum and the outer mitochondrial membrane. However, until now, the role and functions of mitochondria-located enzyme in the cellular metabolism are unclear. In our laboratory, it was previously shown that in the presence xenobiotics mitochondrial cytochrome b5 reductase produces reactive oxygen species (ROS) and radicals of xenobiotics, which, in turn, induce the opening of the permeability transition pore.

In order to elucidate the role of mitochondrial cytochrome b5 reductase in the cytotoxic effect of xenobiotics, we created clones of HEK293T cell line with a diminished expression of the protein. The viability of the parental cells and clones were studied with the use of crystalline violet-based approach in the presence of xenobiotics capable of being reduced by cytochrome b5 reductase (antimicrobial agent nitrofurantoin, vitamin K analogue menadione, and lucigenin). It was found, that viability of cells with the suppressed Cyb5R3 in the presence of nitrofurantoin and menadione was significantly lower than of control cells. Similar, but lesser pronounced effect was observed in the presence of lucigenin.

Thus, in a cell mitochondrial cytochrome b5 reductase plays a protective role in the presence of xenobiotics. The mechanism of this phenomenon is not clear yet. Presumably, ROS and (or) radicals of xenobiotics, which are formed on the reduction of xenobiotics by cytochrome b5 reductase, activate the anti-apoptotic system in cells.

The work was supported by a grant to J.J. Lemasters from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Agreement #14.Z50.31.0028 and a grant to A.B. Nikiforova from the Russian Foundation for Basic Research (#16-34-01158 mol_a).

OVERCOMING THE CONFLUENCE-DEPENDENCE RESISTANCE OF TUMOR CELLS TO DIETHYLDITHIOCARBAMATE: COBALAMIN ENHANCES DDC TOXICITY AND CATALIZES DISULFIRAM FORMATION

Solovieva M.E., Shatalin Yu.V., Fadeev R.S., Kutyshenko V.P., Akatov V.S.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

mso@mail.ru

Alcohol-abuse deterrent Disulfiram (DSF) and its derivatives, for example, diethyldithiocarbamate (DDC), are studied in a new strategy of anticancer therapy last years. The cytotoxic effect of both DSF and DDC is known to be related with their capacity to transport Cu^{+2} into the cells [1, 2]. Recently it was shown that such metals as zinc, cadmium, and gold also enhance the toxicity of thiocarbamates [3– 6].

DDC is a low molecular weight dithiol. We have shown earlier that thiols NAC, GSH, and DTT react with cobalamin (vitamin B12) and catalyze H2O2 generation that induces strong cytotoxic effect [7, 8]. This vitamin is necessary for rapidly proliferating cells that often take place in tumors; therefore some attempts were made to use B12 for carrying cytotoxic compounds into cancer cell [9]. Here we examined whether DDC combined with B12 can induce oxidative stress and cell death. We have shown that B12 significantly enhances the cytotoxic effect of DDC. It was followed by overcoming the resistance to DDC of HEp-2, MCF-7, HT1080, HT29, A431 confluent cultures found in our experiments earlier, and by accelerating the process of cell death realization. Interestingly, the effect of increasing the DDC toxicity by cobalamin was not dependent of serum. Cobalamin induced rapid oxygen reduction in DDC solution, and catalase partly inhibited this reaction, but we could not find both any H2O2 in reaction buffer and ROS generation in cells. However, the level of intracellular GSH significantly decreases during 4 hours of incubation with DDC+B12. No apoptotic features were found in dying and dead cells, and inhibitors of caspases and autophagy were not effective in prevention of cytoplasm vacuolization observed as early as 4 hrs after addition of DDC+B12, and cell death. These findings may indicate paraptosis-like cell death, and it is under research now. Cobalamin catalized massive formation of crystals in concentrated DDC solutions (1 mM DDC and more + 25 mkM B12), and UF- and NMR-spectroscopy revealed

that the product of this reaction is Disulfiram. However, DSF is poorly soluble in water and, as we have found, is not toxic for HEp-2 cells at concentrations up to 30-100 mkM in sparse and confluent cultures, respectively. Thus, the question about the intermediates of DDC+B12 reaction that enhance the cytotoxic effect is obscure and need further investigation.

The work was supported by a grant to J.J. Lemasters from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Agreement #14.Z50.31.0028.

References:

1. Burkitt MJ, Bishop HS, Milne L, Tsang SY, Provan GJ, Nobel CS, et al. Dithiocarbamate toxicity toward thymocytes involves their copper-catalyzed conversion to thiuram disulfides, which oxidize glutathione in a redox cycle without the release of reactive oxygen species. Arch Biochem Biophys 1998;353(1):73–84.

2. Cen D, Brayton D, Shahandeh B, Meyskens FL Jr, Farmer PJ. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. J Med Chem 2004;47(27):6914–20.

3. Li L, Yang H, Chen D, Cui C, Dou QP. Disulfiram promotes the conversion of carcinogenic cadmium to a proteasome inhibitor with pro-apoptotic activity in human cancer cells. Toxicol Appl Pharmacol 2008;229:206–14.

4. Wiggins HL, Wymant JM, Solfa F, Hiscox SE, Taylor KM, Westwell AD, et al. Disulfiram-induced cytotoxicity and endo-lysosomal sequestration of zinc in breast cancer cells. Biochem Pharmacol 2015;93:332–42.

5. Braga MM, Silva ES, Moraes TB, Schirmbeck GH, Rico EP, Pinto CB, Rosemberg DB, Dutra-Filho CS, Dias RD, Oliveira DL, Rocha JBT, Souza DO. Brain zinc chelation by diethyldithiocarbamate increased the behavioral and mitochondrial damages in zebrafish subjected to hypoxia. Sci Rep 6:20279 February 2016. doi: 10.1038/srep20279

6. Milacic V, Chen D, Ronconi L, Landis-Piwowar KR, Fregona D, Dou QP. A Novel Anticancer Gold(III) Dithiocarbamate Compound Inhibits the Activity of a Purified 20S Proteasome and 26S Proteasome in Human Breast Cancer Cell Cultures and Xenografts. Cancer Res 2006; 66(21): 10478-86.

7. Solovieva ME, Soloviev VV, Kudryavtsev AA, Trizna YA, Akatov VS. Vitamin B12b enhances the cytotoxicity of dithiothreitol. Free Rad Biol Med 2008;44,1846–56.

8. Solovieva ME, Soloviev VV, Faskhutdinova AA, Kudryavtsev AA, Akatov VS. Prooxidant and cytotoxic action of N-acetylcysteine and glutathione in combinations with vitamin B12b. Cell Tiss Biol 2007;1:40–9.

9. Walker PR, Smith B, Carson C, LeBlanc J, Sikorska M, Woodhouse CS, et al. Induction of apoptosis in neoplastic cells by depletion of vitamin B12. Cell Death Differ 1997;4:233–41.

DYSFUNCTION OF MOTOR BEHAVIOR IN LONG-TERM MONOCULARLY DEPRIVED GOLDFISH

Pen'kova N.A., Shtanchaev R.Sh. and Mikhailova G.Z.
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia
mihailova_g@rambler.ru

It is well established that a period of monocular deprivation (MD) decreases the activity of neurons in primary visual cortex that respond to stimuli presented to the deprived eye [1]. As result, recovery from sensory deprivation is slow and incomplete in adult visual cortex. Recently, it was shown that visual stimulation during locomotion, which increases the gain of visual responses in primary visual cortex, dramatically enhances recovery in the mouse [2]. Responses to the particular visual stimuli viewed by the animal during locomotion recovered, while those to another normally effective stimulus did not, suggesting that locomotion promotes the recovery only of the neural circuits that are activated concurrent with the locomotion. The fundamental question therefore remains as to whether this enhanced response might be related with an alteration in motor function. The goal of the present study was to determine the impact of extended periods of MD on goldfish visual-motor behavior. In this study, we performed two measures of behavioral lateralization on the same individuals in one unselected population of Carassius auratus: a) rotational bias in a narrow corridor, and b) lateralization of the optomotor response (OMR) by which the animals actively swim to stabilize their position with respect to a drifting visual background. Index of motor laterality was calculated based on the ratio of the number of full turns in a narrow corridor in the preferable direction to the sum of turns in both directions [3]. An optomotor drum [4] modified by inner opaque wall was used in the work. Laterality of OMR was reflected in measurements of response velocity to gratings of low spatial frequency (0,04cycles/degree, the drum speed was 180 degree/sec). Index of the laterality is defined as the ratio: OMR velocity in temporal-to-nasal direction/ sum of OMR velocities in both directions. Monocular deprivation was initiated by eye gluing with opaque, noninvasive mask on water-repellent vehicle and was continued to 2 weeks. The eye was then re-opened to allow for binocular vision. Both eyes remained open afterward, and behavioral data were obtained over the next 2 weeks. Measurements of intact fish showed a particularly significant correlation (Pearson correlation coeff. 0.61, $p<0.001$,

n=35) between the measure of response velocity and the index of motor laterality (IML) (Fig.1A, Table 1). The positive correlation indicated that the subjects that preferentially use the right eye during OMR in nasal-to-temporal direction tended to turn to the left more frequently in a narrow corridor, and vice versa. Then we showed that irreversible monocular deprivation (enucleation of the right eye) dramatically enhances both measures of behavioral lateralization for the ambidextrous fish (Fig.1B). Lastly, we observed that the eye occlusion in ambidextrous fish leads to the development of preference of the turnings to the side of the closed eye ("blind" side). The effect was remained at a higher level two weeks after peeling off the eye mask. Thereby, the value of CMA in the rehabilitation period showed the maintenance of lateralized status in most individuals. At the same time operated fish showed the similar behavior with intact fish while following a moving optomotor drum (Fig.1B). This probably means that long-term deprivation affects rather the motor centers of goldfish (for example, Mauthner cells and other reticulo-spinal neurons [5]) than the direction-selective cells that maintained the perception of optic flow [6,7]. Further research based on used in this paper data can help to clarify the question, and fish seem to offer a good opportunity to investigate these issues.

This work was supported by Russian Foundation of Basic Research No. 16-04-01759-a.

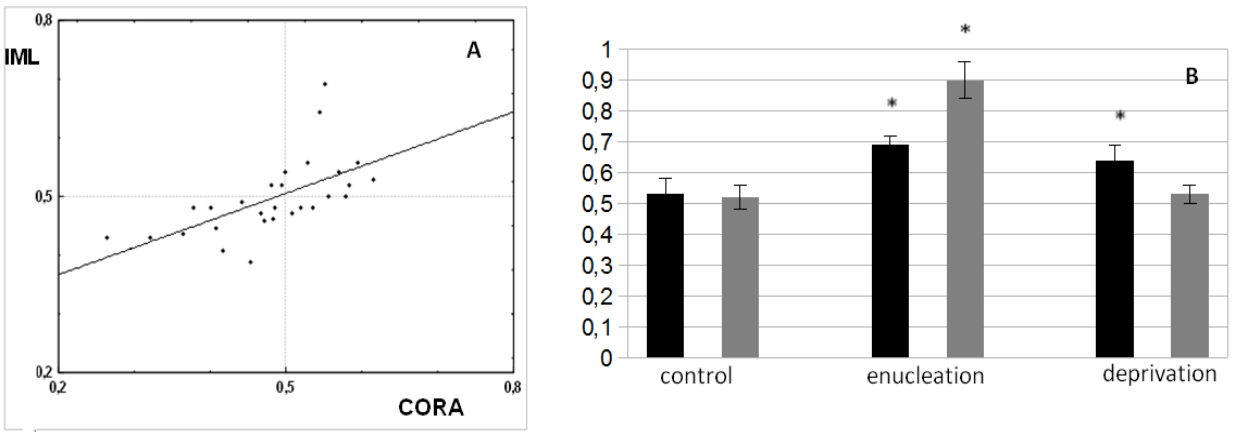


Fig.1. A – Scatter plot for control goldfish. CORA - coefficient of optomotor reaction's asymmetry, IML – index of motor laterality. **B** – Changes of IML and CORA after eye enucleation and deprivation. *, the differences were statistically significant ($p<0.01$; paired two-tail t test). Black columns note the values of IML, grey columns note the values of CORA.

Table 1 – Correlation between the velocity of the optomotor response and motor bias.

Group of fish	Mean velocity, cm/sec		CORA	IML
	temporal-to-nasal	nasal-to-temporal		
Ambidextrous (n=17)	3.2 ± 0.4	3.5 ± 0.4	0.51 ± 0.04	0.52 ± 0.02
Right-turning (n=5)	4.5 ± 0.5	3.6 ± 0.4*	0.56 ± 0.02	0.59 ± 0.03
Left-turning (n=8)	3.4 ± 0.9	4.3 ± 0.8*	0.60 ± 0.05	0.57 ± 0.02
Lateralized (n=14)	To the preferred side	To the contralateral side		
	4.4 ± 0.4	3.6 ± 0.4**	0.58 ± 0.04	0.58 ± 0.02

*, the differences between temporal-to-nasal and nasal-to-temporal motion were statistically significant ($p<0.01$; paired two-tail *t* test). **, $p<0.005$.

References:

1. Hubel D.H. (1988) Scientific American Library (N.-Y.). P.239.
2. Kaneko M. et Stryker M.P. (2014) Elife. V.3. e02798. P.1-16
3. Mikhailova G.Z. (2006) Neurophysiology. V.38. No.1. P.15-26.
4. Shtanchayev R.Sh. et al. (2007) Neurophysiology. V.39. No.2. P.118-129.
5. Gahtan E., Baier H. (2004) Inc. J Neurobiol.V.59. P. 147–161.
6. Kubo F. et al. (2014) Neuron. V.81. P. 1344–1359
7. Masseck O. et al. (2010) PLoS ONE V.5. No.3. e9461. P. 1- 10.

СОДЕРЖАНИЕ

Зинченко В.П., Гайдин С.Г., Долгачева Л.П., Туровский Е.А. НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ IL-10, АКТИВАТОРОВ PI3-КИНАЗЫ, АГОНИСТОВ АЛЬФА-2 РЕЦЕПТОРА И АНТИОКСИДАНТОВ 3

Долгачева Л.П., Федотова Е.И., Абрамов А.Ю., Бережнов А.В. НЕЙРОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МУТАНТНОГО АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА 6

Зинченко В.П., Гайдин С.Г., Теплов И.Ю, Косенков А.М. МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕТИ ГАМКЕРГИЧЕСКИМИ НЕЙРОНАМИ 11

Белослудцева Н.В., Горячева Н.А., Белослудцев К.Н., Миронова Г.Д. УЧАСТИЕ ПОРЫ, ИНДУЦИРУЕМОЙ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ И Sr2+, В МЕХАНИЗМЕ Sr2+/ВАЛИНОМИЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫХ ОСЦИЛЛЯЦИЙ ИОННЫХ ПОТОКОВ В МИТОХОНДРИЯХ В УСЛОВИЯХ ГИПОТОНИИ 14

Белослудцева Н.В., Седельникова Э.А., Белослудцев К.Н. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ОБРАЗОВАНИЯ Ca2+-ЗАВИСИМОЙ ЦИКЛОСПОРИН А-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ПАЛЬМИТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА И МАССЫ ТЕЛА ЖИВОТНОГО 18

Дубинин М.В., Теньков К.С., Ведерников А.А., Белослудцев М.Н., Старинец В.С., Свинин А.О., Белослудцев К.Н., Самарцев В.Н. ОСОБЕННОСТИ ИНДУКЦИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ УЖА ОБЫКНОВЕННОГО (NATRIX NATRIX L.) 23

Мащенко А.В., Аль-Мугхраби Я.М., Мосенцов А.А., Хмиль Н.В., Овсянникова Т.Н., Дяченко В.Д., Миронова Г.Д. ВЛИЯНИЕ СЕЛЕН-СОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ДНФ-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ВХОД ИОНОВ КАЛИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС 27

Овченкова А.П., Голева Т.Н., Рогов А.Г., Звягильская Р.А. НОВЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА МОРФОЛОГИЮ МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ 30

Розова Е.В., Сидоряк Н.Г. ИЗМЕНЕНИЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ КРОВИ И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ТКАНЕЙ ЛЕГКИХ И СЕРДЦА ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НИТРИТА НАТРИЯ 32

Таланов Е.Ю., Мосенцов А.А., Берест В.П. СРАВНЕНИЕ ЭЛЕКТРО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АТФ – ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИТОХОНДРИЙ И МИКРОСОМ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫСЫ 35

Овсянникова Т.Н., Коваленко А.А., Забелина И.А., Маслов В.А., Левченко А.Н. ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС 39

Хмиль Н.В., Горбачева О.С., Белослудцева Н.В., Валуев Т., Минина Н.В., Минин А.А., Миронова Г.Д. ВЛИЯНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ (ВИМЕНТИНА И ДЕСМИНА) НА ТРАНСПОРТ ИОНОВ КАЛИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ 41

Chaplygina A.V., Vekshin N.L., Braslavsky A.V. LIPOFUSCIN FORMATION IN RAT LIVER HOMOGENATES AND ISOLATED MITOCHONDRIA 45

Teplova V.V., Malkov A.E., Holmuhamedov E.L. THE CONTRIBUTION OF THE VOLTAGE-DEPENDENT ANION CHANNELS OF THE OUTER MEMBRANE OF MITOCHONDRIA IN THE DEVELOPMENT OF ALCOHOLIC HEPATIC ENCEPHALOPATHY 47

Teplova V.V., Kruglov A.G., Kovalev L.I., Fedotcheva N.I. ROLE OF GLUTAMATE IN INREASED OXIDATIVE STRESS IN CHRONIC ALCOHOLISM 49

Lvov A.M., Vekshin N.L. TWO PARALLEL RESPIRATORY CHAINS IN RAT LIVER MITOCHONDRIA 50

Kruglov A.G., Milyaev E.V., Kupriyanova E.S., Nikiforova A.B. RESPIRATORY SUBSTRATES MAINTAIN THE MEMBRANE POTENTIAL IN ISOLATED MITOCHONDRIA UNDER CHEMICAL HYPOXIA 51

Kupriyanova E.S., Krestinina O.V., Chekanov A.V., Nikiforova A.B., Solovieva M.E., Sheiko T.V., Kudriavtsev A.A., Craigen W.J., Kruglov A.G. THE IMPACT OF VDAC ISOFORMS ON NADH-OXIDOREDUCTASE ACTIVITY AND ROS GENERATION IN MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS 53

Lezhnev E.I., Lavrovskaya V.P., Popova I.I. THE EFFECT OF POLYDIHYDROXYPHENYLENETHIOSULFONATE SODIUM ON BIOENERGETIC PROCESSES IN MITOCHONDRIA 54

Nikiforova A.B., Kupriyanova E.S., Kruglov A.G. THE ROLE OF THE MITOCHONDRIAL CYTOCHROME B5 REDUCTASE IN THE CYTOTOXIC EFFECT OF REDOX-CYCLING XENOBIOTICS 57

Solovieva M.E., Shatalin Yu.V., Fadeev R.S., Kutyshenko V.P., Akatov V.S. OVERCOMING THE CONFLUENCE-DEPENDENCE RESISTANCE OF TUMOR CELLS TO DIETHYLDITHIOCARBAMATE: COBALAMIN ENHANCES DDC TOXICITY AND CATALIZES DISULFIRAM FORMATION 58

Pen'kova N.A., Shtanchaev R.Sh. and Mikhailova G.Z. DYSFUNCTION OF MOTOR BEHAVIOR IN LONG-TERM MONOCULARLY DEPRIVED GOLDFISH 60