

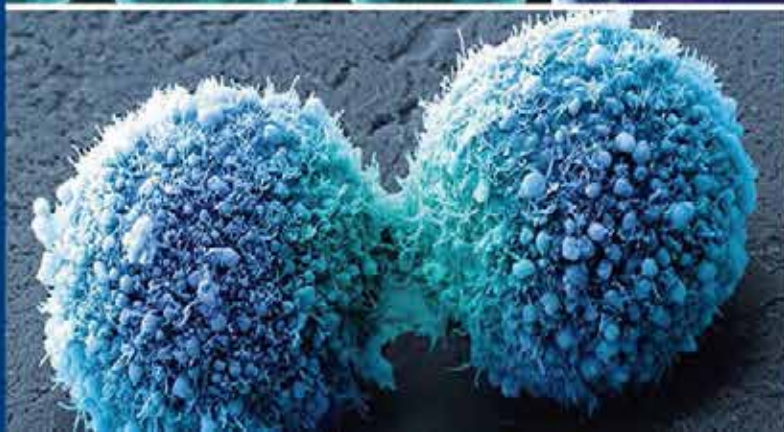
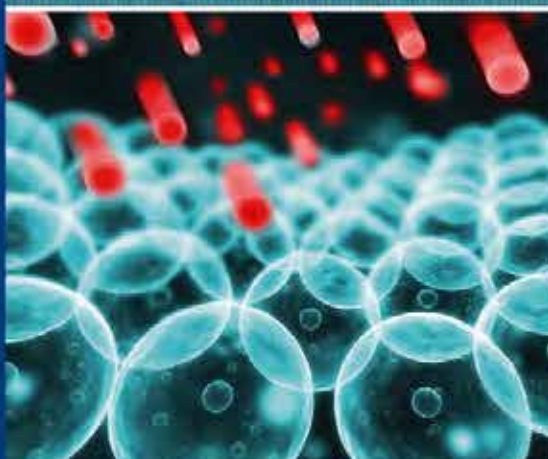
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ  
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ РАН



Под редакцией проф. В.С. Акатова и проф. Дж.Дж. Лемастера



## МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ПОРЫ, КАНАЛЫ И УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТКИ К ПОВРЕЖДАЮЩИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ



**Российская Академия Наук  
Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение  
Науки Институт теоретической и экспериментальной  
биофизики РАН, Пушкино**

**\*\*\***

**Серия «Теоретическая и прикладная биофизика»**

**Митохондриальные поры, каналы и  
устойчивость клеток к повреждающим  
воздействиям**

**Издательство Синхробук  
Synchrobook™**

**– 2016 –**

УДК 577.

Митохондриальные поры, каналы и устойчивость клеток к повреждающим воздействиям

Монография рекомендована к публикации на заседании Ученого Совета Института Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН от 15.12.2016 г.

Пушчинский Научный Центр Биологических Исследований РАН, г. Пушкино, Московская обл.

ISBN 978-5-91874-039-2

Под редакцией Акатова В. С. и Лемастера Дж. Дж.

Научная редакторская коллегия:  
Акатов В. С., профессор, д.ф.-м.н.  
Лемастерс Дж. Дж., профессор  
Крестинина О. В., к.б.н.  
Одинокова И. В., к.б.н.  
Бабурин Ю. Л., к.б.н.

Рецензент: доктор биологических наук Ю.Н. Корыстов

Контакты:

[akatov.vladimir@gmail.com](mailto:akatov.vladimir@gmail.com)

8-916-784-25-59

© Оформление Synchrobook™, Zeeb V.

\* В онлайн-обложке использована  
фотография Дарьи Комаровой.

Издательство Синхробук.

Заказ № 1964

Общероссийский классификатор продукции  
ОК-005-93, том 2; 953000 – книги, брошюры.

ISBN 978-5-91874-039-2

-216 стр.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие .....	7
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	9
<b>ГЛАВА 1. РОЛЬ VDAC И TSPO В РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН</b> .....	12
Введение .....	12
VDAC – регулятор проницаемости внешней мембраны митохондрий .....	12
Молекулярная характеристика VDAC .....	12
Регуляция проницаемости VDAC .....	13
TSPO – белок-партнер поринов во внешней мембране митохондрий .....	14
Молекулярная структура TSPO .....	14
Синтетические и эндогенные лиганды .....	15
TSPO и VDAC в мРTP и в апоптозе .....	16
Регуляция функционирования VDAC и TSPO посредством фосфорилирования .....	20
Заключение и перспективы .....	23
<b>ГЛАВА 2. УЧАСТИЕ ПАЛЬМИТАТ/Ca<sup>2+</sup> -ИНДУЦИРУЕМОЙ ЛИПИДНОЙ ПОРЫ В ВЫХОДЕ ИОНОВ И ОСЦИЛЛЯЦИИ ИОННЫХ ПОТОКОВ В МИТОХОНДРИЯХ</b> .....	27
Введение .....	27
Механизм образования липидной поры .....	28
Свойства и регуляция митохондриальной липидной поры, индуцированной пальмитиновой кислотой и Ca <sup>2+</sup> .....	30
Пальмитат/Ca <sup>2+</sup> -индуцируемая пора как неспецифическая система выброса ионов Ca <sup>2+</sup> из митохондрий .....	31
Липидная пора как система выброса Ca <sup>2+</sup> в условиях добавленной пальмитиновой кислоты .....	31
Липидная пора как система выброса Ca <sup>2+</sup> (Sr <sup>2+</sup> ) при активации фосфолипазы A2 .....	32
Участие поры, индуцируемой жирными кислотами и Sr <sup>2+</sup> , в механизме обратимого Sr <sup>2+</sup> -индуцированного выброса ионов из митохондрий в условиях гипотонии .....	34
Механизм рециклизации ионов Ca <sup>2+</sup> (Sr <sup>2+</sup> ) через митохондриальную мембрану при открытии липидной поры, индуцируемой жирными кислотами .....	37
Заключение .....	40
Список литературы .....	41
<b>ГЛАВА 3. УРИДИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ЕГО АНТИ ИШЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ</b> .....	43
Введение .....	43
УДФ активрует канальную субъединицу митоK <sub>ATP</sub> канала, реконструированного в бислойную липидную мембрану, и целый канал в intactных митохондриях .....	44
Активация митоK <sub>ATP</sub> канала уридиновыми нуклеотидами предотвращает повреждения миокарда при остром инфаркте .....	45
Антиишемическое и антиаритмическое действие уридина и уридин-5'-монофосфата при введении препаратов до и после создания экспериментального инфаркта .....	46
Ингибиторы кальевых каналов снимают антиишемическое действие уридина и уридин-5'-монофосфата, введенных до создания экспериментального инфаркта .....	47
Ингибиторы кальевых каналов снижают антиаритмический эффект уридина и уридин-5'-монофосфата, введенных до создания экспериментального инфаркта .....	49
Уридин и УМФ восстанавливают содержание АТФ и креатинфосфата на 60 мин острой ишемии, а селективный ингибитор митоK <sub>ATP</sub> -каналов 5-гидроксидеканоат препятствует проявлению их кардиопротекторного действия .....	51
Уридин-5'-монофосфат предотвращает активацию перекисного окисления липидов и нарушение функции антиоксидантной системы в сердце на ранних сроках острой ишемии. Селективный блокатор митохондриальных АТФ-зависимых K <sup>+</sup> -каналов 5- гидроксидеканоат устраняет его защитный эффект .....	53

Механизмы защиты сердца при гипоксии, опосредованные активацией митокК <sub>ATP</sub> .....	56
Заключение .....	57
Список литературы .....	58
<b>ГЛАВА 4. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ И ИОННЫЙ ОБМЕН В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ (МОДЕЛЬ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ)</b> .....	60
Введение.....	60
Схема эксперимента.....	61
Результаты и их обсуждение.....	62
Список литературы .....	68
<b>ГЛАВА 5. 2',3'-ЦИКЛОНУКЛЕОТИД-3'-ФОСФОДИЭСТЕРАЗА (СНРАЗА) КАК ПОСРЕДНИК В МЕХАНИЗМЕ ЗАЩИТЫ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ МЕЛАТОНИНА ПРИ СТАРЕНИИ</b> .....	70
Введение.....	70
Мелатонин.....	71
2',3'-циклонуклеотид-3'-фосфодиэстераза (СНРаза) локализация, функции .....	73
СНРаза в процессах старения.....	75
Мелатонин может действовать на митохондриальные функции через 2',3'- циклонуклеотид-3'-фосфодиэстераза (СНРаза).....	77
Заключение .....	81
Список литературы .....	82
<b>ГЛАВА 6. КАК ИЗОФОРМЫ VDAC РЕГУЛИРУЮТ УРОВЕНЬ АФК В МИТОХОНДРИЯХ И КЛЕТКАХ</b> .....	84
Введение.....	84
Подавление экспрессии VDAC2 стимулирует образование АФК в митохондриях и клетках.....	85
Подавление экспрессии VDAC или его блокирование снижает способность системы цитохром с-цитохром оксидаза утилизировать свободные радикалы из шизоля.....	87
Эффект подавления экспрессии VDAC на экспрессию белков, регулирующих уровень АФК в митохондриях и клетках.....	90
Заключение .....	93
Список литературы .....	94
<b>ГЛАВА 7. АНАЛИЗ ПРОДУКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО СУПЕРОКСИДА С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ</b> .....	96
Введение.....	96
Кинетическая модель митохондриальной дыхательной цепи.....	98
Кинетическая модель комплекса I.....	99
Кинетическая модель комплекса III.....	101
ΔΨ и ΔpH зависимость скорости образования АФК с различными субстратами дыхательной цепи.....	102
Гистерезис и бистабильность в кинетике переноса электронов и продукции АФК в дыхательной цепи.....	106
Внешние параметры контроля гистерезиса и бистабильности в дыхательной цепи.....	108
Влияние ингибирования различных сегментов дыхательной цепи на скорость производства АФК.....	110
Q-зависимость скорости генерации АФК антимицин-ингибированным комплексом III.....	115
Заключение .....	118
Список литературы .....	122
<b>ГЛАВА 8. ВЛИЯНИЕ УРИДИНА НА СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ NF-KB И ЭКСПРЕССИЮ HSP72 В ЛИМФОЦИТАХ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ, ПРИ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ, ВЫЗВАННОМ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ТОКСИНОМ</b> .....	124
Введение.....	124

Влияние уридина на концентрацию провоспалительных цитокинов в периферической крови мышей в условиях острого воспаления .....	126
Действие уридина на продукцию белка теплового шока Hsp72 в лимфоцитах селезенки мышей, получавших бактериальный эндотоксин .....	126
Роль уридина в предупреждении активации каскада NF- $\kappa$ B при воздействии острого токсического стресса .....	127
Накопления фосфонуклеотидов в тканях животных, получающих уридин .....	128
Заключение .....	129
Список литературы .....	131
<b>ГЛАВА 9. LINK BETWEEN LISOSOMAL IRON AND MITOCHONDRIA ENHANCES PHOTODYNAMIC THERAPY</b> .....	132
Localization of the photosensitizer is critical in effective photodynamic therapy .....	132
Iron contributes to PDT killing .....	133
Cellular iron homeostasis .....	133
Chelatable versus nonchelatable iron .....	134
Lysosomal iron release enhances PDT .....	134
Mitochondrial iron uptake in cells .....	135
Improved delivery of photosensitizer to lysosomes via a nanoparticle carrier .....	137
Conclusions .....	138
List of references .....	139
<b>ГЛАВА 10. НАДН-ЗАВИСИМАЯ РЕДУКТАЗА ВНЕШНИХ ОТДЕЛОВ МИТОХОНДРИЙ: МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АКТИВАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ</b> .....	141
Введение .....	141
Методы оценки активности НАДН-зависимых редуктаз, ответственных за восстановление ксенобиотиков во внешних отделах митохондрий .....	142
Определение активности НАДН оксидоредуктаз внешних отделов митохондрий по восстановлению люцигенина до диметилбиакридена (ДБА) .....	142
Применение разработанного метода для изучения НАДН оксидоредуктазной активности в клетках на срезах мозга .....	146
НАДН оксидоредуктаза внешних отделов митохондрий индуцирует мРTP путем восстановления ксенобиотиков. Роль АФК и радикалов ксенобиотиков .....	147
Идентификация природы НАДН-зависимой редуктазы редокс-активных соединений и ксенобиотиков во внешних отделах митохондрий .....	149
Ротенон-чувствительная НАДН оксидоредуктазная активность во внешних отделах митохондрий сердца .....	149
Специфические антитела к Cyb <sub>s</sub> R3 подавляют НАДН оксидоредуктазную активность во внешних отделах митохондрий .....	150
Эффекты ингибиторов Cyb <sub>s</sub> R3 и блокаторов VDAC на НАДН оксидоредуктазную активность .....	152
Заключение .....	154
Материалы и методы исследования .....	154
Список литературы .....	155
<b>ГЛАВА 11. РОЛЬ СУБЪЕДИНИЦЫ C В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ НЕСЕЛЕКТИВНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ</b> .....	156
Введение .....	156
История исследования феномена РТР .....	156
Митохондриальная FoF <sub>1</sub> -АТФаза – строение и функционирование .....	159
Субъединичная структура АТФазы .....	159
Принципы работы АТФ-синтазы .....	160
Регуляция АТФ-синтазы .....	162
Гипотезы об участии FoF <sub>1</sub> -АТФ-синтазы в формировании мРТР .....	164
Заключение .....	167
Список литературы .....	169

<b>ГЛАВА 12. ПОВЫШЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТАХ</b>	172
Введение.....	172
Острый миелоидный лейкоз. Этиология, патогенез, классификация.....	173
Лекарственная устойчивость острого миелоидного лейкоза .....	175
Приобретенная лекарственная устойчивость.....	175
<i>De novo</i> (первичная) лекарственная устойчивость.....	176
Лекарственная устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах.....	177
Заключение.....	181
Список литературы.....	181
<b>ГЛАВА 13. ВЛИЯНИЕ ВИМЕНТИНА И ДЕСМИНА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА ИОНОВ КАЛИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ</b>	183
Введение.....	183
Влияние виментина и десмина на энергезависимый вход калия в митохондрии.....	184
Влияние ПФ на АТФ-зависимый ДНФ-стимулированный транспорт калия в митохондриях печени крыс .....	186
Список литературы.....	187
<b>ГЛАВА 14. РОЛЬ ПОРИНОВЫХ КАНАЛОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ В РАЗВИТИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ, ИНДУЦИРУЕМОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ</b>	189
Введение.....	189
Гипотетическая схема окисления этанола в гепатоцитах и транспорта метаболитов через пориновые каналы .....	190
Окисление этанола снижает проницаемость внешней митохондриальной мембраны в гепатоцитах.....	191
Влияние алкогольной интоксикации экспериментальных животных на основные функции изолированных митохондрий .....	193
Развитие системного окислительного стресса при алкогольной интоксикации.....	194
Повреждение мозговой деятельности подопытных животных при развитии алкогольной энцефалопатии.....	196
Активность гиппокампальных нейронов <i>in vivo</i> .....	197
Активность гиппокампальных нейронов <i>in vitro</i> .....	199
Заключение.....	202
Список литературы.....	203
<b>ГЛАВА 15. РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В ИНИЦИАЦИИ КАЛЬЦИНОЗА ИМПЛАНТИРОВАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ</b>	204
Введение.....	204
Источники кальция и фосфатов для биоминерализации.....	205
Возможная роль митохондрий в процессе физиологической биоминерализации .....	208
Гипотеза о роли митохондрий в инициации кальциноза имплантированных биологических тканей.....	209
Заключение.....	214
Список литературы.....	214
<b>СПИСОК АВТОРОВ</b>	216

## *Предисловие*

Митохондрии являются не только энергетическими станциями эукариотических клеток, но и выполняют множество других функций. В частности, они играют важную роль в регуляции апоптотической гибели клеток, связанной с выходом из митохондрий проапоптотических белков (цитохром *c*, AIF, EndoG, Smac). Выход этих белков и низкомолекулярных соединений, ионов осуществляется через митохондриальные поры и каналы. Это определяет возможность сдерживать инициацию апоптотической клеточной гибели при стрессовых воздействиях, модулируя проницаемость пор и каналов митохондрий, что очень важно для разработки новых эффективных кардиопротекторов, гепатопротекторов и т.д. С другой стороны, усиливая выход проапоптотических белков из митохондрий можно повысить эффективность действия новых противоопухолевых препаратов. Такие исследования были поддержаны мегагрантом правительства РФ и выполняются с 2014 г. научным коллективом Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН под руководством ведущего ученого из США профессора Дж. Дж. Лемастера (проект № 14.750.31.028).

В монографии представлены главы по различным темам этого направления. Изложены современные представления о механизмах функционирования  $Ca^{2+}$ -зависимой, циклоспорин А-чувствительной митохондриальной поры (mPTP), о роли белков вольтзависимого анионного канала (VDAC) и транслокаторного белка (TSPO) в mPTP, о модулировании активности митоK<sub>ATP</sub>-канала митохондрий посредством уридиндифосфата, и о важном значении этого эффекта для предупреждения и лечения острого инфаркта миокарда. Представлены интересные данные о формировании жирными кислотами кальций-зависимой спонтанной кратковременной поры в митохондриальных мембранах, о роли пориновых каналов митохондрий и белков этих каналов (VDAC) в генерации активных форм кислорода (АФК) в митохондриях и о роли АФК в регуляции проницаемости митохондриальных мембран, о механизме защитного эффекта мелатонина и о его связи с активацией 2',3'-циклоуклеотид-3'-фосфодиэстеразы и влиянием этой активации на проницаемость митохондриальных мембран. В книге представлены новые данные о влиянии белков промежуточных филаментов клеток виментина и десмина на систему транспорта ионов калия в митохондриях печени, о важной роли освобождения ионов железа из лизосом и их переноса в митохондрии для усиления действия фотодинамической терапии опухолей. В книге излагаются также новые представления о многократном повышении лекарственной устойчивости лейкозных клеток в многоклеточных агрегатах, о роли пориновых белков в механизме этой устойчивости. В целом монография показывает важную роль исследований проницаемости митохондриальных мембран в расширении и углублении наших представлений о биологии клетки, о возможности практического применения этих знаний в медицине. Монография отражает также активизацию научных исследований в этом направлении в Институте теоретической и экспериментальной биофизики и важную роль в этом



процессе государственной поддержки в рамках программы Правительства РФ о выделении мегагрантов для коллективов научных и образовательных учреждений для выполнения работ под руководством ведущих ученых.

Ответственные редакторы:  
профессор В.С. Акатов

профессор Дж.Дж. Лемастерс

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 5-ГД - 5-гидроксидекапоат  
АА/AntA – антимцин А  
АДГ – алкогольдегидрогеназа  
АДФ – Аденозиндифосфат  
АКАР – A-kinase anchor proteins  
АНТ/ANT – adenine nucleotide translocator/транслоказа адениновых нуклеотидов  
АС – аудиогенные судороги  
АТФ – Аденозинтрифосфат  
АТФаза/ATPase – аденозинтрифосфатаза  
АФК/ROS – активные формы кислорода  
АЭ – аудиогенная эпилепсия  
БЛМ – бислойные липидные мембраны  
БСА/BSA – бычий сывороточный альбумин  
ВГ/GSH – восстановленный глутатион  
ГА – глутаровый альдегид  
ГАМК – γ-Аминомасляная кислота  
ГАп – гидроксиалатит  
ГПЛ – гидроперекиси липидов  
ГТФ – гуанозинтрифосфат  
ДБА–диметил биакриден  
ДЕБ – диаминобензидина  
ДК/RCI – дыхательный контроль/Respiratory control index,  
ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота  
ДНФ – 2,4-динитрофенол  
ДЦ – дыхательная цепь митохондрий,  
ИИА – индексе ишемической альтерации  
КМ – крысы линии Крушинского-Молодкина  
КФ – креатинфосфат  
ЛКА – левая коронарная артерии  
ЛПС – липополисахарид  
Люш/Luc – люцифенин  
мРТР – пора неспецифической проницаемости (permeability transition pore)  
МАО – моноамин оксидаза  
митокАТФ – АТФ-зависимый К<sup>+</sup> канал  
ММП – межмембранное пространство  
МСК – мезенхимальные стромальные клетки  
МХ – митохондрии  
НАДН/ NADH – Никотинамидадениндинуклеотид  
НК II – гексокиназа II  
ОИМ – острая ишемия миокарда  
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз  
ОПО – обратный перенос электронов  
ПГБ – полигидроксибутират  
ПКА/РКА – протеинкиназа А  
ПКС – протеинкиназа С II  
ПО – параоксоназа

ПОЛ – перекисное окисление липидов  
 полиФ – полифосфаты  
 ПФ – промежуточные филаменты  
 РНК/RNA – рибонуклеиновая кислота/ Ribonucleic acid  
 Рот/Rot – ротенон  
 Са-Р – кальций-фосфатные  
 СЖК – свободные жирные кислоты  
 СМЧ – субмитохондриальные частицы  
 СОД/SOD – супероксиддисмутаза  
 ССХ – сердечно-сосудистая хирургия  
 ТЖ – тахикардия желудочков  
 ТНФ/TNF – фактор некроза опухолей/tumour necrosis factor  
 ТФФ<sup>+</sup>/ТРР<sup>+</sup> – катион тетрафенилфосфония  
 УДФ – уридин-5'-дифосфат  
 УМФ – уридин-5'-монофосфат  
 УТФ – уридин-5'-трифосфат  
 ФЖ – фибрилляция желудочков  
 ФМН – флаavin мононуклеотид  
 цАМФ /сАМР – Циклический аденозинмонофосфат  
 ЦНС – центральная нервная система  
 ЦсА/CsA – циклоспорин А  
 ЭГА/EGTA – этиленгликольтетрауксусная кислота/ethylene glycol-tetra acetic acid  
 ЭС – экстраксистола  
 ЭТЦ – электрон-транспортная цепь  
 ААСОСФЗ – арахидонилтрифторметил кетон  
 АСВД – acyl-CoA-связывающий домен  
 АIF – апоптоз индуцирующий фактор  
 ALPase – щелочная фосфатаза, alkaline phosphatase  
 CNPаза – 2',3'-циклонуклеотид -3'-фосфодиэстераза  
 СОХIV – цитохром оксидаза IV  
 Cyb5R3 – цитохром b5 редуктаза изоформа 3  
 DBI/ACBP – diazepam-binding inhibitor/Acyl-coenzyme A binding protein  
 DCCD – дициклогексилкарбодимид  
 DCFDA – 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат  
 DIDS – 4,4'-дизотиоциано-2,2'-стильбендисульфоновая кислота  
 DMT1 – divalent metal transporter-1/транспортер бивалентных металлов  
 EGFR – epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста  
 Endo G – эндонуклеаза G  
 ERK – сигнальный путь ERK (Ras-ERK, MAPK/ERK - mitogen-activated protein kinase)  
 FGF – фактор роста фибробластов  
 FS – freeze substitution  
 GSK-3 $\beta$  - гликогенсинтетаза 3 бета  
 GSSH – окисленный глутатион  
 HPF – high-pressure freezing

HPLC - high performance liquid chromatography, Высокоэффективная жидкостная хроматография 12  
 HSP – heat shock protein, белок теплового шока  
 IAP – ионная активность продукта  
 ISP – железо-серный белок Риске  
 MBP – myelin basic protein/основной белок миелина  
 MCLA – 3,7-дигидро -2-метил-6-(4-метоксифенил)имидазол[1,2-а]пирозин-3-один  
 MCU – митохондриальный кальциевый унипортер  
 MDA – малоновый диальдегид  
 MGP – матричный Gla протеин  
 MOSP – myelin/oligodendrocyte-specific protein,  
 MPP<sup>+</sup> – 1-methyl-4-phenylpyridinium ion, 1-метил-4-фенилпиридиний  
 mtNOS – митохондриальная NO синтаза  
 mTOR – серин-треониновая протеинкиназа, mammalian target of rapamycin  
 NOX – NADPH оксидаза  
 NPe6 – N-aspartyl chlorin e6/ N-диметилглюкаминная соль хлорина E6  
 OMM – внешняя мембрана митохондрий  
 OSCP – Oligomycin sensitivity conferring protein  
 PAP7 – PBR-связывающий белок  
 PBR – периферический бензодиазепиновый рецептор  
 Pc 4 – фталоцианин  
 PDT – photodynamic therapy, фотодинамическая терапия  
 Pi – неорганический фосфат  
 PK11195 – 1-(2-хлорфенил)-N-метил-N-(1-метилпропил)-3-изохинолин карбоксамид  
 PKCε – Протеинкиназа C эпсилон  
 PPIX – протопорфирин IX  
 RBM – rat brain mitochondria, митохондрии мозга крысы  
 Rh123 – rhodamine 123/родамин 123  
 RHM – rat heart mitochondria, митохондрии сердца крысы  
 RLM – rat liver mitochondria, митохондрии печени крысы  
 SDS-PAGE/SDS-ПААГ – электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия  
 TMRM – tetramethylrhodamine methylester  
 TNAP – ткане-неспецифичная щелочная фосфатаза  
 TRPM8 – Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8  
 TSPO – 18 кДа транслокаторный белок  
 UCP2 (UCP3) – разобшающие белки  
 V-ATPase – вакуолярная протонная АТФаза  
 VDAC – voltage-dependent anion channel/потенциал-зависимый анионный канал

## **Глава 1. РОЛЬ VDAC И TSPO В РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН**

Азарашвили Т.С.<sup>1</sup>, Бабурина Ю.Л.<sup>1</sup>, Крестинина О.В.<sup>1</sup>, Одиноква И.В.<sup>1</sup>, Акатов В.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУИ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

### **Аннотация**

Функционирование митохондрий регулируется проницаемостью внешней мембраны, которая определяется активностью потенциал-зависимого анионного канала (VDAC). В свою очередь, проводимость VDAC каналов модулируется многочисленными факторами, включая белки. Одним из таких белков является 18 кДа белок-транслокатор (TSPO), известный ранее как периферический бензодиазепиновый рецептор. В работе рассмотрены молекулярные свойства этих белков, указывающие на их тесное взаимодействие и влияние лигандов TSPO на проводимость пориновых каналов и индукцию поры неспецифической проницаемости (permeability transition pore, mPTP).

### **Введение**

Важным фактором регуляции VDAC и TSPO являются их посттрансляционные модификации. В обзоре рассматриваются протеникиназы, участвующие в фосфорилировании VDAC и TSPO и возможное формирование комплексов этих белков с протеникиназами, осуществляющими регуляцию проницаемости мембран и начальных стадий апоптоза. Постоянный обмен между цитозолем клетки и матриксом митохондрий осуществляется внешней мембраной митохондрий, которая проницаема для многих водорастворимых соединений, позволяя многим из них проникать из цитозоля клетки в межмембранное пространство митохондрий. Проницаемость внешней мембраны осуществляется по большей части функционированием белков-поринов, которые после детального изучения были идентифицированы, как каналы, получив название потенциал-зависимого анионного канала (VDAC) [1]. VDAC обеспечивает обмен митохондрий с цитозолем такими соединениями, как АТФ, АДФ и другими метаболическими субстратами.

### **VDAC – регулятор проницаемости внешней мембраны митохондрий Молекулярная характеристика VDAC**

Каналы VDAC формируются единственной полипептидной цепью с молекулярной массой 30-32 кДа, представляющей собою бочонок (barrel), состоящий из 19β-цепочек и одной α-спирали N-конца, расположенной в середине поры, где α-спираль проявляет высокую подвижность. Предполагают, что N-конец влияет на проводимость ионов и метаболитов через мембрану, а также на взаимодействие VDAC с белками-эффекторами [2-5]. Существует несколько изоформ VDAC (VDAC1, VDAC2, VDAC3), которые являются высоко гомологичными и различаются только длиной N-конца. Свойства каналов VDAC1 такие как проводимость одиночных каналов, их селективность и зависимость от потенциала являются консервативными для царства эукариот [4-6]. В результате многочисленных исследований установлено, что

функциональной единицей VDAC является мономер. Однако, мономеры способны ассоциироваться с образованием димеров, тримеров, тетрамеров, гексамеров и олигомеров более высокого порядка [7].

VDAC1 формирует поры диаметром от 1.7 нм до 3 нм с различной проводимостью одиночных каналов [8]. Показана высокая проводимость одиночных каналов (порядка 3.5-4 nS в растворе 1M KCl), проницаемых для соединений размером до 6 кДа. Высокая проводимость отражает конформацию полностью открытого канала, в то время как состояние каналов с низкой проводимостью (2.6 nS и 1.9 nS в растворе 1M KCl) снижает проводимость на 40-60% [7, 9, 10].

### ***Регуляция проницаемости VDAC***

VDAC каналы обычно находятся в открытом состоянии [11-14]. Размер пор VDAC достаточен для прохождения таких ионов и зарядов, как АТФ и NADH [15]. VDAC проницаем и для кальция, который может проникать через его каналы, находящиеся как в открытом, так и в закрытом состоянии. Однако закрытое состояние канала предпочтительнее для транслокации катионов через мембрану [16]. Присутствие или отсутствие кальция не влияет на проводимость VDAC, находящегося в открытом состоянии [17]. Неспособность отрицательно заряженной АТФ проникать через закрытый VDAC, несмотря на то, что размер молекулы АТФ ( $R_{se} \sim 0.7$  нм – меньше размера закрытой поры (1.8 нм)), показывает, что электростатический профиль внутри канала играет более важную роль в процессе транспорта заряженных метаболитов через канал, чем отношение размеров поры/размер молекулы [17]. Закрытие каналов VDAC ограничивает движение АТФ, АДФ, неорганического фосфата и субстратов дыхания внутрь митохондрий, что сопровождается угнетением митохондриальных функций [12] и уменьшает способность анионных метаболитов обмениваться между цитоплазмой и митохондриями [17, 18]. Было обнаружено, что соединения, сходные с АТФ по размеру и заряду, не проникают через канал, и это позволяет предположить, что селективность VDAC достигается при помощи его специфического взаимодействия с проникающими соединениями, схожими с АТФ [19; 20]. Действительно, были установлены специфические три специфических места связывания нуклеотидов [21]. Регуляция VDAC может осуществляться и фосфорилированием при помощи протеинкиназы А [22]. Одним из обсуждаемых положений в настоящее время является транспорт метаболитов через внешнюю мембрану, который может находиться под контролем и регуляцией нуклеиновых кислот, ассоциированных с VDAC [23, 24]. Эффекторами VDAC могут быть вещества разной химической природы [25-28]. Среди них найдены дивалентные катионы [25], адениновые нуклеотиды, NADH и Mg-NADPH [26], tBid [29], полианион Кёнига [27], рутениевый красный, дициклогексилкарбодиимид (DCCD) [28], и 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) [30]. VDAC взаимодействует с рядом белков. Среди них следует отметить тубулин и G-актин [31], белки семейства Vcl2 [29], гексокиназу [32, 33] и митохондриальную креатинкиназу [34]. В частности, находясь в связанном состоянии с VDAC, они способны переводить каналы в закрытое состояние [35, 36]. Следует отметить, что все эти белки являются цитоплазматическими.

### **TSP0 – белок-партнер поринов во внешней мембране митохондрий**

Во внешней мембране митохондрий локализован 18 кДа белок, белок-транслокатор (TSP0), который также взаимодействует с VDAC, и способен формировать с ним прочный комплекс TSP0, который сохраняется при получении очищенного препарата VDAC [37]. Такое тесное взаимодействие этих двух белков, локализованных во внешней мембране митохондрий, до конца не изучено, поэтому в рамках настоящей статьи предпринята попытка проанализировать предпосылки для совместного функционирования этих белков и их участия в регуляции проницаемости мембран митохондрий. TSP0 играет важную роль в апоптозе [38] и стресс-адаптации [39]. Его рассматривают как маркерный белок при воспалительных процессах в мозге и при реактивных глиозах, которые ассоциируются с различными нейропатологиями. Уровень экспрессии TSP0 увеличивается при нарушениях в ЦНС, включая воспаления, метаболический стресс, а также травматические, ишемические и химические повреждения мозга, что позволяет использовать его в качестве маркера при выявлении нарушений в мозге [40, 41]. Показано, что увеличение экспрессии TSP0 коррелирует с увеличением агрессивности опухолей [42].

### **Молекулярная структура TSP0**

Раньше TSP0 был известен как периферический бензодиазепиновый рецептор (PBR). В настоящее время 18 кДа TSP0 описывают как интегральный мембранный белок, состоящий из 5-и трансмембранных альфа спиралей, экстрамитохондриального С-конца, внутри-митохондриального N-конца, двух экстрамитохондриальных петель и двух внутри-митохондриальных петель. Белок-транслокатор имеет короткий N-конец и более длинный С-конец, на котором идентифицирован Cholesterol recognition/interaction amino acid consensus sequence - CRAC motif, L/VX1-5YX1-5R/K) [43]. Показано, что пептид С-конца (аминокислоты 144–169) имеет спиральную конформацию для фрагмента с I.144 до S159. Там образуется впадина, вмещающая молекулу холестерина. Пять трансмембранных доменов TSP0 соединяются двумя экстрамитохондриальными и двумя внутри-митохондриальными петлями. Петли 1 и 3 локализованы с цитоплазматической стороны мембраны, а петли 2 и 4 направлены внутрь митохондрий. Показано, что TSP0 может функционировать как переносчик холестерина [44]. Установлено, что TSP0 в мономерной форме (18 кДа) связывает высокоаффинный лиганд 1-(2-хлорфенил)-N-метил-N-(1-метилпропил)-3-изохинолинкарбоксамид (PK11195) и холестерин. Белок способен образовывать как гомо-олигомерные комплексы TSP0, так и гетеро-олигомеры с другими белками. Образование олигомеров коррелирует с увеличением уровня активных форм кислорода, которые индуцируют ковалентное связывание мономеров. Активные формы кислорода способствуют образованию гомополимеров TSP0, формируемых из 18 кДа мономеров, связанных дитиозиновыми связями [45]. Такие гомополимеры меньше связывают холестерина, но эффективнее связывают другие лиганды. Возможно, олигомеры TSP0 являются функциональными единицами, ответственными за лиганд-активируемое связывание холестерина [46].

## Синтетические и эндогенные лиганды

**Холестерин.** Являясь белком-рецептором, TSP0 имеет лиганды как эндогенные, такие как как холестерин и порфирины, так и синтетические, которые широко используют при изучении функционирования TSP0 [47]. Холестерин, участвует в биосинтезе стероидов, лимитирующие стадии которого протекают в митохондриях при участии TSP0. Начальная стадия стероидогенеза, превращение холестерина в прегненолон, происходит на внутренней мембране митохондрий, на которую с внешней мембраны TSP0 транспортирует холестерин. Одной из основных функций TSP0 в митохондриях является осуществление транспорта холестерина и порфирина с внешней мембраны на внутреннюю мембрану [48, 49]. В связи с этим следует отметить, что было обнаружено связывание холестерина и с VDAC. При фракционировании митохондрий печени в препарате контактных сайтов был идентифицирован VDAC. Препарат контактных сайтов, разделяли методом аффинной колоночной хроматографии (к холестерину), в результате которой была обнаружена фракция, содержащая белок с молекулярной массой 32 кДа, взаимодействующий с холестерином. 32 кДа белок был идентифицирован как VDAC, используя метод SDS-PAGE и NALDI-TOF масс-спектрометрию [50]. Кроме VDAC в контактных сайтах митохондрий концентрируется и TSP0 [51].

В изучении функции TSP0 значительно помогло использование его синтетических лигандов, которые имеют диагностическое и терапевтическое приложение. В частности, они вызывают ослабление клеточной пролиферации при опухолевом росте [52], демонстрируют нейропротекторный эффект [53].

**Протопорфирин PPIX.** Другим эндогенным лигандом являются порфирины, включающие протопорфирин IX, мезопорфирин IX, дейтеропорфирин IX и гемин, с высокими аффинностями ( $K_i = 14,5; 23,1; 31,3$  и  $40,6$  нМ соответственно). Порфирины – тетрапиррольные пигменты, образующиеся при биосинтезе гема, являются необходимыми компонентами простетических групп митохондриальных цитохромов, гемоглобина и других гем-содержащих белков. Было установлено, что дикарбоновые порфирины, в том числе мезопорфирин IX и дейтеропорфирин IX, а также гем значительно ингибируют связывание PK1195, в то время как продукты катаболизма гема линейные тетрапирролы – проявляют активность в более высоких микромолярных концентрациях [54]. В связи тем, что поздние стадии биосинтеза гема осуществляются в митохондриях, было выдвинуто предположение, что TSP0 может участвовать в транспорте интермедиатов биосинтеза гема и порфиринов [55]. Возможно, при осуществлении этого транспорта вовлекается и VDAC. Существует ряд исследований, демонстрирующих, что TSP0 в нативном состоянии связывается с несколькими белками-партнерами. Он взаимодействует с VDAC и транслоказой адениновых нуклеотидов (ANT), образуя тримерный комплекс, ранее называемый периферическим бензодиазепиновым рецептором [56].

Следует отметить, что некоторые продукты порфириновой природы действуют не только на TSP0, но и на тримерный комплекс, состоящий из VDAC, TSP0 и ANT. Показано, что в изолированных митохондриях сердца крысы гемин индуцирует открытие неспецифической митохондриальной поры. Из препаратов митохондрий выделяли комплекс VDAC/TSP0/ANT, который



затем встраивали в искусственные бислойные липидные мембраны (БЛМ). Оказалось, что гемин вызывает закрытие канала, формируемого этим комплексом [57]. В дополнение к холестерину и порфирину, большой интерес представляет такой эндогенный лиганд TSPO, как DBI/ACBP (diazepam binding inhibitor/Acyl-coenzyme A binding protein). Название DBI связано со способностью белка связываться с TSPO с очень высоким сродством и делать его недоступным для других лигандов, т.е. ингибировать связывание лигандов TSPO [58]. Этот же эндогенный лиганд имеет второе название ацил-коазим А-связывающего белка, вследствие его способности связывать тиоэфиры жирных кислот и кофермента А [59]. Определение аминокислотной последовательности DBI и ACBP показало их идентичность. К эндогенным лигандам TSPO относят и фосфолипазу А<sub>2</sub>, а в качестве белков-партнеров кроме VDAC и ANT, рассматривают циклофилин А и D, гексокиназу, креатинкиназу, переносчик фосфата и белки семейства Bcl-2 [60].

**PK11195.** Наиболее изученным синтетическим лигандом TSPO является лиганд PK11195, который связывается с TSPO при наномолярных концентрациях. PK11195 используют как зонд при томографии для визуализации воспалений мозга у пациентов с нейрональными повреждениями [61]. Изучение трехмерной структуры комплекса TSPO-PK11195 показало, что в формировании комплекса участвуют пять трансмембранных спиралей белка. Идентифицировано наличие 61 контактных мест для связывания PK11195 с TSPO. В контактах определены такие аминокислоты, как Ala23, Val26, Leu49, Ala50, Phe52, Trp107, Ala110, Leu114, Ala147 и Leu150. Связывание PK11195 с TSPO приводит к стабилизации трехмерной структуры белка, что способствует транспорту холестерина [62]. Было исследовано влияние PK11195 и рекомбинантного TSPO на реконструированные искусственные фосфолипидные мембраны (БЛМ) и было обнаружено, что присутствие микромолярных концентраций PK11195 вызывает изменения в структуре БЛМ. Присутствие PK11195 формирует более упорядоченные структуры и уменьшает текучесть мембран [63]. Поскольку TSPO действует как переносчик холестерина, то связывание с PK11195 может вызывать конформационные изменения TSPO, необходимые для усиления транспорта холестерина [64].

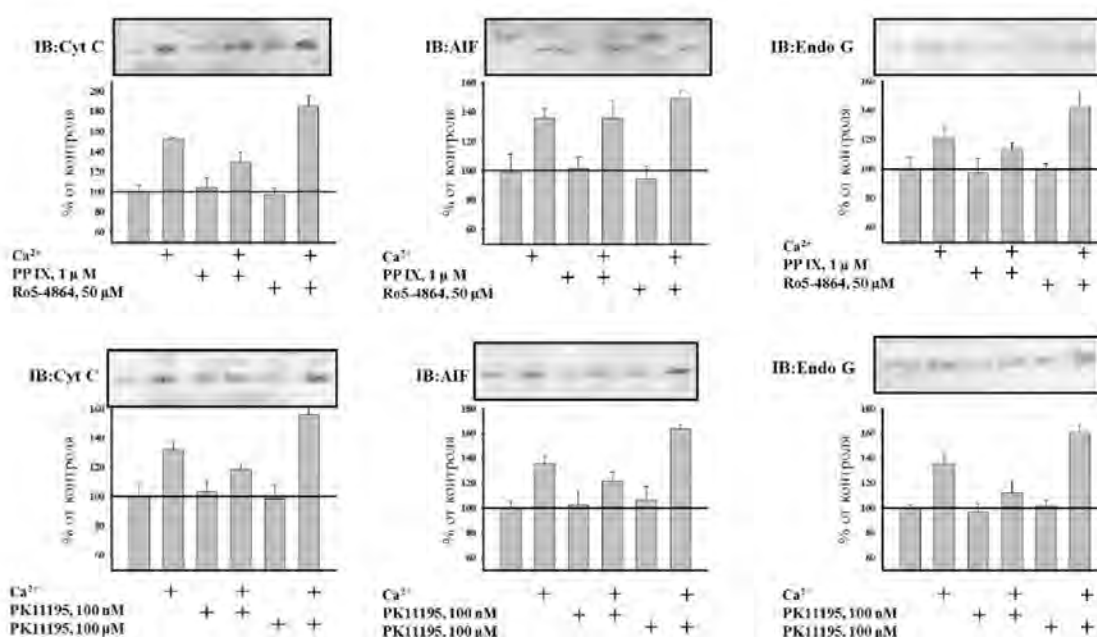
### **TSPO и VDAC в мPTP и в апоптозе**

Многие годы изучения TSPO выявили, что этот белок вовлекается в основные клеточные процессы, такие как апоптоз и аутофагия, взаимодействуя с VDAC. Этот комплекс может осуществлять сигнальные и регуляторные функции. Связь TSPO с функционированием мPTP также интенсивно изучалась. Было установлено, что лиганды TSPO способны модулировать открытие мPTP [65], влиять на клеточный цикл и вызывать индукцию апоптоза [66]. В работе Мазер и др. была показана функциональная роль TSPO в клеточной гибели на первичной культуре человеческого рака прямой кишки и клеточных линиях HT29, LS174T и Colo320 DM. Обнаружено, что лиганды TSPO FGIN-1-27, PK11195 и Ro 5-4864 ингибировали клеточную пролиферацию. В их присутствии отмечали уменьшение трансмембранного потенциала митохондрий и увеличение активности каспазы-3, что позволило авторам рассматривать TSPO как новую терапевтическую мишень при лечении рака прямой кишки [66]. В

некоторых работах про-апоптическую роль TSP0 связывают с увеличением уровня экспрессии TSP0 в раковых клетках или со способностью синтетических лигандов PK11195 и Ro5-4864 стимулировать апоптоз в культуре, например, в hepatic stellate cells [67-69]. Но в некоторых экспериментах наблюдали и анти-апоптотические функции TSP0, в частности, уменьшение окислительного стресса или подавление индукции почечного тубулярного апоптоза при ишемии/реперфузии [70]. Непосредственно участвуя в процессах деградации и гибели клеток, TSP0, по-видимому, является одним из важных участников апоптоза.

Локализация TSP0 в митохондриях и активация открытия мPTP лигандами TSP0 указывают на вовлечение TSP0 в регуляцию неселективной поры, которая формируется как следствие повышения проницаемости внутренней мембраны митохондрий [67]. Увеличение проницаемости внутренней мембраны происходит при достижении сверхпороговых концентраций кальция в матриксе митохондрий или в ответ на окислительный стресс. Формирование поры позволяет соединениям с молекулярной массой до 1.5 кДа диффундировать через нее. Активация неселективной поры характеризуется падением мембранного потенциала, набуханием митохондрий и выходом из митохондрий апоптотических факторов, таких как цитохром c, AIF, Endo G. и др. [71]. Несмотря на многолетние исследования, природа поры, существование одной или нескольких пор, их структура, а также механизмы регуляции неселективной поры до сих пор не установлены [5, 72-74]. Прямое участие TSP0 в мPTP было показано нами, в частности, при изучении влияния TSP0 антител, выработанных к N-концевому фрагменту TSP0 мышей (аминокислотные остатки 9-27, с последовательностью (VGLTLVPSLGGFMGAYFVR) [75]. Аминокислотные остатки этого фрагмента (9-й остаток из N-конца) TSP0 расположены в первом трансмембранном домене, но несколько аминокислот располагаются в первой петле, ориентированной в цитоплазму, поэтому добавление антител к суспензии митохондрий предполагало доступность антител для TSP0 и возможность взаимодействия с рецептором. В результате экспериментов оказалось, что анти-TSP0 антитела способны предотвращать открытие мPTP в митохондриях концентрационно-зависимым образом, указывая на потенциальное вовлечение TSP0 в индукцию мPTP [76]. Ингибирующая способность антител была значительно эффективнее циклоспорина А, известного блокатора поры. Эффект антител был специфичным, поскольку замена анти-TSP0 антител на бычий сывороточный альбумин или на неродственные другие антитела не приводила к предотвращению открытия поры. Обнаружено также, что антитела к TSP0 специфически подавляют  $Ca^{2+}$ -индуцируемый выход кальция из митохондрий. В присутствии антител величина кальциевого выброса, определяемая как величина высвобождаемого  $Ca^{2+}$ , была в три раза ниже по сравнению с контролем. На основании этих данных нами было выдвинуто предположение, что анти-TSP0 антитела специфически подавляют систему высвобождения  $Ca^{2+}$  в митохондриях мозга крысы [76].

Вовлечение С-конца, на котором идентифицирован Cholesterol recognition/interaction amino acid consensus sequence - CRAC motif, L/VX1-5YX1-5R/K [43] не было исследовано до недавнего времени. Мы проверили как влияет синтезированный CRAC пептид (VLNYYVW), обладающий способностью связывать холестерин на индукцию открытия мПТР в митохондриях печени и мозга. Было показано, что пептид VLNYYVW обладал свойством стабилизировать митохондрии и придавать им устойчивость к открыванию поры. Однако, лиганд PK11195 устранял эту устойчивость митохондрий, если его добавляли вместе с – CRAC пептидом (Azarashvili и сотрудники, в печати International J Mol Science). Недавно, был получен ингибитор CRAC домена, 19-Atriol. Было обнаружено, что, 19-Atriol индуцирует открытие мПТР в митохондриях, вызывая деполяризацию внутренней мембраны, стимулируя



**Рисунок 1.** Влияние лигандов TSPO на выход проапоптотических факторов из митохондрий. Верхняя панель – действие Ro5-4864 и PPIX, нижняя – действие PK11195 высокоамплитудное набухание и увеличивая Ca<sup>2+</sup>-индуцируемый выход кальция из митохондрий (Azarashvili и сотрудники, в печати International J Mol Science). Результаты указывают, что С-конец TSPO, в частности CRAC домен может принимать участие в регуляции функционирования неселективной поры. Следующие подтверждения участия TSPO в изменении проницаемости внутренней мембраны митохондрий были получены при исследовании выхода апоптогенных факторов в результате индукции открытия мПТР. Было установлено, что в условиях мПТР происходит выход в цитозоль апоптоз индуцирующего фактора (AIF), который непосредственно индуцирует конденсацию ядерного хроматина и фрагментацию низкомолекулярной ДНК. Высвобождение AIF из митохондрий, нагруженных кальцием, (в условиях открытой поры), полностью подавляется анти- TSPO антителами [76]. Поскольку AIF является одним из основных факторов каспаз-независимого апоптоза, то можно предположить, что TSPO, возможно, контролирует начальную стадию каспаз-независимого пути апоптоза [76, 77]. Это предположение получило подтверждение в экспериментах по выходу апоптогенных факторов цитохрома c, AIF и Endo G под действием лигандов TSPO (Рис. 1). Было показано также, что

такие лиганды TSP0 как PK11195, PPIX и Ro5-4864, используемые в микромолярном диапазоне концентраций, стимулируют  $Ca^{2+}$ -индуцируемое открытие мПТР в изолированных митохондриях печени и мозга [76, 77]. Было установлено, что PPIX при концентрации 1 мкМ стимулирует набухание митохондрий и снижение мембранного потенциала, однако, не влияет на выход апоптогенных факторов.

Ro5-4864 (50 мкМ) увеличивает выход цитохрома *c* и Endo G и не влияет на выход AIF. PK11195 при концентрации 100 нМ, предотвращающей открытие поры, уменьшает выход исследованных апоптогенных факторов, в то время как при концентрации 100 мкМ, стимулирующей открытие поры, наблюдается значительная активация выхода цитохрома *c*, AIF и Endo G из митохондрий мозга. Как сказано выше одной из важнейших способностей TSP0 является способность регулировать пролиферацию и апоптоз в различных тканях и органах. В литературе отмечается, что высокий уровень TSP0 согласуется с высокой степенью пролиферации, а повышение экспрессии TSP0 коррелирует с повышением степени агрессивности опухолей [7, 78-81]. При этом остается актуальным вопрос, каким образом VDAC1 опосредует выход апоптогенных факторов через внешнюю мембрану. Предполагается, что VDAC1 является мишенью как для про-, так и для анти-апоптотических белков семейства Bcl-2 и вовлекается в процесс выхода апоптогенных факторов из митохондрий. Существуют данные, свидетельствующие, что про-апоптотические белки BAX и BAK могут стимулировать выход цитохрома *c* из липосом, содержащих VDAC, через образование большой поры, содержащей VDAC и B/BAK [82-84]. Интересно отметить, что BAX содержит CRAC motif, что указывает на возможное его взаимодействие не только с VDAC, но и с TSP0.

С другой стороны, Madesh and Hajnóczky нашли, что для выхода цитохрома *c* достаточно одного VDAC [85]. Ростовцева и др. не обнаружили взаимодействия между VDAC и BAX, но показали, что tBID может индуцировать закрытие каналов VDAC [29]. Предполагают, что при индукции апоптоза происходит олигомеризация VDAC1, которая сопровождается формированием новой большой поры, позволяющей белкам, подобным цитохрому *c*, проникать через нее. Некоторые исследователи рассматривают олигомеризацию VDAC1 как важную стадию в митохондриальном апоптозе, предполагая, что олигомеры формируют пути выхода цитохрома *c* из межмембранного пространства митохондрий [86-88].

Ранее VDAC рассматривали как структурный компонент мПТР, однако, в результате проведения экспериментов по выявлению эффекта делеции трех генов VDAC (VDAC1, VDAC-2, и VDAC-3) на апоптоз, зависимый от митохондрий [89], выяснилось, что VDAC не является обязательным для формирования поры и не является ее структурным компонентом, оставаясь при этом одним из главных регуляторов функционирования мПТР. Возможно, что в регуляции апоптоза и выходе апоптогенных факторов VDAC и TSP0 функционируют в комплексе. И если VDAC и ANT не являются структурными компонентами поры, тем не менее, они вместе с TSP0 способны формировать функциональный комплекс, известный ранее как периферический бензодиазепиновый рнцептор [56]. Мы показали выше, что лиганды TSP0 модулируют выход апоптогенных факторов из митохондрий, в которых VDAC

не подвергался никаким воздействиям. Но было исследовано также влияние лигандов TSPO (PPIX и PK11195) на индукцию мПТР при закрытом состоянии каналов VDAC (в присутствии блокатора каналов G3139). В настоящее время G3139 (Oblimersen Genasense, Bcl-2 antisense) - синтетический фосфоротиоат 18-мерного олигонуклеотида одноцепочечной ДНК, является единственным эффективным блокатором VDAC [90, 91]. Чтобы определить, связывается ли G3139 непосредственно с VDAC, его добавляли к очищенным препаратам VDAC, встроенным в искусственные фосфолипидные мембраны. Определили, что каналы VDAC в присутствии 5-10 мкМ G3139 при потенциале -40 mV переходят в закрытое состояние (поскольку G3139 является заряженной молекулой). В связи с этим предположили, что блокирующее действие G3139 зависит от потенциала. Блокирование VDAC в присутствии G3139 зависит линейно от концентрации G3139, указывая, что связывание происходит в соотношении 1:1 [92, 93]. G3139 блокирует VDAC только в том случае, если канал находится в открытом состоянии. Когда VDAC находится в одном из его закрытых состояний, G3139 не может его заблокировать. Следует отметить, что G3139, индуцируя полное закрытие VDAC, блокирует и вход кальция, и это состояние отличается от закрытия VDAC, зависящего от потенциала. Нами было обнаружено, что добавление 5 мкМ G3139 к суспензии очищенных митохондрий мозга приводит к инициации открытия неселективной поры, сопровождаемое снижением пороговой концентрации кальция и уменьшением времени лаг-фазы перед  $Ca^{2+}$ -индуцированным выходом кальция из митохондрий. Одновременное добавление PPIX (лиганда TSPO) и G3139 к митохондриям ускоряло открытие поры, по сравнению с контролем и по сравнению с эффектом, вызванным только PPIX или G3139. Несожданный эффект наблюдали после одновременного добавления к суспензии митохондрий мозга 100 нМ PK11195 и G3139 [94]. Ранее нами было показано, что в присутствии только 100 нМ PK11195 происходит стабилизация митохондрий, вследствие того, что при этой концентрации PK11195 предотвращается открытие поры [95]. При одновременном присутствии 100 нМ PK11195 и G3139 в суспензии митохондрий происходит ускорение открытия мПТР. При этом резко снижается как пороговая концентрация кальция, необходимая для открытия поры, так и время лаг-фазы, т.е. способность удерживать кальций в митохондриях. Эти данные позволяют предположить, что TSPO и VDAC могут совместно регулировать проницаемость мембран митохондрий.

### **Регуляция функционирования VDAC и TSPO посредством фосфорилирования**

Рассматривая возможные механизмы регуляции проницаемости внешней мембраны и, в частности, регуляцию проводимости VDAC, следует отметить, что как сам VDAC, так и его белки-партнеры могут быть пост-трансляционно модифицированы, в частности, путем их фосфорилирования протеинкиназами. К настоящему времени в митохондриях клеток млекопитающих обнаружены и идентифицированы cAMP-зависимые и независимые протеинкиназы [96], а также особые якорные белки, связывающие протеинкиназы [97], фосфатазы и фосфодиэстеразы [98]. В митохондриях обнаружена и аденилатциклаза, синтезирующая вторичный мессенджер 3',5'-cAMP. Аденилатциклаза вместе с

фосфодиэстеразой регулирует как уровень сАМР в митохондриях, так и активность протеинкиназ [99].

В результате многолетнего изучения изменения статуса фосфорилирования мембранно-связанных митохондриальных белков, коррелируемого с присутствием в среде сверхпороговых концентраций кальция, инициирующих открытие поры, нами было выявлено, что в этих условиях происходит изменение уровня фосфорилирования некоторых белков. Эти фосфобелки разделяли методом электрофореза в SDS-PAGE с последующим проведением Western blot и масс-спектрометрии белков. Таким образом были детектированы белки с молекулярными массами в области 65-67 кДа, 43-47 кДа, (идентифицированных как коннексин43 и фосфодиэстераза 2',3'-циклических нуклеотидов с молекулярной массой 46 кДа), 30-32 кДа [100] и низкомолекулярного гидрофобного пептида, идентифицированного как субъединица с FoF<sub>1</sub>-АТФ-синтетазы [101]. Также было выявлено, что лиганды 18 кДа TSPO, были способны влиять на включение [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ, т.е. модулировать статус фосфорилирования тех же белков кальций-зависимым образом [76]. Было установлено, что VDAC подвергается фосфорилированию протеинкиназами. Вид протеинкиназ, принимающих участие в фосфорилировании поринов и белков, взаимодействующих с ним, рассмотрены ниже.

**Протеинкиназа А.** VDAC, выделенный из митохондрий печени, может быть фосфорилирован *in vitro* каталитической субъединицей сАМР-зависимой протеинкиназы А (ПКА). В результате экспериментов, выполненных на бислойных липидных мембранах, обнаружено, что фосфорилирование VDAC приводит к уменьшению проводимости канала [22, 102].

Вовлечение TSPO в функционирование неселективной поры происходит, по-видимому, на уровне ее регуляции посредством фосфорилирования. Функционирование самого TSPO также регулируется фосфорилированием, осуществляемым протеинкиназой А (ПКА) [103]. Это подтверждается тем фактом, что TSPO взаимодействует с белком, связывающим регуляторные субъединицы ПКА RIa and RIa, действуя подобно якорному белку A-kinase anchoring protein. Этот белок первоначально был обозначен как PAP7 (PBR-associated protein). Недавно было установлено, что PAP7 является членом семейства белков, содержащих acyl-CoA-связывающий домен (ACBD), в частности ACBD3 [104]. Роль PAP7 в различных механизмах передачи сигнала сАМР близка к роли АКАР (A-kinase anchor proteins) [75]. Кроме этого, нами было выявлено, что лиганды TSPO, такие как PK11195, Ro5-4864 и PPIX, модулируют статус фосфорилирования митохондриальных мембранно-связанных белков, которое коррелирует с индукцией открытия мПТР. Было показано, что CsA и анти-TSPO антитела увеличивали включение [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ в белки и предотвращали открытия поры [77, 95, 105]. Полученные данные позволили выстроить систему регуляции мПТР, осуществляемую TSPO комплексом, состоящим из PAP7 и регуляторной субъединицей Ia (ПКА-RIa). Недавно был идентифицирован регуляторный комплекс, состоящий из PKA-ACBD3-TSPO-VDAC, который переносит холестерин из внешней мембраны на P450sc и передает сигналы, модулирующие функции митохондрий. Этот комплекс назвали трансдусома (transducesome) [106-109]. Когда комплекс PAP7/ACBD3 ассоциирован с митохондриями, он может служить местом

связывания для PKA [110] и фосфорилирования TSPO. Сигнал фосфорилирования может быть транслирован с TSPO на VDAC, а затем на ANT [76]. ANT, будучи частью АТФ синтазосомы, может контактировать с субъединицей *c* FoF<sub>1</sub>-АТФазы [111]. В результате последовательности такой передачи сигнала, может происходить регуляция статуса фосфорилирования субъединицы «с», которая рассматривается в настоящий момент, как возможный структурный элемент мРТР [101; 112; 113].

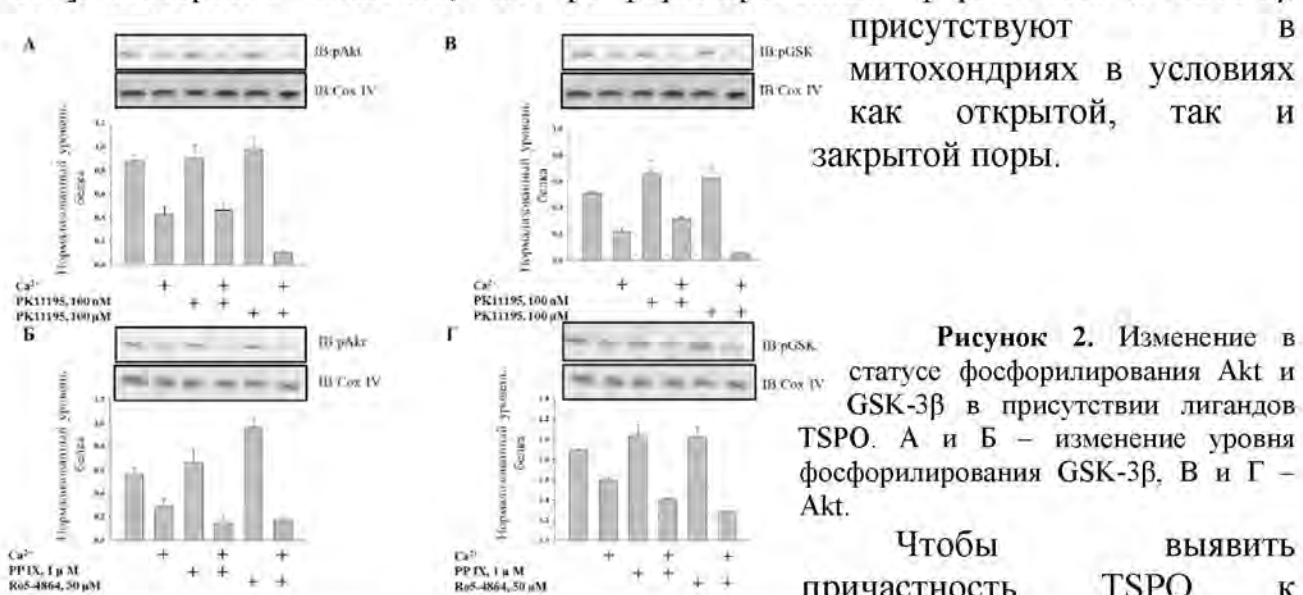
**Протеинкиназа С эпсилон (PKC<sub>ε</sub>)** колокализуется в митохондриях с VDAC1, ANT1 и гексокиназой II *in vivo* [32, 114, 115]. Однако только VDAC1 непосредственно связывает PKC<sub>ε</sub> *in vitro*. Следовательно, способность ANT и гексокиназы кооперироваться с PKC<sub>ε</sub> может происходить только через их взаимодействие с VDAC. Кроме этого, было установлено, что, связываясь с VDAC, рекомбинантная PKC<sub>ε</sub> может его фосфорилировать [115]. Интересно отметить, что сверх-экспрессии PKC<sub>ε</sub> в митохондриях мышей коррелирует с высоким статусом фосфорилирования ERK, локализованной в межмембранном пространстве митохондрий [32, 114, 115]. Фосфорилирование ERK предотвращает индукцию открытия мРТР, вследствие фосфорилирования киназы гликогенсинтетазы 3 бета (GSK-3β) [32, 114, 115]. Так как PKC<sub>ε</sub> тесно взаимодействует с VDAC1 и ANT1, рассматриваемые в качестве модуляторов мРТР, то предположили, что PKC<sub>ε</sub>, находясь в межмембранном пространстве митохондрий в активном состоянии, может ингибировать индукцию мРТР через ERK-GSK-3β сигнальные пути [116].

**Тирозиновая протеинкиназа.** К настоящему моменту накопились данные, указывающие на возможность фосфорилирования митохондриальных белков по тирозиновым остаткам. Тирозиновое фосфорилирование увеличивается в ответ на редокс-сигналы. Это представляет особый интерес в случае с митохондриями, т.к. они являются основным источником активных форм кислорода (АФК) [117]. Члены семейства Src киназ и тирозиновых фосфатаз Shp-2 были первыми тирозиновыми киназами и фосфатазами, обнаруженными в митохондриях [118]. Среди митохондриальных фосфобелков, фосфорилированных по тирозину, идентифицированы ANT, VDAC, гексокиназа и креатинкиназа. Можно предположить, что фосфорилирование VDAC, осуществляемое, тирозиновой протеинкиназой модулирует его функцию или изменяет его конформацию, влияя на взаимодействие с другими белками [116, 119, 120].

**Akt киназа (протеинкиназа B),** существующая в трех изоформах, присутствует в митохондриях. В митохондриях Akt обнаружена во внешней и внутренней мембранах, а также в матриксе. В митохондриях Akt фосфорилирует субъединицу β АТФ-синтетазы, GSK-3β и митохондриальную форму гексокиназы II, которая способствует ассоциации НК II с VDAC [121]. Результатом такой ассоциации является снижение проводимости пориновых каналов. На изолированных митохондриях сердца, используя рекомбинантную Akt, было показано, что она непосредственно фосфорилирует VDAC [122].

**GSK-3β.** Киназа-3-бета гликогенсинтетазы является одной из нескольких протеинкиназ, фосфорилирующих и инактивирующих гликогенсинтетазу, конечный фермент в биосинтезе гликогена. Она существует в двух родственных изоформах GSK-3α и GSK-3β, экспрессирующихся в тканях животных. Функционирование GSK-3β высоко регулируется посредством

фосфорилирования и образования белковых комплексов. Активность GSK-3 $\beta$  подавляется, когда киназа фосфорилирована по Ser 9. В фосфорилировании серина-9 участвуют протеинкиназы Akt, PKC, PKA, PKG и ERK [35, 122], а фосфорилирование GSK-3 $\beta$  по тирозину-216 увеличивает ее ферментативную активность [35, 123, 124], указывая на сложную регуляцию GSK-3 $\beta$ . Самый большой пул GSK-3 $\beta$  находится в цитозоле, где фермент менее активен, по сравнению с GSK-3 $\beta$ , локализованной в ядрах и митохондриях [35, 123, 124]. Интересно, что GSK-3 $\beta$  предпочитает в качестве своих мишеней белки, которые уже предварительно фосфорилированы другими киназами. Было показано, что в составе VDAC существует фрагмент (motif 51-55) аминокислотной последовательности для фосфорилирования при помощи GSK-3 $\beta$ . Мутация Thr51 на аланин приводит к неспособности GSK-3 $\beta$  фосфорилировать VDAC. Интересно, что этот участок расположен на стороне внешней мембраны митохондрий, обращенной в цитозоль и близок к Glu72, остатку, который считается критичным для способности VDAC связываться с гексокиназами I и II. Поскольку VDAC обладает множеством мест фосфорилирования, возможно, физиологическая регуляция VDAC достигается через механизм двойного фосфорилирования, включая Akt или тирозиновую киназу для первичного фосфорилирования, а GSK-3 $\beta$  для вторичного фосфорилирования [35, 122, 123, 125]. Интересно отметить, что фосфорилированные формы Akt и GSK-3 $\beta$



Чтобы выявить причастность TSPO к регуляции мРTP стресс-киназами, нами было исследовано влияние лигандов TSPO на статус фосфорилирования Akt и GSK-3 $\beta$ . На рисунке видно, что PPIX, Ro5-4864 и PK11195, ускоряющие открытие поры, снижают статус фосфорилирования Akt и GSK. Таким образом, в регуляции функций митохондрий, осуществляемой разными протеинкиназами, принимают участие TSPO и VDAC, действие которых, возможно, скоординировано.

### Заключение и перспективы

Суммируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что VDAC и TSPO, локализованные в мембранах митохондрий, являются трансмембранными белками внешней мембраны, но присутствуют и в контактных сайтах, формируемых внешней и внутренней мембранами. VDAC и TSPO обладают способностью связывать холестерин, указывая на возможное их присутствие в



структурах, подобных липидным рафтам. TSP0 со-локализуется с VDAC и способен сам или через свои лиганды модулировать проводимость каналов VDAC. Оба белка регулируются посредством фосфорилирования, осуществляемого такими протеинкиназами, как PKA, PKC, тирозиновой PK, а также при участии стресс-киназ Akt-GSK-3 $\beta$ . Регулируя проводимость VDAC, TSP0 может контролировать проницаемость внешней мембраны, а также мРTP и апоптоз.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 16-04-00927, 14-04-00625) и гранта Правительства РФ (14.Z50.31.0028).

#### *Список литературы*

1. Colombini M (2012). *Biochim Biophys Acta*. 1818,1457-1465.
2. Geula S, Naveed H, Liang J, Shoshan-Barmatz V (2012). *J Biol Chem*. 287,2179-2190.
3. Zachariae U, Schneider R, Briones R, Gattin Z, Demers JP, Giller K, Maier E, Zweckstetter M, Griesinger C, Becker S, Benz R, de Groot BL, Lange A (2012). *Structure*. 20,1540-1549.
4. Mertins B, Psakis G, Essen LO (2014). *Biol Chem*. 395,1435-1442.
5. Szabo I, Zoratti M (2014). *Physiol Rev*. 94,519-608.
6. Shoshan-Barmatz V, De P, V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N (2010). *Mol Aspects Med*. 31,227-285.
7. Shoshan-Barmatz V, Golan M (2012). *Curr Med Chem*. 19,714-735.
8. Rostovtseva T, Colombini M (1997). *Biophys J*. 72,1954-1962.
9. Amodeo GF, Scorciapino MA, Messina A, De P, V, Ceccarelli M (2014). *PLoS One*. 9,e103879.
10. Mertins B, Psakis G, Essen LO (2014). *Biol Chem*. 395,1435-1442.
11. Colombini M (2004). *Mol Cell Biochem*. 256-257,107-115.
12. Holmlundedov E, Lemasters JJ (2009). *Arch Biochem Biophys*. 481,226-233.
13. Lieber CS (2005). *Clin Liver Dis*. 9,1-35.
14. Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS (2006). *Curr Pharm Des*. 12,2249-2270.
15. Rostovtseva TK, Komarov A, Beznikov SM, Colombini M (2002). *J Membr Biol*. 187,147-156.
16. Tan W, Colombini M (2007). *Biochim Biophys Acta*. 1768,2510-2515.
17. Rostovtseva TK, Tan W, Colombini M (2005). *J Bioenerg Biomembr*. 37,129-142.
18. Rostovtseva TK, Sheldon KL, Hassanzadeh E, Monge C, Saks V, Beznikov SM, Suckett DL (2008). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105,18746-18751.
19. Thomas L, Blachly-Dyson E, Colombini M, Forte M (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90,5446-5449.
20. Zizi M, Forte M, Blachly-Dyson E, Colombini M (1994). *J Biol Chem*. 269,1614-1616.
21. Yehezkel G, Hadad N, Zaid H, Sivan S, Shoshan-Barmatz V (2006). *J Biol Chem*. 281,5938-5946.
22. Bera AK, Ghosh S (2001). *J Struct Biol*. 135,67-72.
23. Liu MY, Colombini M (1991). *Am J Physiol*. 260,C371-C374.
24. Liu MY, Torgirson A, Colombini M (1994). *Biochim Biophys Acta*. 1185,203-212.
25. Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V (2001). *Biochem J*. 358,147-155.
26. Lee J, O'Neill RC, Park MW, Gravel M, Bruni PE (2006). *Mol Cell Neurosci*. 31,446-462.
27. Mammella CA, Guo XW (1990). *Biophys J*. 57,23-31.
28. Nakashima RA, Mangan PS, Colombini M, Pedersen PL (1986). *Biochemistry*. 25,1015-1021.
29. Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M, Beznikov SM (2004). *J Biol Chem*. 279,13575-13583.
30. Shoshan-Barmatz V, Gincel D (2003). *Cell Biochem Biophys*. 39,279-292.
31. Xu X, Forbes JG, Colombini M (2001). *J Membr Biol*. 180,73-81.
32. Pastorino JG, Hoek JB (2008). *J Bioenerg Biomembr*. 40,171-182.
33. Perevoschikova IV, Zorov SD, Kotova EA, Zorov DB, Antonenko YN (2010). *FEBS Lett*. 584,2397-2402.
34. Guzun R, Gonzalez-Gruillo M, Karu-Virkmaa M, Gréhne A, Usson Y, Kaambre T, Guerrero-Roesch K, Kuznetsov A, Schlatter U, Saks V (2012). *Biochim Biophys Acta*. 1818,1545-1554.
35. Azoulay-Zohar H, Israelson A, bu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V (2004). *Biochem J*. 377,347-355.
36. Rostovtseva TK, Beznikov SM (2012). *Biochim Biophys Acta*. 1818,1526-1535.
37. McEnery MW, Dawson TM, Verma A, Gurley D, Colombini M, Snyder SH (1993). *J Biol Chem*. 268,23289-23296.
38. Veenman J, Shandalov Y, Gavish M (2008). *J Bioenerg Biomembr*. 40,199-205.
39. Frank W, Baur KM, Qudeimat E, Woriedh M, Alhawady A, Ratnadewi D, Grenillon L, Grimm B, Reski R (2007). *Plant J*. 51,1004-1018.
40. Chen MK, Guilarte TR (2008). *Pharmacol Ther*. 118,1-17.
41. Vlodaysky E, Palzur E, Soustiel JF (2014). *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 13,620-629.

42. Brown RC, Degenhardt B, Kotoula M, Papadopoulos V (2000). *Cancer Lett.* 156,125-132.
43. Li H, Papadopoulos V (1998). *Endocrinology*. 139,4991-4997.
44. Bernassau JM, Reversat JL, Ferrara P, Capri D, Lefur G (1993). *J Mol Graph.* 11,236-244, 235.
45. Delavore F, Li H, Hardwick M, Robert JC, Giatzakis C, Perantzi G, Yao ZX, Maccario J, Lacapere JJ, Papadopoulos V (2003). *Biochemistry*. 42,4506-4519.
46. Corsi L, Geminiani E, Baraldi M (2008). *Curr Clin Pharmacol.* 3,38-45
47. Snyder SH (1987). *Isr J Med Sci.* 23,145-152.
48. Gavish M, Bachman I, Shouknan R, Katz Y, Veerman L, Weisinger G, Weizman A (1999). *Pharmacol Rev.* 51,629-650.
49. Papadopoulos V, Amini H, Li H, Yao Z, Brown RC, Vidic B, Culty M (2001). *Therapie.* 56,549-556.
50. Campbell AM, Chan SH (2007). *Arch Biochem Biophys.* 466,203-210.
51. Lacapere JJ, Papadopoulos V (2003). *Steroids.* 68,569-585.
52. Veerman L, Gavish M (2012). *Curr Mol Med.* 12,398-412.
53. Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D, Schumacher M (2010). *Nat Rev Drug Discov.* 9,971-988
54. Verma A, Nye JS, Snyder SH (1987). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84,2256-2260.
55. Wendler G, Lindemann P, Lacapere JJ, Papadopoulos V (2003). *Biochem Biophys Res Commun.* 311,847-852.
56. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89,3170-3174.
57. S: JCLXMECEFW5 (2008). *J Clinical and Basic cardiology.* 11,5.
58. Costa E, Guidotti A (1991). *Life Sci.* 49,325-344.
59. Knudsen J, Hojrup P, Hansen HO, Hansen HF, Roepstorff P (1989). *Biochem J.* 262,513-519
60. Kolodziejczyk A (2015). *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 69,34-50.
61. Owen DR, Matthews PM (2011). *Int Rev Neurobiol.* 101,19-39.
62. Jurenko L, Jurenko M, Giller K, Becker S, Zweckstetter M (2014). *Science.* 343,1363-1366.
63. Miccoli L, Oudard S, Beurdeley-Thomas A, Dutrillaux B, Poupon MF (1999). *Biochem Pharmacol.* 58,715-721.
64. Hatty CR, Le Brun AP, Lake V, Clifton LA, Liu GJ, James M, Banati RB (2014). *Biochim Biophys Acta.* 1838,1019-1030
65. Castedo M, Perfettini JL, Kroemer G (2002). *J Exp Med.* 196,1121-1125.
66. Maaser K, Hopfner M, Jansen A, Weisinger G, Gavish M, Kozikowski AP, Weizman A, Carayon P, Riecken EO, Zeitz M, Schenkl H (2001). *Br J Cancer.* 85,1771-1780.
67. Casellas P, Gallegue S, Basile AS (2002). *Neurochem Int.* 40,475-486.
68. Decaudin D, Castedo M, Nemati F, Beurdeley-Thomas A, De PG, Caron A, Poullart P, Wijdenes J, Rouillard D, Kroemer G, Poupon MF (2002). *Cancer Res.* 62,1388-1393.
69. Fischer R, Schmitt M, Bode JG, Haussinger D (2001). *Gastroenterology.* 120,1212-1226
70. Kunduzova OR, Escourrou G, De La FF, Salvayre R, Seguelas MH, Ledueq N, Bono F, Herbert JM, Parnis A (2004). *J Am Soc Nephrol.* 15,2152-2160.
71. Zoratti M, Szabo I, De MU (2005). *Biochim Biophys Acta.* 1706,40-52.
72. Siemen D, Ziener M (2013). *IOBMB Life.* 65,255-262.
73. Bonora M, Pinton P (2014). *Front Oncol.* 4,302.
74. Bernardi P, Di Lisa F (2015). *J Mol Cell Cardiol.* 78,100-106.
75. Li H, Degenhardt B, Tobin D, Yao ZX, Tasken K, Papadopoulos V (2001). *Mol Endocrinol.* 15,2211-2228.
76. Azarashvili T, Grachev D, Krestinina O, Evtodienko Y, Yurkov I, Papadopoulos V, Reiser G (2007). *Cell Calcium.* 42,27-39.
77. Azarashvili T, Krestinina O, Yurkov I, Evtodienko Y, Reiser G (2005). *J Neurochem.* 94,1054-1062.
78. Basile AS, Weissman BA, Skolnick P (1987). *Brain Res Bull.* 19,1-7.
79. Gonzalez-Polo RA, Carvallo G, Braun T, Decaudin D, Fabre C, Larochette N, Perfettini JL, Djavaheri-Mergny M, Youlyouz-Marfak I, Codogno P, Raphael M, Feuillard J, Kroemer G (2005). *Oncogene.* 24,7503-7513.
80. Hirsch T, Decaudin D, Susin SA, Marchetti P, Larochette N, Resche-Rigon M, Kroemer G (1998). *Exp Cell Res.* 241,426-434
81. McConnis KS, Barnes CP (2012). *Bbi-Bionmembranes.* 1818,1444-1450.
82. Shi Y, Chen J, Weng C, Chen R, Zheng Y, Chen Q, Tang H (2003). *Biochem Biophys Res Commun.* 305,989-996.
83. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999). *Nature.* 399,483-487.
84. Tsujimoto Y, Shimizu S (2000). *Cell Death Differ.* 7,1174-1181.
85. Madesh M, Hajnoczky G (2001). *J Cell Biol.* 155,1003-1015.
86. Shoshan-Barmatz V, Mizrahi D, Keinan N (2013). *Prog Mol Biol Transl Sci.* 117,303-334.
87. Shoshan-Barmatz V, Keinan N, Abu-Hamad S, Tyomkin D, Aram L (2010). *Biochim Biophys Acta.* 1797,1281-1291.
88. Zulk R, Isnielson A, Girty ES, Azoulay-Zohar H, Shoshan-Barmatz V (2005). *Biochem J.* 386,73-83.
89. Barnes CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD (2007). *Nat Cell Biol.* 9,550-555.
90. Lai JC, Tan W, Benimetskaya L, Miller P, Colombini M, Stein CA (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103,7494-7499.
91. Tan W, Lai JC, Miller P, Stein CA, Colombini M (2007). *Am J Physiol Cell Physiol.* 292,C1388-C1397.

92. Tan W (2012). *Biochim Biophys Acta*. 1818,1555-1561.
93. Tan W, Loke YH, Stein CA, Miller P, Colombini M (2007). *Biophys J*. 93,1184-1191.
94. Azarashvili T, Krestinina O, Baburina Y, Odinkova I, Grachev D, Papadopoulos V, Akatov V, Lenesters JJ, Reiser G (2015). *Arch Biochem Biophys*. 587, 70-77.
95. Krestinina OV, Grachev DE, Odinkova IV, Reiser G, Evtodienko YV, Azarashvili TS (2009). *Biochemistry (Moscow)* 74,421-429.
96. Sardanelli AM, Technikova-Dobrova Z, Scacco SC, Speranza F, Papa S (1995). *FEBS Lett*. 377,470-474.
97. Sardanelli AM, Signorile A, Nuzzi R, Rasmo DD, Technikova-Dobrova Z, Drahota Z, Occhiello A, Pica A, Papa S (2006). *FEBS Lett*. 580,5690-5696.
98. Hasunuma K (1983). *J Bacteriol*. 156,291-300.
99. Zippin JH, Chen Y, Nahimey P, Kamenetsky M, Wuttke MS, Fischman DA, Levin LR, Buck J (2003). *FASEB J*. 17,82-84.
100. Azarashvili T, Krestinina O, Galvita A, Grachev D, Baburina Y, Stricker R, Evtodienko Y, Reiser G (2009). *Am J Physiol Cell Physiol*. 296,C1428-C1439.
101. Azarashvili TS, Tyynela J, Odinkova IV, Grigorjev PA, Baunton M, Evtodienko YV, Saris NE (2002) *J Bioenerg Biomembr*. 34,279-284.
102. Bera AK, Ghosh S, Das S (1995). *Biochem Biophys Res Commun*. 209,213-217.
103. Whalin ME, Boujrad N, Papadopoulos V, Krueger KE (1994). *J Recept Res*. 14,217-228.
104. Fan J, Liu J, Culty M, Papadopoulos V (2010). *Prog Lipid Res*. 49,218-234.
105. Azarashvili T, Krestinina O, Odinkova I, Evtodienko Y, Reiser G (2003). *Cell Calcium*. 34,253-259.
106. Issop L, Rone MB, Papadopoulos V (2013). *Mol Cell Endocrinol*. 371,34-46.
107. Liu J, Rone MB, Papadopoulos V (2006). *J Biol Chem*. 281,38879-38893.
108. Miller WL (2013). *Mol Cell Endocrinol*. 379,62-73.
109. Papadopoulos V, Liu J, Culty M (2007). *Mol Cell Endocrinol*. 265-266,59-64.
110. Liu J, Li H, Papadopoulos V (2003). *J Steroid Biochem Mol Biol*. 85,275-283.
111. Chen C, Ko Y, Delamoy M, Ludtke SJ, Chiu W, Pedersen PL (2004). *J Biol Chem*. 279,31761-31768.
112. Azarashvili T, Odinkova I, Bakunts A, Ternovsky V, Krestinina O, Tyynela J, Saris NE (2014). *Cell Calcium* 55,69-77.
113. Krestinina O, Azarashvili T, Baburina Y, Galvita A, Grachev D, Stricker R, Reiser G (2015). *Neurochem Int*. 80,41-50.
114. Baines CP, Song CX, Zheng YJ, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P (2003). *Circ Res*. 92,873-880.
115. Sun L, Shukair S, Naik TJ, Moussef F, Ardelali H (2008). *Mol Cell Biol*. 28,1007-1017.
116. Lewandrowski U, Sickmann A, Cesaro L, Brunati AM, Toninello A, Salvi M (2008). *FEBS Lett*. 582,1104-1110.
117. Changji P (2005). *Free Radic Res*. 39,353-364.
118. Salvi M, Stringaro A, Brunati AM, Agostinelli E, Arancia G, Clari G, Toninello A (2004). *Cell Mol Life Sci*. 61,2393-2404.
119. Cesaro L, Salvi M (2010). *Biofactors*. 36,437-450.
120. Salvi M, Brunati AM, Toninello A (2005). *Free Radic Biol Med*. 38,1267-1277.
121. Bijur GN, Jope RS (2003). *J Neurochem*. 87,1427-1435.
122. Das S, Wong R, Rajapakse N, Murphy E, Steenbergen C (2008). *Circ Res*. 103,983-991.
123. Bijur GN, Jope RS (2003). *Neuroreport*. 14,2415-2419.
124. Jope RS, Johnson GV (2004). *Trends Biochem Sci*. 29,95-102.
125. Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N (2005). *Cancer Res*. 65,10545-10554.

## **Глава 2. УЧАСТИЕ ПАЛЬМИТАТ/ $\text{Ca}^{2+}$ -ИНДУЦИРУЕМОЙ ЛИПИДНОЙ ПОРЫ В ВЫХОДЕ ИОНОВ И ОСЦИЛЛЯЦИИ ИОННЫХ ПОТОКОВ В МИТОХОНДРИЯХ**

Белослудцев К.Н.<sup>1,2</sup>, Белослудцева Н.В.<sup>1</sup>, Сарис Н.-Э.<sup>3</sup>, Миронова Г.Д.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

<sup>2</sup>Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия;

<sup>3</sup>Университет Хельсинки, Хельсинки, Финляндия

### **Аннотация**

Митохондрии играют важную роль в поддержании внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостаза. Считается, что транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  через внутреннюю митохондриальную мембрану осуществляется системами входа и выхода иона: митохондриальным  $\text{Ca}^{2+}$  унипортером и  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  обменниками. Как показано в наших исследованиях, выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из органелл может осуществляться в результате открытия во внутренней мембране митохондрий липидной поры, индуцированной пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$ . Обсуждаются вопросы о механизмах образования и регуляции этой поры и ее возможное участие в ионном гомеостазе клеток.

### **Введение**

Митохондрии играют важную роль в поддержании гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  и внутриклеточной кальциевой сигнализации [1-3]. Система митохондриального транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ , изучение которой началась с середины прошлого века [4], достаточно хорошо охарактеризована с функциональной точки зрения. В течение последних лет был достигнут значительный прогресс и в идентификации ее молекулярных компонентов. Открытие молекулярной структуры  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  обменника в 2010 г. [5] и  $\text{Ca}^{2+}$  унипортера в 2011 г. [6, 7], которые изучались на протяжении долгих лет, помогло практически полностью охарактеризовать всю систему митохондриального  $\text{Ca}^{2+}$  транспорта. Дополнительно были обнаружены и другие белки, участвующие в митохондриальном транспорте иона: рианодинновый рецептор [8], белок *Letm1* [9] и разобщающие белки *UCP2* и *UCP3* [10]. Рециклизация  $\text{Ca}^{2+}$  через внутреннюю митохондриальную мембрану достаточно подробно описана в ряде обзоров [3, 11, 12].

На сегодняшний день известно, что митохондрии играют роль внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  «депо», поглощая ионы кальция, вышедшие из эндоплазматического ретикулума и аккумулируя их в матриксе. Таким образом, митохондриальная система транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  сбалансирована так, что скорость входа кальция в митохондрии во много раз превышает скорость его выхода из органелл. Было показано, что максимальная скорость входа кальция в митохондрии посредством  $\text{Ca}^{2+}$  унипортера в 70 раз выше суммарной скорости выброса иона [13]. Следовательно, можно предположить, что митохондрии находятся под постоянной угрозой  $\text{Ca}^{2+}$  перегрузки. Перегрузка митохондрий ионами  $\text{Ca}^{2+}$  в конечном счете будет приводить к образованию митохондриальной поры – мРТР (*mitochondrial permeability transition*) поры. мРТР пора – белковый мегаканал, состоящий из белков внутренней и внешней мембраны (аденилаттранслокатор, фосфатный переносчик, АТФ-синтаза, порин и ряд других белков) [14]. Открытие этой поры ингибируется циклоспорином А.

Необходимо понимать, что открытие митохондриальной мРТР поры практически всегда будет приводить к клеточной гибели. Однако, несмотря на это в начале 90-х годов прошлого века показано, что циклоспорин А способен значительно увеличивать поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  и снижать его выброс изолированными кардиомиоцитами без влияния на клеточную морфологию и жизнеспособность. Этот эффект специфичен для митохондрий [15]. Подобные результаты были получены недавно на клетках, нокаутированных по циклофилину Д [16, 17]. На основе этих наблюдений П. Бернарди предположил, что именно открытие мРТР поры ответственно за выброс ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из органелл, то есть мРТР пора может быть неспецифической системой выброса ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из органелл [13, 18]. Гипотеза «мРТР как система выброса  $\text{Ca}^{2+}$ » основана на возможном кратковременном («мерцающем») открытии мРТР. Режим открывания мРТР: «постоянный» или «кратковременный» – зависит от концентрации индуцирующих ее агентов, прежде всего,  $\text{Ca}^{2+}$  [19].

Большое преимущество перед мРТР имеет липидная пора, индуцируемая пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$ , охарактеризованная в нашей лаборатории [20, 21]. Во-первых, липидная пора способна самопроизвольно закрываться [22, 23]. В результате этого при открытии поры может происходить быстрый выброс иона из митохондрий, после чего интактность мембраны восстановится, и митохондрии будут функционировать в прежнем режиме. Во-вторых,  $\text{Ca}^{2+}$  является индуктором фосфолипазы  $\text{A}_2$ , что будет приводить к появлению свободных жирных кислот, образованию пор и выбросу иона из митохондрий [24, 25, 26]. В настоящем обзоре обсуждаются вопросы о механизмах образования, регуляции этой поры, и ее возможное участие в рециклизации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через внутреннюю митохондриальную мембрану.

### **Механизм образования липидной поры**

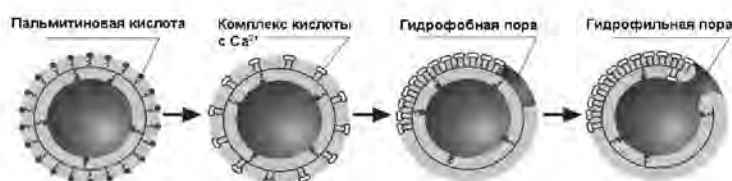
Исследования липидной поры начались в нашей лаборатории в середине 90-х годов прошлого века, когда в липидной фракции экстракта митохондрий, полученной при выделении ионных каналов, был обнаружен неизвестный на тот момент « $\text{Ca}^{2+}$  сенсор» для мРТР [27]. Было показано, что этот неизвестный гидрофобный компонент обладает очень высоким сродством к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ . Как оказалось, в дальнейшем, этим компонентом являются насыщенные длинноцепочечные жирные кислоты (преимущественно пальмитиновая и стеариновая). Было показано, что именно насыщенные жирные кислоты связывают  $\text{Ca}^{2+}$  со сродством, которое на 1-2 порядка выше, чем сродство ненасыщенных жирных кислот и других липидов и сравнимо со сродством ряда белков к этому иону [28].

Изначально было предположено, что свободные насыщенные жирные кислоты являются кофактором для индукции ионами кальция мРТР. Однако, проведенные исследования позволили в конечном итоге сделать вывод о новом типе митохондриальной поры – липидной поры. Во-первых, пальмитиновая и стеариновая жирные кислоты при связывании с  $\text{Ca}^{2+}$  индуцировали появление неспецифической проницаемости для искусственных мембран (БЛМ и липосом) [22, 28]. Во-вторых, модуляторы мРТР (в том числе и циклоспорин А) не влияли на набухание митохондрий, индуцированное пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$  [29, 30]. Кроме того, пальмитат-зависимую проницаемость митохондриальной и

липосомальной мембран можно было индуцировать не только ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , но и другими двухвалентными катионами (например,  $\text{Sr}^{2+}$ ), что находилось в непосредственном противоречии с результатами, описывающими открытие мРТР. Вследствие экспериментов, проведенных на липосомах, был предложен возможный механизм образования липидной поры при связывании ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с жирными кислотами в бислоевой мембране.

Как показано на рисунке 1, связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с анионами жирной кислоты приведет к фазовой сегрегации ПК/ $\text{Ca}^{2+}$ -комплексов в плоскости бислоя в отдельные мембранные домены. Температура плавления пальмитиновой кислоты равна  $63^\circ\text{C}$ , связывание кислоты с  $\text{Ca}^{2+}$  приведет к повышению до  $150^\circ\text{C}$ . Поэтому при физиологических условиях мембранные домены, сформированные комплексами пальмитиновой кислоты с  $\text{Ca}^{2+}$  будут находиться в гель-состоянии.

При отвердевании мембранных доменов, содержащих комплексы пальмитиновой кислоты и  $\text{Ca}^{2+}$ , происходит сокращение их площади, поскольку упаковка углеводородных цепей в упорядоченном гель-состоянии более компактна, чем в жидкокристаллической фазе [31]. По расчётам, сокращение площади может достигать до 20-25% от площади бислоя [32]. В результате



**Рисунок 1.** Схема образования пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной липидной поры в мембране липосом при ламеллярном фазовом переходе (Из [21]).

внешний монослой, в котором произошла сепарация комплексов пальмитиновой кислоты с кальцием, окажется растянутым (в нем возрастет мембранное латеральное натяжение), а внутренний монослой окажется сжатым (произойдет увеличение силы латерального давления). В конечном счете, такой межслойный дисбаланс латеральных сил натяжения/давления приведет к появлению локальных дефектов в мембране, гидрофобных пор, края которых образованы углеводородными цепями липидов. Углеводородные цепи фосфолипидов в гидрофобных порах будут обращены в водную среду, что термодинамически невыгодно. Поэтому произойдет разрыв внутреннего монослоя, после чего края монослоев по периметру разрыва сомкнутся и возникнет гидрофильная липидная пора.

Следует отметить, что образование крупных гидрофильных пор в липидном бислое мембран не является редким явлением. Они образуются в результате осмотического шока, например, при гемолизе эритроцитов [33], электрического пробоя мембран [34], а также при фазовых переходах в липидном бислое [35]. Это предполагает, что липидные поры, такие как митохондриальная

пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированная пора, могут принимать участие в ряде клеточных процессов.

### **Свойства и регуляция митохондриальной липидной поры, индуцированной пальмитиновой кислотой и $\text{Ca}^{2+}$**

Проведенные исследования позволили выявить ряд характерных закономерностей, отличающих липидную пору от белковой мРТР. В отличие от белковых пор, липидные поры являются преходящими (transient) порами, поскольку способны к «самозалечиванию» в результате латеральной диффузии мембранных липидов. Восстановление целостности мембраны происходит достаточно быстро (через доли секунды), но только тогда, когда радиус поры не превышает критической величины (для жидкокристаллического бислоя это примерно 9 нм) [33-36]. Подобное явление мы наблюдали в экспериментах по пермеабиллизации липосом и митохондрий. Стоит обратить внимание на то, что в митохондриях после открытия поры пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдалось падение мембранного митохондриального потенциала. Однако, со временем, потенциал восстанавливался до исходных значений, что говорит о том, что пора в митохондриальной мембране закрылась [23].

Исходя из липидной природы пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры, трудно представить, что механизмы регуляции ее образования будут носить какой-либо специфический характер. В отличие, например, от белковой мРТР, различных ионных каналов, переносчиков и поровых белков, для которых имеются специфические модуляторы [37], специфические ингибиторы липидных пор не известны. В то же время, можно ожидать, что регуляция пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемой поры будет осуществляться либо в результате изменения физико-химических свойств мембраны [32], либо с помощью хелатирующих агентов, которые убирают из системы индукторы поры – то есть, ионы кальция и жирные кислоты. Действительно, ингибиторы (ЦсА, АДФ, дитиотреитол) и активаторы (атрактилозид, неорганический фосфат, тимеросал) мРТР не влияли на открытие пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры в митохондриях и липосомах [20]. В то же время, изменение липидного состава мембраны, или ее поверхностного заряда являлись достаточно мощными модификаторами липидной поры. Так было показано, что экранирование отрицательного поверхностного заряда мембраны приводило к ингибированию образования липидной поры, а появление в мембране такого липида, как кардиолипин, усиливало индукцию поры [38, 39]. Ингибиторами поры являются и хелаторы  $\text{Ca}^{2+}$  (ЭГТА и АТФ), а также бычий сывороточный альбумин, связывающий свободные жирные кислоты [29, 30].

Митохондриальная липидная пора зависит от наличия мембранного митохондриального потенциала. Связано это с тем, что открытие поры происходит на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны. Поскольку вход кальция в митохондрии является электрофоретическим, то в отсутствие мембранного потенциала кальций не будет транспортироваться в митохондрии и накапливаться в митохондриальном матриксе. Это приведет к ингибированию порообразования.

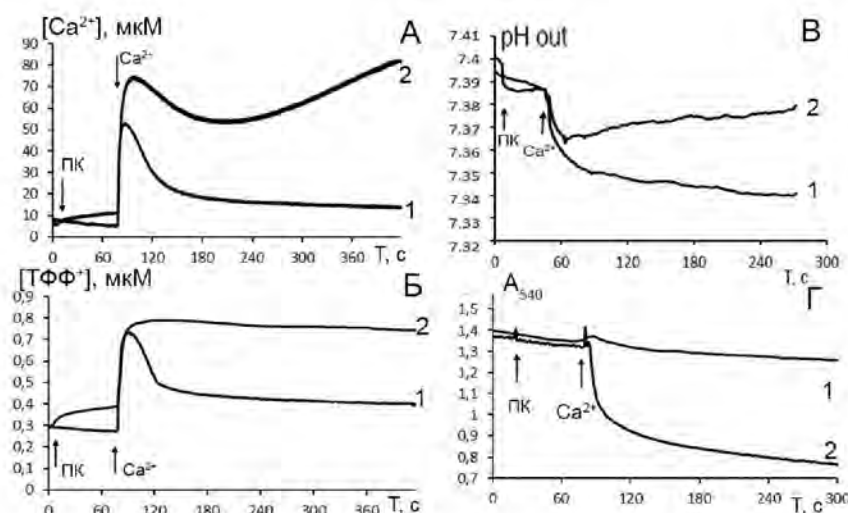
## Пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемая пора как неспецифическая система выброса ионов $\text{Ca}^{2+}$ из митохондрий

Как было сказано выше, участие митохондриальных пор в рециклизации ионов кальция через внутреннюю митохондриальную мембрану в качестве неспецифической системы выброса кальция из митохондрий было предложено в начале 90-х годов прошлого века. Тогда эта роль отводилась исключительно мРТР. Однако, накопление данных позволило нам предсказать и доказать то, что липидная пора, индуцируемая пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$  может являться даже более вероятным участником системы транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  через митохондриальную мембрану.

### Липидная пора как система выброса $\text{Ca}^{2+}$ в условиях добавленной пальмитиновой кислоты

Как известно, добавление  $\text{Ca}^{2+}$  к митохондриям печени крыс приводит к временному увеличению концентрации иона в среде инкубации с последующим практически полным поглощением иона митохондриями (рис. 2). Поскольку скорость поглощения иона  $\text{Ca}^{2+}$  через унипортер значительно выше скорости выброса иона через системы специфического выхода иона ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - или  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен) [13], при физиологических условиях процессы транспорта практически всегда смещены в сторону поглощения иона митохондриями. Вход  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии является энергозависимым, поэтому поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями сопровождается деполяризацией внутренней митохондриальной мембраны и закислением среды инкубации. Однако после того, как произошло поглощение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями, мембранный потенциал восстанавливается практически до исходного уровня. При этом не наблюдается изменения митохондриального объема (рис. 2).

Иную картину мы наблюдаем по всем этим параметрам в присутствии пальмитиновой кислоты. После добавления  $\text{Ca}^{2+}$  к пальмитат-содержащим



**Рисунок 2.** ЦсА-нечувствительные изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (А),  $\text{TF}\Phi^+$  (Б), pH (В) и набухание митохондрий (Г), индуцированные  $\text{Ca}^{2+}$  (1) или пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$  (2). Добавки: митохондрии печени крысы (1 мг белка/мл), 30 мкМ ПК и 65 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (А-В) или митохондрии печени крысы (0.4 мг белка/мл), 15 мкМ ПК и 30 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (Г). (Из [21]).



митохондриям происходило поглощение иона органеллами, однако со временем усиливался выброс иона  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий (рис. 2А, *кривая 2*). Это сопровождалось стойкой и продолжительной деполяризацией внутренней митохондриальной мембраны (рис. 2Б, *кривая 2*). В присутствии пальмитиновой кислоты после добавления  $\text{Ca}^{2+}$  к митохондриям закисление среды инкубации было выражено слабее. При этом со временем происходило восстановление рН среды инкубации практически до начального уровня (рис. 2В, *кривая 2*).

Стоит отметить, что небольшое снижение мембранного потенциала и закисление среды инкубации после добавки пальмитиновой кислоты связано с ее протонофорным действием [40]. Одновременно с деполяризацией, защелачиванием среды инкубации и выбросом  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий наблюдалось набухание органелл (рис. 2Г, *кривая 2*), что свидетельствует об открытии неспецифической поры.

Полученные данные прямо указывают на то, что ЦсА-нечувствительная пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированная пора является системой выброса ионов из органелл. Эта система неспецифическая, поскольку при открытии поры наблюдается выравнивание и других ионных градиентов – в частности, как показано на рис. 2В, градиента ионов водорода. Стоит отметить, что добавление в описанных выше условиях к митохондриям ингибитора  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортера рутения красного через 6-10 минут после открытия пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры приводило к остановке выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из органелл, быстрому восстановлению мембранного потенциала и частичному ингибированию митохондриального набухания [41]. Восстановление митохондриального мембранного потенциала после добавления рутения красного также свидетельствует о том, что пора, индуцированная пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$ , способна самопроизвольно закрываться. Так, в случае открытия мРТР, индуцированной  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии неорганического фосфата, добавление рутения красного не приводило к восстановлению мембранного потенциала [30, 42].

### ***Липидная пора как система выброса $\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{Sr}^{2+}$ ) при активации фосфолипазы $\text{A}_2$***

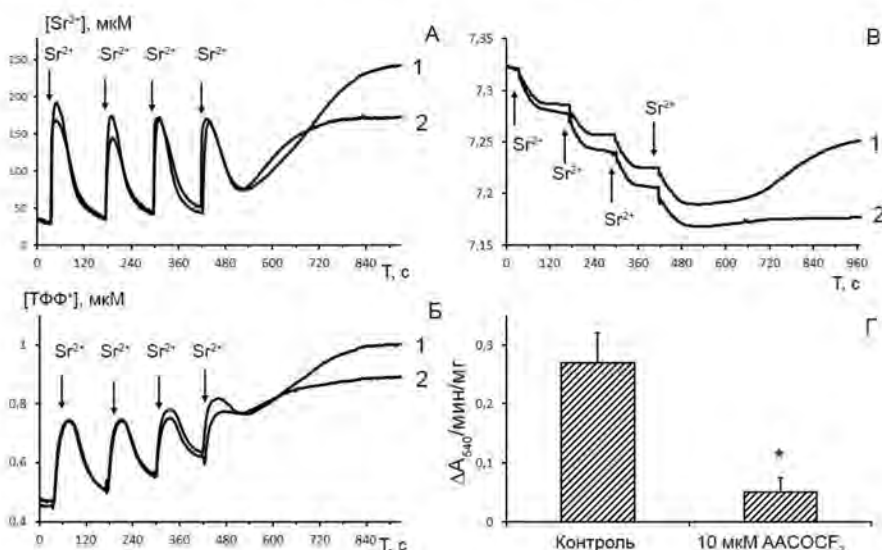
Как было описано в предыдущем разделе, выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий в присутствии добавленной пальмитиновой кислоты опосредуется образованием липидных пор по механизму хемотропного фазового перехода. Механизм этот может, по-видимому, осуществляться в клетке, поскольку биологические мембраны всегда содержат нуль свободных жирных кислот. Отметим, что концентрация добавленной жирной кислоты в предыдущей серии экспериментов превышала уровень эндогенной пальмитиновой кислоты в два раза. Кроме того, высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  активируют митохондриальную фосфолипазу  $\text{A}_2$  [43- 45], что будет приводить к увеличению уровня свободных жирных кислот в митохондриальной мембране. Безусловно, основным продуктом фосфолипазы  $\text{A}_2$  являются ненасыщенные жирные кислоты [26]. Однако накопление насыщенных жирных кислот (C16:0-C18:0) в митохондриальной мембране при инкубации митохондрий с  $\text{Ca}^{2+}$  также показано [28, 46]. Возможно, это происходит вследствие того, что митохондриальная  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая

фосфолипаза  $A_2$  ( $\beta 3$  изоформа) способна гидролизовать фосфолипиды как по *sn-2*, так и по *sn-1* положению (в *sn-1* положении фосфолипидов находятся преимущественно насыщенные жирные кислоты) [26]. Исходя из всего этого, образование липидных пор может, в принципе, запускаться добавлением одного лишь  $Ca^{2+}$  в высоких концентрациях. Подобные события могут происходить при различных стрессовых стимулах – и, в таком случае, образование липидной поры может являться эндогенным механизмом выброса  $Ca^{2+}$  из митохондрий.

Как известно, высокие концентрации  $Ca^{2+}$  вызывают активацию митохондриальной фосфолипазы  $A_2$ , но они являются и индуктором мПТР. Чтобы исключить возможное образование мПТР в исследованиях в качестве миметика кальция зачастую используются ионы  $Sr^{2+}$ . Важное сходство этих катионов состоит в том, что, во-первых,  $Sr^{2+}$ , как и  $Ca^{2+}$ , транспортируется в органеллы через  $Ca^{2+}$ -унипортер [47] и, во-вторых, он способен активировать фосфолипазу  $A_2$  [25] и вызывать открытие циклоспорин А-нечувствительной пальмитат-зависимой поры. В то же время,  $Sr^{2+}$  не способен индуцировать открытие мПТР во внутренней митохондриальной мембране.

На рисунке 3 показано, что добавление к митохондриям ионов  $Sr^{2+}$  в присутствии неорганического фосфата и ЦсА приводит к снижению мембранного потенциала, что связано с входом иона в органеллы через унипортер, после чего потенциал на мембране восстанавливался до стабильного уровня.

После нескольких дробных добавок  $Sr^{2+}$  этот устойчивый уровень мембранного потенциала начинает постепенно снижаться, и после очередной добавки иона наблюдалась полная деполяризация митохондрий. Одновременно с этим начинался выброс ионов стронция из митохондрий, сопровождавшийся защелачиванием среды инкубации и набуханием органелл.



**Рисунок 3.** ЦсА-нечувствительные изменения концентраций  $Sr^{2+}$  (А), ТФФ<sup>+</sup> (Б), рН среды инкубации (В) и митохондриальное набухание (Г), индуцированные дробными добавками к митохондриям печени крысы ионов  $Sr^{2+}$ , в отсутствие (1) и присутствии (2) ингибитора  $Ca^{2+}$ -зависимой фосфолипазы  $A_2$  AACOCF<sub>3</sub> (15 мкМ). Добавки: А-В) митохондрии печени крысы – 1 мг/мл, 4\*200 мкМ  $Sr^{2+}$ ; Г) митохондрии печени крысы = 0.4 мг/мл, 4\*100 мкМ  $Sr^{2+}$ . (Из [21]).

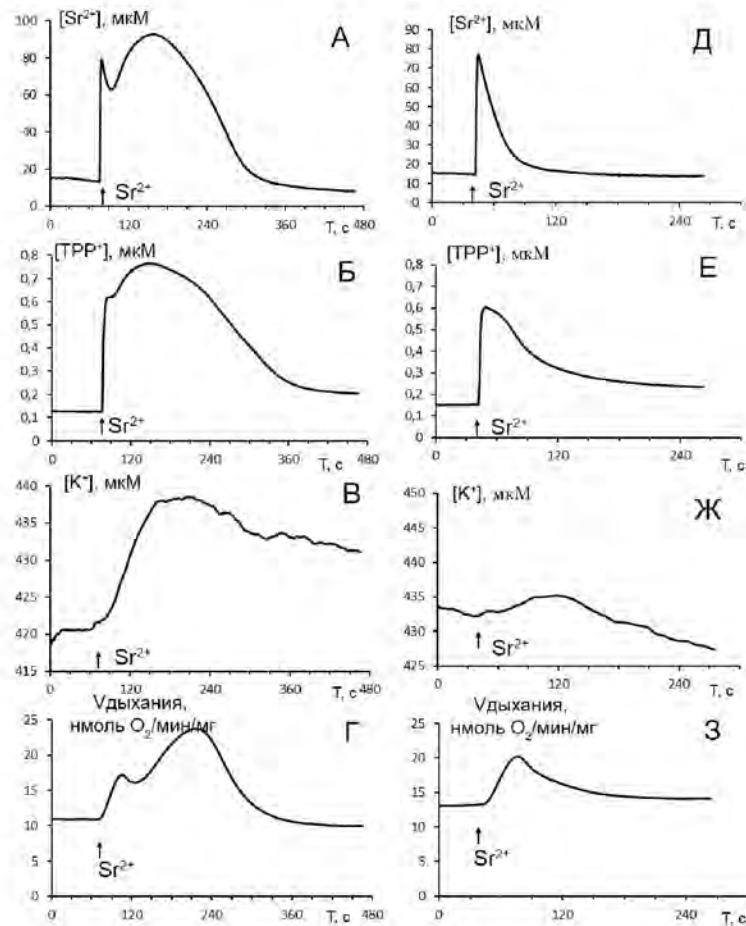
Приведенные здесь результаты говорят о том, что загрузка митохондрий ионами стронция приводит к изменению ионного гомеостаза митохондрий (а при сильной загрузке возможно и повреждение органелл). В основе этих процессов лежит открытие митохондриальной неселективной ЦсА-нечувствительной поры. Можно предположить, что происходит открытие липидной поры, индуцированной жирными кислотами и  $Sr^{2+}$ , вследствие активации ионами стронция фосфолипазы  $A_2$ . Если это так, то ингибиторы фосфолипазы  $A_2$  или БСА, который связывает жирные кислоты, должны подавлять  $Sr^{2+}$ -индуцированное повреждение митохондрий.

Действительно, ингибитор фосфолипазы  $A_2$ , арахидонилтрифторметил кетон (ААСОСФ<sub>3</sub>), частично ингибировал выброс  $Sr^{2+}$  из митохондрий, а также ослаблял развитие мощной деполяризации мембраны и практически останавливал зацелачивание среды инкубации при перегрузке митохондрий печени ионами  $Sr^{2+}$ . ААСОСФ<sub>3</sub> также значительно снижал скорость набухания митохондрий печени. Подобным эффектом обладали и другие ингибиторы  $Ca^{2+}$ -зависимой фосфолипазы  $A_2$ : аристолоховая кислота (25 мкМ) и трифторперазин (10 мкМ). Ранее нами было показано, что БСА обладал схожим действием с ингибиторами фосфолипазы  $A_2$  [41, 42]. Более того, БСА увеличивал стронциевую емкость митохондрий печени крыс. Возможно это связано с тем, что в отличие от ингибиторов фосфолипазы  $A_2$  БСА может удалять и свободные жирные кислоты, которые находились в мембране до активации фосфолипазы  $A_2$  ионами стронция.

Таким образом, митохондриальная ЦсА-нечувствительная пора, открытие которой лежит в основе выброса  $Sr^{2+}$  из митохондрий и повреждения митохондрий, вероятно, индуцируется жирными кислотами и  $Sr^{2+}$ .

### ***Участие поры, индуцируемой жирными кислотами и $Sr^{2+}$ , в механизме обратимого $Sr^{2+}$ -индуцированного выброса ионов из митохондрий в условиях гипотонии***

Полученными нами данными можно объяснить  $Sr^{2+}$ -индуцированные колебания ионных потоков в гипотонической среде инкубации, которые впервые были продемонстрированы в работах А.В. Гюльхандаряна и Э.Л. Холмухамедова. Было показано, что импульсная добавка ионов  $Sr^{2+}$  к энергизованным митохондриям печени, помещенным в гипотоническую среду инкубации, вызывает неселективное и обратимое увеличение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны для ионов  $Sr^{2+}$ ,  $H^+$  и  $K^+$  [48-51]. Показано, что происходит и обратимое падение митохондриального мембранного потенциала. При исследовании этих явлений авторы тогда предположили, что в этих условиях происходит образование неселективных пор. Проведенные нами исследования позволили предположить, что в данном случае выброс ионов из митохондрий опосредуется открытием ЦсА-нечувствительных липидных пор, индуцированных жирными кислотами и  $Sr^{2+}$ .

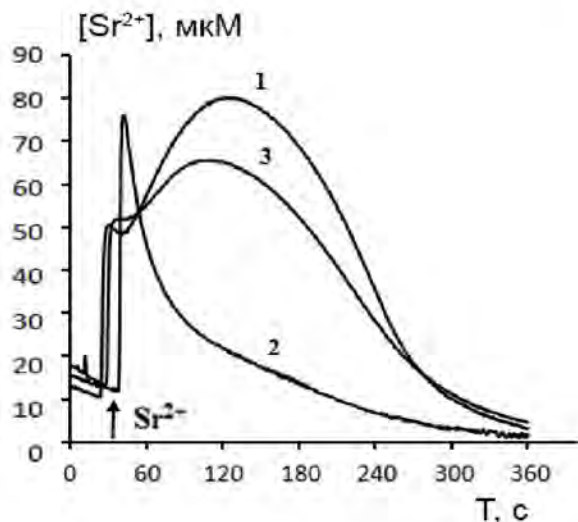


**Рисунок 4.** ЦсА-нечувствительные  $\text{Sr}^{2+}$ -индуцированные изменения концентрации  $\text{Sr}^{2+}$ , ТФФ<sup>+</sup>,  $\text{K}^+$  и скорости митохондриального дыхания в отсутствие (А, Б, В, Г) и присутствии (Д, Е, Ж, 3) 15 мкМ ААСОСФ<sub>3</sub>. Добавки: 47 нмоль  $\text{Sr}^{2+}$ /мг митохондриального белка. Среда инкубации содержала 20 мМ сахарозу, 1 мМ КСl, 1 мкМ ЦсА, 5 мМ янтарную (рН 7.3) (Из [21]).

На рисунке 4 показана одновременная запись ЦсА-нечувствительных изменений концентрации ионов  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , ТФФ<sup>+</sup>, а также скорости митохондриального дыхания после добавления  $\text{Sr}^{2+}$  к митохондриям печени в гипотонической среде инкубации. Как следует из рисунка, добавление  $\text{Sr}^{2+}$  запускает спонтанные обратимые изменения скорости митохондриального дыхания (рис. 4Г), которые сопровождаются соответствующими обратимыми изменениями в мембранном потенциале (рис. 4Б) и движением ионов через мембрану (рис. 4А и В). Обратимые  $\text{Sr}^{2+}$ -индуцированные изменения не специфичны для митохондрий печени. Подобный ЦсА-нечувствительный обратимый  $\text{Sr}^{2+}$ -индуцированный выброс  $\text{Sr}^{2+}$  наблюдался и в митохондриях сердца крыс.

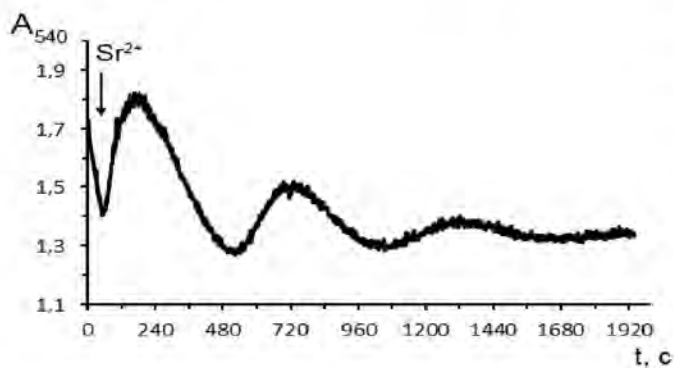
Как известно, в условиях гипотонии наблюдается активации фосфолипазы А<sub>2</sub> [52]. Следовательно, можно предположить, что ингибиторы фосфолипазы А<sub>2</sub> будут влиять на изменение неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны в условиях гипотонии. На рис. 4Д-3 продемонстрирован эффект ААСОСФ<sub>3</sub> на  $\text{Sr}^{2+}$ -индуцированные изменения ионных потоков. Как видно из рисунка, ингибитор эффективно подавлял все  $\text{Sr}^{2+}$ -индуцированные циклические изменения в митохондриях. В присутствии других ингибиторов

фосфолипазы  $A_2$  (аристолоховой кислоты и трифторперазина) результаты были похожими. Как показано на рис. 5, добавление пальмитиновой кислоты в присутствии ингибитора фосфолипазы  $A_2$  приводило к появлению такого же



**Рисунок 5.** Пальмитиновая кислота перезапускает ЦсА-нечувствительный  $Sr^{2+}$ -индуцированный выброс  $Sr^{2+}$  митохондрий (1), заингибированный блокатором фосфолипазы  $A_2$  – AACOCF<sub>3</sub> (2). Добавки: 41 нмоль  $Sr^{2+}$ /мг митохондриального белка. 1, Контроль; 2, + 15 мкМ AACOCF<sub>3</sub>; 3) + 15 мкМ AACOCF<sub>3</sub> + 40 мкМ ПК (Из [53]).

обратимого  $Sr^{2+}$ -индуцированного выброса  $Sr^{2+}$ , как и в контрольном эксперименте. Эти результаты подтверждают наше предположение, что в основе

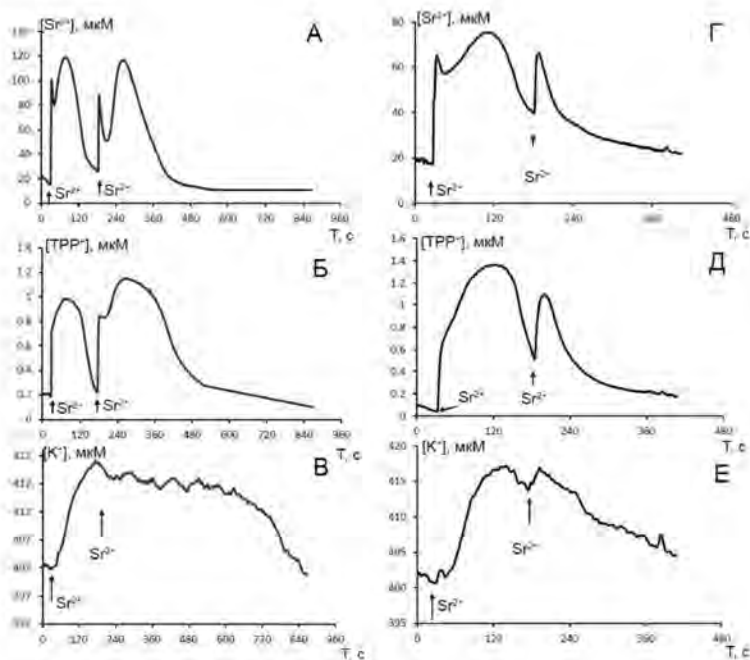


**Рисунок 6.** ЦсА-нечувствительные  $Sr^{2+}$ -индуцированные колебания объема митохондрий печени крыс. Добавки: 45 нмоль  $Sr^{2+}$ /мг митохондриального белка (Из [21]).

$Sr^{2+}$ -индуцированного выброса ионов из митохондрий лежит активация фосфолипазы  $A_2$ , появление жирных кислот и образование липидных пор. Стоит отметить, что после восстановления мембранного потенциала в ряде экспериментов (например, в присутствии калиевого ионофора – валиномицина) наблюдалось появление волн входа и выхода ионов из митохондрий, а также циклические изменения объема

митохондриального матрикса (рис. 6). Это говорит о том, что митохондрии могут перейти в осцилляторный режим.

Стоит отметить, что еще одной добавкой  $Sr^{2+}$  можно было запустить новый цикл  $Sr^{2+}$ -индуцированных изменений после того, как предыдущий цикл был завершен (рис. 7А-В). Вторая добавка стронция индуцирует такие же циклические изменения концентрации  $Sr^{2+}$  и мембранного потенциала, какие наблюдаются во время первого цикла.



**Рисунок 7.** Второй  $\text{Sr}^{2+}$ -пульс индуцирует новый цикл ионных потоков только после того, как весь  $\text{Sr}^{2+}$  от первой добавки полностью аккумулировался митохондриями, и мембранный потенциал полностью восстановился. **А и Г** – изменения концентрации  $\text{Sr}^{2+}$ , **Б и Д** –  $\text{ТФФ}^+$ , **В и Е** –  $\text{K}^+$ . Вторая добавка  $\text{Sr}^{2+}$  была сделана после того (**А-В**) или перед тем (**Г-Е**), как первый пульс  $\text{Sr}^{2+}$  был полностью поглощен митохондриями (Из [53]).

Однако второй цикл  $\text{Sr}^{2+}$ -индуцированной пермеабиллизации митохондрий не может быть запущен до тех пор, пока полностью не закончится первый цикл (рис. 7Г-Е). Таким образом, чтобы ответить на второй стимул, митохондриям требуется время вернуться в их начальное состояние – то есть, существует период рефрактерности. Как видно из рисунка, добавление  $\text{Sr}^{2+}$  до окончания первого  $\text{Sr}^{2+}$ -цикла (то есть до полного восстановления мембранного потенциала и поглощения  $\text{Sr}^{2+}$  митохондриями) не будет приводить к обратимым изменениям ионных потоков через митохондриальную мембрану. Ранее подобные наблюдения были сделаны в работах Холмухамедова Э.Л. с соавторами [54].

### ***Механизм рециклизации ионов $\text{Ca}^{2+}(\text{Sr}^{2+})$ через митохондриальную мембрану при открытии липидной поры, индуцируемой жирными кислотами***

В настоящей работе была предложена гипотеза о том, что липидная пора, индуцируемая жирными кислотами и  $\text{Ca}^{2+}(\text{Sr}^{2+})$ , является системой выброса ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий.

Идея о том, что митохондриальная пора может являться системой выброса ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , не нова. Роль жирных кислот в транспорте ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях обсуждается в литературе в течение 40 лет [44, 55, 56]. Показано, что жирные кислоты активируют механизмы выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий [44, 56], а также сделано предположение об участии фосфолипазы  $\text{A}_2$  в этом процессе [57]. В то же время, полученные в настоящей работе данные позволяют

объяснить наблюдаемые ранее явления и закономерности с позиции иного механизма.

Как показано в настоящей работе, открытие липидной поры в митохондриальной мембране всегда сопровождается изменением ионного гомеостаза. В наших экспериментальных условиях при открытии поры наблюдается выравнивание всех ионных градиентов на внутренней митохондриальной мембране. В то же время, в клетке не существует градиентов ионов  $K^+$  и  $Na^+$  на внутренней митохондриальной мембране [13]. Поэтому, если в митохондриях живой клетки может произойти открытие пальмитат/ $Ca^{2+}$ -индуцируемой поры, то оно приведет к селективному выбросу ионов  $Ca^{2+}$  из митохондрий без нарушений ионного гомеостаза  $K^+$  и  $Na^+$ .

Как показали наши исследования, открытие липидной поры и выброс ионов  $Ca^{2+}$  из митохондрий стимулируется как добавленной жирной кислотой, так и кислотой, появившейся в мембране в результате активации фосфолипазы  $A_2$ . Механизм образования липидной поры имеет одну очень важную особенность: пермеабиллизация мембраны, связанная с образованием липидной поры, является кратковременной. Способность липидной поры быстро заткаться, если ее размер не превышает критического значения, является ее важным свойством. Следовательно, этот механизм может сам по себе существовать в режиме, который будет приводить к циклическим изменениям мембранной проницаемости. Мембранная пермеабиллизация будет сопровождаться последующим восстановлением целостности мембраны, и этот цикл будет повторяться до тех пор, пока существует движущая сила в виде мембранного потенциала.

В зависимости от силы стимула, который вызывает открытие липидных пор, частота их появления, диаметр и, следовательно, время жизни будут варьировать. Соответственно, могут существовать различные режимы митохондриальной пермеабиллизации. Образование одной поры небольшого диаметра, приводящее к локальной и временной мембранной деполяризации, может приводить к быстрой и краткосрочной циклизации ионов через мембрану. Здесь очень важными являются данные о  $Sr^{2+}$ -индуцированных изменениях концентрации  $K^+$  через митохондриальную мембрану [53]. Тот факт, что  $Sr^{2+}$ -индуцированный выброс  $K^+$  из митохондрий не ингибируется хинидином, говорит о том, что выброс  $K^+$  в данном случае обусловлен  $Sr^{2+}$ -индуцированной неспецифической пермеабиллизацией митохондриальной мембраны. Возможно, при каждой такой добавке стронция происходит образование липидных короткоживущих пор.

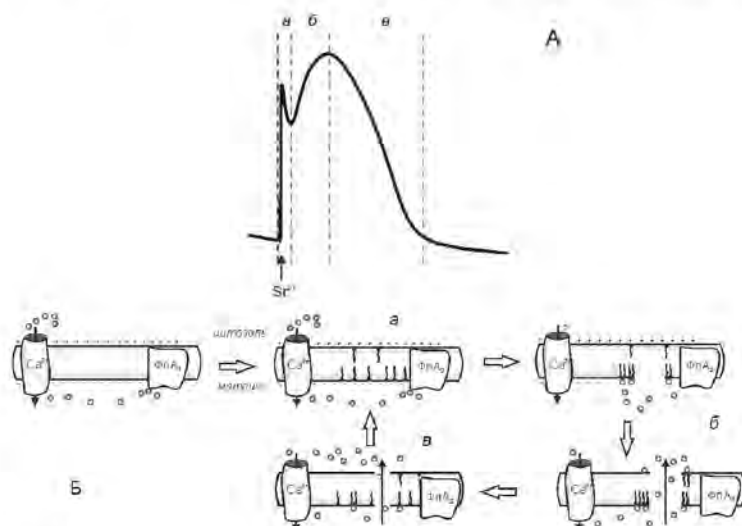
Стоит также отметить, что активация фосфолипазы  $A_2$  в отсутствие двухвалентных катионов приводит к слабому разобщению, что говорит о работе жирных кислот в качестве разобщителей. Однако при этом не наблюдается неспецифическая пермеабиллизация мембраны [58].

С другой стороны, увеличение количества пор может приводить к достаточно сильному разобщению митохондрий и полному сбросу трансмембранных ионных градиентов. При этом митохондрии все равно могут оставаться функционально активными. Как показано на рис. 2, добавление пальмитиновой кислоты и  $Ca^{2+}$  к энергизованным митохондриям приводит к подобным последствиям (падению мембранного потенциала и мощному

выбросу  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий). Однако добавление рутения красного реполяризовало мембрану обратно, что свидетельствует о том, что в основе этой деполяризации митохондрий лежит рециклизация  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану, а не повреждение митохондрий.

Еще одним интересным режимом митохондриальной пермеабиллизации является так называемый «импульсный режим», который наблюдается, когда пермеабиллизация запускается одним сильным стимулом, например, пульсом стронция. Эта модель была описана ранее в работах Холмухамедова Э.Л. с соавторами [49, 50, 54]. В гипотонических условиях пульс стронция может приводить как к одиночному обратимому спонтанному выбросу ионов из митохондрий, так и к циклизации ионных потоков. Здесь после начального быстрого поглощения стронция митохондриями (фаза *а*), происходит уравнивание трансмембранных ионных градиентов (фаза *б*) (рис. 8). Эта пермеабиллизация сопровождается последующим восстановлением целостности мембраны и относительно медленной реполяризацией митохондрий и поглощением стронция (фаза *в*). Полученные данные свидетельствуют, что в эти процессы вовлечена скорее липидная пора, индуцированная жирными кислотами, чем мРТР. Действительно, ингибиторы фосфолипазы  $\text{A}_2$  и БСА предотвращали функционирование этого  $\text{Sr}^{2+}$ -цикла, а пальмитиновая кислота в присутствии ингибиторов перезапускала осцилляции.

Из полученных данных становится очевидным, что для работы такого  $\text{Ca}^{2+}$ -цикла в митохондриях должны быть выполнены определенные условия. Во-первых, это высокая внутримитохондриальная концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Sr}^{2+}$ ), которая необходима для активации фосфолипазы  $\text{A}_2$  и появления



**Рисунок 8.** Предполагаемый механизм рециклизации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Sr}^{2+}$ ) с участием ЦсА-нечувствительной поры, индуцированной жирными кислотами. А) стадии входа и выхода  $\text{Sr}^{2+}$  из митохондрий в условиях гипотонии. Б) Модель рециклизации  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану при образовании липидной поры (Из [21]).

свободных жирных кислот. Без этого липидная пора не образуется, и ионы не будут выходить из митохондрий. Показано, что медленная и продолжительная инфузия того же количества стронция в суспензию митохондрий не приводила к обратимым осцилляциям ионов через митохондриальную мембрану [54]. Возможно, это было обусловлено связыванием иона в митохондриальном



матрикса и понижением концентрации свободного стронция в этих условиях. Во-вторых, необходим высокий мембранный потенциал. Именно наличие высокого мембранного потенциала лежит в основе явления рефрактерности. Как показано на рис. 7, до тех пор, пока не произошло полное восстановление мембранного потенциала, новый цикл не запускался даже еще одной добавкой стронция. Возможно, при сниженном потенциале  $Sr^{2+}$  поступает в митохондрии с низкой скоростью и внутримитохондриальная концентрация свободного  $Sr^{2+}$  недостаточна, чтобы инициировать образование новых пор.

Таким образом, представленные результаты подтверждают участие свободных жирных кислот в транспорте ионов  $Ca^{2+}$  ( $Sr^{2+}$ ) через митохондриальную мембрану. Быстрое поглощение двухвалентных ионов через  $Ca^{2+}$ -унипортер приводит к активации фосфолипазы  $A_2$ , появлению свободных жирных кислот (в том числе, пальмитиновой), которые накапливаются на матриксовой стороне внутренней митохондриальной мембраны и формируют комплексы с  $Ca^{2+}$  ( $Sr^{2+}$ ) (рис. 8Б). В результате происходит образование липидных пор. Такая временная пермеабиллизация митохондриальной мембраны лежит в основе выхода  $Ca^{2+}$  или  $Sr^{2+}$  из митохондрий.

Возникает вопрос, может ли такой цикл функционировать в живой клетке. С одной стороны, образование небольшого количества митохондриальных липидных пор будет приводить к ситуации, когда запуск футильных  $Ca^{2+}$  и  $K^+$  циклов будут незначительно снижать мембранный потенциал, тем самым защищая клетку от окислительного стресса и регулировать внутриклеточный ионный гомеостаз и митохондриальный объем. С другой стороны, длительное повышение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме, которое наблюдается при различных патологиях, будет приводить к активации фосфолипазы  $A_2$ , увеличению уровня свободных жирных кислот, то есть, созданию благоприятных условий для формирования липидной поры. Возможность такого механизма, который может быть реализован в клетке была продемонстрирована на модели глутамат-индуцированной дегенерации нейронов мозга [59]. Дегенерация нейронов характеризуется развитием отсроченной  $Ca^{2+}$  ( $Sr^{2+}$ ) дисрегуляции и митохондриальной деполяризации, которые не ингибируются циклоспорином А [60], но могут быть подавлены ингибиторами фосфолипазы  $A_2$ . Поэтому регуляция этого фермента, вероятно, является важным фактором, определяющим судьбу клетки.

### Заключение

Неспецифическая пермеабиллизация внутренней митохондриальной мембраны (как следствие открытия митохондриальной поры) считается важным путем выброса ионов  $Ca^{2+}$  из митохондрий. Как показано в настоящей работе, митохондриальная пора, индуцированная пальмитиновой кислотой и  $Ca^{2+}$  ( $Sr^{2+}$ ) может также являться важной частью системы транспорта ионов  $Ca^{2+}$  через внутреннюю митохондриальную мембрану. Ее способность кратковременно открываться и закрываться будет вести к выбросу ионов  $Ca^{2+}$  из митохондрий и быстрой разгрузке органелл от иона. Это делает ее важным игроком в регуляции внутриклеточного ионного гомеостаза при физиологических и патологических ситуациях и способствует спасению митохондрий от  $Ca^{2+}$  перегрузки. Вполне

вероятно, что такой механизм может лежать в основе распространения внутриклеточных кальциевых волн или деградации нервных клеток.

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

#### Список литературы

1. Pizzo P, Drago I, Filadi R, Pozzan T (2012). *Pflugers Arch.* 464(1),3–17.
2. Olson ML, Chalmers S, McCarron JG (2012). *Biochem Soc Trans.* 40(1),158–167.
3. Mammucari C, Patron M, Granatiero V, Rizzuto R (2011). *Biofactors.* 37(3),219-227.
4. Carafoli E (2012). *Cell Calcium.* 52(1),1–8.
5. Palty R, Silverman WF, Hershfinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvili D, Sekler I (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(1),436-441.
6. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011). *Nature.* 476(7360),336-440.
7. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Kotliansky V, Mootha VK (2011). *Nature.* 476(7360),341-345.
8. Ryu SY, Beutner G, Kinnally KW, Dirksen RT, Sheu SS (2011). *J Biol Chem.* 286(24),21324–21329.
9. Jiang D, Zhao L, and Clapham DE (2009). *Science.* 326(5949),144-147.
10. Waldeck-Weiermair M, Duan X, Naghdi S, Khan MJ, Trenker M, Malli R, Graier WF (2010). *Cell Calcium.* 48(5),288–301.
11. Starkov AA (2010). *FEBS J.* 277(18),3652-3663.
12. Malli R, Graier WF (2010). *FEBS Lett.* 584(10),1942–1947.
13. Bernardi P, von Stockum S (2012). *Cell Calcium.* 52,22-27.
14. Halestrap AP, Richardson AP (2015). *J Mol Cell Cardiol.* 78,129-141.
15. Altschuld RA, Hohl CM, Castillo LC, Garleb AA, Starling RC, Brierley GP (1992). *Am J Physiol.* 262,H1699–H1704.
16. Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthivel B, Goonasekera SA, Karch J, Gabel S, Farber J, Force T, Brown JH, Murphy E, Molkentin JD (2010). *J Clin Invest.* 120,3680-3687.
17. Parone PA, Da Cruz S, Han JS, McAlonis-Downes M, Vetto AP, Lee SK, Tseng E, Cleveland DW (2013). *J Neurosci.* 33,4657-4671.
18. Bernardi P, Petronilli V (1996). *J Bioenerg Biomembr.* 28,131-138.
19. Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F (1999). *Biophys J.* 76(2),725-734
20. Белослудцев КН, Миронова ГД (2012). Патологическая физиология и экспериментальная терапия. (3),20-32.
21. Белослудцев КН (2015). Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Пушкино.
22. Agafonov A, Gritsenko E, Belosludtsev K, Kovalev A, Gateau-Roesch O, Saris N-E L, Mironova GD (2003). *Biochim Biophys Acta.* 1609(2),153-160.
23. Mironova GD, Gritsenko E, Gateau-Roesch O, Levrat C, Agafonov A, Belosludtsev K, Prigent AF, Muntean D, Dubois M, Ovize M (2004). *J Bioenerg Biomembr.* 36(2),171-178.
24. Северина ЕП, Евтодисенко ЮВ (1981). *Биохимия.* 46,1199-1201.
25. Saris N-E L (1994). *Magnesium Res.* 7(1),5–10.
26. Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K (2011). *Prog Lipid Res.* 50(2),152-192.
27. Mironova GD, Lazareva A, Gateau-Roesch O, Tyynela J, Pavlov Y, Vanier M, Saris N-E L (1997). *J Bioenerg Biomembr.* 29(6),561-569.
28. Mironova GD, Gateau-Roesch O, Levrat C, Gritsenko E, Pavlov E, Lazareva AV, Limarenko E, Rey P, Louisot P, Saris N-E L (2001). *J Bioenerg Biomembr.* 33,319-331.
29. Sultan A and Sokolove P (2001a). *Arch Biochem Biophys.* 386,31-51.
30. Белослудцев КН, Белослудцева НВ, Миронова ГД (2005). *Биохимия.* 70(7),987-994.
31. Jacobson K and Parahadjopoulos D (1975). *Biochemistry.* 14,152–161.
32. Харакоз ДП (2001). *Успехи биологической химии.* 41,333-364.
33. Rand RP (1964). *Biophys J.* 17,303-316.
34. Чизмаджев ЮА, Аракелян ВБ, Пастушенко ВФ (1981). *Биофизика мембран.* М.:Наука,207-229.
35. Антонов ВФ, Шевченко ЕВ (1995). *Вестн РАМН.* 10,48-55.
36. Rand RP (1964). *Biophys J.* 17,303-316.
37. Sempersu E, Kinosita K, Tsong T (1985). *Biochim Biophys Acta.* 812,779-785.
38. Zoratti M and Szabo I (1995). *Biochim Biophys Acta.* 1241,139-176.
39. Belosludtsev KN, Saris N-E L, Belosludtseva NV, Trudovishnikov AS, Lukyanova LD, Mironova GD (2009). *J Bioenerg Biomembr.* 41(4),395-401.
40. Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Agafonov AV, Penkov NV, Samartsev VN, Lemasters JJ, Mironova GD (2015). *Biochim Biophys Acta.* 1848(10),2200-2205.
41. Skulachev VP (1998). *Biochim Biophys Acta.* 1363,100 –124.

42. Белослудцева НВ (2008). Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Пушкино.
43. Mironova GD, Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Critsenko EN, Khodorov BI, Saris N-E L (2007). *J Bioenerg Biomembr*. 39(2),167-174.
44. Waite M, Van Deenen L, Ruigrok T, Elbers P (1969). *J Lipid Res*. 10,599-608.
45. Medvedev BI, Severina EP, Gogvadze VG, Chulova EA, Evtodienko YV (1985). *Gen Physiol Biophys*. 4,549-556.
46. Brockmeier K, Pfeiffer D (1995). *Biochemistry*. 34,16440-16449.
47. Thorne TE, Voelkel-Johnson C, Casey WM, Parks LW, Laster SM (1996). *J Virol*. 70(12),8502-8507.
48. Gunter T, Gunter K, Sheu S-S, and Gavin C (1994). *Am J Physiol*. 255,313-339.
49. Gylklandanyan AV, Evtodienko YV, Zhabotinsky AM, Kondrasheva MN (1976). *FEBS Lett*. 66(1),44-47.
50. Холмухамедов ЭЛ, Чулова ЭА, Зинченко ВП, Евтодиенко ЮВ (1988). *Биологические мембраны*. 5(8),866-870.
51. Холмухамедов ЭЛ, Теплова ВВ, Чулова ЭА (1991). *Биологические мембраны*. 8(6),612-620.
52. Сидаш СС, Евтодиенко ЮВ, Холмухамедов ЭЛ, Теплова ВВ (1994). *Биологические мембраны*. 11,429-436.
53. Каргаполов АВ (1979). *Вдохвмя*. 44,293-296.
54. Mironova GD, Saris N-E L, Belosludtseva NV, Agafonov AV, Elantsev AB, Belosludtsev KN (2015). *Biochim Biophys Acta*. 1848(2),488-495
55. Hohlhammedov EL, Teplova VV, Chukhlova EA, Evtodienko YV, Ulrich RG (1995). *Biochem Mol Biol Int*. 36(1),39-49.
56. Pfeiffer DR, Schmid PC, Beatrice MC, Schmid HO (1979). *J Biol Chem*. 254,11485-11494
57. De Villiers M, Lochner A (1986). *Biochim Biophys Acta*. 876(2),309-317.
58. Harris EJ, Cooper MB (1981). *Biochem Biophys Res Commun*. 103(2),788-796
59. Jezek J, Jaburek M, Zelenka J, Jezek P (2010). *Physiol Res*. 59(5),737-747.
60. Миронова ГД, Белослудцев КН, Сурин АМ, Трудовичников АС, Белослудцева НВ, Писельс ВГ, Красильникова ИА, Ходоров БИ (2011). *Биологические мембраны*. 28(6),483-494.
61. Khodorov B (2004). *Prog Biophys Mol Biol*. 86,279-351.

**Глава 3. УРИДИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ  
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА.  
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ЕГО АНТИГИНОКСИЧЕСКОГО  
ДЕЙСТВИЯ**

Белослудцева Н.В.<sup>1,2</sup>, Крылова И.Б.<sup>3</sup>, Бульон В.В.<sup>3</sup>, Селина Е.Н.<sup>3</sup>,  
Родионова О.М.<sup>3</sup>, Сапронов Н.С.<sup>3</sup>, Миронова Г.Д.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

<sup>2</sup>Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия;

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия.

**Аннотация**

На модели острого инфаркта миокарда у крыс показано, что предшественники метаболического активатора митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (митоK<sub>ATP</sub> канала), уридина-5'-дифосфата - уридин и УМФ, проявляют выраженное антиишемическое и антиаритмическое действие. Антиишемическое действие уридина и УМФ опосредовано активацией митоK<sub>ATP</sub> канала, тогда как антиаритмический эффект – в большей степени цитоплазматического канала. Установлено, что профилактическое применение уридина способствует стабилизации энергетического обмена сердца в условиях коронарной недостаточности. Одновременно препарат предотвращает нарушения функции антиоксидантной системы и чрезмерную активацию перекисного окисления липидов. Селективный блокатор митоK<sub>ATP</sub> канала – 5-гидроксидеканоат устраняет защитный эффект уридина, что свидетельствует о вовлечении канала в механизмы кардиопротективного действия препарата. Показана ускоренная по сравнению с интактными животными элиминация внутривенно введенного уридина из крови животных с острой ишемией миокарда. Обсуждаются механизмы защиты сердца при гипоксии, опосредованные активацией митоK<sub>ATP</sub>.

**Введение**

По данным Всемирной Организации Здравоохранения около половины всех причин человеческих смертей в высокоразвитых странах и почти 60% в России приходится на болезни системы кровообращения, среди которых первое место занимает острая ишемия миокарда (ОИМ) [1]. При данной патологии, наряду с применением традиционных фармацевтических препаратов, которые улучшают коронарное кровоснабжение, в последнее время большое внимание уделяется метаболической защите миокарда. В частности, возрастает интерес к исследованию возможностей лечебного применения эндогенных регуляторов и природных метаболитов, являющихся естественными факторами адаптации миокарда к патологическим воздействиям [2]. К числу таких соединений можно отнести нуклеотиды и нуклеозиды, которые обладают большим набором регуляторных функций на рецепторном уровне. В настоящее время хорошо изучены кардиотропные свойства таких представителей этого класса

соединений, как аденозин, аденозин-монофосфат, аденозин-трифосфат, гуанозин-монофосфат, инозин, а созданные на их основе лекарственные препараты используются в клинике [3].

Потенциальными средствами профилактики и терапии острого инфаркта миокарда могут выступать пиримидиновый нуклеозид уридин и его фосфонуклеотиды: уридин-5'-монофосфат (УМФ) и уридин-5-дифосфат (УДФ). В экспериментальных и клинических исследованиях была установлена высокая терапевтическая активность уридина и его нуклеотидов при центральной и периферической нейропатиях, дисфункции печени, нарушении репродуктивной функции, при врожденной оротоацидурии и цистическом фиброзе [4]. В то же время, фармакологическая активность этих соединений в отношении сердечно-сосудистой системы остается малоизученной.

Большое значение в защите миокарда от ишемического и постишемического повреждения придается ишемической адаптации (прекондиции) [5]. Конечным эффектором в реализации ее кардиопротективных влияний выступают АТФ-зависимые калиевые каналы ( $K_{ATP}$  каналы), локализованные на цитоплазматической и внутренней митохондриальной мембранах. Принципиально новым в лечении и предупреждении сердечных заболеваний является развиваемый в последнее время подход, связанный с активацией этих каналов [6-10]. Нами было продемонстрировано, что нуклеотид уридина – уридиндифосфат (УДФ) является эндогенным регулятором АТФ-зависимых калиевых каналов [11-12].

Роль митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (мито $K_{ATP}$ ) в защите сердце и мозга от ишемического поражения широко обсуждается в настоящее время. По последним данным, активация этого канала является одним из ключевых защитных механизмов при адаптации организма к ишемии.

Основной целью настоящей работы было показать, что активация АТФ-зависимых калиевых каналов производными УДФ может быть одним из механизмов адаптации животных к окислительному стрессу, вызванному различными факторами. На модели острого инфаркта миокарда, было проведено исследование антиишемического и антиоксидантного потенциала предшественников синтеза УДФ - уридина и УМФ, а также установление связи их кардиопротекторного действия с активацией mito $K_{ATP}$  каналов.

### **УДФ активировал каналную субъединицу mito $K_{ATP}$ канала, реконструированного в бислойную липидную мембрану, и целый канал в нитчатых митохондриях**

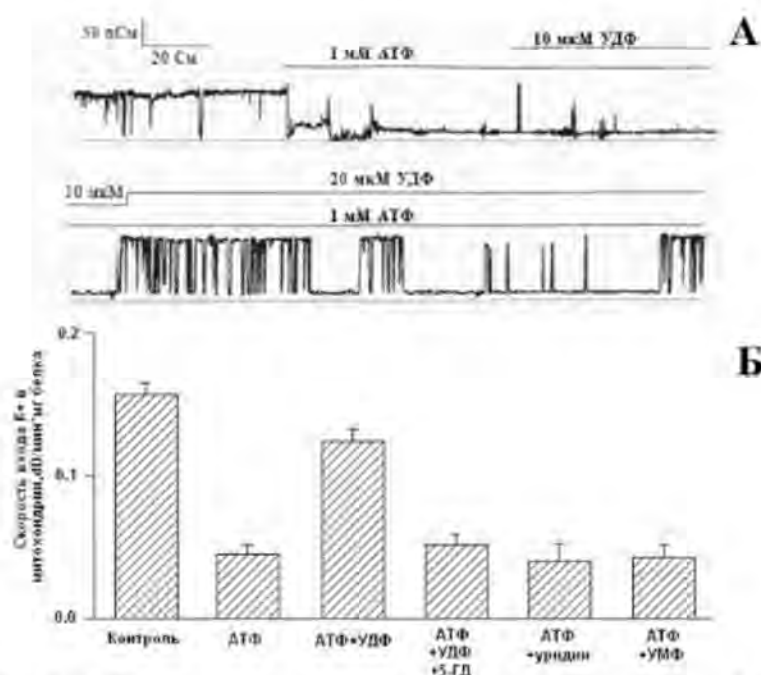
Данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что синтетические активаторы  $K_{ATP}$  каналов способны оказывать кардиопротекторный эффект при ишемии миокарда [13, 14]. В то же время, АТФ является ингибитором канала, и снижение его концентрации при ишемии сопровождается активацией данного канала.

В нашей лаборатории помимо синтетического донора электронов диаминобензидина (ДЕБ), который селективно активировал mito $K_{ATP}$  [11, 12], был обнаружен ряд природных, то есть метаболических активаторов этого канала [15, 11, 12]. Применение природных активаторов mito $K_{ATP}$  канала обладает рядом преимуществ, поскольку оно не вызывает побочных эффектов,

которые могут наблюдаться при использовании синтетических препаратов, и концентрацию таких метаболитов в клетке легко регулировать.

Нами было обнаружено, что дифосфонуклеотиды активируют реконструированную в бислойную липидную мембрану (БЛМ) канальную субъединицу канала (митоK<sub>ATФ</sub>), причем наиболее эффективным из них является уридин-5'-дифосфат (УДФ). Оказалось, что УДФ в микромолярных концентрациях (20 мкМ) полностью реактивирует заингибированную АТФ канальную субъединицу, реконструированную в БЛМ (Рис.1А). В интактных митохондриях, mitoK<sub>ATФ</sub> реактивируется при тех же концентрациях УДФ, и этот эффект снимается неселективным и селективным ингибиторами канала глибенкламидом и 5-гидроксидеканоатом (5-ГД) (Рис. 1Б).

Концентрации УДФ, необходимые для активации реконструированного в БЛМ mitoK<sub>ATФ</sub> и целого канала в нативных митохондриях, являются одинаковыми. Следовательно, участок связывания УДФ локализуется на канальной субъединице. Следует отметить, что для активации цитоK<sub>ATФ</sub> нужны значительно большие концентрации этого препарата [16].



**Рис. 1.** УДФ активирует канальную субъединицу mitoK<sub>ATФ</sub> белка-канала, реконструированного в бислойную липидную мембрану (А), и целый канал в нативных митохондриях печени крысы (Б) (Из [12]).

### **Активация mitoK<sub>ATФ</sub> канала уридиновыми нуклеотидами предотвращает повреждения миокарда при остром инфаркте**

Ранее на моделях тотальной и регионарной ишемии изолированных перфузируемых сердец крыс было показано, что уридин и УМФ проявляют антиаритмическую активность в отношении реперфузионных аритмий, предупреждают развитие миокардиального станинга при постишемической реперфузии, препятствуя депрессии сократительной функции миокарда и предотвращая развитие контрактуры [17].

В настоящей работе было проведено исследование кардиопротекторного действия данного препарата при введении его животным *in vivo*. Однако следует отметить, что УДФ не способен проникать через клеточную мембрану [18], а, следовательно, будучи введенным внутривенно, не может воздействовать на канал, локализованный во внутренней мембране митохондрии. Поэтому в работе использовались уридин и УМФ – предшественники уридиндифосфата, способные, в отличие от последнего, проникать в клетку, где они дополнительно фосфорилируются до УДФ [18]. При этом сами по себе предшественники УДФ не влияли на работу канала в изолированных митохондриях.

Исследования проводились на модели ОИМ у крыс с помощью общепринятых методов [19]. При этом проводилась окклюзия левой коронарной артерии (ЛКА) в течение 60 минут без последующей реперфузии. Исследуемые препараты (уридин и УМФ) вводили внутривенно в дозе 30 мг/кг веса животного за 5 минут до окклюзии коронарной артерии.

### Антиишемическое и антиаритмическое действие уридина и уридин-5'-монофосфата при введении препаратов до и после создания экспериментального инфаркта

В работе были исследованы две схемы введения уридина и УМФ: внутривенное введение за 5 минут до окклюзии ЛКА – имитация прекондииции, и сразу после окклюзии – купирующее действие.

**Таблица 1.** Антиишемический и антиаритмический эффект инъекций уридина и УМФ до и после окклюзии левой коронарной артерии сердца крысы (Из [20-21]).

Группа (количество животных, n)	Анти- ишемический эффект (60 мин после окклюзии)		Антиаритмический эффект		
	ИНА	Ампл туда Т- волны, мВ	Э С, n	ЖТ, сек	Ф Ж, сек
<u>Контроль</u> (7)	1,27±0,04	0,53±0,04	395±38	89,7±18,8	26,5±6,9
<u>Уридин</u> -до окклюзии (7)	0,59±0,06*	0,35±0,03*	189±43	32,2±4,6	9,5±3,4
-после окклюзии (7)	0,92±0,12	0,47±0,06	146±7	41,0±8,3	13,7±4,9
<u>УМФ</u> -до окклюзии (5)	0,30±0,10*	0,34±0,02*	134±39	20,0±9,9*	6,0±2,3*
-после окклюзии (7)	0,83±0,11*	0,42±0,04	127±9	14,8±1,9*	10,2±3,5*

Уридин и УМФ вводили внутривенно за 5 минут до окклюзии коронарной артерии в дозе 30 мг/кг веса животного. \*  $p < 0.05$ , по сравнению с контролем.

Как видно из таблицы 1, кардиопротекторный эффект препаратов наиболее ярко проявлялся при его превентивном введении. Однако следует отметить, что

введение уридина и УМФ после окклюзии также приводит к существенному положительному эффекту.

Полученные результаты определили дальнейший выбор схемы внутривенных инъекций до окклюзии для более углубленных исследований кардиопротекторного действия уридина и УМФ. Кроме того, поскольку постокклюзионное введение препаратов тоже проявляло заметное защитное действие, использования уридина и УМФ не только для предотвращения, но и для лечения ОИМ также является весьма перспективным.

### **Ингибиторы калиевых каналов снимают антиишемическое действие уридина и уридин-5'-монофосфата, введенных до создания экспериментального инфаркта**

**Таблица 2.** Эффект уридина и УМФ на индекс ишемической альтерации (ИИА) через 60 минут после окклюзии левой коронарной артерии (Из [20, 21]).

<b>Группа (количество животных, n)</b>	<b>Индекс ишемической альтерации</b>
Контроль <sup>#</sup> (15)	1.085±0.045
5-ГД (8)	0.923±0.066
Глибенкламид (10)	1.083±0.047
Уридин (7)	0.588±0.056*
Уридин + Глибенкламид(8)	0.926±0.074
Уридин + 5-ГД (9)	0.841±0.082
УМФ (7)	0.311±0.074*
УМФ + Глибенкламид (9)	1.034±0.090
УМФ – 5-ГД (10)	1.150±0.054

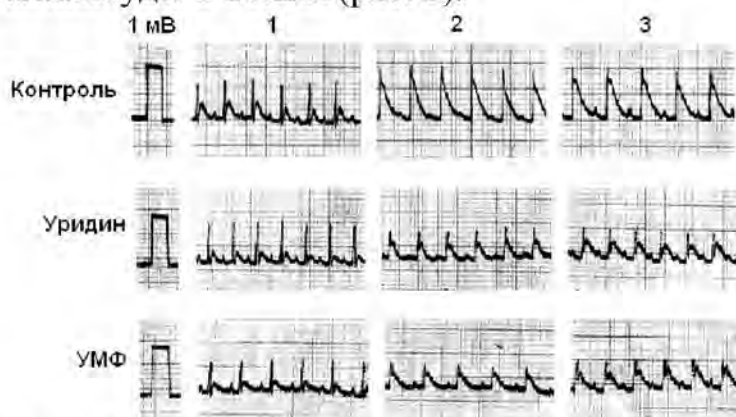
Уридин и УМФ (оба в концентрации 30 мг/кг) вводились внутривенно за 5 минут до окклюзии коронарной артерии. Глибенкламид (1 мг/кг внутривенно) – 35 мин до окклюзии, 5-ГД (5 мг/кг внутривенно) – 10 мин до окклюзии. \*  $p < 0.05$ , по сравнению с контролем. В качестве контрольных брали животных с окклюзией левой коронарной артерии без введения им модуляторов.

В работе было обнаружено, что уридин и УМФ, введенные за 5 минут до окклюзии ЛКА, проявляют ярко выраженные антиишемические свойства. Одним из показателей, характеризующих размер зоны инфаркта, является индекс ишемической альтерации (ИИА) миокарда, определяемый исходя из размера зоны ишемической альтерации гистохимическим методом. Как видно из таблицы 2, уридин снижает ИИА в 2 раза, а УМФ – почти в 3.5 раза.

Как видно из таблицы, ингибиторы АТФ-зависимых калиевых каналов - глибенкламид и 5-гидроксидекалоат (5-ГД), существенно снижают защитное действие препаратов. При этом ни глибенкламид, ни 5-ГД сами по себе не влияли на формирование зоны инфаркта. Как упоминалось выше, 5-ГД является специфическим ингибитором митоK<sub>ATP</sub>, не влияющим в малых концентрациях на активность цитоK<sub>ATP</sub> [22]. Таким образом, его способность блокировать антиишемическое действие уридина и УМФ позволяет сделать вывод о доминирующей роли митоK<sub>ATP</sub> в защите миокарда от ишемических повреждений.



Вторым важным показателем острых ишемических нарушений функций миокарда является увеличение амплитуды Т-волны. Предварительное внутривенное введение животным исследуемых препаратов приводило к снижению амплитуды Т-волны (рис. 2).



**Рис. 2.** Влияние уридина и УМФ на нарушения амплитуды Т-волны сердца крыс при окклюзии левой коронарной артерии (ЭКГ, II стандартное отведение). 1 – начальная фаза, 2 – 3 минуты после окклюзии ЛКА, 3 – 60 минут после окклюзии ЛКА (Из [20-21]).

Положительный эффект препаратов полностью блокировался как глибенкламидом, так и 5-ГД, что также подтверждает первостепенную роль митоK<sub>ATФ</sub> в опосредовании антиишемического действия уридина и УМФ (Таблица 3). Глибенкламид и 5-ГД без последующего введения уридина или УМФ не изменяли величину зоны ишемической альтерации по сравнению с контролем.

Оценивая антиишемическое действие препаратов, следует заметить, что они оба проявляли выраженный защитный эффект, однако УМФ был более эффективен в качестве агента, уменьшающего размеры зоны инфаркта.

**Таблица 3.** Эффект уридина и УМФ на амплитуду Т-волны после окклюзии левой коронарной артерии (ЛКА) (Из [20-21]).

Группа (количество животных, n)	Амплитуда Т-волны (мВ)			
	Начальная фаза	После окклюзии ЛКА		
		3 мин	30 мин	60 мин
Контроль (16)	0.19±0.01	0.54±0.04	0.59±0.02	0.55±0.03
5-ГД (12)	0.17±0.02	0.63±0.03	0.65±0.04	0.59±0.04
Глибенкламид (10)	0.19±0.01	0.70±0.06*	0.65±0.05	0.59±0.05
Уридин (7)	0.18±0.01	0.34±0.03*	0.40±0.02*	0.35±0.03*
Уридин+ Глибенкламид (9)	0.18±0.01	0.57±0.04	0.51±0.04	0.47±0.03
Уридин +5-ГД (8)	0.20±0.01	0.54±0.00	0.58±0.01	0.53±0.04
УМФ (7)	0.17±0.02	0.41±0.03*	0.38±0.03*	0.34±0.02*
УМФ+ Глибенкламид (9)	0.20±0.01	0.74±0.07*	0.72±0.04*	0.68±0.06*
УМФ +5-ГД (10)	0.18±0.01	0.67±0.06	0.66±0.03	0.64±0.03

Дозы препаратов такие же, как в таблице 2. \* p<0.05, по сравнению с контролем.

### Ингибиторы калиевых каналов снижают антиаритмический эффект уридина и уридин-5'-монофосфата, введенных до создания экспериментального инфаркта

Показатели ишемических повреждений миокарда, о которых говорилось выше, характеризуют острый инфаркт миокарда только с одной стороны. Другой группой негативных последствий гипоксии являются нарушения сердечного ритма (Рис. 3).

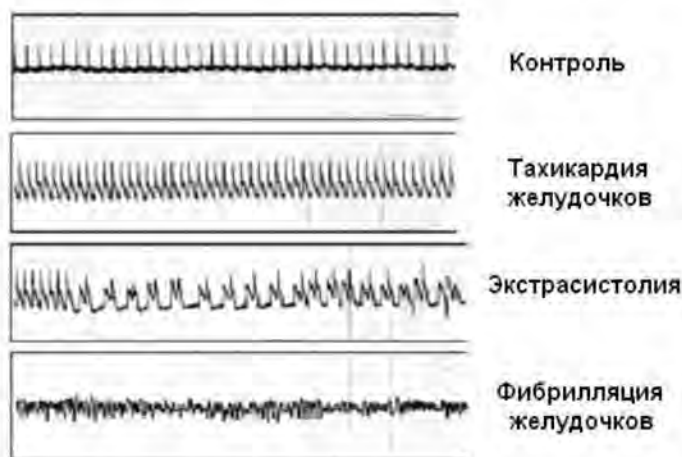


Рис. 3. Ранние аритмии у крыс при окклюзии левой коронарной артерии сердца. ЭКГ, II стандартное отведение (Из [20-21]).

В работе также показано, что предварительное введение уридина уменьшает длительность ранней пост-окклюзионной тахикардии в 4 раза, а УМФ – в 9 раз (Таблица 4).

Кроме того, как видно из таблицы, введение уридина сокращает количество экстрасистол в 2 раза, а введение УМФ - почти в 6 раз. Антиаритмический эффект уридина и УМФ блокировался, главным образом, глибенкламидом, а 5-ГД, хотя и снимал действие уридина, но оказывал менее выраженный эффект. Этот факт говорит о том, что, в отличие от антиишемического, антиаритмическое действие уридиновых препаратов опосредованно активацией обоих каналов, но, в большей степени, активацией цито $K_{ATP}$ .

Из представленных данных также можно заключить, что сами ингибиторы  $K_{ATP}$  каналов, глибенкламид и 5-ГД, практически не оказывали влияния на развитие ранних постокклюзионных аритмий сердца крысы, за исключением того, что классический ингибитор  $K_{ATP}$  каналов, глибенкламид, достоверно снижал продолжительность фибрилляции желудочков.

Исследование антифибрилляторной активности препаратов показало, что введение уридина и УМФ позволяет снизить длительность фибрилляций в 4 и 10 раз, соответственно, и существенно уменьшить частоту возникновения фибрилляций (Таблица 4, [20-22]). При этом ни глибенкламид, ни 5-ГД не блокируют положительное действие уридиновых препаратов на длительность фибрилляций, но почти полностью снимают защитный эффект уридина и УМФ в отношении частоты возникновения фибрилляций.

Таблица 4. Эффект уридина и УМФ на возникновение ранних постокклюзионных аритмий в сердцах крыс (Из [20, 21, 22]).

Группа (количество животных, n)	Длитель- ность аритмин , сек	Нарушения ритма			Частота возникновения, %	
		ЭС, n	ТЖ, сек	ФЖ, сек	Фиб- рилл яций	аритмий
Контроль (14)	844±73	344±29	132±16	43±12	86	100
Глибенкламид (10)	778±30	278±35	110±20	23±9	70	100
5-ГД (9)	842±51	257±38	128±22	44±15	67	100
Уридин (8)	469±42*	168±24*	32±5*	12±4*	37*	88
Уридин- Глибенкламид (8)	744±63°	275±45	110±2°	7±4*	62	89
Уридин 5- ГД (10)	710±54°	180±36*	20±4*	12±3*	60	80
УМФ (7)	457±75*	61±30*	14±12*	4±2*	29*	43
УМФ + Глибенклами д (9)	843±57 <sup>#</sup>	361±43 <sup>#</sup>	116±24 <sup>#</sup>	5±3*	55	89
УМФ -5- ГД (9)	749±82 <sup>#</sup>	240±42*	38±11*	7±4*	54	82

ЭС – количество экстрасистол; ТЖ – тахикардия желудочков; ФЖ – фибрилляция желудочков. Дозы препаратов такие же, как в таблице 3.

\* $p < 0.05$  относительно контроля; °  $p < 0.05$  относительно уридиновой группы; <sup>#</sup>  $p < 0.05$  относительно группы УМФ.

Следует отметить, что оба ингибитора действуют аналогично. Полученные результаты позволяют предположить, что как цито-, так и митоK<sub>АТФ</sub> каналы опосредуют антифибрилляторное действие уридина и УМФ лишь частично, снижая частоту возникновения фибрилляций и существенно не влияя на уменьшение длительности фибрилляций. В последнем случае могут быть задействованы иные механизмы.

Полученные в работе результаты говорят в пользу участия АТФ-зависимого калиевого канала внутренней мембраны митохондрий сердца в опосредовании механизма защиты миокарда от ишемических повреждений. Антиаритмическое действие изучаемых препаратов, вероятно, обусловлено активацией как митохондриального, так и цитоплазматического калиевых каналов. Однако основной вклад в реализацию этого эффекта вносит активация цитоK<sub>АТФ</sub>.

Результаты, полученные в этой работе, согласуются с литературными данными о кардиопротекторном действии β эстрадиола [23]. Тот факт, что положительный эффект препарата на зону инфаркта миокарда устранялся 5-ГД, но не специфическим для цитоK<sub>АТФ</sub> ингибитором NMR-1098, указывает на ведущую роль митоK<sub>АТФ</sub> канала в опосредовании антиишемической защиты миокарда. Антиаритмическое же действие β эстрадиола блокировалось, как и в

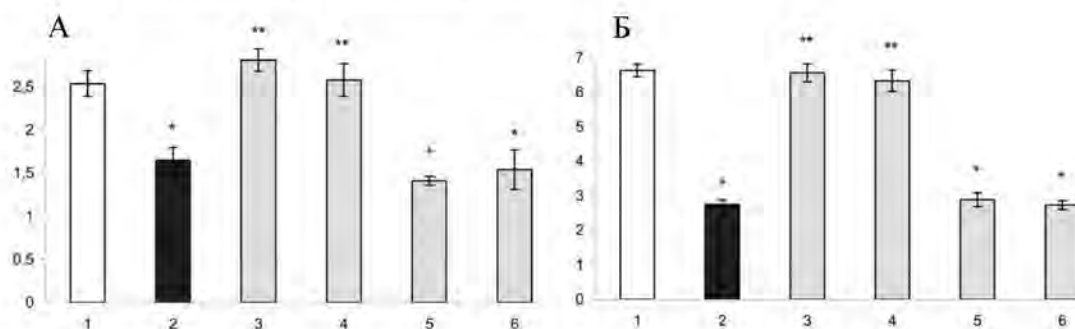
наших исследованиях, главным образом, за счет ингибирования клеточного  $K_{ATP}$  канала, так как HMR-1098 снимал этот эффект. Полученные данные позволили авторам объяснить факт меньшей частоты возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у женщин в период менопаузы, по сравнению с мужчинами той же возрастной группы [23].

Что касается механизма антифибрилляторного действия уридина и УМФ, то следует отметить, что оба канала участвуют в регуляции частоты возникновения аритмии. Однако поскольку ингибиторы  $K_{ATP}$  каналов практически не предупреждают снижение длительности фибрилляции, наблюдающееся при действии уридина и УМФ, не исключено, что данный механизм защиты сердца опосредован путями, не связанными с активацией  $K_{ATP}$  каналов. Объяснить это можно следующим образом. Одной из основных причин нарушений ритма является дисфункция систем ионного транспорта через сарколемму, работу которых обеспечивает АТФ, образующийся в ходе гликолиза [24]. АТФ осуществляет энергообеспечение физиологической продолжительности потенциала действия мембраны миокардиальной клетки. Дефицит АТФ существенно повышает опасность развития фибрилляции желудочков. Ряд литературных данных подтверждает усиление синтеза гликогена и, следовательно, активации гликолитического энергообразования при введении экзогенного уридина при гипоксии [25]. При этом следует отметить, что в условиях инфаркта миокарда у крыс введение УМФ сопровождается повышением активности основных ферментов гликолиза лактат дегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы в перинфарктной зоне [17]. У крыс с дистрофией миокарда уридин и УМФ повышали содержание АТФ и креатинфосфата в миокарде [26]. Таким образом, участие уридина и УМФ в ресинтезе гликогена и поддержании, в связи с этим, энергетического обмена может лежать в основе антифибрилляторного действия уридина и УМФ.

Полученные в работе данные, касающиеся кардиопротекторного действия уридина и УМФ, согласуются с литературными данными о том, что при окклюзии аорты у крыс [27] и у кроликов [28] почти на 50% увеличивается общее содержание уридиновых фосфонуклеотидов в клетке в течение 48 часов. Уридин при ишемии начинает более эффективно поглощаться тканью сердца из кровотока [18], при этом миокард, в отличие от других тканей, обладает в 1,5-2 раза большей аффинностью к уридину [29]. Кроме того, методом HPLC на культуре крысиных кортикоэнцефалических клеток показано, что в условиях ишемии в клетке снижается концентрация трифосфатов (АТФ, ГТФ, УТФ) и значительно повышается концентрация АДФ и УДФ, при неизменной концентрации ГДФ. При этом 5-ГД (30 мкМ) блокирует наблюдающиеся изменения концентраций нуклеотидов и нуклеозидов [30]. Эти данные также подтверждают наши представления об участии мито $K_{ATP}$  в кардиопротекции.

**Уридин и УМФ восстанавливают содержание АТФ и креатинфосфата на 60 мин острой ишемии, а селективный ингибитор мито $K_{ATP}$ -каналов 5-гидроксидеканоат препятствует проявлению их кардиопротекторного действия**

Как известно, основным патогенетическим звеном ишемического повреждения кардиомиоцитов является возникновение дефицита макроэргических соединений [2]. Результаты нашего исследования показали, что через 60 мин после окклюзии ЛКА в миокарде крыс наблюдалось значительное уменьшение концентрации АТФ и КФ (рис. 4). Обнаружено, что снижение содержания КФ было более выраженным по сравнению с АТФ. Возможно, это связано с тем, что имеющийся на ранних стадиях острой ишемии запас КФ используется для внутриклеточного транспорта энергии и поддерживает, таким образом, локальные клеточные пулы АТФ, в то время как пул самого КФ в условиях гипоксии не пополняется.



**Рис. 4.** Влияние ингибирования митоK<sub>АТФ</sub> на энергосберегающий эффект уридина и УМФ при острой ишемии миокарда: А – содержание АТФ (мкмоль/г) в миокарде, Б – содержание КФ (мкмоль/г) в миокарде, 1 – интактные, 2 – контроль – острая ишемия миокарда (ОИМ), 3 – ОИМ + уридин, 4 – ОИМ + 5-НД + уридин, 5 – ОИМ + УМФ, 6 – ОИМ + 5-НД + УМФ. \*- достоверность отличия по сравнению с группой интактных крыс, \*\* - достоверность отличия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ ; в каждой группе по 8-10 крыс (Из [31, 32]).

Как видно из рисунка, введение животным УМФ за 5 мин до окклюзии приводило к стабилизации энергетического обмена в ишемизированном миокарде, что проявлялось в восстановлении до исходного уровня концентрации АТФ на 30-ой мин, а КФ на 60-ой мин окклюзии. Селективный блокатор митоK<sub>АТФ</sub> 5-НД, введенный животным за 5 мин до уридина или УМФ, устранял их энергостабилизирующее действие. Содержание АТФ и КФ в миокарде крыс этой группы оставалось на уровне значений этих показателей у контрольных животных. Этот факт позволяет говорить о том, что кардиопротекторный эффект изученных соединений определяется, в основном, их способностью активировать митоK<sub>АТФ</sub>. Можно полагать, что активация митоK<sub>АТФ</sub> канала приводит к сохранению структурно-функциональной организации митохондрий и возможности аэробного синтеза АТФ. Подтверждением этого предположения являются полученные нами ранее данные о том, что в условиях ишемии миокарда производные уридина с одной стороны увеличивают содержание пирувата, с другой – не усиливают ацидоз, вызванный ишемией [33]. Как известно, пируват, включаясь в цикл Кребса с последующим митохондриальным окислением, способствует сохранению энергетического баланса в кардиомиоцитах. В наших экспериментах было изучено также изменение содержания УДФ в миокарде после введения уридина или УМФ интактным крысам в условиях ОИМ (рис. 5). Установлено, что через 60 мин после введения уридина интактным животным содержание УДФ в миокарде увеличивалось в 2 раза, а при введении УМФ – в 1,3 раза по сравнению с фоновыми значениями. Эти результаты подтверждают предположение о возможности включения

экзогенных уридина и УМФ в метаболические превращения с образованием УДФ в кардиомиоцитах.

Не столь четкие результаты были получены у животных с ОИМ. В этом случае при введении УМФ также наблюдалось значительное увеличение концентрации УДФ (на 86% по сравнению с фоновыми значениями и на 34% по сравнению с его уровнем при ОИМ), в то время как при введении уридина отмечена лишь тенденция к увеличению содержания УДФ в миокарде. Это может быть связано с разной скоростью захвата из крови, доставки к мишени и метаболизма уридина и УМФ при ишемии, а также с разными темпами метаболизма самого УДФ в условиях нормоксии и гипоксии. Какие-либо данные относительно параметров кинетики уридина и его производных в литературе отсутствуют. Можно предположить, что пик увеличения содержания УДФ после введения нуклеозида достигается на более ранних сроках, чем 60 мин. То есть время максимального увеличения концентрации УДФ в сердце после введения уридина и УМФ может быть разным.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что профилактическое применение уридина и УМФ приводит к повышению устойчивости кардиомиоцитов к недостатку кислорода в условиях острой ишемии миокарда, что проявляется, в частности, в сохранении энергетического статуса. Поскольку 5-НД является специфическим ингибитором митоK<sub>ATP</sub>, его способность блокировать антиишемическое действие уридина и УМФ позволяет сделать вывод о ведущей роли митоK<sub>ATP</sub> в реализации механизма защитного действия этих соединений на миокард при ишемическом воздействии.

### **Уридин-5'-монофосфат предотвращает активацию перекисного окисления липидов и нарушение функции антиоксидантной системы в сердце на ранних сроках острой ишемии. Селективный блокатор митохондриальных АТФ-зависимых K<sup>+</sup>-каналов 5-гидроксидеканоат устраняет его защитный эффект**

Как известно, нарушения энергетического обмена и сопутствующая им активация свободнорадикальных реакций являются триггером в формировании каскада патобиохимических процессов, приводящих к гибели клеток в условиях гипоксии [34, 35]. Дыхательная цепь митохондрий в условиях кислородной недостаточности становится основным источником образования свободных радикалов кислорода, инициирующих чрезмерное усиление ПОЛ [36]. Другим источником этих радикалов является прооксидантная ксантиноксидантная система [37, 38]. Усиленная продукция свободных радикалов сопровождается расходом тканевых антиоксидантов и стимуляцией пероксидации мембран клеток [39]. В связи с этим было проведено исследование влияния УМФ на перекисное окисление липидов (ПОЛ) и антиоксидантную систему миокарда, а также изучена зависимость эффектов препарата от активности митоK<sub>ATP</sub>-каналов при ОИМ.

В настоящей работе определяли содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ), восстановленного глутатиона (ВГ) и активность СОД через 60 мин после окклюзии ЛКА в сердце методом ВЭЖХ. В сыворотке крови определяли активность параоксоназы (ПО).

Результаты настоящего исследования показали, что после перевязки ЛКА длительностью 60 мин в миокарде значительно увеличивается количество ГПЛ (на 97%) (Таблица 5). Одновременно отмечались изменения в активности антиоксидантной системы, ограничивающей скорость ПОЛ. Так, наблюдалось ингибирование активности СОД - ключевого фермента, восстанавливающего супероксидный радикал до перекиси водорода (на 28%). Отмечалось также снижение активности глутатионовой системы, обеспечивающей утилизацию перекиси водорода и ГПЛ, что проявлялось в уменьшении количества ВГ на 30%.

**Таблица 5.** Влияние уридина и комбинации 5-ГД с уридином на показатели ПОЛ и антиоксидантной системы в миокарде при остром инфаркте миокарда длительностью 60 мин (ОИМ) (Из [31]).

Группы животных	ГПЛ (ОД <sub>480</sub> )	СОД (усл.ед./мг белка)	ВГ (мкМ/г)
Интактные	0,070±0,003	2,27±0,02	34,37±0,62
ОИМ, контроль	0,138±0,014*	1,63±0,01*	23,99±1,02*
уридин+ОИМ	0,077±0,003**	1,99±0,05**	33,61±1,73**
5ГД-уридин+ОИМ	0,124±0,005*	1,65±0,04*	20,75±1,25*

*Примечание.* Представлены средние значения ± ошибка средней. \* - достоверность отличия по сравнению с группой интактных крыс, \*\* - достоверность отличия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ ; в каждой группе по 8-10 крыс.

В сыворотке крови при этом на 93% повышалась активность параоксоназы ПО (Таблица 6). Этот антиоксидантный фермент, полностью ассоциированный с липопротеидами высокой плотности, препятствует окислению липидов в липопротеидах низкой плотности.

**Таблица 6.** Влияние уридина и комбинации 5-ГД с уридином на активность параоксоназы в сыворотке крови при остром инфаркте миокарда (ОИМ) длительностью 60 мин (Из [31]).

Группы	ПО (мкМ/мин·л) в сыворотке крови
Интактные	21,39±1,69
ОИМ, контроль	41,4±3,39*
уридин+ОИМ	26,47±1,97**
5-ГД+уридин+ОИМ	43,56±23,21*

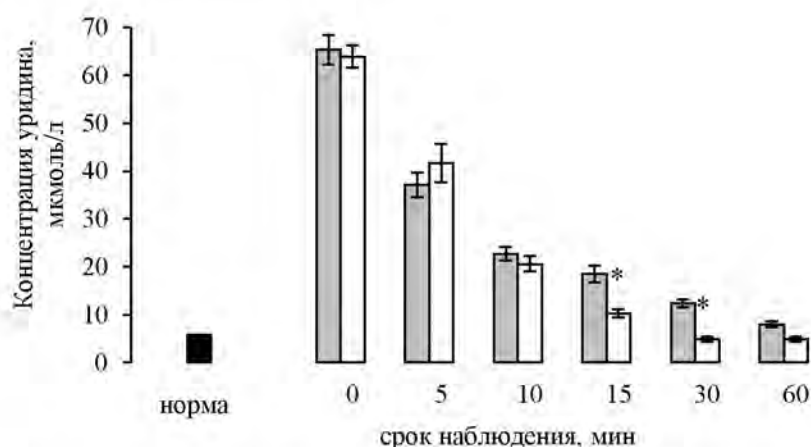
*Примечание.* Представлены средние значения ± ошибка средней. \* - достоверность отличия по сравнению с группой интактных крыс, \*\* - достоверность отличия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ ; в каждой группе по 8-10 крыс.

Как видно из таблиц, профилактическое введение уридина приводило к предотвращению активации ПОЛ и нарушений функции антиоксидантной системы. Так, содержание ГПЛ, активность СОД, концентрация ВГ в ишемизированном миокарде и активность ПО в сыворотке крови на фоне действия препарата оставались на уровне этих показателей у интактных крыс,

что свидетельствует о сохранении равновесия процессов ПОЛ и активности антиоксидантной системы, необходимом для поддержания гомеостаза в клетках.

Селективный блокатор митоK<sub>ATФ</sub> каналов 5-ГД, введенный животным за 5 мин до инъекции УМФ и последующей окклюзии ЛКА длительностью 60 мин, полностью устранял положительный эффект УМФ в отношении ограничения интенсивности ПОЛ и активации антиоксидантной системы, о чем свидетельствовало сохранение на уровне контрольных значений содержания ГПЛ, активности СОД, концентрации ВГ в миокарде и активности ПО в сыворотке крови.

В работе исследована также динамика изменения содержания уридина в крови после его внутривенного введения (рис. 6). Как видно из таблиц, профилактическое введение уридина приводило к предотвращению активации ПОЛ и нарушений функции антиоксидантной системы. Так, содержание ГПЛ, активность СОД, концентрация ВГ в ишемизированном миокарде и активность ПО в сыворотке крови на фоне действия препарата оставались на уровне этих показателей у интактных крыс, что свидетельствует о сохранении равновесия процессов ПОЛ и активности антиоксидантной системы, необходимом для поддержания гомеостаза в клетках.



**Рис.6.** Влияние ишемии миокарда на темпы элиминации уридина из крови крыс после его внутривенного введения (Из [31]).

*Примечания.* Точка «0» соответствует концентрации уридина в крови через 5 мин после его введения и моменту окклюзии ЛКА у крыс 3-ей группы. Черный столбик – содержание уридина в крови у интактных животных (физиологическая норма), серые столбики - содержание уридина в крови интактных крыс, получивших уридин (2-ая группа), светлые столбики - содержание уридина в крови у животных с ОИМ и предварительным введением уридина (3-я группа). \* - достоверность различий между 2-ой и 3-ей группой при  $p < 0,05$ .

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что профилактическое введение УМФ приводит к повышению устойчивости кардиомиоцитов к недостатку кислорода в условиях острой ишемии, что проявляется в сохранении энергетического статуса миокарда и равновесии между ПОЛ и антиоксидантной системой в клетках. Результаты настоящего и ранее проведенных исследований с применением селективного блокатора митоK<sub>ATФ</sub> каналов позволяют заключить, что активация этих каналов играет ведущую роль в реализации защитного эффекта УМФ при ишемии миокарда.



## Механизмы защиты сердца при гипоксии, опосредованные активацией митоK<sub>ATP</sub>

Несмотря на то, что роль митоK<sub>ATP</sub> в адаптации организма к гипоксии доказана, остается неясным вопрос, каким образом открытие канала приводит к защите сердца от ишемических повреждений. Недавно были предложены три различных механизма защиты сердца при гипоксии, которые могут проявляться при открытии митоK<sub>ATP</sub>: 1) механизм, при котором усиление входа K<sup>+</sup> в митохондрии ведет к набуханию матрикса, что предупреждает распад АТФ; 2) механизм, основанный на снижении концентрации Ca<sup>2+</sup>, что уменьшает вероятность открытия митохондриальной поры и предупреждает гибель кардиомиоцитов; 3) механизм, связанный с изменением уровня активных форм кислорода (АФК), повышенная концентрация которых, с одной стороны, активирует ряд ферментов, а с другой, необратимо повреждает мышечную ткань при гипоксии.

Известно, что при набухании митохондрий усиливается окисление жирных кислот и увеличивается продукция АТФ [40, 41]. Хотя ранее было продемонстрировано, что набухание митохондрий является следствием открытия митоK<sub>ATP</sub>, вопрос о связи этого эффекта непосредственно с сохранением целостности митохондрий после ишемии и реперфузии остается открытым [42]. Идея о том, что потребление K<sup>+</sup> митохондриями и сопутствующее ему набухание этих органелл оказывает кардиопротекторный эффект, подтверждается тем, что активация других митохондриальных K<sup>+</sup> каналов, например, Ca<sup>2+</sup>-активируемого K<sup>+</sup> канала, также предупреждает ишемические повреждения [43]. Однако, этот эффект не блокируется ингибитором митоK<sub>ATP</sub>, что наблюдается при «preconditioning». Следовательно, именно митоK<sub>ATP</sub> задействован в формировании феномена «preconditioning».

Согласно второй гипотезе [44-47], в состоянии аноксии митохондриальная мембрана деполяризуется, скорость электрофоретического входа кальция снижается и, соответственно, уменьшается количество Ca<sup>2+</sup> в митохондриях. Это, в свою очередь, предупреждает образование Ca<sup>2+</sup>-активируемой митохондриальной поры, открытие которой ведет к развитию апоптоза и некроза ткани [48]. Полученные данные согласуются с результатами исследований о предотвращении апоптоза при активации митоK<sub>ATP</sub> [49], возможно, путем ингибирования митохондриальной поры [50]. Однако, как показано в лаборатории проф. Гарлида, при открытии митоK<sub>ATP</sub> снижение потенциала настолько мало [51], что не может существенно отразиться на скорости входа Ca<sup>2+</sup> в митохондриях.

Третий механизм, в настоящее время наиболее обсуждаемый, основан на обнаружении изменений уровня АФК, как во время прекондииции [52], так и в условиях реперфузии [14]. Стимуляция образования АФК короткими эпизодами гипоксии или при введении активаторов митоK<sub>ATP</sub>, предотвращаемая 5-ГД, оказывает защитное действие, ингибируемое антиоксидантами [53]. Этот эффект связан, вероятно, с активацией протеинкиназ, активируемых АФК, что ведет к иницированию целого ряда реакций, приводящих к кардиопротекции [54]. Предварительная обработка активаторами митоK<sub>ATP</sub> подавляет образование АФК при реперфузии [55]. Следовательно, митоK<sub>ATP</sub> может способствовать

продукции «защитных» АФК при адаптации к гипоксии и уменьшать образование «повреждающих» АФК при реоксигенации.

Учитывая все вышесказанное можно сделать вывод, что механизм антиишемического действия активаторов митоK<sub>ATP</sub> до сих пор окончательно не выяснен. В частности, остается непонятной причина сохранения устойчивости миокарда к гипоксии в течение длительного времени после ишемической адаптации сердца. Именно этот феномен может лежать в основе гипобарической адаптации животных и человека к гипоксии и связан он, вероятно, с экспрессией ряда белков, в том числе и белков, формирующих митоK<sub>ATP</sub> [56].

### Заключение

В работе проведено исследование кардиопротекторных и антиоксидантных свойств предшественников УДФ - уридина и УМФ, а также установлена связь механизма их действия с активацией митоK<sub>ATP</sub> канала. Установлено, что активация митоK<sub>ATP</sub> является уридиновыми нуклеотидами природным механизмом защиты от гипоксии, который предупреждает появление морфофункциональных и биохимических нарушений, а также ограничивает развитие окислительного стресса, возникающих в результате острой ишемии миокарда.

На митохондриях и бислойной липидной мембране показано, что УДФ является метаболическим активатором митоK<sub>ATP</sub> канала, который активирует целый канал через его канальную субъединицу. Следует заметить, что концентрации УДФ, активирующие канал, являются физиологическими, и значительно меньше концентраций, влияющих на цитоK<sub>ATP</sub> канал [16, 57]. Следовательно, согласно нашим данным, УДФ является важным физиологическим и специфическим активатором митоK<sub>ATP</sub> канала. В то же время, использование УДФ как фармакологического агента осложнялось его химической нестабильностью и неспособностью проникать в клетку, что определило дальнейшее использование его метаболических предшественников - уридина и УМФ с целью изучения их антиишемического потенциала. Эти соединения, в отличие от УДФ, могут проникать в клетку и участвовать в его синтезе.

В работе на модели острого экспериментального инфаркта миокарда у крыс установлено антиишемическое и антиаритмическое действие уридина и УМФ. Показано, что эти соединения существенно снижают размеры зоны инфаркта миокарда (более чем в 3 раза), способствуют нормализации амплитуды Т-волны. Кроме того, наблюдается заметное улучшение параметров ритма сердца, а именно снижение количества экстрасистол, длительности желудочковой тахикардии и межжелудочковой фибрилляции. Антиишемическое действие уридина и УМФ блокируется как глибенкламидом, так и 5-ГД, что говорит о преимущественном вкладе в защитное действие препаратов активации митоK<sub>ATP</sub> канала. В то же время, антиаритмический эффект предшественников УДФ опосредован активацией и митохондриального, и цитоплазматического K<sub>ATP</sub> каналов, но в большей степени, активацией цитоK<sub>ATP</sub>. Антифибрилляторный же эффект уридина и УМФ опосредуется не только активацией мито- и цитоK<sub>ATP</sub> каналов, но, в большей степени, другими

механизмами, поскольку защитный эффект препаратов блокируется 5-ГД и глйбенкламидом незначительно.

Следует особо подчеркнуть, что поскольку антиаритмический эффект уридина проявляется в равной степени при введении препарата до и через 5 минут после окклюзии ЛКА, этот препарат может быть перспективным не только в плане предупреждения, но и в плане его использования в лечебных целях в остром периоде развития инфаркта.

Введение животным уридина или УМФ за 5 мин до окклюзии приводило к стабилизации энергетического обмена в ишемизированном миокарде, что проявлялось в восстановлении концентрации АТФ и КФ до исходного уровня, а также предотвращению активации ИОЛ и нарушений функции антиоксидантной системы. Селективный блокатор митоK<sub>ATP</sub> 5-ГД, введенный животным за 5 мин до уридина или УМФ, устранял их энергостабилизирующее и антиоксидантное действие. Этот факт позволяет говорить о том, что кардиопротекторный эффект изученных соединений определяется, в основном, их способностью активировать митоK<sub>ATP</sub>. На это указывает и тот факт, что проведенное нами измерение концентрации уридина в крови больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями может быть тестом на тяжесть заболевания.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о большой физиологической значимости митоK<sub>ATP</sub> канала в механизмах адаптации организма к гипоксии. Предложена теория, по которой цитоK<sub>ATP</sub> и митоK<sub>ATP</sub> каналы являются конечными эффекторами в защите сердца от окислительного стресса. Основным положением этой теории является то, что активация АТФ-зависимых калиевых каналов приводит к кардиопротекции, а ингибиторы обеих каналов почти полностью снимают положительные эффекты этой активации. Роль каналов, по всей вероятности, связана с обеспечением снижения образования в митохондриях активных форм кислорода, которые, как известно, в основном синтезируются в митохондриях и накапливаются в клетке при старении организма и в большинстве случаев заболеваний, что ведёт к разрушению клеточных мембран и гибели клетки.

Результаты, касающиеся влияния природных активаторов канала на развитие толерантности к ишемии и гипоксии, подтверждают возможность использования соединений подобного рода для разработки новых подходов к профилактике и терапии ряда заболеваний, вызванных нарушением коронарного кровообращения. Способность уридина проникать внутрь клетки и включаться в различные метаболические пути, а также предположение о возможности активации с помощью уридиновых соединений внутриклеточных процессов адаптации к ишемии, делают этот класс соединений перспективным для создания новых кардиопротекторных лекарственных препаратов.

Работа поддержана Правительством РФ (договор № 14.z50.31.0028), грантами РФФИ №16-15-00157 и РФФИ № 16-04-00692.

#### Список литературы

1. Захаров ВН (2001). М.: Наука, 285с.
2. Галенко-Ярошевский ЛА, Гацуря ВВ (2001). М.: Медицина, 384с.
3. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG (1997). *Cardiovasc Res.* 33(2),243-257.
4. Lopaschuk GD (1998). *Press Med.* 27(39),2100-2104.
5. Connolly GP, Duley JA (1999). *Trends Pharmacol Sci.* 20(5),218-225.
6. Gross G, Fryer RM (1999). *Circ Res.* 84(9),973-979.

7. Garlid K, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray H, Darbenzio R, D'Alonzo A, Lodge N, Smith M, Grover G (1997). *Circ Res*. 81,1072-1082.
8. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E (1998). *Circulation*. 97(24),2463-2469.
9. Fryer RM, Eells JT, Hsu AK (2000). *Am J Physiol*. 278.H305-H312.
10. Маслов ЛН, Липманов ЮБ, Гросс Г Дж, Стефано Дж (2002). *Вестник аритмологии*. 26,77-90.
11. Mironova GD, Skarga YN, Grigoriev SM, Negoda AE, Kolomytkin OV, Marinov BS (1999). *J Bioenerg Biomembr*. 31(2),157-161.
12. Mironova GD, Negoda A, Marinov BS et al. (2004). *J Biol Chem*. 279(31),32562-32568.
13. Auchampach J, Grover G, Gross G (1992). *Cardiovasc Res*. 26,1054-1062.
14. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C et al. (2000). *Circ Res*. 86,541-548.
15. Grigoriev SM, Skarga YY, Mironova GD, Marinov BS (1999). *Biochim Biophys Acta*. 1410(1),91-96.
16. Alekseev AE, Brady PA, Terzic A (1998). *J Gen Physiol*. 111,381-394.
17. Eliseev V, Evdokimova N, Krilova I, Turchina A, Slobodskaya V, Sliapot E. (1989). *Chemico-pharmaceutical J*. 3,270-273.
18. Matsushita S, Farburg B. (1970) *Circ Res*. 27,415-28.
19. Selye H, Bajusz E, Grasso S, Mendel P (1960). *Angiology*. 11,398-407.
20. Krilova IB, Kachalova EV, Rodionova OM, Evdokimova NR, Balina MI, Mironova GD, Sapronov NS (2006). *Experimental Gerontology*. 41(7),697-703.
21. Миронова ГД, Качалева ЕВ, Крылова ИБ, Родионова ОМ, Балдина МИ, Евдокимови НР, Сапронов НС (2007). *Вестник Российской Академии Медицинских наук*. 2,34-43.
22. Бульон ВВ, Крылова ИБ, Селина ЕН, Родионова ОМ, Евдокимови НР, Сапронов НС, Миронова ГД (2014). *Бюллетень Эксперимент биологии и медицине*. 6,696-699
23. Tsai Ch, Su Sh, Chou T, Lee T (2002) *J Pharmacol and Experim Therap*. 301,234-440.
24. Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marban E (2000). *Circulation*. 102,800-805.
25. Aussedat J, Ray A, Rossi A (1984) *Mol Physiol*. 6,247-256
26. Eliseev V, Slobodskaya V, Ilyin G, Kostin E. (1985). *Chemico-pharmaceutical J*. 6,694-696
27. Koide T, Rabinowitz M (1969). *Circ Res*. 24(1),9-18
28. Rossi A (1975). *J Mol Cell Cardiol*. 7(12),891-906
29. Aussedat J, Ray A, Rossi A (1984) *J Molecular Physiol*. 6,247-256.
30. Reinhardt R, Marmenko A, Guenther A, Franke H, Dieckel T, Garcia de Arriba S, Mueckli G, Schneider D, Wagner A, Illes P (2003). *Neurochem Int*. 43(6),563-571.
31. Крылова ИБ, Бульон ВВ, Селина ЕН, Миронова ГД, Сапронов НС (2012). *Бюллетень эксперимент биологии и медицины*. 5,596-599.
32. Бульон ВВ, Крылова ИБ, Селина ЕН, Емельянова ЛВ, Миронова ГД, Сапронов НС (2010). *Мед акаде журн*. 3,89-94.
33. Бульон ВВ, Крылова ИБ, Родионова ОМ и соавт. (2007). *Бюллетень эксперимент биологии и медицины*. 144(9),297-300.
34. Honda HM, Korge P, Weiss JN *Ann* (2005) *NY Acad Sci*. 1047,248-258
35. Zarubina IV (1999) *Нyxoxia Med J*. 1(7),2-9
36. Скулачев ВП (1995). *Мол биол*. 29(6),1119-1209.
37. Chambers DF, Parks DA, Patterson GA (1985). *J Cell Cardiol*. 17,145-152.
38. Nishino T (1994). *J Biochem. (Tokyo)*. 116,1-6.
39. Зарубина ИВ, Шабанов ПД (2004). *СНБ.: Н-Л*.
40. Grover G and Garlid K (2000). *J Mol Cell Pharmacol*. 32,677-695.
41. Halestrap AP (1989). *BBA*. 973(3),355-382.
42. Lim KH, Javadov SA, Das M, Clarke SJ, Suleiman MS, Halestrap AP (2002). *J Physiology*. 545,961-974.
43. Xu W, Liu Y, Wang S et al. (2002). *Science*. 298,895-902.
44. Liu Y, Sato T, Scharaseyov J et al. (1999). *Ann N Y Acad Sci*. 874,27-37.
45. Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marban E (2001). *Circ Res*. 89,891-898.
46. Korge P, Honda HM, Weiss JN (2002). *Proc Natl Acad Sci USA*. 99,3312-3317.
47. Holmuhamedov E, Wang L, Terzic A (1999). *J Physiol (Lond)*. 519,347-360.
48. Szabo I, Adams C, Gulbins E (2004). *Pflügers Arch Europe J Physiol*. 448,304-312.
49. Takashi E, Wang Y, Ashraf M (1999). *Circ Res*. 85. 1146-1153.
50. Akao M, O'Rourke B, Kusuoka H et al. (2003). *Circ Res*. 92,195-202.
51. Carreira R, Facundo H, Kowaltowski A (2005). *Braz J Med Biol Res*. 38(3). 345-352.
52. Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP, Terzic A (2002). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 282,531-539.
53. Forbes RA, Steenberger C, Murphy E (2001). *Circ Res*. 88,802-809.
54. Takashi E, Wang Y, Ashraf M (1999). *Circ Res*. 85. 1146-1153.
55. Pain T, Yang X, Critz S, Yue Y, Nakano A, Liu G, Heusch G, Cohen M, Downey J (2000). *Circ Res*. 87,460-466.
56. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM (1993). *Circ Res*. 88(3). 1264-1272.
57. Anderson C, Parkinson F (1997). *Trends Pharmacol Sci*. 18(10). 387-392.

**Глава 4. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ И ИОННЫЙ ОБМЕН В  
МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ (МОДЕЛЬ  
КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ)**

Венедиктова Н.И.<sup>1</sup>, Горбачева О.С.<sup>1</sup>, Белослудцева Н.В.<sup>1,2</sup>, Федотова И.Б.<sup>3</sup>,  
Сурина Н.М.<sup>3</sup>, Полетаева И.И.<sup>3</sup>, Мурзасва С.В.<sup>2</sup>, Миронова Г.Д.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино

<sup>2</sup>Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

<sup>3</sup>Московский Государственный университет им. Ломоносова, Москва

**Аннотация**

Роль митохондрий мозга и печени при эпилептических состояниях была изучена на крысах линии Крушинского-Молодкина (КМ), которые реагируют на звук интенсивными судорожными приступами (аудиогенная эпилепсия). Мы не обнаружили существенных изменений в дыхании митохондрии мозга и печени крыс КМ и контрольных крыс; однако эффективность синтеза АТФ в митохондриях крыс КМ была снижена на 10%. У крыс с аудиогенной эпилепсией концентрация маркера окислительного стресса – малонового диальдегида в митохондриях мозга (но не печени) была в 2 раза выше, чем у контрольных крыс. Скорость образования  $H_2O_2$  в митохондриях мозга крыс КМ было вдвое выше, чем у контрольных животных при использовании NAD-зависимых субстратов. Эта разница была менее выражена в митохондриях печени. У КМ крыс, АТФ-зависимое набухание митохондрий было на 30% ниже, чем этот же параметр в митохондриях печени контрольных крыс. При исследовании ионного обмена было установлено снижение способности удерживать  $Ca^{2+}$  в митохондриях крыс с аудиогенной эпилепсией. Данные, полученные в исследовании, позволяют предположить, что активаторы митохондриального калиевого канала и антиоксиданты могут быть использованы в качестве лекарственного средства для профилактики и лечения хронической эпилепсии.

**Введение**

Эпилепсия и другие судорожные расстройства относятся к числу наиболее распространенных заболеваний центральной нервной системы. Этим определяется большая социальная значимость исследований патофизиологических механизмов судорожных состояний, а также поиска методов их предупреждения. Одним из перспективных подходов к изучению эпилепсии является экспериментальное моделирование судорожных расстройств.

Наиболее удобными для создания генетических моделей эпилепсии оказались грызуны. В конце 1940-х гг Л.В. Крушинский и его коллеги провели селекцию (на основе популяции крыс Wistar) линии животных (сейчас линия крушинского-молодкиной (КМ)), которые почти в 100% случаев в течение 10 сек, реагируют на сильный звук развитием интенсивного судорожного припадка (аудиогенная эпилепсия (АЭ)) [1]. В настоящее время существует несколько линий животных, у которых обнаруживаются аудиогенные судороги (АС) в

ответ на звук. Это линии крыс: KM, линии GFPR [2], WAR [3], а также мыши другого ряда линий, в частности, 101/11Y [4].

У крыс линии KM при развитии АС проявления эпилептической активности регистрируются в стволовых отделах мозга. В отделах мозга – неокортексе и гиппокампе, эпилептиформные разряды обнаруживаются только после многократных экспозиций воздействия звука, что сопровождается появлением миоклонических судорог (феномен киндлинга (kindling) или раскочки).

У описанных выше специализированных генетических линий крыс и мышей, проявление АС более или менее схожи [1]. Эндофенотип (аудиогенная эпилепсия) – это совокупность генетических и нейрохимических особенностей, проявляющихся как на уровне периферического органа слуха, так и на уровне структур головного мозга [5]. Основными признаками данного эндофенотипа являются: дисбаланс глутамат- и ГАМК-эргических систем в мозге, нарушение обмена моноаминов, пуринэргической, гистаминэргических систем, а также дисфункция цитокинов в мозге [5]. Изучение развития патологических особенностей в энергетическом, ионном и окислительном обменах при аудиогенной эпилепсии сможет, вероятно, помочь в понимании механизма реализации этого эндофенотипа.

Известно, что судорожные припадки возникают при «каскаде» деполаризации клеточных мембран нейронов. В норме потенциал на клеточной мембране равен 60-70 мВ, и он поддерживается градиентом калия, существующим между внеклеточной и клеточной средой [6]. Считается, что нарушение калиевого гомеостаза клетки является одним из патогенных моментов в возникновении судорог при эпилепсии. Предрасположенность центральной нервной системы к развитию судорог характеризуется снижением мембранного потенциала клетки и определенным соотношением внеклеточной и внутриклеточной концентраций ионов калия. Показано, что увеличение внеклеточной концентрации калия (например, с 2 до 9 мМ) приводит к снижению мембранного потенциала клетки с -63 мВ до -52 мВ. Такая деполаризация приводит к появлению судорог [6]. Было также установлено, что при эпилепсии наблюдаются нарушения в окислительном обмене [7, 8]. В настоящее время полагают, что нарушение калиевого и кальциевого гомеостаза клетки является главным патогенным моментом в эпилептогенезе, однако, механизм развития судорожного состояния пока не ясен. Для выявления механизмов развития этого заболевания необходим комплексный подход. Поэтому изучение ионного, энергетического и окислительного обменов на моделях экспериментальной эпилепсии является актуальным.

Использование крыс KM, обладающих повышенной судорожной готовностью, позволяет подойти к выяснению особенностей ионного, энергетического и окислительного обменов при предрасположенности животных к судорогам. В то же время, использованная в настоящей работе крысы линии KM, у которых за 2 дня до эксперимента создавали АС, позволяет дать характеристику происходящим процессам в клетке после развития судорог.

### **Схема эксперимента**

В работе были использованы 3 группы животных:

1 - крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ), которые в высокой степени предрасположены к судорожным припадкам в ответ на звук (фоновая группа);

2 - крысы КМs, которые за 2 дня до эксперимента были подвергнуты действию звука (3-4 мин, 12 кГц) с развитием интенсивных клонико-тонических судорог (аудиогенная эпилепсия) (Рис 1);

3 - контрольные крысы линии Вистар, которые не были предрасположены к аудиогенной эпилепсии (АЭ).



Рисунок 1. Развитие судорожной реакции крыс линии КМ в ответ на звуковое воздействие.

## Результаты и их обсуждение

Исследование биологических и генетических моделей эпилепсии важно для понимания этиологии этого психического расстройства и изучения молекулярных и биохимических основ его патогенеза. Крысы линии КМ – это генетическая модель эпилепсии, позволяющая анализировать возможные генетические механизмы развития предрасположенности к судорогам [1].

В данной работе были исследованы энергетический, окислительный и ионные обмены в митохондриях мозга и печени крыс линии КМ (фоновая группа и крысы КМs через 48 часов после интенсивного судорожного припадка), а также проведено сравнение полученных данных с результатами исследований у контрольных животных. В доступной литературе данных об энергетическом, окислительном и ионном обмене в митохондриях крыс линии КМ нами не найдено.

Проведенные исследования энергетического метаболизма митохондрий мозга и печени крыс показали, что при использовании НАД - зависимых субстратов достоверных отличий в показателях скоростей дыхания контрольных и опытных крыс не обнаружено. При оценке дыхания на субстрате второго участка дыхательной цепи - сукцинате в митохондриях мозга крыс КМ были отмечены изменения эффективности и времени фосфорилирования АДФ. (Табл.1).

В митохондриях печени у животных КМ (фоновая группа) и КМs было обнаружено статистически достоверное снижение эффективности фосфорилирования АДФ и увеличение времени его фосфорилирования по сравнению со значениями контрольных животных (Вистар). Таким образом, мы

обнаружили частичные изменения энергетического обмена на данной модели только на втором участке дыхательной цепи.

Ранее исследования энергетического обмена митохондрий мозга проводились как на пациентах с эпилепсией [9, 10], так и на нескольких моделях животных с экспериментальными судорожными припадками [11-14]. Было обнаружено, что параметры окислительного

**Таблица. 1.** Параметры дыхания митохондрий мозга и печени крыс

	Митохондрии мозга				Митохондрии печени			
	V <sub>3</sub>	RCR	ADP/O	t	V <sub>3</sub>	RCR	ADP/O	t
Control (Вистар)	58.6±3.1	2.8±0.3	2±0.1	3.5±0.1	156.9±13.4	7.4±0.2	2±0.1	1.44±0.1
КМ	61.1±6.2	2.5±0.2	1.6±0.3	4.4±0.9	132.2±5.6	6.9±0.2	1.8±0.1	1.9±0.09*
КМs	80.6±15	2.8±0.2	2±0.1	3.5±0.5	135.8±12.7	6.9±0.3	1.7±0.1*	2.2±0.2*

Митохондрии мозга и печени крысы (5мМ сукц<sup>1</sup>1μМ ротенон, 50 μМ ДНФ, 0.2 mM АДФ). V<sub>3</sub>, V<sub>4</sub>, V<sub>4</sub>, V<sub>днф-н-атом</sub> O/мин\*мг; АДФ/О-микромоль/мг-атом O, t-мин. Концентрация белка в кювете равна 0.5mg/ml, \*P<0.05 в сравнении с Вистар.

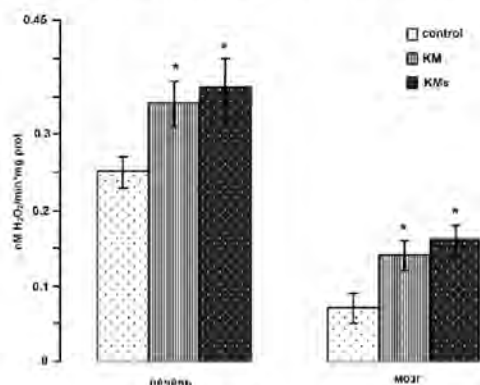
фосфорилирования, дыхательный контроль, а также концентрация АТФ в митохондриях неокортекса неполовозрелых крыс после экспериментально вызванных судорог не изменились по сравнению с показателями животных контрольной группы [15]. При этом было зарегистрировано снижение активности I комплекса дыхательной цепи в мозге опытных животных [14, 15]. Шейн Роули с соавторами на каннатной модели эпилепсии крыс обнаружили снижение скоростей окислительного фосфорилирования в митохондриях гиппокампа во время острой и хронической фаз развития судорог [13]. При индукции эпилепсии пиротоксином в мозге крыс было отмечено снижение скоростей дыхания при использовании субстратов для I и II участков дыхательной цепи. Кроме того, в митохондриях мозга опытных крыс было показано снижение активности сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы [16].

Следует отметить, что дыхание митохондрий при этом заболевании в основном анализируется на митохондриях мозга. Это, на наш взгляд, недостаточно, поскольку эпилепсия - это комплексное заболевание, затрагивающее многие системы организма. Нарушения работы дыхательной цепи и параметров окислительного фосфорилирования в митохондриях печени описаны только в единичных исследованиях у больных с эпилептической энцефалопатией, а также в данном исследовании [17-19].

Изучению окислительного обмена при эпилепсии в литературе посвящено значительно большее внимание [7, 8]. Однако на модели аудиогенной эпилепсии крыс КМ подобные исследования на митохондриях не проводились. В настоящей работе было обнаружено, что при использовании НАД-зависимых



субстратами, скорость образования перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) в митохондриях мозга крыс КМ и КМ<sub>s</sub> была значительно (в 2 и более раз) выше по сравнению с этой скоростью у контрольных животных, а после создания судорог эта скорость ещё несколько увеличилась (Рис. 2).



**Рис. 2.** Скорость образования перекиси водорода в митохондриях мозга и печени крыс. Используемый субстрат: 2,5мМ глутамат/2,5мМ малат. \*P<0.05 в сравнении с контролем.

В митохондриях печени эти различия были менее выражены, хотя общая скорость образования перекиси водорода в них выше, чем в митохондриях мозга. Это подтверждает большее вовлечение мозга в развитие акустической эпилепсии. Достоверных

различий в скоростях генерации  $H_2O_2$  митохондриями мозга и печени исследуемых групп крыс при применении в качестве субстрата сукцината не было обнаружено, хотя после создания судорог, в митохондриях мозга наблюдается увеличение этой скорости (Табл. 2).

**Таблица. 2.** Скорость образования перекиси водорода в митохондриях печени и мозга различных групп крыс.

	Контроль (Вистар)	КМ	КМ <sub>s</sub>
Митохондрии мозга	0,14±0,02	0,13±0,01	0,19±0,09
Митохондрии печени	0,28±0,03	0,31±0,02	0,33±0,04

Используемый субстрат: 5 мМ сукцинат + 1μМ ротенон. Скорость образования  $H_2O_2$ , nM/min/mg

Следовательно, продукция  $H_2O_2$  в условиях нашего эксперимента происходит больше на I участке дыхательной цепи, где образующийся супероксидный радикал при помощи супероксиддисмутазы превращается в перекись водорода.

Мы отметили, что у контрольных животных скорость образования  $H_2O_2$  в митохондриях печени в 2-3 раза выше, чем в митохондриях мозга (Рис. 2 и табл. 2). При этом оказалось, что концентрация малонового диальдегида (МДА) в митохондриях мозга контрольных животных в 3 раза выше, чем в митохондриях печени (Табл. 3). Это может быть связано с разной активностью антиоксидантных систем в этих тканях. Считается, что клетки мозга более уязвимы к повреждениям, индуцируемым окислительным стрессом, так как в них больше митохондрий, большая степень окисляемых липидов, большие количества железа и меди, высокое потребление кислорода и меньшая антиоксидантная активность, чем в других тканях [20, 21].

В работе обнаружено, что в митохондриях мозга крыс КМ концентрация МДА статистически достоверно повышена, при этом значение этого показателя у крыс КМ<sub>s</sub> после акустической эпилепсии увеличено в 2 раза (Табл. 3). МДА используется для идентификации окислительного повреждения липидов при многих патологиях [22].

**Таблица. 3.** Концентрация МДА в митохондриях мозга и печени крыс

	[МДА] митохондрии печени, $\mu\text{M}/\text{mg}$	[МДА] митохондрии мозга, $\mu\text{M}/\text{mg}$
Контроль (Вистар)	$1.2 \pm 0.1$	$4 \pm 0.3$
КМ	$1.1 \pm 0.06$	$4.6 \pm 0.3^{\dagger\dagger\dagger}$
КМ <sub>s</sub>	$1.1 \pm 0.08$	$8.4 \pm 0.5^{***}$

\*\*\* $P < 0.001$  в сравнении с В,  $^{\dagger\dagger\dagger} P < 0.001$  в сравнении с КМs

Увеличение продукции перекисного окисления липидов (ПОЛ) было обнаружено в слуховой коре, гиппокампе, базальных ганглиях и мозжечке после эпилептогенного приступа на нескольких моделях экспериментальной эпилепсии в первые часы после приступа [23], которое снижалось в коре после 24 часов [24, 25]. Представлено довольно много работ об увеличении концентрации МДА в гиппокампе животных во время острой фазы судорожного припадка на экспериментальных моделях эпилепсии грызунов [26-28]. В литературе обнаружены исследования, в которых концентрация МДА увеличивалась в 12-14 часов после развития судорог, но затем значения снижались или достигали базового уровня. Предполагается, что такая нормализация уровня МДА происходит из-за снижения метаболизма, частичной гибели нейронов или усиления активности антиокислительной системы защиты организма [29].

Описанное выше двухфазное распределение  $\text{H}_2\text{O}_2$  и МДА было обнаружено во многих экспериментальных моделях и связано, вероятно, с повышением в латентный период заболевания активности ферментов антиокислительной защиты, таких как восстановленного глутатиона и др. [20, 19, 30].

Известно, что реактивные формы кислорода и ионы кальция в физиологических условиях исполняют роль сигнальных посредников в клетке, но повышенное их образование может привести к митохондриальной дисфункции, окислительному стрессу и повреждению клеток [8]. В результате, белки могут подвергаться посттрансляционным модификациям, таким как S-глутатионилирование/S-нитрозилирование. Изменение структуры ионных каналов и зависимых от энергии транспортёров может привести к нарушению возбудимости нейронов [20].

В митохондриях существуют несколько систем транспорта  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , и в работе мы показали нарушение их активации при экспериментальной эпилепсии. Известно, что митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы (митоК<sub>АТФ</sub>) сопрягают метаболизм с возбудимостью клеток, регулируя движение калия через мембрану. Изучение параметров АТФ-зависимого транспорта калия в митохондриях проводилось несколькими методами, а именно:

- а) энергозависимый вход калия в митохондрии исследуемых животных
- б) ДНФ-стимулируемый транспорт калия в митохондриях мозга и печени исследуемых крыс
- в) определение концентрации калия в митохондриях мозга и печени у крыс исследуемых групп

Было обнаружено, что активность митоK<sub>ATP</sub> в митохондриях опытных крыс снижается и вероятно, это может быть одной из причин развития повреждения клеток при эпилепсии (Табл. 4, 5, 6).

В работе показано, что скорость набухания митохондрий печени крыс КМ была ниже в среднем на 30% по сравнению с теми же показателями у крыс Вистар (Табл. 4). Скорость набухания митохондрий мозга оценить сложно, так как количество крист, от которых зависит объем органелл, значительно меньше, чем в митохондриях печени [31].

У крыс линии КМ (крысы, не подвергаемые звуковому воздействию) наблюдалась сниженная по сравнению с контрольными животными скорость выхода K<sup>+</sup> из митохондрий как печени, так и мозга (Табл. 5).

**Таблица 4.** Скорость набухания митохондрий печени крыс у различных групп животных.

	Скорость набухания митохондрий печени, OD/min*mg
Контроль (Вистар)	0.20±0.014
КМ	0.14±0.004*
КМ <sub>s</sub>	0.15±0.01*

\*P<0.05 в сравнении с контролем.

При исследовании ДНФ-индуцированного выхода калия, который также отражает работу митоK<sub>ATP</sub>, мы обнаружили, что в митохондриях печени у крыс КМ<sub>s</sub> скорость выхода калия увеличилась, но не изменилась в митохондриях мозга (Табл. 5). При этом скорость выхода калия из митохондрий мозга и печени у крыс КМ (без звукового воздействия) была ниже, чем те же показатели у крыс КМ после аудиогенной эпилепсии (Табл. 5).

**Таблица 5.** ДНФ-индуцируемый выход калия в митохондриях печени и мозга крыс

	печень	мозг
Control (Вистар)	27.2±1.7	18.8±0.9
КМ	18.3±1.1 <sup>†</sup>	14±0.4 <sup>†, **</sup>
КМ <sub>s</sub>	34.6±1.6 <sup>**</sup>	18.1±0.7

DNP-скорость выхода K<sup>+</sup>-μM/min·mg protein, <sup>†</sup>-P<0.05 в сравнении с КМ<sub>s</sub>. <sup>\*\*</sup>-P<0.05 в сравнении с Вистар.

При использовании калий-селективного электрода, в работе было обнаружено, что количество калия в митохондриях мозга примерно в 2 раза выше, чем в митохондриях печени (Табл. 6). При этом достоверное увеличение концентрации иона было найдено только в митохондриях печени крыс КМ<sub>s</sub> после звукового воздействия. Сходные результаты были получены и для митохондрий печени, но только при использовании НАД-зависимых субстратов (Рис. 3).

Известно, что ингибирование митоK<sub>ATP</sub> ведёт к увеличению продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [32], необратимому повреждению нейронов [33] и нарушению работы дыхательной цепи [34]. Не исключено, что это может оказывать влияние и на концентрацию калия в цитоплазме и изменение концентрационного градиента этого иона между клеткой и внеклеточным пространством. Нарушение

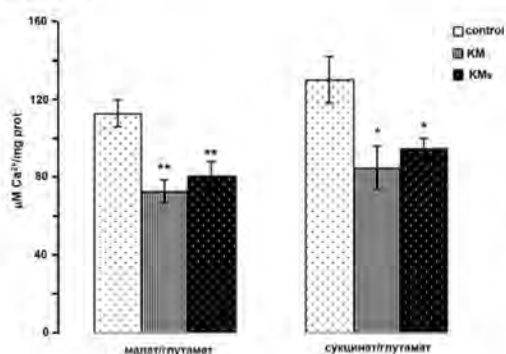
гомеостаза калия может вызвать снижение мембранного потенциала клетки, приводящее к появлению судорог [35].

**Таблица 6.** Концентрация иона калия в митохондриях мозга и печени крыс

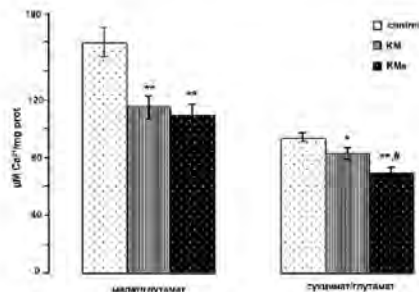
	[K <sup>+</sup> ], митохондрии печени	[K <sup>+</sup> ], митохондрии мозга
Control (Вистар)	62.1±4	156±13.9
КМ	72.8±5.8	139.3±7.2
КМ <sub>s</sub>	77.7±1.2*	165.7±10.7

[K<sup>+</sup>]- μM/mg, \*-P<0.05 в сравнении с контролем.

Развитие окислительного стресса и усиление ПОЛ приводит также, по нашим данным, к снижению способности митохондрий удерживать Ca<sup>2+</sup> (Рис. 3 и 4). В митохондриях мозга крыс КМ и КМ<sub>s</sub> способность удерживать кальций была снижена в 1,4-1,5 раза по сравнению с контрольной группой животных (Рис. 3).



**Рис. 3.** Ca<sup>2+</sup>-емкость митохондрий мозга опытных крыс при использовании 5 mM малата/5mM глутамата (субстраты I комплекса митохондриальной дыхательной цепи) или 5 mM сукцината/2.5 mM глутамата (субстраты II комплекса). Представлена конечная концентрация добавленного Ca<sup>2+</sup> необходимая для открытия митохондриальной проницаемой поры в мозге. \*P<0.05 в сравнении с контролем, \*\*P<0.01 в сравнении с контролем.



**Рис. 4.** Ca<sup>2+</sup>-емкость митохондрий печени опытных крыс при использовании 5 mM малата/5mM глутамата (субстраты I комплекса митохондриальной дыхательной цепи) или 5 mM сукцината/2.5 mM глутамата (субстраты II комплекса). Представлена конечная концентрация добавленного Ca<sup>2+</sup>, необходимая для открытия митохондриальной проницаемой поры в печени. \*P<0.05 в сравнении с контролем, \*\*P<0.01 в сравнении с контролем, # P<0.05 в сравнении с КМ.

Следует отметить, что воздействие звуком на крыс КМ за 2 дня до эксперимента существенно не повлияло на способность митохондрий удерживать Ca<sup>2+</sup> по сравнению с фоновой группой КМ.

Нарушение кальциевого обмена может влиять на возбудимость нейронов, а также на повышение вероятности открытия неспецифической циклопорин А-чувствительной поры в митохондриях и индуцировать механизмы, ведущие к гибели клетки. Перегрузка клеток кальцием может привести к апоптозу/некрозу нейронов при эпилепсии [20, 36, 8].

Таким образом, на модели аудиогенной эпилепсии в митохондриях мозга и печени крыс, по нашим данным, обнаруживаются генетически детерминированные: повышение скорости образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, увеличение продуктов перекисного окисления липидов, изменение работы дыхательной цепи, снижение активности митоK<sub>ATP</sub> канала и нарушение способности органелл удерживать кальций.

Учитывая полученные в работе данные, можно предположить, что в арсенал уже известных лекарственных средств альтернативной профилактики или лечения хронической эпилепсии, таких как кетогенная диетотерапия, введение различных нейротропных факторов, гормонов или антиоксидантов, активаторов вольт-зависимых калиевых каналов [37-39] и др. могут быть также внесены активаторы митоK<sub>ATP</sub> канала. В последнее время активаторы канала уже используются для предупреждения окислительного стресса, сопровождающего многие заболевания [40-42]. Кроме того, на модели острого клондинга после введения животным уридина было зафиксировано снижение эпилептических припадков [43]. Известно, что введение уридина крысам увеличивает концентрацию в клетке уридиндифосфата, природного активатора митохондриального калиевого канала [44]. Кроме того, недавно было показано вовлечение митоK<sub>ATP</sub> в защиту животных во время судорог, вызванных электрошоком. [45]. Совокупность литературных и полученных в работе данных указывает на участие митохондриального калиевого канала в механизме генерации судорожных состояний у крыс.

Работа поддержана Правительством РФ (договор № 14.Z50.31.0028), ДПННТ № 2014-281/2495, грантами РФФИ №16-15-00157 и РФФИ № 16-04-00692.

#### Список литературы

1. Poletieva II, Surina NM, Kostina ZA, Perpelkina OV, Fedotova IB (2015) *Epilepsy Belav*. pii: S1525-5050(15)00251-6. doi: 10.1016/j.yebeh.2015.04.072. Epub ahead of print..
2. Kurtz BS, Lehman J, Garlick P, Amberg J, Mishra PK, Dailey JW (2001). *J Neurogenet.* 15,233–244.
3. Doretto MC, Fonseca CG, Lobo RB, Terra VC, Oliveira JA, Garcia-Cairasco N (2003). *Behav Genet.* 33,33–42.
4. Sparks DL, Buckholtz NS (1985). *Pharmacol Biochem Behav.* 23,753–757.
5. Gould TD, Gottesman II (2006) *Genes Brain Behav.* 5(2),113-119
6. Müller M, Sonjen GG (2000) *J Neurophysiol.* 83(2),735-745.
7. Puttachary S, Sharma S, Stark S, Thippeswamy T (2015). *BioMed Res Int.* 745613. doi: 10.1155/2015/745613
8. Martini B, Grabnar I, Vosk T (2012). *Current Neuropharmacology.* 10,328-343.
9. Kunz WS, Kudin AP, Vielhaber S, Blümecke I, Zusehrater W, Schramm J, Beck H, Elger CE (2000). *Ann Neurol.* 48(5),766-773
10. Lee YM, Kang HC, Lee JS, Kim SH, Kim EY, Lee SK, Slama A, Kim HD (2008). *Epilepsia.* 49(4),685-690
11. Kudin AP, Kudina TA, Seyfried J, Vielhaber S, Beck H, Elger CE, Kunz WS (2002). *Eur J Neurosci.* 15(7),1105-1114.
12. Steven H, Gibbs JE, Heales S, Thom M, Cook HR (2006). *Neurochem Int.* 48(2),75-82.
13. Rowley S, Liang LP, Fulton R, Shumizu T, Day B, Patel M (2015) *Neurobiol Dis.* 75,151-158.
14. Folbergrová J, Jesina P, Haugvicová R, Lisý V, Houstek J (2010). *Neurochem Int.* 56(3),394-403.
15. Folbergrová J, Jesina P, Drahotu Z, Lisý V, Haugvicová R, Vojtisková A, Houstek J (2007). *Exp Neurol.* 204(2),597-609.
16. Acharya MM, Kutyure SS (2005). *Exp Neurol.* 192(1),79-88.
17. Saunders C, Smith L, Wibrand F, Raven K, Bross P, Thiffault I, Christensen M, Atherton A, Farrow E, Miller N, Kingsmore SF, Ostergaard E (2015). *Am J Hum Genet.* 96(2),258-265.
18. de Vries MC, Rodenburg RJ, Morava E, van Kaauwen EP, ter Laak H, Mullaart RA, Snoeck IN, van Hasselt PM, Harding P, van den Heuvel LP, Smeitink JA (2007). *Eur J Pediatr.* 166(3),229-234.
19. Gauthier-Villars M, Landrien P, Cormier-Daire V, Jacquemin E, Chrétien D, Rötig A, Rustin P, Munnich A, de Lonlay P (2001). *Neuropediatrics.* 32(3),150-152.
20. Waldbaum S, Patel M (2010). *Epilepsy Res.* 88(1),23–45.
21. Raigorodskaja DI, Medvedev, Gorkin VZ, Fedotova IB, Semiokhina AF (1991). *Vopr Med Khim.* 37(2),46–48.
22. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD (1989). *J Neurochem.* 52(2),381–389.
23. Frantseva MV, Perez Velazquez JL, Tsoraklidis G, Mendonca AJ, Adamchik Y, Mills LR, Carlen PL, Burnham MW (2000). *Neuroscience.* 97(3),431-5.
24. Gluck MR, Jayatilake E, Shaw S, Rowan AJ, Haroutunian V (2000). *Epilepsy Res.* 39(1),63–71.
25. Kulagina TP, Aripovsky AV, Savina TA, Shchepakina TG, Godukhin OV (2015). *Russ Fiziol Zh im I. M. Sechenova.* 101(9),999-1006.
26. Freitas RM, Vasconcelos SM, Souza FC, Viana GS, Fonteles MM (2005). *FEBS J.* 272(6),1307-1312.

27. Candelario-Jalil E, Al-Dalain SM, Castillo R, Martínez G, Fernández OS (2001). *J Appl Toxicol.* 21(5),403-407.
28. dos Santos PS, Costa JP, Tomé Ada R, Saldanha GB, de Souza GF, Feng D, de Freitas RM (2011). *Eur J Pharmacol.* 668(1-2),65-71.
29. Dal-Pizzol F, Klant F, Vianna MM, Schröder N, Quevedo J, Benfato MS, Moreira JC, Walz R (2000). *Neurosci Lett.* 291(3),179-182.
30. Jarretta Stuart G, Li-Ping Lianga, Hellierrb Jennifer L, Staley Kevin J, Patela Manisha. (2008). *Neurobiol Dis.* 30(1),130-138.
31. Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC, Moraru II, Slepchenko B, Loew LM, Hsieh CE, Buttle K, Marko M (2001). *IUBMB Life.* 52(3-5),93-100.
32. Ferranti R, da Silva MM, Kowaltowski AJ (2003). *FEBS Lett.* 536(1-3),51-55.
33. Huang Chin-Wei, Wu Sheng-Nan, Cheng Juei-Tang, Tsai Jing-Jane, Huang Chao-Ching. (2010). *Neurotox Res.* 17,305-316.
34. Montoya-Pérez R, Saavedra-Molina A, Trujillo X, Huerta M, Andrade F, Sánchez-Pastor E, Ortiz M (2010). *J Bioenerg Biomembr.* 42(1),21-27.
35. Yazdi S, Stein M, Elinder F, Andersson M, Lindahl E (2016). *PLoS Comput Biol.* 11, 12(1),e1004704.
36. Kovac S, Domijan A-M, Walker MC, Abramov AY (2012). *J Cell Sci.* 125(Pt 7),1796-1806.
37. Acharya MM, Hattiangady B, Shetty AK (2008). *Prog Neurobiol.* 84(4),363-404.
38. Waldbaum S, Patel M (2010). *J Bioenerg Biomembr.* 42(6),449-455.
39. Testai L, Rapposelli S, Martelli A, Breschi MC, Calderone V (2015). *Med Res Rev.* 35(3),520-553.
40. Krylova IB, Kachaeva EV, Rodionova OM, Negoda AE, Evdokimova NR, Balina MI, Sapronov NS, Mironova GD (2006). *Exp Gerontol.* 41(7),697-703.
41. Крылова ИБ, Бульон ВВ, Селина ЕН, Миронова ГД, Сапронов НС (2012). *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 153(5),596-599.
42. Маньковская ИИ, Носарь ВИ, Горбачева ОС, Гончар ОА, Гавенаускас БЛ, Братусь ЛВ, Миронова ГД (2014). *Биофизика.* 59(5),941-945.
43. Zhao Q, Marolewski A, Rusche JR, Holmes GL (2006). *Epilepsy Research.* 70,73-82.
44. Anderson CM, Parkinson FE (1997). *TIPS.* 18,387-397.
45. Shafaroodi H, Barati S, Ghasemi M, Almasirad A, Moezi L (2016). *Epilepsy Research.* 121,8-13.

**Глава 5. 2',3'-ЦИКЛОНУКЛЕОТИД-3'-ФОСФОДИЭСТЕРАЗА (СНРАЗА) КАК ПОСРЕДНИК В МЕХАНИЗМЕ ЗАЩИТЫ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ МЕЛАТОНИНА ПРИ СТАРЕНИИ**

Крестинина О.В.<sup>1</sup>, Бабурин Ю.Л.<sup>1</sup>, Одинокова И.В.<sup>1</sup>, Азарашвили Т.С.<sup>1</sup>, Акагов В.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

**Аннотация**

Процесс старения тесно связан с митохондриальной дисфункцией. Одной из причин старения является повышенная чувствительность к индукции митохондриальной поры неспецифической проницаемости (mPTP) во внутренней мембране митохондрий. Мелатонин, природный антиоксидант, - это гормон, вырабатываемый эпифизом. С возрастом секреция мелатонина уменьшается. В настоящем исследовании мы показали, что хроническое введение мелатонина старым крысам улучшает функциональное состояние митохондрий, таким образом, что пороговая концентрация  $Ca^{2+}$  повышается, а митохондриальное набухание замедляется. Мелатонин предотвращал mPTP и снижал освобождение цитохрома *c* и 2',3'-циклонуклеотид-3'-фосфодиэстеразы (СНРаза) из митохондрий молодых и старых крыс. Наши данные свидетельствуют о том, что мелатонин сохраняет СНРаза внутри митохондрий, тем самым обеспечивая защиту белка от вредного воздействия 2', 3'-цАМФ при старении.

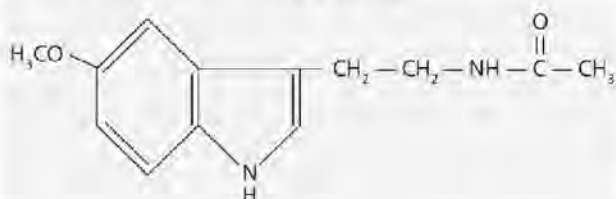
**Введение**

Митохондрии являются органеллами, производящими большое количество клеточной АТФ через окислительное фосфорилирование и выполняют важные метаболические процессы в клетке [1]. Нарушение функций митохондрий рассматривается как основной фактор процессов старения, ишемии/реперфузии, септического шока и нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона. Факторами, ответственными за повреждение митохондриальных функций при старении считаются повышение продукции активных форм кислорода (АФК) и снижение активности ферментов дыхательной цепи, приводящее к повышенной активации индукции поры неспецифической проницаемости (permeability transition pore, mPTP, формирующаяся между цитозолем и митохондриальным матриксом), в конечном итоге приводящее к гибели клеток [2]. Окислительный стресс и снижение активности кальций-транспортирующей системы митохондрий является важным фактором митохондриальной дисфункции при старении [3]. mPTP образуется в ответ на окислительный стресс или при повышении концентрации кальция в митохондриальном матриксе до сверхпороговых значений. Открытие  $Ca^{2+}$ -индуцированной поры приводит к деполаризации внутренней мембраны, разобщению окислительного фосфорилирования, набуханию митохондрий и освобождению из митохондрий проапоптотических белков, таких как апоптоз-индуцирующий фактор, цитохром *c* и др. Сверхчувствительность митохондрий к открытию mPTP при старении, т.е. снижение пороговой концентрации  $Ca^{2+}$ , была обнаружена в митохондриях мозга, печени, сердца исследователями различных лабораторий [4, 5]. Точный

механизм, лежащий в основе возраст-зависимых изменений, не установлен, но большое внимание уделяется исследованиям, цель которых направлена на установление защитных механизмов к окислительному стрессу при помощи антиоксидантов, чтобы снизить возраст-зависимые окислительные повреждения и митохондриальную дисфункцию [6]. Кроме того, с дисфункцией митохондрий и развитием программируемой гибели клеток сопряжено ослабление антиоксидантной защиты во время старения [7]. Разрушительное действие АФК сдерживается функционированием защитных систем, к которым относятся как ферментативные (супероксид-дисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза (GPx)/глутатионредуктаза (GRd), каталаза), так и неферментативные соединения (баланс восстановленного/окисленного глутатиона (GSH/GSSG)). Таким образом, можно предполагать, что старение связано с изменением баланса окислительно-восстановительного статуса в митохондриях [8], а антиоксидантные ферменты предохраняют биологические макромолекулы и ткани от окислительных повреждений [9]. Одним из известных и широко изучаемых антиоксидантов является мелатонин.

### Мелатонин

Мелатонин представляет собою гормон (рис.1), вырабатываемый шишковидной железой из триптофана посредством последовательного 4-х стадийного ферментативного превращения [10]. Кроме эпифиза, мелатонин продуцируется и во многих других тканях и органах, растениях и микроорганизмах [11, 12].



**Рисунок.1** Структурная формула мелатонина

Мелатонин высоко липофильная молекула, которая проникает через клеточные мембраны, легко достигая

субклеточные структуры [13], включая ядра и митохондрии, причем в последних его концентрация может в 100-200 раз превышать концентрацию в цитозоле [14]. С увеличением возраста синтез мелатонина значительно снижается [15], вследствие этого снижаются его антиоксидантные свойства и увеличивается содержание свободных радикалов [16]. Предполагается, что мелатонин может играть значительную роль в поддержании митохондриального гомеостаза и повышении эффективности электронного транспорта [17]. Помимо того, что мелатонин обладает антиоксидантными свойствами [18], он является лигандом нескольких G-белкаов рецепторов. У млекопитающих в головном мозге и периферических тканях обнаружены две изоформы рецептора мелатонина, MT1 и MT2 [19].

Известно, что мелатонин препятствует клеточной смерти через рецептор-опосредованный механизм, а также через антиоксидантный защитный механизм, так как введение мелатонина в нейропротекторной дозе не полностью сохраняет экспрессию MT1 рецептора [20]. Было показано, что хроническое введение мелатонина в фармакологической дозе влияет на функциональное состояние митохондрий и препятствует митохондриальной дисфункции при



экспериментальных диабетах и интоксикациях, проявляя митохондрий-специфическую активность мелатонина [21]. Хроническое введение мелатонина представляет собой введение мелатонина в организм животного с питьевой водой. Мелатонин готовят следующим образом: навеску мелатонина, из расчета 150 мкг/мл растворяют в нескольких каплях этилового спирта и затем растворяют в питьевой воде. Полученный раствор меняют, через каждые 2 дня. Все группы животных содержатся в одинаковых условиях (температура, влажность воздуха, кормление [22]). В наших экспериментах мелатонин растворяли в воде без добавления спирта, поэтому концентрация растворенного мелатонина составляла 100 мкг/мл [23].

В дополнении к своим способностям элиминировать митохондриальные АФК мелатонин предотвращает  $Ca^{2+}$ -индуцированное открытие мРТР в митохондриях астроцитов при  $Ca^{2+}$ -опосредованном апоптозе. Мелатонин поддерживает мембранный потенциал митохондрий и препятствует индукции мРТР, но и также предохраняет потенциал-зависимое образование АТФ [24]. Кроме того, было показано, что мелатонин вызывает падение мембранного потенциала, ускоряет набухание митохондрий, приводя к открытию мРТР в изолированных митохондриях печени, т.е. действует как индуктор мРТР.

Наблюдения способности мелатонина инициировать мРТР через окислительный стресс поддерживают гипотезу, что гормон является возможным проапоптотическим агентом. Действительно, при инкубировании митохондрий с  $Ca^{2+}$  и мелатонином происходит освобождение цитохрома *c* и апоптоз-индуцирующего фактора в цитозоль, показывая проапоптотические возможности мелатонина и активацию как каспаз-зависимого, так и каспаз-независимого путей апоптоза [25]. С другой стороны, мелатонин способен препятствовать мРТР и блокировать освобождение цитохрома *c* в митохондриях сердца крысы [26] и защищать лейкоциты человека и некоторые опухолевые клеточные линии от индукции мРТР и апоптоза.

Недавно, ряд неврологов показали, что мелатонин влияет на морфологические свойства нервных тканей, предполагая его нейропротекторные, антиоксидантные и анальгетические действия при нейродегенеративных заболеваниях периферических нервов. В частности, было показано, используя различные экспериментальные модели повреждений, что мелатонин проявлял позитивные действие на ряд аксонов и толщину миелиновой оболочки [27] и способствовал миелинизации в белом веществе [28]. Влияние окислительного стресса на плотность митохондрий и транскрипцию фермента при экспериментально вызванной демиелинизации и защитным действием мелатонина были обнаружены в мышинной модели рассеянного склероза [29].

Исследователь Флавио Х. Беральдо показал, что мелатонин индуцировал повышение уровня цАМФ (аналога аденозин 3', 5' цикломонифосфат Н6-бензоил) в *Plasmodium falciparum* [30]. Повышенный уровень аденозина может приводить к увеличению воспалительного сигнала благодаря активации А2А рецепторов [31]; производимый микроглией аденозин обладает нейропротекторными свойствами, предотвращая экзотоксическую смерть в нейронах гиппокампа [32]. Известно, что мелатонин взаимодействует с белками, такими как калмодулин, G-белки, протеинкиназа А и аденилат циклаза, которые играют существенную роль в развитии нервной системы и  $Ca^{2+}$  сигнализации.

Эти белки принимают участие в  $Ca^{2+}$  сигнализации и цАМФ сигнальном каскаде [33]. Важным ферментом в 2',3'-цАМФ - аденозиновом пути, который участвует в производстве аденозина, как защитного нейромодулятора является 2',3'-циклонуклеотид-3'-фосфодиэстераза (СНРаза, ЕС 3.1.4.37) [34].

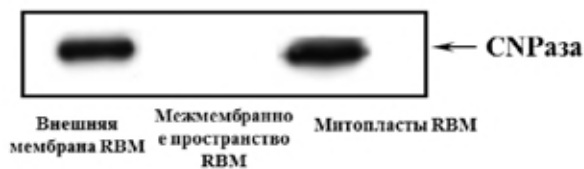
### **2',3'-циклонуклеотид-3'-фосфодиэстераза (СНРаза) локализация, функции**

СНРаза – белок, осуществляющий гидролиз циклических нуклеотидов до соответствующих монофосфатов (2'-нуклеотидов). СНРаза это белок, входящий в состав миелиновых оболочек, которые являются высокоорганизованными многослойными мембранными структурами, состоящими из специализированного набора белков и липидов. Среди миелиновых белков СНРаза составляет 4% в центральной нервной системе по весу от общего белка, а в периферической нервной системе уровень СНРаза составляет около 10% от ее содержания в центральной нервной системе. Известны две изоформы СНРаза, CNP1 (46 кДа) и CNP2 (48 кДа), [35], которые кодируются одним геном. Две изоформы обусловлены наличием двух альтернативных сайтов инициации трансляции [32].

Известны несколько посттрансляционных модификаций СНРаза, такие как фосфорилирование, изопренилирование и ацилирование [36]. Недавнее исследование, трансфицированных олигодендроцитов (OLN93), избыточно экспрессирующих CNP1 и CNP2, показали, что CNP2 может транслоцироваться в митохондрии из-за наличия митохондриального сигнала на N конце, который расщепляется и импортируется в митохондрии [37]. Транслокация CNP2 регулируется с помощью фосфорилирования направленного сигнала по протеинкиназе С.

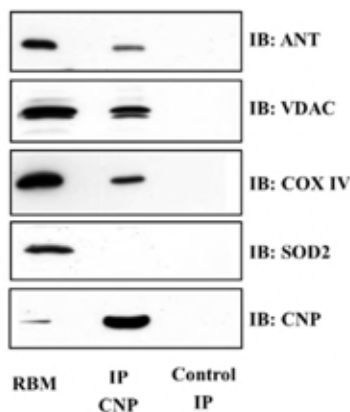
СНРаза была первым ферментом, обнаруженным в миелине, поскольку, ранее считали, что миелин энзиматически инертен [38]. СНРаза считается интегральным белком миелина в олигодендроцитах в центральной нервной системе, а в периферической нервной системе в шванновских клетках [39]. Большинство исследований, изучающих роль СНРаза были сосредоточены исключительно на экспрессии СНРаза в олигодендроцитах и шванновских клетках и ее вовлечение в миелиногенез. Тем не менее, появляется все больше доказательств того, что этот фермент присутствует в различных типах клеток. CNP-подобная ферментативная активность была найдена в немиелиновых препаратах мембран, полученных из селезенки, печени, вилочковой железы, надпочечников, почках, сердце и скелетных мышцах [40]. Активность СНРаза была обнаружена в митохондриях печени крыс, в частности, в наружной и внутренней мембранах митохондрий [40]. *In vivo* биологическая роль СНРаза неизвестна, и функция СНРаза в митохондриях еще более загадочна.

Нами были изучены некоторые функции СНРаза в митохондриях, а также влияние ее субстратов на функции митохондрий. В митохондриях, изолированных из мозга, печени, сердца, клеток глиомы С6 и олигодендроцитов детектировали СНРазу как белок с молекулярной массой 46 кДа, соответствующий изоформе СНРаза1. Из митохондрий мозга крысы были получены высокоочищенные субмитохондриальные фракции: внешние мембраны, межмембранное пространство и митопласты, содержащие матрикс и внутренние мембраны (рисунок 2).



**Рисунок 2.** Локализация CNPазы в субмитохондриальных фракциях

VDAC, поэтому мы выполнили иммунопреципитацию CNPазы (преципитируя



**Рисунок 3.** Коиммунопреципитация CNPазы с регуляторами мРTP (ANT и VDAC) и с COXIV в митохондриях мозга крысы

Методом Вестерн блот было показано, что фермент локализуется в мембранных фракциях митохондрий мозга крыс (рис.2) и не присутствует в межмембранном пространстве [41].

Кроме того, было исследовано взаимодействие CNPазы с известными регуляторами мРTP, такими как ANT и

VDAC. Иммунопреципитация с CNPазой содержала иммуореактивные полосы ANT и VDAC, а также COX IV. (рисунок 3)

Далее мы исследовали влияние субстратов CNPазы на функции митохондрий, в частности на транспорт кальция и изменение проницаемости внутренней мембраны митохондрий (permeability transition). Одним из механизмов, ответственных за

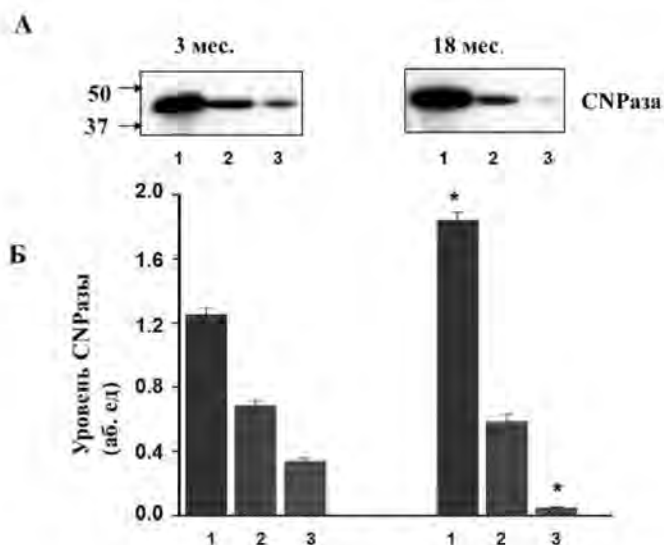
пермеабиллизацию митохондриальных мембран, является функционирование неселективной поры. Вовлечение CNPазы в функционирование неселективной поры митохондрий было исследовано в митохондриях, изолированных из клеток олигодендроцитов OLN93 [41]. Эти клетки содержат высокий эндогенный уровень белка. Клетки OLN93 трансфецировали siPHK CNP для снижения экспрессии белка в клетках. Из клеток, дефицитных (knockdown) по CNPазе, выделяли митохондрии, в которых обнаружили как уменьшение содержания CNPазы (46 кДа), так и пониженную ферментативную активность, по сравнению с митохондриями, изолированными из клеток OLN93 дикого типа. В качестве контроля использовали также митохондрии, выделенные из scrambled siPHK OLN93 клеток, которые были трансфецированы siPHK, не влияющей на экспрессию CNPазы.

Функционирование таких митохондрий было аналогично митохондриям, выделенным из нетрансфецированных клеток OLN93. В митохондриях трансфецированных клеток снижение уровня CNPазы и ее активности коррелировало с ускорением активации выхода кальция из митохондрий. Этот процесс усиливался в присутствии 2',3'-цАМФ. Эти результаты показывают, что содержание CNPазы в митохондриях модулирует функционирование поры, предотвращая ее индукцию [41]. Это подтверждается и расположением CNPазы в обеих мембранах митохондрий, предполагая её концентрирование в контактных сайтах. Субстратом для CNPазы в митохондриях могут служить олигонуклеотиды, содержащие 2',3'-циклические концы и 2',3'-циклические интермедиаты, образующиеся при ферментативной деградациии РНК. В частности, митохондриальная РНК может быть субстратом для неспецифической эндонуклеазы G, которая освобождается из митохондрий во

время ранних стадий апоптоза [42]. РНК также может быть субстратом для CNРаза. Исследуя РНК-связывающие свойства CNРаза, Гравел и сотрудники показали, что CNРаза ингибирует и синтез белка [43]. Принимая во внимание, что митохондрии являются единственной органеллой клетки, обладающей собственным геномом и системой синтеза белка, можно предположить, что подобные свойства (связывать РНК и ингибировать синтез белка) CNРаза сохраняет и в митохондриях.

### CNРаза в процессах старения

Существует большое количество работ, посвященных роли CNРаза в патогенезе заболеваний нервной системы, а также при старении. Известно, например, что при старении мозга изменения, зависящие от возраста, происходят



**Рисунок 4.** Распределение CNРаза по митохондриальным фракциям у крыс разного возраста. 1 – миелиновая фракция, 2 – синаптосомальная фракция, 3 – несинаптические митохондрии мозга.

в ключевых белках миелина. Это приводит, в частности, к нарушению когнитивной функции [44]. Недавно было показано, что в белом веществе головного мозга обезьян со старением повышается содержание интактных миелиновых белков MBP (myelin basic protein), MOSP (myelin/oligodendrocyte-specific protein) и CNРаза. Было показано увеличение как общего уровня CNРаза в изолированной миелиновой фракции белого вещества головного мозга, так и деградированной формы фермента. Параллельно с этим было обнаружено повышенное содержание активированной кальций-зависимой протеазы

кальпаина-1. Было установлено, что CNРаза является субстратом для кальпаина *in vitro* [45]. Предположили, что деградация CNРаза происходит в основном *in situ* в микродоменах миелиновых мембран, в присутствии микромолярных концентраций кальция, который активирует кальпаин-1, и эта активация становится значительной при старении. Исследования CNРаза, проведенные на трансгенных и нокаутных мышах, говорят о важной роли CNРаза в сборке и формировании миелиновых мембран и в поддержании аксональной целостности [46]. Таким образом, с возрастом происходит разрушение миелиновых мембран, вызванное не только окислительным стрессом и нитрованием миелиновых белков, но и повышенной активностью кальпаина и других протеаз [46].

В наших исследованиях мы попытались выяснить, изменяется ли уровень CNРаза в митохондриальных фракциях (миелиновой фракции, синаптосомальной фракции и несинаптических митохондриях) при старении.

В своих наблюдениях мы обнаружили увеличение содержания CNРаза в миелиновой фракции после разделения в градиенте перкола, в головном мозге старых крыс (Рис. 4). Интересно отметить, что содержание CNРаза было

снижено в несинаптических митохондриях старых крыс. Пониженное содержание CNPaзы в несинаптических митохондриях, выделенных из мозга старых крыс сопровождалось снижением ферментативной активности CNPaзы в митохондриях старых крыс [47]. Ранее мы заметили, что в митохондриях мозга CNPaза локализована с нейрональным белком p42<sup>W4</sup> и вольт-зависимым анионным каналом (VDAC) [48]. В этом исследовании мы установили корреляцию в снижении уровней p42<sup>W4</sup> и VDAC в несинаптических митохондриях мозга старых крыс по сравнению с молодыми.

Ранее было показано, что CNPaза, p42<sup>W4</sup> и VDAC участвуют в регуляции мРTP [41, 48], поэтому интересно было проследить взаимосвязь между изменением уровня CNPaзы в митохондриях и активацией мРTP при старении. Согласно полученным результатам наблюдалось, что несинаптические митохондрии старых крыс, которые имели пониженный уровень CNPaзы, были более чувствительны к Ca<sup>2+</sup>-индуцированной активации мРTP, что показало снижение мембранного потенциала, уменьшение скорости накопления Ca<sup>2+</sup>, а также уменьшение способности митохондрий удерживать Ca<sup>2+</sup>. Эти результаты предполагают, что возраст-зависимое ускорение открытия мРTP может вносить вклад в повышенную чувствительность некоторых тканей к клеточным повреждениям в процессе старения. В присутствии субстрата CNPaзы, 2',3'-цАМФ, наблюдалось заметное ускорение открытия мРTP в митохондриях как молодых, так и старых крыс.

В головном мозге у больных шизофренией, а также у пациентов с биполярным расстройством и депрессивным состоянием, содержание CNPaзы в олигодендронитах и миелине устойчиво снижается как на уровне мРНК, так и на уровне белка [49]. Это говорит о том, что снижение уровней CNPaзы может быть критичным у пациентов с психоневрологическими заболеваниями. Кроме того, недавнее исследование показало, что снижение экспрессии CNPaзы связано с особой поведенческой аномалией, кататонией (изменение движения и поведения, повлекшее за собой бесцельную гиперактивность или оцепенение), которая проявляется только при старении [50].

Следует отметить, что недавно было показано, что 2',3'-цАМФ – аденозиновый путь, экспрессируется *in vivo* эндогенно в мозге мышей и человека [34]. Эксперименты на мышах, нокаутных по CNPaзе, показали, что CNPaза вовлечена в метаболизм эндогенного 2',3'-цАМФ до 2'-АМФ и далее до аденозина. У мышей с черепно-мозговым повреждением активируется 2',3'-сАМР-аденозиновый путь. Кроме того, в спинномозговой жидкости у пациентов с травмами головного мозга, уровень 2',3'-цАМФ явно увеличивался.

Дальнейшие наблюдения тех же авторов предполагают, что черепно-мозговые повреждения усиливаются у мышей, лишенных CNPaзы. 2',3'-цАМФ образуется в клетках при деградации мРНК [51], и, следовательно, его биосинтез стимулируется клеточными повреждениями [52]. Как мы ранее показали, внутриклеточное накопление 2',3'-цАМФ является проапоптотическим сигналом через активацию мРTP [53, 54], но, с другой стороны, внеклеточный аденозин – нейропротективный. Таким образом, 2',3'-цАМФ-аденозиновый путь тоже может быть нейропротективным. Метаболизм 2',3'-цАМФ во время клеточного повреждения может быть источником для внеклеточного нейропротекторного аденозина, но также являться важным механизмом, для избавления от

внутриклеточного вредного агента 2',3'-цАМФ в клетке. Сниженная экспрессия CNРазы в несинаптической митохондриях со старением делает клетку гораздо более восприимчивой к мРТР и, вероятно, снижает уровень аденозина (как нейропротектора), что может привести к нарушению миелин-аксонального взаимодействия. Поэтому митохондриальная CNРаза может играть важную роль в защите этих органелл от вредного воздействия повышенных уровней внутриклеточного 2',3'-цАМФ, который образуется при повреждении клеток.

### **Мелатонин может действовать на митохондриальные функции через 2',3'-циклонуклеотид-3'-фосфодиэстераза (CNРаза)**

С возрастом митохондриальные функции ухудшаются. Окислительный стресс и снижение активности митохондриальной кальций-транспортирующей системы рассматривается как важный фактор в митохондриальной дисфункции, связанной со старением [3]. Гибель клеток, связанная с митохондриальной дисфункцией, может быть вызвана увеличением неселективной проницаемости внутренней мембраны, происходящей из-за повышенной концентрации (порогового уровня) ионов кальция в матриксе [55]. Митохондриальная проницаемость за счет открытия неселективной поры (мРТР) вызывает диссипацию мембранного потенциала, набухание митохондрий и приводит к прохождению растворенных веществ примерно до 1500 Да, и освобождению апоптотических факторов [55]. Мелатонин способен предотвращать открытие мРТР и выход цитохрома *c* в митохондриях сердца крысы [26] и, как мы уже сообщали ранее, хроническое введение мелатонина может предотвращать гидропероксид кумол-индуцированное набухание митохондрий мозга, выделенных из молодых и старых крыс. Мелатонин снимал прооксидантный эффект гидропероксида кумола в митохондриях мозга старых крыс [23].

Митохондриальной сопряжение является важной особенностью функционального состояния митохондрий. Митохондриальный дыхательный

Экспериментальные группы	RCI (дыхательный контроль)	АДФ/О
Мх молодых крыс (1 гр.)	7.09 ± 0.49	2.23 ± 0.21
Мх молодых, МЕЛ-обработанных крыс (2 гр.)	7.17 ± 0.32	2.4 ± 0.26
Мх старых крыс (3 гр.)	7.25 ± 0.45	2.4 ± 0.28
Мх старых МЕЛ-обработанных крыс (4 гр.)	7.85 ± 0.19	2.3 ± 0.24

**Таблица 1.** Сравнение дыхательных активностей в митохондриях печени, изолированных из молодых и старых крыс, эффект мелатонина.

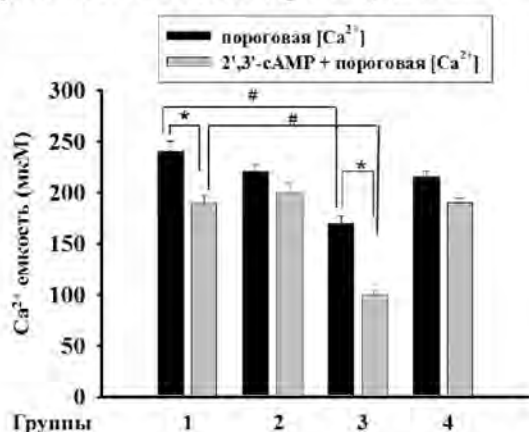
контроль (Respiratory control index, RCI) как отношение скоростей состояния 3 к 4, контролируется наличием АДФ (фосфата) и окисляемым субстратом, может создать поток электронов вдоль дыхательной цепи. Дыхательный контроль показывает эффективность митохондрий в развитии окислительного

фосфорилирования и, следовательно, герметичность связи между потреблением кислорода и производством АТФ.

Согласно нашим результатам, мы не заметили никаких существенных изменений в RCI, а также в соотношении АДФ/О в митохондриях печени, изолированных из каждой экспериментальной группы крыс. Это указывает на то, что старение не вызывает существенных изменений в митохондриальной мембране.

Ранее нами было показано, что митохондрии мозга и печени, изолированные из молодых и старых мышей линии Wistar, продемонстрировали повышенную чувствительность к открытию мРТР [4]. Мы также показали, что митохондрии мозга и печени, выделенные из старых животных, усиливают активацию открытия мРТР из-за снижения пороговых концентраций кальция [4]. Как упоминалось выше хроническое введение мелатонина в фармакологической дозе влияет на митохондриальную функцию [23].

Недавно мы показали, что открытие  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной неселективной поры в митохондриях головного мозга, выделенных из старых животных после длительного хронического введения мелатонина привело к увеличению пороговой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и предотвращало открытие мРТР [23]. Интересно отметить, что хроническое введение мелатонина привело к улучшению митохондриальной функции у старых животных и сделало их более устойчивыми к  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированному увеличению проницаемости митохондриальных мембраны (Рис.5). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что длительное введение мелатонина улучшает функционирование митохондрий печени и предотвращает открытие мРТР и, следовательно, может улучшить энергетическую трансдукцию клетки. Кроме того, мы показали, что набухание митохондрий (одна из важных характеристик митохондриальных функций), происходит быстрее



**Рисунок 5.** Сравнительный анализ пороговой  $[\text{Ca}^{2+}]$  в присутствии/отсутствии  $2',3'$ -сАМФ в митохондриях всех экспериментальных групп.

в митохондриях печени старых крыс по сравнению с молодыми животными и после хронического введения мелатонина митохондриальное набухание замедляется как в молодых, так и старых крысах по сравнению с соответствующими контролями. Ранее мы наблюдали, что  $2',3'$ -цАМФ является индуктором открытия мРТР в митохондриях мозга и печени крыс [53], и  $2',3'$ -цАМФ ускоряет открытие мРТР в митохондриях головного мозга крыс при старении [47]. Принимая во внимание, что  $2',3'$ -цАМФ в диапазоне концентраций 1-5 мкМ повышает  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное открытие мРТР в несинаптических митохондриях мозга крысы [53], и  $2',3'$ -цАМФ (5 мкМ) вызывает ускоренное открытие мРТР в митохондриях при старении [47], мы исследовали влияние мелатонина на пороговую  $[\text{Ca}^{2+}]$  в митохондриях печени крыс в условиях открытия поры. На рисунке 5 показано изменение пороговой  $[\text{Ca}^{2+}]$  в  $\text{Ca}^{2+}$ -нагруженных митохондриях в отсутствие/присутствии  $2',3'$ -цАМФ.

Пороговая  $[\text{Ca}^{2+}]$  снижалась на 28% в митохондриях старых крыс и незначительно уменьшалась в митохондриях, изолированных из мелатонин-обработанных молодых крыс по сравнению с контрольными животными. Никакой разницы не было обнаружено в  $\text{Ca}^{2+}$  емкости между митохондриями, изолированными из старых мелатонин-обработанных и молодых крыс, не

получавших мелатонин. Тем не менее, пороговая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях старых мелатонина-обработанных крыс увеличилась по сравнению с митохондриями старым крыс, не получавших мелатонин. Таким образом, ясно, что пороговая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  изменяется с возрастом, что согласуется с нашими предыдущими данными [54]. Пороговая  $[\text{Ca}^{2+}]$  митохондрий уменьшилась при старении, а введение мелатонина предотвращало это снижение. Пороговая  $[\text{Ca}^{2+}]$  снижалась при добавлении 5 мкМ 2',3'-цАМФ к митохондриям из молодых крыс на 25% (1-я группа) и незначительно ускоряло индукцию мРТР в митохондриях из мелатонин-обработанных молодых крыс (2-я группа) по сравнению с соответствующим контролем. В митохондриях 3-й опытной группы мы наблюдали значительное ускорение открытия мРТР в присутствии 2',3'-цАМФ, пороговая  $[\text{Ca}^{2+}]$  снижалась на 41% по сравнению с соответствующим контролем, в то время как разница между пороговой  $[\text{Ca}^{2+}]$  в присутствии/отсутствии 2',3'-цАМФ в митохондриях 4-й группы была незначительной. Мелатонин защищал митохондрии от активации мРТР в митохондриях как молодых, так и старых крыс.

Кальций-индуцированное набухание митохондрий является одной из характеристик открытия мРТР. Добавление  $\text{Ca}^{2+}$  при пороговой концентрации в суспензии митохондрий, инкубированных в стандартной среде, вызвало уменьшение светорассеяния, что свидетельствует о набухании, и митохондриальные мембраны становились проницаемыми для веществ с низкой

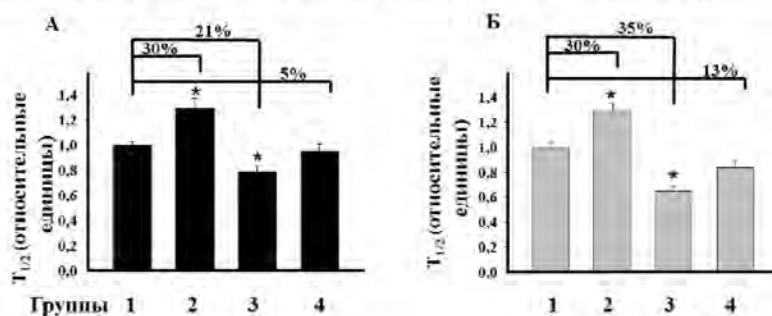


Рисунок 6. Сравнительный анализ митохондриального набухания в присутствии/отсутствии 2',3'-цАМФ в митохондриях всех экспериментальных групп. А – при пороговой  $[\text{Ca}^{2+}]$ , Б – в присутствии 2',3'-цАМФ при пороговой  $[\text{Ca}^{2+}]$

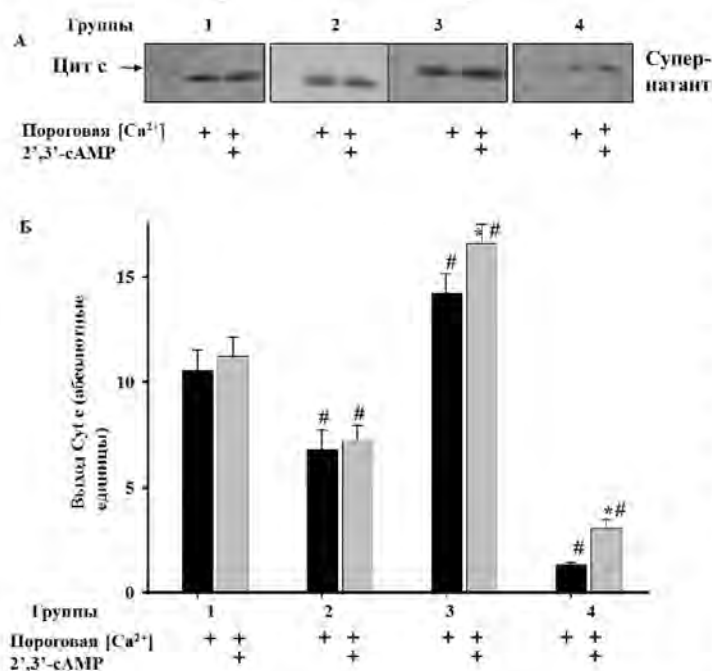
молекулярной массой.

Мы сравнили набухание митохондрий печени, изолированных из молодых и старых, мелатонин-обработанных и необработанных крыс. На рисунке 6 показано среднее значение полупериода ( $T_{1/2}$ ) митохондриального  $\text{Ca}^{2+}$ -активированного

набухания.  $T_{1/2}$  набухания митохондрий старых крыс уменьшился на 21%, по сравнению с  $T_{1/2}$  в митохондриях молодых крыс, в то время как  $T_{1/2}$  митохондрий молодых крыс, обработанных мелатонином, увеличился на 30%. Набухание митохондрий старых крыс, обработанных мелатонином замедлялось, по сравнению с контрольными животными; кроме того, его значение  $T_{1/2}$  приблизилась  $T_{1/2}$  митохондриальной набухания молодых контрольных крыс, указывая на профилактический эффект мелатонина в возраст-зависимой активации набухания митохондрий. Рисунок 6(Б) показывает среднее значение полупериода ( $T_{1/2}$ ) набухания митохондрий, активированного  $\text{Ca}^{2+}$  и 5 мкМ 2',3'-цАМФ. 2',3'-цАМФ замедлял набухание митохондрий из второй группы на 30% и ускорял набухание митохондрий старых крыс из третьей группы на 35%, в то время как митохондриальное набухание митохондрий 4-ой группы повышалось на 13%. Мелатонин предотвращал набухание митохондрий у старых крыс,



вызванных 2',3'-цАМФ -зависимой стимуляцией, но в меньшей степени, чем без 2',3'-цАМФ. Далее, мы исследовали влияние мелатонина на выход цитохрома *c* (как апоптотического фактора) из митохондрий, изолированных из всех групп крыс после открытия мРТР в отсутствие и в присутствии 2',3'-цАМФ. Как показано на рис. 7, в контрольных условиях (без добавления  $Ca^{2+}$ ) мы не



**Рисунок 7.** Влияние 2',3'-цАМФ на выход цитохрома *c* из митохондрий всех экспериментальных групп. А - Вестерн блот Анализ, Б - количественный анализ

снижению освобождения цитохрома *c* из митохондрий, демонстрируя способность мелатонина ингибировать выход цитохрома *c* и предотвращать нарушение митохондриальных функций. Кроме того, мы исследовали влияние 2',3'-цАМФ на выход цитохрома *c* при пороговой  $[Ca^{2+}]$ . Мы наблюдали усиление освобождения цитохром *c* из митохондрий мелатонин-обработанных старых и необработанных крыс по сравнению с соответствующими значениями при пороговой  $[Ca^{2+}]$  в отсутствие 2',3'-цАМФ. Мы не заметили эффекта 2',3'-цАМФ на выход цитохрома *c* из митохондрий, изолированных из молодых мелатонина-обработанных и необработанных крыс. Основным результатом этого эксперимента является то, что мелатонин предотвращает освобождение цитохрома *c* из митохондрий, что было особенно выражено в митохондриях старых крыс.

Эффект 2',3'-цАМФ возможно связан с наличием в митохондриях белка, участвующего в регуляции мРТР, CNРазы (2',3'-цАМФ является субстратом CNРазы). Ранее мы заметили, что наряду с выходом цитохрома *c* из  $Ca^{2+}$  -нагруженных несинаптических митохондрий крыс, происходит выход CNРазы [56], мы исследовали влияние мелатонина на выход CNРазы из митохондрий каждой экспериментальной группы. Анти-CNР антитела использовали для визуализации CNРазы на той же мембране, которая использовалась для исследования выхода цитохрома *c*. На рис. 8 (А) показан вестерн блот анализ выхода CNРазы в контрольных условиях (без  $Ca^{2+}$ ), в присутствии/отсутствии 2',3'-цАМФ при пороговой  $[Ca^{2+}]$ . Как видно из рисунка выход CNРазы наблюдался в контрольных условиях (без  $Ca^{2+}$ ) в митохондриях всех

наблюдали выхода цитохрома *c* из митохондрий печени всех четырех групп крыс. При добавлении пороговой  $[Ca^{2+}]$  наблюдалось освобождение цитохрома *c*, причем выход цитохрома *c* снижался на 36% в мелатонин-обработанных крысах по сравнению с контрольными. В митохондриях, выделенных из старых контрольных крыс, освобождение цитохрома *c* усиливалось на 36% по сравнению с таковым значением в митохондриях, изолированных из молодых крыс в присутствии пороговой  $[Ca^{2+}]$ . Обработка мелатонином старых крыс привела к значительному

экспериментальных групп крыс, причем выход CNРаза увеличивался в два раза из митохондрий старых крыс, и в 1.5 раза из митохондрий старых мелатонин-обработанных крыс по сравнению с таковым значением в митохондриях молодых крыс. Индукция мРТР усиливала выход CNРаза из митохондрий молодых контрольных крыс примерно в три раза по сравнению со значением (без  $\text{Ca}^{2+}$ ). Выход CNРаза из  $\text{Ca}^{2+}$ -нагруженных митохондрий увеличился примерно на 44% в третьей группе, снижался на 24% во второй группе и на 27% в четвертой группе крыс по сравнению с контрольными условиями ( $\text{Ca}^{2+}$ -нагруженные митохондрии 1 группы). Мы наблюдали более выраженное снижение выхода CNРаза из  $\text{Ca}^{2+}$ -нагруженных митохондрий, выделенных из старых мелатонин-обработанных крыс, но не из молодых мелатонин-обработанных крыс по сравнению с соответствующими контролями. Добавление к митохондриям 2',3'-цАМФ приводило к незначительным изменениям в выходе CNРаза из митохондрий каждой группы по отношению к  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированному выходу CNРаза. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что мелатонин сохраняет CNРаза внутри  $\text{Ca}^{2+}$ -нагруженных митохондрий в присутствии/отсутствии 2',3'-цАМФ как в митохондриях молодых, так и старых крыс.

### Заключение

CNРаза является миелиновым белком, который также был обнаружен и в немиелиновых тканях. 2',3'-цАМФ, субстрат для CNРаза, индуцирует  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительную мРТР, и увеличивает чувствительность к активации мРТР по

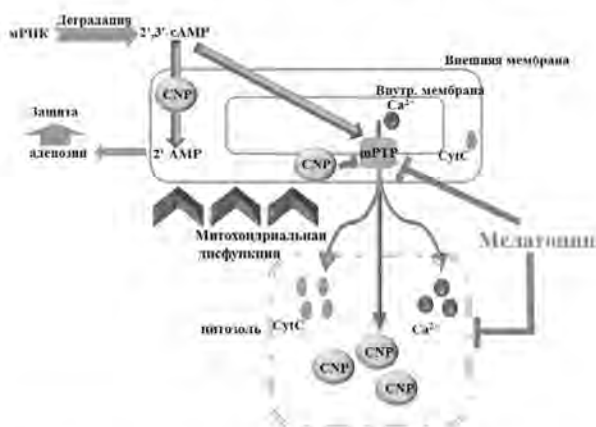


Схема 1. Взаимодействие CNРаза и 2',3'-цАМФ с мРТР. Влияние мелатонина на мРТР при старении.

еще неизвестным механизмам. 2',3'-цАМФ образуется в клетках в результате деградации РНК, и ее формирование стимулирует повреждение клеток и митохондриальную дисфункцию. 2',3'-цАМФ метаболизируется с помощью 2',3'-цАМФ-аденозинового пути до аденозина. Внутриклеточные/митохондриальные накопления 2',3'-цАМФ уменьшают способность митохондрий удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  и облегчают активацию мРТР. Повреждение клеток и стресс-сигналы также приводят к нарушению регуляции клеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , что способствует открытию мРТР. В представленной схеме митохондриальная CNРаза защищает эти органеллы от вредного воздействия повышенных уровней 2',3'-цАМФ, разрушая его до 2'-АМФ. Мелатонин является весьма липофильной молекулой, которая проникает через клеточные мембраны, легко достигая субклеточных структур, и

накапливается в митохондриях в высоких концентрациях. Содержание CNРаза уменьшается со старением, и клетки становятся уязвимыми к повреждениям. Мы показали, что мелатонин предотвращает открытие мРТР и уменьшает освобождение цитохрома *c* и CNРаза из митохондрий в цитозоль. Кроме того, он сохраняет CNРаза внутри митохондрий, обеспечивая защиту клеток от вредного воздействия 2',3'-цАМФ при старении.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00625, 16-04-00927 и грантом Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение #14.Z50.31.0028).

#### Список литературы

1. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006). *Curr Biol*. 16.R551-R560.
2. Harman D (2003). *Antioxid Redox Signal*. 5,557-561.
3. Di Lisa F, Bernardi P (2005). *Cardiovasc Res*. 66,222-232.
4. Krestinina OV, Kruglov AG, Grachev DE, Baburina YL, Fstodienko YV, Moshkov DA, Santalova IM, Azarashvili TS (2010). *Biol Membrany*. 27,177-183.
5. Mather M, Rottenberg H (2000). *Biochem Biophys Res Commun*. 273,603-608.
6. Beckman KB, Ames BN (1998). *Physiol Rev*. 78,547-581.
7. Gemma C, Vila J, Bachstetter A, Bickford PC (2007) Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. In: Riddle DR (ed) *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. Boca Raton (FL).
8. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE, Jr. (1980). *Exp Gerontol*. 15,575-591.
9. Tian L, Cui Q, Wei H (1998). *Free Radic Biol Med*. 24,1477-1484.
10. Falcon J, Bessou L, Fuentes M, Sauzet S, Magnanou E, Boeuf G (2009). *Am N Y Acad Sci*. 1163,101-111.
11. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ (2003). *J Pineal Res*. 34,75-78.
12. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen L.D, Chen S, Manchester LC, Barlowwalden LR (1993). *Cancer Lett*. 70,65-71.
13. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ (1993). *J Pineal Res*. 15,59-69.
14. Lopez A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez LC, Acuna-Castroviejo D (2009). *Journal of Pineal Research*. 46,188-198.
15. Karasek M (2004). *Exp Gerontol*. 39,1723-1729.
16. Anisimov VN (2008). *Usp Fiziol Nauk*. 39,40-65.
17. Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ (2001). *J Pineal Res*. 30,65-74.
18. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R (2002). *Curr Top Med Chem*. 2,181-197.
19. Drew JF, Barrett P, Mercer JG, Moar KM, Canet E, Delagrangue P, Morgan PJ (2001). *J Neuroendocrinol*. 13,453-458.
20. Caraniza-Lira S, Garcia Lopez F (2000). *Med Sci Monit*. 6,1209-1212.
21. Cheshechovik VT, Lapshina EA, Droniza IK, Zabrodskaya SV, Reiter RJ, Prokopchik NI, Zavodnik IB (2012). *Toxicol Appl Pharmacol*. 261,271-279.
22. Petrosillo G, Moro N, Paradisi V, Ruggiero FM, Paradisi G (2010). *J Pineal Res*. 48,340-346.
23. Krestinina OV, Baburina YL, Azarashvili TS (2014). *Biol Membrany*. 31,95-103.
24. Jou MJ (2011). *J Pineal Res*. 50,427-435.
25. Martins P, Zago L, Maritati M, Bartaglia V, Grancani S, Rizzoli V, Agostinelli E, Brigadin M, Tommello A (2012). *Anno Acids*. 42,1827-1837.
26. Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tinivanti E, Di Venosa N, Fiore T, Paradisi G (2009). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297.H1487-1493.
27. Turgut M, Kaplan S (2011). *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 5,100-108.
28. Villapol S, Fau S, Renolleau S, Binin V, Charriat-Marlangue C, Baud O (2011). *Pediatr Res*. 69,51-55.
29. Kashani IR, Rajabi Z, Akbari M, Hassanzadeh G, Mohseni A, Eransadati MK, Rafiee K, Beyer C, Kipp M, Zendedel A (2014). *Exp Brain Res*. 232,2835-2846.
30. Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, Garcia CR (2005). *J Cell Biol*. 170,551-557.
31. Dai SS, Zhou YG (2011). *Rev Neurosci*. 22,231-239.
32. Lauro C, Cipriani R, Catalano M, Trettel F, Checc G, Brusadin V, Antonilli L, van Rooijen N, Eusebi F, Fredholm BB, Limatola C (2010). *Neuropsychopharmacology*. 35,1550-1559.
33. de Faria Poloni J, Feltes BC, Bonatto D (2011). *Funct Integr Genomics*. 11,383-388.
34. Verrier JD, Jackson TC, Bansal R, Kochanek PM, Puccio AM, Okonkwo DO, Jackson EK (2012). *J Neurochem*. 122,115-125.
35. Gravel M, DeAngelis D, Braun PE (1994). *J Neurosci Res*. 38,243-247.
36. De Angelis DA, Braun PE (1994). *J Neurosci Res*. 39,386-397.

37. Lee J, O'Neill RC, Park MW, Gravel M, Braun PE (2006). *Mol Cell Neurosci*. 31,446-462.
38. Adams CW, A.N. D. N.A. G (1963). *J Neurochem*. 10,383-395.
39. Sprinkle TJ (1989). *Crit Rev Neurobiol*. 4,235-301.
40. Dreiling CE, Schilling RJ, Reitz RC (1981). *Biochim Biophys Acta*. 640,114-120.
41. Azarashvili T, Krestinina O, Galvita A, Grachev D, Baburina Y, Stricker R, Evtodienko Y, Reiser G (2009). *Am J Physiol Cell Physiol*. 296,C1428-C1439.
42. Low RL (2003). *Mitochondrion*. 2,225-236.
43. Gravel M, Robert F, Kottis V, Gallouzi IE, Pelletier J, Braun PE (2009). *J Neurosci Res*. 87,1069-1079.
44. Peters A, Rosene DL, Moss MB, Kemper TL, Abraham CR, Tigges J, Albert MS (1996). *J Neuropathol Exp Neurol*. 55,861-874.
45. Sloane JA, Hinman JD, Lubonia M, Hollander W, Abraham CR (2003). *J Neurochem*. 84,157-168.
46. Rasband MN, Taylor J, Kaga Y, Yang Y, Lappe-Siefke C, Nave KA, Bansal R (2005). *Glia*. 50,86-90.
47. Krestinina O, Azarashvili T, Baburina Y, Galvita A, Grachev D, Stricker R, Reiser G (2015). *Neurochemistry International*. 80,41-50.
48. Galvita A, Grachev D, Azarashvili T, Baburina Y, Krestinina O, Stricker R, Reiser G (2009). *J Neurochem*. 109,1701-1713.
49. Mitkus SN, Hyde TM, Vakkalanka R, Kolachana B, Weinberger DR, Kleinman JE, Lipska BK (2008). *Schizophr Res*. 98,129-138.
50. Hagemeyer N, Goebbels S, Papiol S, Kastner A, Hofer S, Begemann M, Cervig UC, Boretius S, Wieser GL, Ronnenberg A, Gurvich A, Heckers SH, Frahm J, Nave KA, Ehrenreich H (2012). *EMBO Mol Med*. 4,528-539.
51. Thompson JE, Venegas FD, Raines RT (1994). *Biochemistry*. 33,7408-7414.
52. Jackson EK, Ren J, Mi Z (2009). *J Biol Chem*. 284,33097-33106.
53. Azarashvili T, Krestinina O, Galvita A, Grachev D, Baburina Y, Stricker R, Evtodienko Y, Reiser G (2009). *Am J Physiol Cell Physiol*. 296,C1428-1439.
54. Krestinina O, Azarashvili T, Baburina Y, Galvita A, Grachev D, Stricker R, Reiser G (2015). *Neurochemistry international*. 80,41-50.
55. Leung AW, Halestrap AP (2008). *Biochim Biophys Acta*. 1777,946-952.
56. Baburina Y, Azarashvili T, Grachev D, Krestinina O, Galvita A, Stricker R, Reiser G (2015). *Neurochemistry International*. 90,46-55.

## **Глава 6. КАК ИЗОФОРМЫ VDAC РЕГУЛИРУЮТ УРОВЕНЬ АФК В МИТОХОНДРИЯХ И КЛЕТКАХ**

Круглов А.Г.<sup>1</sup>, Куприянова Е.С.<sup>1</sup>, Крестнина О.В.<sup>1</sup>, Никифорова А.Б.<sup>1</sup>, Чеканов А.В.<sup>1</sup>, Бэлл Л.Е.<sup>2</sup>, Соловьева М.Е.<sup>1</sup>, Бабурина Ю.Л.<sup>1</sup>, Комте-Уолтерс С.Л.<sup>2</sup>, Шейко Т.<sup>3</sup>, Крэйген У.Дж.<sup>3</sup>, Лемастерс Дж.Дж.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

<sup>2</sup>Медицинский университет Южной Каролины, Чарльзтон

<sup>3</sup>Медицинский колледж Бэйлора, Хьюстон

### **Аннотация**

Данные о роли различных изоформ VDAC в регуляции уровня АФК в митохондриях и клетках противоречивы. В настоящей работе показано, что подавление экспрессии различных изоформ VDAC в эмбриональных мышечных фибробластах приводит к увеличению уровня АФК в митохондриях и клетках, повышению уровня ферментов антиоксидантной защиты в митохондриях, а также снижению уровня белков, ответственных за поддержание структуры крист. Кроме того, снижение уровня или блокирование VDAC препятствует детоксикации свободных радикалов цитозоля системой цитохром *c*/цитохром оксидаза.

### **Введение**

Потенциал-зависимый анионный канал (voltage-dependent anion channel, VDAC) или порин, представленный у млекопитающих тремя изоформами VDAC1, VDAC2 и VDAC3, является основным белком внешней мембраны митохондрий. Канал проницаем для неполярных соединений с молекулярной массой до 4–6 кДа (в зависимости от изоформы) и для полярных или заряженных соединений меньшей массы. Поэтому, долгое время считалось, что единственная функция VDAC заключается в облегчении обмена метаболитами (такими как субстраты дыхания, АТФ, АДФ, неорганический фосфат) между митохондриями и цитозолем клетки. Позже было показано, что VDAC взаимодействует со многими белками, такими как гексокиназа 1 и 2 [1, 2], TSP0 [3], тиоредоксин [4], а также с белками семейства Bcl-2 [5, 6] и транслоказа адениновых нуклеотидов (ANT) [7–10], и участвует в регуляции проницаемости внешней и внутренней митохондриальных мембран для низкомолекулярных соединений и апоптогенных белков межмембранного пространства. Накопываются данные, показывающие важную роль VDAC в регуляции уровня активных форм кислорода (АФК) в митохондриях и клетках [11–15]. Кроме того, по меньшей мере, пять групп исследователей сообщили, что VDAC1 проявляет НАДФН оксидоредуктазную активность [16–23]. По данным авторов VDAC1 способен восстанавливать редокс активные соединения, такие как паракват [18, 24], фуранонафтохиноны [16] и менадион. Циклическое восстановление данных соединений до аутоокисляющихся семихинонных форм и их последующее окисление кислородом приводит к образованию АФК в биологических системах. Однако, в настоящее время нет консенсуса относительно того, какой именно эффект оказывает VDAC на генерацию АФК в митохондриях и клетках и каков механизм данного эффекта.

## Подавление экспрессии VDAC2 стимулирует образование АФК в митохондриях и клетках

Данные, представленные в научной литературе, о роли различных изоформ VDAC в регуляции уровня клеточных и митохондриальных АФК с одной стороны, не полны, а с другой, достаточно противоречивы. Ранее было показано, что ограничение проницаемости каналов VDAC олигонуклеотидом G3139 приводило к затруднению выхода супероксид аниона из межмембранного пространства, что, в свою очередь, повышало уровень митохондриальных АФК, чувствительность митохондрий к  $Ca^{2+}$  и облегчало открывание  $Ca^{2+}$ -зависимой мРTP [15]. С другой стороны, еще один известный блокатор VDAC 4,4'-диизотиоциано-2,2'-стильбен-дисульфоновая кислота (DIDS) и его производные блокировали индукцию  $Ca^{2+}$ -зависимой мРTP и продукцию АФК [12, 13]. Однако, следует учитывать, что DIDS и его производные способны связываться с тиоловыми группами и оказывать эффект на функционирование различных белков [25]. Поэтому, ответ на вопрос о влиянии VDAC на уровень АФК могли бы дать эксперименты с использованием методик, меняющих уровень различных изоформ VDAC в митохондриях.

Данные, полученные на мышинных эмбриональных фибробластах с полностью подавленной экспрессией VDAC1 (нокаут) [11] согласуются с полученными ранее данными о важности VDAC для выхода токсических АФК из митохондрий [15]. Так, было показано, что нокаут по VDAC1 вызывал существенное усиление генерации АФК в клетках [11].

С другой стороны, и увеличение экспрессии VDAC по сравнению с нормальным состоянием сопряжено с повышением уровня эндогенных АФК. Так, увеличение экспрессии VDAC1 приводило к повышению чувствительности клеток различных карцином к действию агентов, вызывающих образование межцепочечных сшивок в молекуле ДНК (цисплатин, мелфалан и др.) [26]. При этом, облегчалась индукция мРTP и усиливалась генерация АФК.

Аналогичные данные получены на дрожжах, экспрессирующих и не экспрессирующих различные изоформы дрожжевого порина (por). Оверэкспрессия различных изоформ человеческого VDAC (hVDAC) приводила к усилению генерации АФК [14]. Если дрожжи экспрессировали por, то наибольшую продукцию АФК вызывала экспрессия hVDAC1. Если же por не экспрессировался ( $\Delta$ por), то наибольший прирост АФК вызывала изоформа hVDAC3.

Сходные данные получены с использованием фармакологических и химических модуляторов уровня экспрессии VDAC. Так, лекарственные препараты, которые способствуют повышению экспрессии VDAC1 в клетках немелкоклеточного рака легких, способствовали и повышению уровня АФК [27]. В растительных клетках (arabidopsis) солевой стресс вызывал увеличение экспрессии atVDAC3, что приводило к увеличению продукции АФК [4].

Кроме того, сообщалось, что VDAC способен регулировать уровень АФК, выполняя функцию редокс буфера. В частности изоформа 3 VDAC имеет несколько остатков цистеина (Cys2, Cys8, Cys122) ориентированных в межмембранное пространство, которые могут быть окислены АФК [28]. При этом, меняется проводимость канала. (В связи с этим интересно отметить, что

различные транскрипционные варианты VDAC2 человека, мыши и крысы содержат от 6 до 11 цистеиновых остатков, а VDAC3 – 6–7 остатков.)

На рисунке 1 представлены результаты измерения уровня пероксида водорода и супероксид аниона в мышечных эмбриональных фибробластах с нормальной экспрессией поринов (контроль) и нокаутом по изоформам 1 и 3 (VDAC1/3-) и 2 (VDAC2-). Уровень пероксида водорода в цитозоле клеток измеряли с помощью флуоресцентного зонда 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетата (DCFDA) (Рис. 1А). На рисунке представлена средняя медианная флуоресценция  $\pm$  стандартная ошибка средней для не менее чем четырех стандартных экспериментов (каждый раз анализировали не менее 20000–25000 клеток). Звездочки показывают статистически достоверные различия. Как следует из рисунка, нокаут по изоформам 1 и 3 порина приводил к двукратному повышению внутриклеточных АФК (гидропероксида), тогда как нокаут по изоформе 2 вызывал почти шестикратный прирост АФК. Измерение уровня супероксид аниона, чувствительного к действию добавленной супероксиддисмутазы (200 Ед./мл) с помощью специфического зонда на супероксид анион 3,7-дигидро-2-метил-6-(4-метоксифенил)имидазол[1,2-а]пиразин-3-она (MCLA) в клетках, мембрана которых была пермеабилizована дигитонином, также, показало прирост АФК в клетках, с подавленной экспрессией VDAC2 (Рис. 1Б).

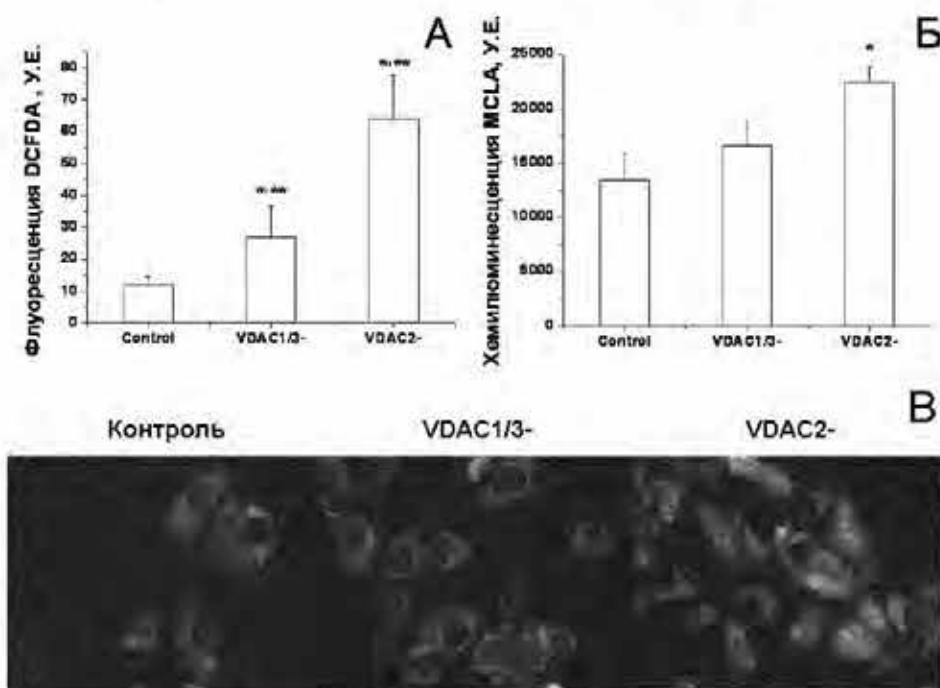


Рис. 1. Эффект подавления экспрессии различных изоформ VDAC в мышечных эмбриональных фибробластах на уровень гидропероксида в интактных клетках (А) и уровень супероксид аниона в пермеабилizованных клетках (Б) и митохондриях интактных клеток (В).

Однако, прирост супероксид аниона был значительно менее выражен, чем прирост гидропероксида. Поскольку, и MCLA и супероксид анион (в отличие от пероксида водорода) достаточно плохо проникают через мембрану митохондрий (и клеток), мы исследовали уровень супероксид аниона в митохондриях интактных фибробластов с помощью митохондриального зонда Mito-SOX-red (Рис. 1В). На рисунке показано наложение зеленой флуоресценции митохондриального потенциал-зависимого зонда родамин 123 и красной флуоресценции окисленной формы Mito-SOX-red. Как следует из рисунка,

наибольший уровень митохондриального супероксид аниона наблюдался в клетках с подавленной экспрессией VDAC2.

Таким образом, подавление экспрессии VDAC2 и, в меньшей степени, VDAC1 и VDAC3, вызывает повышение уровня внутриклеточных АФК. По-видимому, источником АФК являются митохондрии, а не цитозольные оксидоредуктазы.

### **Подавление экспрессии VDAC или его блокирование снижает способность системы цитохром c-цитохром оксидаза утилизировать свободные радикалы из цитозоля**

В последние годы, по меньшей мере, пять групп исследователей сообщили, что VDAC1 проявляет НАДН оксидоредуктазную активность [16–23]. Авторы заявляли, что VDAC1 восстанавливает феррицианид [17], плазминоген [23], и, что особенно интересно, некоторые редокс активные соединения, такие как паракват [18, 24], фуранонафтохиноны [16] и менадион. Под редокс активными соединениями мы понимаем такие соединения, которые способны осуществлять циклические окислительно-восстановительные переходы в присутствии восстановителя и окислителя (в англоязычной литературе они обозначаются термином “redox cyclers” или “redox-cycling compounds”). Восстановление данных соединений до автоокисляющихся семихинонных форм и их последующее окисление кислородом приводит к образованию АФК в биологических системах. Согласно недавним сообщениям, очищенный до 90–95% гомогенности VDAC1 проявлял НАДН оксидоредуктазную активность [17]. В то же время, рекомбинантный VDAC1, а также VDAC1, очищенный от сопутствующих белков не проявляли подобной активности [18]. Авторы объяснили эти данные необходимостью взаимодействия VDAC1 с неизвестным партнером для образования активного комплекса.

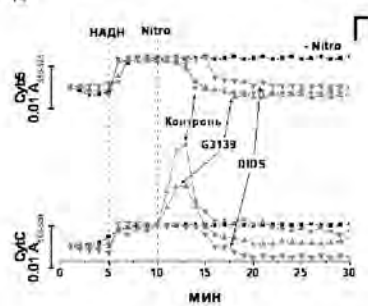
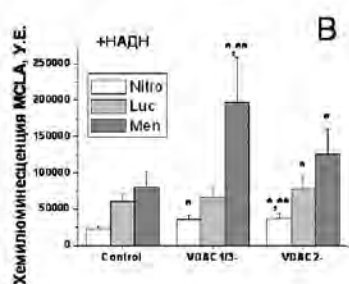
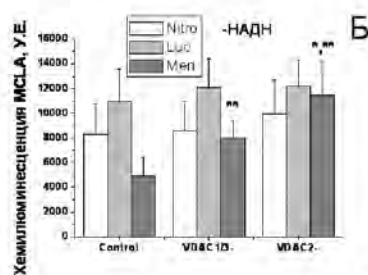
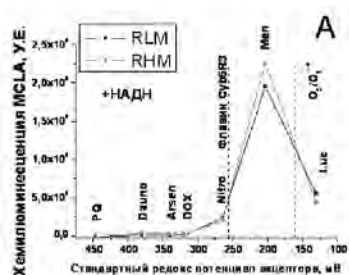
Однако, эти интересные данные вызывают сомнения, поскольку уникальная структура молекулы VDAC не содержит каких-либо известных каталитических доменов. Так, девятнадцать трансмембранных участков, образующих, так называемую бета-бочку (beta-barrel), формируют стенки канала [29], а N-концевая альфа спираль прикрывает его просвет. При этом, ни одна из изоформ VDAC не имеет элементов или кофакторов, существенных для НАД(Ф)Н оксидоредуктазной активности большинства известных НАД(Ф)Н оксидоредуктаз: флавина [30], гема [31], складки Россманна для связывания НАД(Ф)Н, каталитического мотива Туг-Хаа-Хаа-Хаа-Lys (консервативный признак короткоцепочечных алкоголь дегидрогеназ [32]), ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-бочечной структуры (альдо-кето редуктазы [33]) или связанных ионов [29]. В то же время, известно, что VDAC1 имеет сайт связывания НАДН и, по-видимому, других нуклеотидов [29, 34]. Кроме того, VDAC1 содержит 2 цистеиновых остатка, которые, как предполагается, важны для оксидоредуктазной активности [18].

Сравнение эффектов блокаторов VDAC и ингибиторов известной редуктазы ксенобиотиков внешней мембраны митохондрий НАДН цитохром b5 редуктазы (Cytb5R3) на НАДН-зависимое восстановление ксенобиотиков во внешних отделах митохондрий показало, что VDAC1 (или другие его изоформы) скорее всего не способны восстанавливать ксенобиотики и точно не способны делать это с заметной скоростью [25]. В то же время, ингибиторы,



использовавшиеся в работе (такие как DIDS, *p*-хлормеркуриобензоат, эбселен и т.п.) не являются специфическими ингибиторами VDAC или Cyb5R3. Это не позволяет исключить их влияния на оба изучаемых белка. Поэтому, далее мы исследовали эффект подавления экспрессии различных изоформ VDAC на уровень супероксид аниона, генерируемого при восстановлении редокс активных соединений внутриклеточными НАДН оксидоредуктазами мышинных эмбриональных фибробластов (Рис. 2). Редокс активные соединения, которые по данным литературы, могут быть восстановлены до автоокисляющихся форм внешними митохондриальными оксидоредуктазами (паракват, даунорубицин, доксорубицин, арсеназо III, нитрофурантоин, менадион и люцигенин), были предварительно протестированы на способность стимулировать генерацию супероксид аниона во внешних отделах митохондрий печени (RLM) и сердца крыс (RHM) при добавлении НАДН (Рис. 2А).

Как следует из рисунка, в митохондриальной суспензии НАДН заметно стимулировал образование супероксид аниона в присутствии трех соединений: нитрофурантоина, менадиона и люцигенина. Мы предположили, что для эффективного переноса электрона с активного центра НАДН оксидоредуктазы на кислород (с образованием супероксид аниона) стандартный редокс потенциал



редокс пар хинон/семихинон указанных соединений должен быть выше, чем редокс потенциал активного центра (восстановленный/1- $\bar{e}$  окисленный) и ниже, чем потенциал редокс пары кислород/супероксид анион.

**Рисунок 2.** Эффект

подавления экспрессии различных изоформ VDAC на уровень супероксид аниона с цитозольной стороны митохондриальной мембраны в присутствии некоторых редокс активных соединений и НАДН. А. Прирост СОД-чувствительной хемилюминесценции

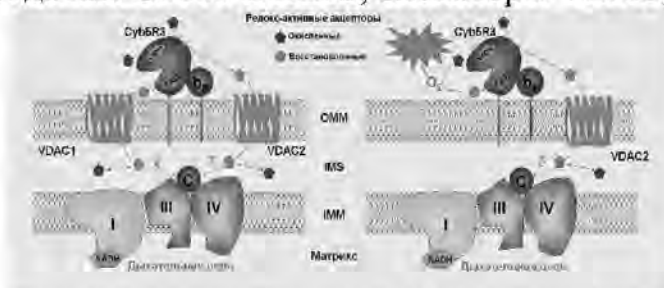
MCLA в изолированных митохондриях печени (RLM) и сердца крыс (RHM) в ответ на добавление НАДН в присутствии параквата (PQ), даунорубицина (Dauno), доксорубицина (Dox), арсеназо III (Arsen), нитрофурантоина (Nitro), менадиона (Men) и люцигенина (Luc). Показан прирост интегральной хемилюминесценции за 20 мин с начала инкубации. На оси абсцисс показаны значения стандартного редокс потенциала редокс активных соединений. Вертикальные пунктирные линии показывают значения стандартных редокс потенциалов флавина Cyb5R3 и пары кислород/супероксид анион. Б и В. СОД-чувствительная хемилюминесценция МСЛА (Б) и ее прирост в ответ на добавление НАДН (В) в пермеабелизованных мышинных эмбриональных фибробластах с нормальной и подавленной экспрессией различных изоформ VDAC в присутствии редокс активных соединений. Звездочки показывают статистически достоверные отличия. Г. Перенос электронов от внешних митохондриальных НАДН оксидоредуктаз на цитохром *c* межмембранного пространства радикалами нитрофурантоина. Эффект блокаторов VDAC.

Следовательно, стандартный редокс потенциал активного центра НАДН-зависимой редуктазы, которая восстанавливает редокс активные соединения во внешней мембране или межмембранном пространстве митохондрий, лежит в диапазоне от  $-250$  до  $-150$  мВ. Значения стандартного редокс потенциала

флавиона Cyb5R3 примерно попадает в указанный диапазон (–258 и –160 мВ [35], –268 и –190 мВ [36], –272 и –194 мВ [37] в отсутствие и присутствии НАД<sup>+</sup>, соответственно).

Далее с использованием отобранных соединений мы изучили СОД-чувствительную генерацию супероксид аниона в пермеабелизованных мышинных эмбриональных фибробластах с нормальной и подавленной экспрессией различных изоформ VDAC в отсутствие (Рис. 2Б) и присутствие добавленного НАДН (Рис. 2В). На рисунке 2Б показан прирост интеграла хемилюминесценции MCLA по отношению к контролю без редокс активных соединений. Как видно из рисунка, в отсутствие добавленного НАДН, генерация супероксид аниона была примерно одинаковой во всех линиях в присутствии люцигенина и нитрофурантоина, а с менадином выше в клетках, с подавленной экспрессией поринов. Добавление НАДН (Рис. 2В) вызывало мощную стимуляцию продукции супероксид аниона в присутствии всех редокс активных акцепторов в контрольных клетках. При этом, в клетках с подавленной экспрессией VDAC1/3 и VDAC2 уровень супероксид аниона был существенно выше, чем в контроле. Только в присутствии люцигенина уровень супероксид аниона в контроле и VDAC1/3- был примерно одинаков. Поскольку, НАДН не проникает через внутреннюю мембрану интактных митохондрий, можно заключить, что восстановление ксенобиотиков осуществляют оксидоредуктазы цитозоля и ориентированные в цитозоль оксидоредуктазы плазматической мембраны и других мембранных структур, включая внешнюю мембрану и внешнюю поверхность внутренней мембраны митохондрий. Тот факт, что в клетках с подавленной экспрессией различных изоформ VDAC восстановление редокс активных соединений не ингибируется, говорит о том, что VDAC не является оксидоредуктазой.

Возникает вопрос, почему в клетках, с подавленной экспрессией VDAC уровень АФК в присутствии ксенобиотиков выше, чем в нормальных клетках? Ранее было показано, что цитохром *c* межмембранного пространства митохондрий способен эффективно утилизировать супероксид анион, генерируемый ксантиноксидазой [38, 39]. Мы предположили, что образующиеся в цитозоле клеток радикалы ксенобиотиков также могут быть деактивированы цитохромом *c*. Рисунок 2Г показывает, что нитрофурантоин получает электроны от Cyb5R3 во внешней мембране митохондрий, окисляя при этом цитохром *b5*, и восстанавливает цитохром *c* межмембранного пространства. Важно, что супероксиддисмутаза оказывала минимальный эффект на данный перенос (не показано), тогда как G3139 и DIDS, блокаторы VDAC, мощно его подавляли.

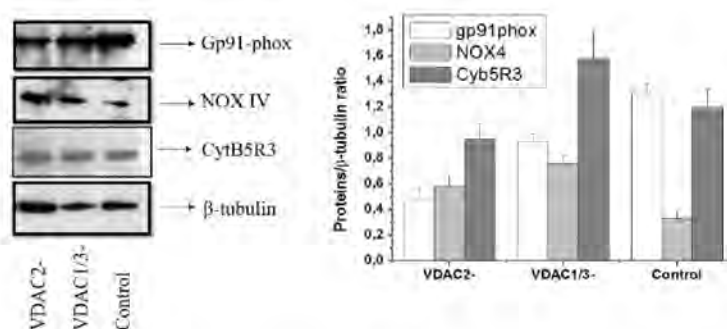


**Рисунок 3.** Механизм усиления генерации АФК в цитозоле в присутствии редокс активных соединений при подавлении экспрессии изоформ VDAC в митохондриях. OMM – внешняя мембрана, IMM – внутренняя мембрана, IMS – межмембранное пространство митохондрий, C – цитохром *c*, b5 – цитохром *b5*.

Таким образом, как показано на рисунке 3, подавление экспрессии различных изоформ VDAC (или его блокирование специфическими блокаторами) препятствует проникновению свободных радикалов из цитозоля в межмембранное пространство митохондрий, что снижает способность системы цитохром *c*-цитохром оксидаза эти радикалы утилизировать.

### Эффект подавления экспрессии VDAC на экспрессию белков, регулирующих уровень АФК в митохондриях и клетках

Однако, повышение уровня АФК в клетке при снижении экспрессии изоформ VDAC может быть связано не только со снижением ёмкости редокс-буфера клетки (снижение количества цистеиновых остатков) [28] или с подавлением антирадикальной активности цитохрома *c*/цитохром *c* оксидазы. Эффект VDAC на редокс баланс клеток и, в частности, уровень АФК может быть реализован по более сложному механизму. Так, было показано, что VDAC1 контролирует экспрессию различных белков, включая белки антиоксидантной системы, а, с другой стороны, его экспрессия может контролироваться антиоксидантными белками [40, 41]. Недавние исследования транскриптома эмбриональных мышечных фибробластов показали, что нокаут лишь одной изоформы VDAC1 приводит к изменению экспрессии более чем 220 генов, если клетки инкубировали в нормальных условиях. Если инкубацию проводили в условиях модельной гипоксии, то это число возрастало до 600 [11].



**Рисунок 4.** Экспрессия белков-генераторов АФК в клетках с нормальной и подавленной экспрессией различных изоформ VDAC. Gp91phox – каталитическая субъединица НАДФН оксидазы 2, NOX IV (4) – каталитическая субъединица не требующей активации НАДФН оксидазы 4, CytB5R3 – НАДН цитохром b5 редуктаза микросом и внешней мембраны митохондрий.

На рисунке 4 показано, что в клетках с подавленной экспрессией VDAC1/3 и VDAC2 увеличивается относительное количество постоянно-активной НАДФН оксидазы 4 (NOX 4), генерирующей пероксид водорода, в отличие от других членов данного семейства, которые производят супероксид анион. В то же время, относительное количество NOX 2 (gp91phox) было снижено, а уровень CytB5R3 был соизмерим с контролем, также, как и уровень цитохром P450 редуктазы (данные не приведены). Эти данные, показывают, что NOX4 может быть, отчасти, ответственна за повышенный уровень гидропероксида в цитозоле клеток с подавленной экспрессией поринов (см. Рис. 1). Однако, эти данные не могут объяснить повышенный уровень АФК в митохондриях.

Уровень АФК в митохондриях может зависеть от трех параметров: скорости их генерации, скорости их утилизации и скорости их выведения из митохондрий. В митохондриях известно несколько систем, способных

генерировать АФК. Большинство из данных систем представлено комплексами, состоящих из 2-46 субъединиц. Антиоксидантная система митохондрий также включает больше десяти ферментов, либо непосредственно взаимодействующих с АФК, либо участвующих в регенерации окисленных форм антиоксидантных ферментов. Несмотря на то, что пероксид водорода достаточно легко проникает через митохондриальные мембраны, ряд данных показывает, что пермеабиллизация мембран облегчает его выход. Для выхода супероксид аниона из матрикса митохондрий в межмембранное пространство, по-видимому, существует некий путь, молекулярная природа которого окончательно не установлена [42]. Из межмембранного пространства в цитозоль супероксид анион выходит через VDAC внешней мембраны [42, 43]. Поскольку митохондрии, как правило, содержат разветвленную систему складок/впячиваний внутренней мембраны (крист), для удаления АФК из митохондрий важно, чтобы существовало сообщение между пространством внутри крист и межмембранным пространством митохондрий. За структуру крист и их сообщение с межмембранным пространством в митохондриях отвечает ряд белков, включая прогибитины 1 и 2, митофузин 1, OPA-1 и другие.

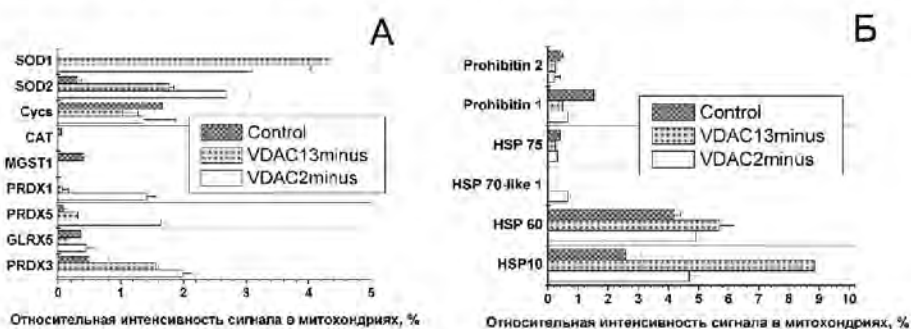
Из мышечных эмбриональных фибробластов с нормальной и подавленной экспрессией различных изоформ VDAC были выделены митохондрии и произведена их очистка в градиенте перколла. Из митохондрий были приготовлены образцы для протеомных исследований, которые были проведены сотрудниками Центра масс-спектрометрии Факультета клеточной и молекулярной фармакологии Медицинского Университета Южной Каролины под руководством Дж. Дж. Лемастера.

Генерацию АФК в митохондриях осуществляют, в первую очередь, комплексы I и III дыхательной цепи, а также комплекс II в патологических условиях [44]. Локализованная в матриксе митохондрий флаavin-содержащая липоамид дегидрогеназа (EC 1.6.4.3), компонент пируват дегидрогеназного и альфа-кетоглутарат дегидрогеназного суперкомплексов вносит существенный вклад в продукцию АФК [45]. Кроме того, глицерол-3-фосфат дегидрогеназа (EC 1.1.99.5) и дигидрооротат дегидрогеназа (EC 1.3.3.1/EC 1.3.99.11) способны генерировать АФК как в субстрат-связывающих сайтах со стороны межмембранного пространства, так и при передаче электронов в комплексе III и I дыхательной цепи (прямой и обратный перенос электронов) [46, 47]. Моноамин оксидаза (MAO-A и MAO-B, EC 1.4.3.4) внешней мембраны митохондрий является важным генератором перекиси водорода в митохондриях млекопитающих, осуществляющих превращение нейромедиаторов или окисление экзогенных аминов [48]. Потенциальными, но пока недостаточно изученными источниками АФК, а также активных форм азота, в матриксе митохондрий, могут быть НАДФН аденодоксин редуктаза/аденодоксин [49] или гипотетическая митохондриальная NO синтаза (mtNOS), способная генерировать супероксид анион во флаavin-связывающем сайте при разобщении [50].

Однако, нет прямой связи между уровнем экспрессии различных субъединиц АФК-генерирующих ферментов и самой продукцией АФК. При этом, мутации или условия, нарушающие структуру или функционирование ферментных комплексов, могут приводить к резкому усилению продукции АФК.

Поэтому, данные по относительному количеству АФК-генерирующих комплексов на данном этапе не дали нам ключа к пониманию причин повышенного уровня АФК в митохондриях с подавленной экспрессией различных поринов. Напротив, изучение систем утилизации и выведения АФК преподнесло сюрпризы.

На рисунке 5 приведены данные сравнения относительного количества белков антиоксидантной системы (А) и белков-шаперонов (Б) в митохондриях с нормальной и подавленной экспрессией различных изоформ VDAC. На Рис. 5А показано, что относительный уровень пяти белков антиоксидантной защиты из девяти идентифицированных, существенно выше в митохондриях, не имеющих различных изоформ VDAC. Эти данные указывают на то, что скорость генерации АФК в митохондриях с нокаутом по изоформе 2 порина, и, в меньшей степени, по изоформам 1 и 3 порина, существенно больше, чем в контроле. Даже увеличение экспрессии белков-антиоксидантов не может снизить его до нормального уровня. Можно предположить, что полученные данные свидетельствуют о накоплении повреждений в переносчиках дыхательной цепи и дегидрогеназах цикла Кребса, вследствие «перегрева» митохондрий с нокаутом по порину, из-за снижения эффективности выхода супероксид аниона.



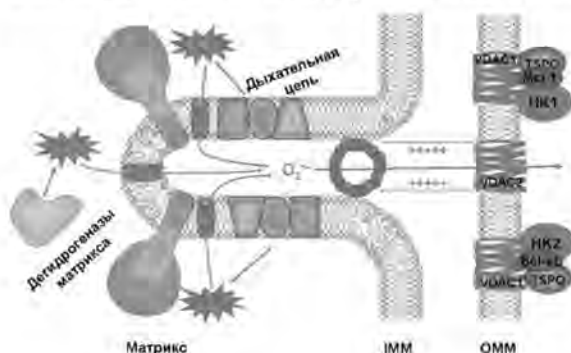
**Рисунок 5.** Относительное количество белков антиоксидантной защиты (А) и белков-шаперонов (Б) в митохондриях мышинных эмбриональных фибробластов с нормальной и подавленной экспрессией различных изоформ VDAC. Обозначения белков: Cu-Zn супероксиддисмутазы (SOD1), Mn супероксиддисмутазы (SOD2), цитохром *c* (соматический) (Cytc), каталаза (CAT), микросомальная глутатион S-трансфераза 1 (MGST1), пероксиредоксин 1 (PRDX1), пероксиредоксин 5 (PRDX5), белок 5, родственник глутаредоксину (GLRX5), тиоредоксин-зависимая пероксид редуктаза (PRDX3), HSP – белки теплового шока 10, 60, 70 и 75.

Эти данные косвенно подтверждаются тем, что в митохондриях с подавленной экспрессией различных изоформ VDAC происходит увеличение экспрессии шаперонных белков теплового шока HSP10 и HSP70-like protein 1 (Рис. 5Б), которые участвуют в поддержании структуры поврежденных белков. С другой стороны, одним из объяснений высокого уровня эндогенных АФК в митохондриях с нокаутом по различным изоформам порина, может быть то, что уровень прохибитинов в них существенно снижен. С учетом того, что в нокаутах не детектируются партнеры прохибитинов - митофузин 1 и OPA 1 (данные не приведены), можно предположить, что структура крист в их митохондриях серьезно дезорганизована. Это, в свою очередь, не позволяет быстро удалять супероксид анион из митохондрий или утилизировать его с участием цитохрома *c*/цитохром *c* оксидазы (Рис. 6).

Из данных масспектрометрического анализа следует, что подавление экспрессии как изоформы 2, так и изоформ 1/3 VDAC приводит к снижению уровня прохибитинов и повышению уровня шаперонов. Возникает вопрос,

почему же при подавлении именно VDAC2 наблюдается многократный рост уровня АФК даже на фоне повышенной экспрессии антиоксидантных белков?

Можно предположить, что это связано с особенностями регуляции проводимости VDAC1 белками-партнерами. Известно, что, по крайней мере, некоторые из белков, связывающихся с VDAC1 (TSPO [3], Bcl<sub>xL</sub>, Mcl-1 [5, 6], а также некорректно свернутые белки [51] способны менять его проводимость при связывании. Так, TSPO, связываясь с VDAC1, не только блокировал взаимодействие с митохондриями белков SQSTM1/p62 и LC3, ответственных за митофагию, но и повышал уровень внутриклеточных АФК, усиливал повреждение митохондрий и клеточную гибель [3, 52]. Напротив, Mcl-1, антиапоптотический белок семейства Bcl-2, связывался с VDAC1 и VDAC3 и снижал Ca<sup>2+</sup> емкость митохондрий и уровень АФК, а также миграцию клеток карциномы легкого [53]. Возможно, некоторые молекулярные партнеры VDAC1 способны резко снижать его проницаемость для супероксида аниона или других АФК. С другой стороны, можно предположить, что цистеиновые остатки VDAC играют роль в транспорте или утилизации АФК [28]. Поскольку, различные транскрипционные варианты VDAC2 человека, мыши и крысы содержат от 6 до 11 цистеиновых остатков, VDAC3 – 6–7 остатков, а VDAC1 всего 2, антиоксидантный эффект изоформы 2 может быть существенно выше.



**Рисунок 6.** Предполагаемая роль VDAC2 в предотвращении окислительного стресса в митохондриях. VDAC стабилизирует проингибиторный комплекс, что облегчает выход АФК из внутреннего пространства крист. При этом VDAC2 является предпочтительным путем для выхода АФК из межмембранного пространства митохондрий.

Долговременное снижение эффективности выхода АФК из митохондрий может вызвать

окислительное повреждение оксидоредуктаз внутренней мембраны и матрикса митохондрий. Дезорганизация структуры и функционирования оксидоредуктаз может, в свою очередь, привести к усилению продукции АФК и индуцировать лавинообразный самоусиливающийся процесс: АФК → повреждение → усиление продукции АФК → увеличение тяжести повреждения → и т. д. В конечном итоге, это может привести к необратимым повреждениям и элиминации клетки.

### Заключение

VDAC играют важную роль в обмене метаболитами между цитоплазмой и митохондриями, в регуляции неспецифической митохондриальной поры (mPTP), пермеабиллизации внешней мембраны (MOMP) для апоптогенных факторов, и, как следствие, в контроле клеточной гибели. Сообщалось об участии VDAC в регуляции уровня АФК в митохондриях и клетках. Однако данные о том, какой именно эффект оказывали различные изоформы VDAC в различных условиях весьма противоречивы. Блокирование VDAC специфическими ингибиторами могло как усиливать, так и подавлять генерацию АФК. И подавление, и усиление экспрессии, в первую очередь, VDAC1 приводило к увеличению продукции

АФК в митохондриях и клетках. Сообщалось, также, о способности VDAC1 восстанавливать НАДН-зависимым образом редокс активные ксенобиотики и природные соединения до автоокисляющихся радикалов. В данной работе мы оценили эффект подавления экспрессии различных изоформ VDAC на уровень АФК в цитозоле и митохондриях мышечных эмбриональных фибробластов. Было обнаружено, что подавление экспрессии VDAC2 и, в меньшей степени, VDAC1 и 3 вызывало повышение уровня пероксида водорода в цитозоле и супероксид аниона в митохондриях. Вестерн блот анализ экспрессии некоторых АФК-генерирующих НАД(Ф)Н оксидоредуктаз (NOX2, NOX4, Cyb5R3, POR) показал, что NOX 4 может, отчасти, быть ответственной за повышенный уровень АФК в митохондриях и цитозоле клеток с подавленной экспрессией VDAC. Мы изучили уровень АФК в пермеабилizованных клетках в присутствии НАДН и отобранных редокс активных ксенобиотиков, и показали, что подавление экспрессии или блокирование VDAC приводит к снижению способности системы цитохром *c*-цитохром *c* оксидаза утилизировать свободные радикалы цитозоля. Изучение протеома митохондрий с помощью масс спектрометрического анализа показало, что в митохондриях с подавленной экспрессией различных изоформ VDAC происходило увеличение уровня стресс белков и снижение уровня белков, отвечающих за поддержание митохондриальной ультраструктуры, в частности, системы крист (прохибитины 1 и 2, митофузин 1). Кроме того, подавление экспрессии VDAC2 приводило к мощному повышению уровня пяти антиоксидантных белков из девяти детектируемых.

Таким образом, митохондрии с подавленной экспрессией различных изоформ VDAC характеризовались А) более высоким уровнем митохондриальных АФК, Б) более высоким уровнем митохондриальных ферментов антиоксидантной защиты, и В) более низким уровнем экспрессии белков, ответственных за поддержание нормальной структуры крист. Эти данные могут свидетельствовать о том, что VDAC и, в первую очередь, изоформа 2 (характеризующаяся наличием большого количества цистеиновых остатков) ответственны за выход супероксид аниона, образующегося в матрице митохондрий, и/или играют роль редокс буфера для АФК. Кроме того, VDAC, по-видимому, важен для поддержания структуры крист митохондрий. Разрушение структуры крист может приводить к ухудшению отвода эндогенного супероксид аниона к каналам VDAC или системам утилизации радикалов в межмембранном пространстве митохондрий, таким как цитохром *c*/цитохром *c* оксидаза. Можно предположить, что длительное снижение эффективности выхода АФК из митохондрий может индуцировать лавинообразный самоусиливающийся процесс: АФК → повреждение → усиление продукции АФК → увеличение тяжести повреждения.

Работа поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ 14-04-01664) Круглову А.Г. и грантом Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение #14.Z50.31.0028) Лемастеру Дж.Дж.

#### Список литературы

1. Panfili F, Sandri G (1985). *Biochem Biophys Res Commun*, 131(1),6-12.
2. Nakashima RA, Mangan PS, Colombini M, Pedersen PL. (1986). *Biochemistry*, 25(5),1015-1021

3. Gatliff J, East D, Crosby J, Abeti R, Harvey R, Craigen W, Parker P, Campanella M (2014). *Autophagy*, 10(12),2279-2296.
4. Zhang M, Takano T, Liu S, Zhang X (2015). *FEBS Lett*, 589(11),1207-1213.
5. Renault TT, Chipuk JE (2014). *Chem Biol*, 21(1),114-123.
6. Roy MJ, Vom A, Czaboljar PE, Lessene G (2014). *Br J Pharmacol*, 171(8),1973-1987.
7. Toninello A, Salsi M, Schweizer M, Richter C (2004). *Free Radic Biol Med*, 37(7),1073-1080.
8. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, Forte MA (2006). *FEBS J*, 273(10),2077-2099.
9. Crompton M (1999). *Biochem J*, 341(2),233-249.
10. Halestrap AP, Woodfield KY, Connem CP (1997). *J Biol Chem*, 272(6),3346-3354.
11. Brahimi-Horn MC, Giuliano S, Saland E, Lacas-Gervais S, Skeiko T, Pelletier J, Bourget I, Bost F, Féral C, Boulter E, Tauc M, Ivan M, Garny-Susini B, Popa A, Mari B, Sany JE, Craigen WJ, Pouyssegur J, Mazure NM (2015). *Cancer Metab*, 3,8.
12. Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V (2016). *Biochim Biophys Acta*, 1863(7Pt A),1612-1623.
13. Chen H, Gao W, Yang Y, Guo S, Wang H, Wang W, Zhang S, Zhou Q, Xu H, Yao J, Tian Z, Li B, Cao W, Zhang Z, Tian Y (2014). *Apoptosis*, 19(12),1712-1726.
14. De Pinto V, Guarino F, Guarnera A, Messina A, Reina S, Tomasello FM, Palermo V, Mazzoni C (2010). *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7),1268-1275.
15. Tikunov A, Johnson CB, Padiaditakis P, Markevich N, Macdonald JM, Lemasters JJ, Holmuhamedov F (2010). *Arch Biochem Biophys*, 495(2),174-181.
16. Sinamura E, Hirai K, Shinoda H, Koyama J, Niwa Y, Shimizu S (2006). *Cancer Biol Ther*, 5,1523-1529.
17. Deniard A, Rossi C, Bergaud A, Honard J, Campagna S, Knoll W (2007). *Langmuir*, 23(7),3898-3905.
18. Shinoda H, Hirai K, Sinamura E, Hata T, Iwakiri H, Mizuki K (2009). *J Biol Chem*, 284(42),28642-28649.
19. Sinamura E, Shinoda H, Ishigaki Y, Hata T, Higashi N, Hirai K (2008). *Anat Sci Int*, 83(4),261-266.
20. Baker MA, Lane DJ, Ly JD, De Pinto V, Lawen A (2004). *J Biol Chem*, 279(6),4811-4819.
21. Lawen A, Ly JD, Lane DJ, Zarschler K, Messina A, De Pinto V (2005). *Int J Biochem Cell Biol*, 37(2),277-282.
22. Akanda N, Tofighi R, Brask J, Tammi C, Elinder F, Ceccatelli S (2008). *Cell Cycle*, 7(20),3225-3234.
23. Gonzalez-Gronow M, Ray R, Wang F, Pizzo SV (2013). *J Biol Chem*, 288(1),498-509.
24. Shinoda H, Hirai K, Sinamura E, Pan J (1998). *Arch Biochem Biophys*, 351,75-81.
25. Nikiforova AB, Saris NE, Kruglov AG (2014). *Free Radic Biol Med*, 74,74-84.
26. Shuaif el dein O, Gallerne C, Brenner C, Lemare C (2012). *Biochem Pharmacol*, 83(9),1172-1182.
27. Leone A, Roca MS, Ciardiello C, Terranova-Barberio M, Vitagliano C, Ciliberto G, Mancini R, Di Gennaro E, Bruzzese F, Budillon A (2015). *Free Radic Biol Med*, 89,287-299.
28. Reina S, Checchetto V, Saletti R, Gupta A, Chaturvedi D, Guardiani C, Guarino F, Scorciapino MA, Magri A, Fofi S, Ceccarelli M, Messina AA, Mahalakshmi R, Szabo I, De Pinto V (2016). *Oncotarget*, 7(3),2249-2268.
29. Hiller S, Abramson J, Mannella C, Wagner G, Zeth K (2010). *Trends Biochem Sci*, 35,514-521.
30. Deller S, Macheroux P, Sollner S (2008). *Cell Mol Life Sci*, 65(1),141-160.
31. Zhang Y, Jarade K, Jiang ZG, Ho S, Wang W, Zhu H (2010). *J Lipid Res*, 51(1),53-62.
32. Jönvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, González-Duarte R, Jeffery J (1995). *Biochemistry*, 34(18),6003-6013.
33. Mindnich RD, Penning TM (2009). *Hum Genomics*, 3(4),362-370.
34. Villinger S, Giller K, Bayrhuber M, Lange A, Griesinger C, Becker S, Zweckstetter M (2014). *J Biol Chem*, 289(19),13397-13406.
35. Iyanagi T (1977). *Biochemistry*, 16(12),2725-2730.
36. Marohnic CC, Bewley MC, Barber MJ (2003). *Biochemistry*, 42(38),11170-11182.
37. Rona GW, Crowley LJ, Davis CA, Barber MJ (2005). *Biochemistry*, 44(41),13467-13476.
38. Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantinov AA, Skulachev VP (2003). *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 6),1312-1315.
39. Korshunov SS, Knisnikov BF, Pereverzev MO, Skulachev VP (1999). *FEBS Lett*, 462(1-2),192-198.
40. Galganski H, Kurechito A, Wojtkowska M, Stobienia O, Budzinska M, Knita H (2010). *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7),1276-1280.
41. Magri A, Di Rosa MC, Tomasello MF, Guarino F, Reina S, Messina A, De Pinto V (2016). *Biochim Biophys Acta*, 1857(6),789-798.
42. Lustgarten MS, Bhattacharya A, Muller FL, Jang YC, Shimizu T, Shimizuwa T, Richardson A, Van Remmen H (2012). *Biochem Biophys Res Commun*, 422(3),515-521.
43. Han D, Antunes F, Camali R, Rettori D, Cadenas E (2003). *J Biol Chem*, 278(8),5557-5563.
44. Dröse S, Brandt U (2012). *Adv Exp Med Biol*, 748,145-169.
45. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C (2004). *J Neurosci*, 24,7779-7788.
46. Tretter L, Takacs K, Hegedus V, Adam-Vizi V (2007). *J Neurochem*, 100(3),650-663.
47. Forman HJ, Kennedy J (1975). *J Biol Chem*, 250(11),4322-4326.
48. Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E (1996). *Arch Biochem Biophys*, 335,295-304.
49. Omura T (2010). *J Biochem*, 147(3),297-306.
50. Parihar MS, Nazarewicz RR, Kincaid E (2008). *Biochem Biophys Res Commun*, 366,23-28.
51. Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW (2010). *Neuron*, 67(4),575-587.
52. Veenman L, Shudalov Y, Gavish M (2008). *J Bioenerg Biomembr*, 40(3),199-205.
53. Huang H, Shah K, Bradbury NA, Li C, White C (2014). *Cell Death Dis*, 5,e1482.



## **Глава 7. АНАЛИЗ ПРОДУКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО СУПЕРОКСИДА С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Маркевич Н.И.<sup>1,2</sup>, Хоек Я.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, Пущино;

<sup>2</sup>Университет Томаса Джефферсона, Филадельфия, США

### **Аннотация**

Избыток активных форм кислорода (АФК), связанный с различными патологиями, вызывает окислительную модификацию клеточных макромолекул и способствует гибели клеток. Одной из важнейших мишеней АФК является митохондриальная пора, вызывающая переход мембраны митохондрий в состояние высокой проницаемости, которая активируется АФК и, в свою очередь, активирует сигнальные пути клеточной гибели, такие как апоптоз и некроз/некроптоз. Данная работа посвящена математическому моделированию генерации АФК в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий при варьировании субстратов и ингибировании различных сегментов ЭТЦ.

Компьютерная модель формирования супероксида в ЭТЦ объясняет многочисленные, часто противоречивые данные по эффекту  $\Delta\Psi$  и  $\Delta pH$ , а также различных субстратов и ингибиторов ЭТЦ на производство АФК. В частности, результаты моделирования подтверждают, что, в дополнение к формированию АФК в комплексе III и на сайте ФМН комплекса I, хинон связывающий сайт комплекса I является дополнительным сайтом генерации супероксида. При этом, когда комплекс III или/и цитохром *c* оксидаза ингибируются при окислении сукцината, производство АФК на этом сайте исключается. Кроме того, количественный анализ гистерезиса и бистабильности в работе дыхательной цепи был проведен с помощью разработанной нами математической модели.

### **Введение**

За последние несколько десятилетий накопилось огромное количество доказательств того, что активные формы кислорода (АФК), таких как супероксид, перекись водорода и другие активные формы кислорода являются важными посредниками в широком спектре процессов клеточной сигнализации [1, 2]. Одной из наиболее важных мишеней АФК среди митохондриальных ионных каналов являются митохондриальные поры, вызывающие переход мембраны митохондрий в состояние высокой проницаемости и играющие ключевую роль в активации сигнальных путей клеточной гибели, таких как апоптоз и некроз/некроптоз [3]. Производство АФК в клетке должно тщательно контролироваться, поскольку окислительный стресс, связанный с неконтролируемой генерацией АФК может привести к повреждению белков, липидов мембран и ДНК. АФК-индуцированная гибель клеток и повреждение тканей играют важную роль в различных заболеваниях от рака до ишемического повреждения миокарда и инсульта, а также других заболеваниях, связанных с возрастом [2]. Понимание того, как клетки защищены от повреждений, вызванных окислительным стрессом, требует понимания как процессов, которые способствуют образованию АФК, так и механизмов активации утилизации АФК. Митохондриальная электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) является одним из основных источников образования АФК в большинстве клеток.

Ранние исследования, проведенные Чансом с соавторами [4] показали, что митохондрии генерируют  $H_2O_2$  со скоростью, которая зависит от многих факторов, наиболее важными из которых являются субстраты ЭТЦ, содержание кислорода, а также присутствие различных ингибиторов дыхательной цепи. Работы многих исследователей подтвердили, что комплексы I и III дыхательной цепи митохондрий, являются основным источником АФК в клетках, главным образом в виде супероксида. Однако, несмотря на интенсивные биохимические и биофизические исследования переноса электронов и протонов в различных сегментах дыхательной цепи, многочисленные вопросы о механизмах генерации АФК остаются нерешенными. Одним из них является определение мест формирования супероксида в комплексе I. Общеизвестно, что восстановленный флаavin моноклеотид является одним из сайтов восстановления кислорода до супероксида в комплексе I [5]. Однако экспериментальные данные по скорости образования АФК в комплексе I митохондрий во время прямого и обратного переноса электронов показывают, что как минимум еще один сайт производства АФК в комплексе I должен быть рассмотрен для того, чтобы объяснить экспериментальные наблюдения (см. обзор [6]). Убихинон связывающий сайт был предложен как дополнительный сайт образования супероксида в комплексе I [7, 8].

Кроме того, многие вопросы, связанные с образованием АФК при ингибировании различных сегментов дыхательной цепи, остаются нерешенными [9]. Например, недавние экспериментальные наблюдения показали неожиданные немонокотонные зависимости производства АФК антимицин-ингибированным комплексом III от активности сукцинатдегидрогеназы [10] и концентрации окисленного убихинона Q [11]. В работе [11] было предположено, что окисленный убихинон поддерживает образование супероксида на  $Q_o$ -сайте комплекса III, действуя в качестве редокс-медиатора переноса электронов от восстановленного цитохрома bL на убихинон в обратной реакции  $Q_o$ -сайта. Это означает, что окисленный кофермент Q может связываться с восстановленным цитохромом bL и покидать  $Q_o$ -сайт до того, как происходит перенос электронов от bL к цитохрому bH. С другой стороны, Бранд и коллеги [10] показали, что экспериментальные данные по скорости образования супероксида антимицин-ингибированным комплексом III можно объяснить только при предположении, что константы скорости окисления убихинола на  $Q_o$ -сайте очень низкие, если цитохром bL находится в восстановленном состоянии. Все эти вопросы не являются неожиданными для такой сложной системы как дыхательная цепь, анализ поведения которой трудно делать только на основе экспериментальных исследований. Подходы так называемой компьютерной системной биологии (в России с 70-х годов прошлого столетия это направление науки более известно, как «биофизика сложных систем») могут быть полезными при этом анализе, отправной точкой для которого служит подробная математическая модель всей дыхательной цепи. Такая компьютерная механистическая модель переноса электронов и образования супероксида в митохондриальной ЭТЦ особенно незаменима в ходе исследования сильно нелинейных кинетических свойств ЭТЦ. Селиванов и коллеги [12, 13] недавно обнаружили бистабильное поведение в работе дыхательной цепи митохондрий и показали, что бистабильность может быть причиной резкого увеличения производства АФК при аноксии-

реоксигенации. Компьютерный анализ бистабильности и увеличение производства АФК при аноксии-реоксигенации был сделан [12, 13] с помощью модели, основанной на предположении о применении принципа независимости к переносу электронов в ЭТЦ, то есть, что перенос электрона между редокс-парами определенных переносчиков не зависит от редокс-состояния остальных переносчиков электронов в дыхательной цепи. В отличие от этой модели, основанной на определенных правилах (английский термин “the rule-based model” [12, 13]), мы применили стандартный кинетический подход, использованный ранее для компьютерного моделирования ЭТЦ [14 - 17] с использованием явного представления наиболее важных путей переноса электронов в комплексах I и III, и разработали более расширенную компьютерную модель генерации супероксида в ЭТЦ [18, 19]. Модель была проанализирована при различных условиях (прямого и обратного переноса электронов, в присутствии и без различных ингибиторов комплексов I и III) с учетом имеющихся экспериментальных данных о производстве АФК для того, чтобы дискриминировать различные гипотезы и сделать прогнозы, которые могут быть экспериментально проверены. В частности, мы проанализировали механизмы возникновения гистерезиса в стационарных кинетических характеристиках и условия, при которых гистерезис и бистабильность существуют в дыхательной цепи митохондрий, с помощью этой детальной компьютерной модели переноса электронов и образования супероксида в ЭТЦ.

Целью этого исследования являлось определение значений констант скорости и концентраций различных переносчиков электронов в модели, при которых наиболее вероятно появление гистерезиса и бистабильности в дыхательной цепи. Предварительные результаты по компьютерному анализу образования АФК в ЭТЦ митохондрий с помощью математического моделирования были недавно опубликованы нами в работах [18, 19].

### **Кинетическая модель митохондриальной дыхательной цепи**

Кинетическая схема переноса электронов и производства супероксида, лежащая в основе механистической компьютерной модели митохондриальной дыхательной цепи, представлена на рис.1. Схема модифицирована на основе кинетической модели, опубликованной в работах [18, 19]. Эта упрощенная кинетическая схема включает следующие переносчики электронов: а) для комплекса I (НАДН-дегидрогеназа, также известная как НАДН:Убихинон Оксидоредуктаза): флаavin мононуклеотид (ФМН), последовательность железосерных кластеров, начиная с N3 и N1a и заканчивая N2 кластером, и убихинон Q (Рис.1А); б) для комплекса III (Цитохром bc1 комплекс, также известный как Убихинол:Цитохром c-Оксидоредуктаза): убихинон Q, негемовый железосерный белок Риске (ISP), цитохромы bL, bH и c1 (Рис.1В); в) Цитохром c и комплекс IV (Цитохром c оксидаза) представлены на рис.1Г. Комплекс II (Сукцинат дегидрогеназа) (Рис. 1Б) и комплекс IV представлены упрощенно, поскольку они, как правило, не считаются источником АФК в митохондриальной ЭТЦ. Перенос электронов в комплексах I и III подробно описан для того, чтобы учесть редокс состояния переносчиков электронов, которые ответственны за формирование супероксида. Реакции, в которых происходит генерация и утилизация супероксида, отмечены красным в кинетической схеме (Рис.1-2). Вся

цепь реакций переноса электронов и производства супероксида, соответствующая этой кинетической схеме на рис.1, состоит из 40 реакций, значения констант скорости и концентрации переносчиков электронов которых были взяты из литературных данных.

### Кинетическая модель комплекса I

Начальные стадии переноса электронов в комплексе I (реакции (1-5)) были взяты из кинетической модели, разработанной Куссмауль и Херст [20] для изолированного комплекса I. Эти авторы предположили, что супероксид формируется путем переноса одного электрона от полностью восстановленного флавин мононуклеотида с одним диссоциированным протоном (ФМНН<sup>-</sup>) на O<sub>2</sub> (реакция (16) на Рис.1А). Детальный анализ НАДН/НАД<sup>+</sup> связывания с комплексом I проведен Виноградовым в обзоре [21]. Некоторые кинетические константы окисления НАДН, сопряженные с восстановлением молекулярного кислорода, оценивались при предположении пинг-понг механизма [22]. Хотя недавно было показано, что кинетика окисления НАДН и восстановления убихинона (Q) в комплексе I может не подчиняться классическому пинг-понг механизму из-за сильного пространственного разделения этих реакций и наличия буферной зоны, состоящей из цепочки Fe-S редокс-центров между НАДН - и Q-связывающих сайтов [23]. Более того, используя фитинг процедуру,

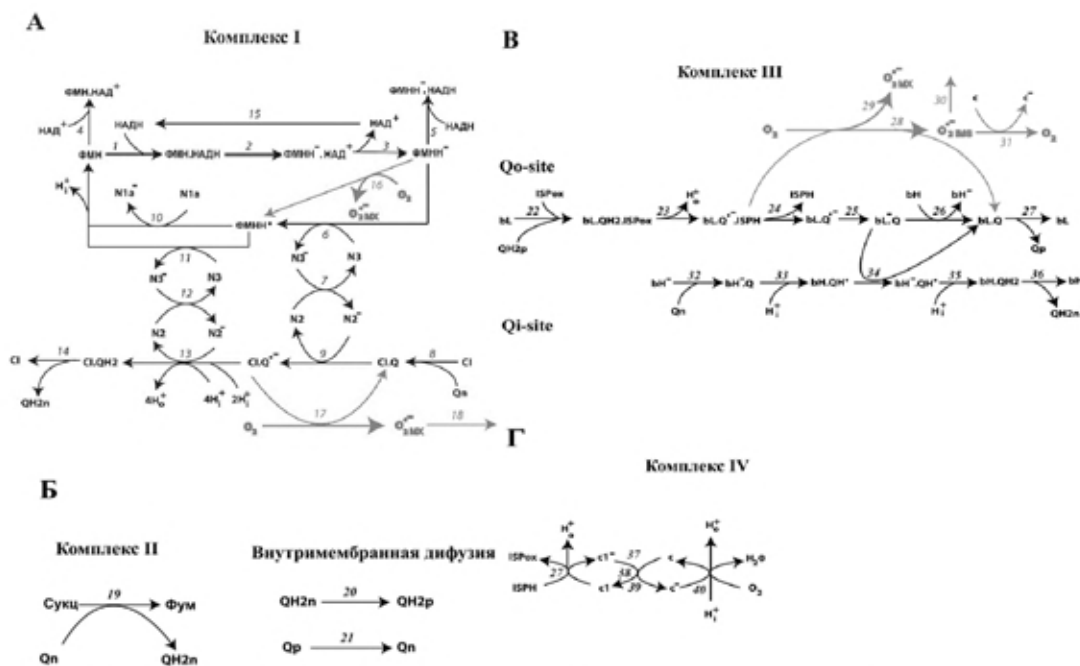


Рисунок 1. Кинетическая схема переноса электронов и генерации супероксида в различных комплексах дыхательной цепи митохондрий. А. Комплекс I. Б. Комплекс II и диффузия восстановленного и окисленного убихинона между внутренней и внешней сторонами внутренней мембраны митохондрий. В. Комплекс III. Г. Часть комплекса III, показывающая реакции переноса электронов от белка Риске (ISPH) к цитохрому с1, цитохром с и комплекс IV. Реакции образования и утилизации супероксида показаны красными стрелками. Подробное описание реакций представлено в тексте.

авторы [23] оценили константы скорости QH<sub>2</sub>/Q и НАДН/НАД<sup>+</sup> связывания с комплексом I, а также туннелирование электронов между различными редокс-центрами с помощью стохастической модели комплекса I, предполагающей

более сложный механизм с учетом возможной диффузии хинона внутри широкого убихинон связывающего кармана.

В модели, представленной здесь, для кинетического описания переноса электронов по цепи Fe-S кластеров учитывались общепринятые предположения, что ФМНН<sup>-</sup> отдает первый электрон Fe-S кластеру N3 (реакция (6)). Перенос электрона от N3 до конечного кластера N2 по цепи редокс-центров N1b, N4, N5, ба, и N6b аппроксимирован реакцией в одну стадию (реакция (7)) с кажущейся константой скорости  $10^4 \text{ с}^{-1}$  так как время движения электронов по всей цепи занимает около 100 мкс [24]. Затем первый электрон переносится от N2 на окисленный убихинон Q, связанный с комплексом I (реакции (8), (9)), восстанавливая убихинон до семихинона.

Второй электрон переносится от полу-восстановленного флавин радикала ФМНН<sup>•</sup> на кластер N1a или кластер N3 (реакция (10) и (11)). Перенос электрона от кластера N1a на кластер N3 очень медленный (прямая константа скорости около  $160 \text{ с}^{-1}$  [25]) по сравнению с другими реакциями в комплексе I. Поэтому мы предполагаем, что кластер N1a только обратимо связывает электроны без их доставки к цепочке из семи редокс-центров. Кинетическая модель переноса электронов в мембранном домене комплекса I и сопрягающем механизме транслокации протонов через мембрану учитывает последние рентгеновские исследования структуры комплекса I и гипотезу о “поршневом” механизме трансмембранного транспорта протонов, как предположили Сазанов и коллеги [26]. Вполне вероятно, в соответствии с этим механизмом, что перенос  $3 \text{ H}^+$  через митохондриальную мембрану осуществляется одновременно (посредством трансмембранных субъединиц NuoL, NuoM и NuoN) при переносе электронов от кластера N2 к убихинону, связанному с комплексом I. Мы предполагаем, что конформационные переключения и перенос  $3 \text{ H}^+$  через мембрану происходит при переносе электронов от восстановленного кластера N2<sup>-</sup> к семихинону с формированием убихинола QH2 (реакция (13)), что отражает экспериментально наблюдаемое увеличение концентрации семихинона при увеличении  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  [27].

Путь переноса четвертого протона в комплексе I не очень понятен, хотя предполагается, что он также контролируется конформационными переходами в мембранном домене [26]. Скорость образования супероксида в комплексе I и редокс-состояния флавина в ходе окисления НАДН не зависит от мембранного потенциала в присутствии ингибитора хинон-связывающего сайта ротенона [28]. Это означает, что транслокация четвертого протона также сопряжена с переносом электронов от N2 к семихинону в убихинохинон-связывающем кармане. Поэтому мы предполагаем, что все 4 протона переносятся через митохондриальную мембрану одновременно в реакции (13). Реакции (8) и (14) на рис. 1А описывают связывание и диссоциацию Q<sub>n</sub> и QH2<sub>n</sub>, соответственно, в хинон-связывающем сайте, где индекс “n” относится к отрицательной стороне внутренней мембраны.

Кроме того, мы предполагаем, что семихинон анион Q<sup>•-</sup> (Рис. 1А) является вторым сайтом (местом) формирования супероксида в комплексе I (реакция (17)). Эта гипотеза подтверждается многочисленными хотя и косвенными экспериментальными доказательствами того, что семихинон Q<sup>•-</sup> может быть одним из сайтов генерации супероксида в комплексе I (См. обзор в [6]).

### Кинетическая модель комплекса III

Полностью восстановленный убинон QH<sub>2</sub>n генерируемый комплексами I (реакция (14)) или II (реакция (19)) переносится к положительной стороне внутренней мембраны (реакция (20)), и QH<sub>2</sub>r дважды окисляется на Q<sub>o</sub>-сайте комплекса III (реакции (22-26)). Затем окисленный Q<sub>r</sub> транспортируется от положительной к отрицательной стороне внутренней мембраны (реакция (21)), и Q<sub>n</sub> дважды восстанавливается на Q<sub>i</sub>-сайте комплекса III (реакции (32-36)), завершая Q-цикл Митчелла [29] после связывания и окисления второй QH<sub>2</sub>r молекулы на Q<sub>o</sub>-сайте.

Кинетическая схема окисления QH<sub>2</sub>r на Q<sub>o</sub>-сайте представлена на рис. 1В, Г основана главным образом на работе Крофтса и коллег [9]. Эти авторы предположили, что сначала образуется тройной комплекс из цитохрома bL, QH<sub>2</sub>r и окисленного железосерного белка Риске, ISPOx, (комплекс bL.QH<sub>2</sub>.ISPOx на рис. 1В) на Q<sub>o</sub> сайте (реакция (22)) с последующей реакцией раздвоения, где первый электрон от QH<sub>2</sub> передается в цепь с высоким потенциалом, состоящей из ISP (реакция (23)) и cyt c1 (реакция (27)). Второй электрон переносится от семихинона Q•- в низкопотенциальную цепь, состоящую из цитохромов bL (реакция (24)) и bH (реакция (25)). Перенос электронов от восстановленного железосерного Риске протеина (обозначенного как ISPH на рис. 1В, Г) происходит за счет перемещения подвижного внешнего домена ISP (ISP-ED) между цитохромами b и c1 [30]. Состояния ISP, соответствующие различному положению ISP-ED обозначены на рис. 1 и 2 как различные комплексы ISPOx и ISPH, где ISPOx и ISPH это окисленное и восстановленное состояния ISP-ED. Таким образом, описанные в тексте конформационные изменения состояний ISPOx или ISPH подразумевают перемещение окисленной или восстановленной форм домена ISP-ED.

Крофтс и коллеги [9] предположили, что восстановленный ISPH движется из цитохром b-положения в c1-позицию (реакция (24)) перед тем как второй электрон переходит на цитохром bL (ранняя диссоциация ISPH). Однако другая гипотеза [30] предполагает, что конформационные переходы ISPH происходят только после переноса второго электрона от цитохрома bL на bH (поздняя диссоциация ISPH). Для сравнения, кинетическая схема комплекса III с поздней диссоциацией ISPH представлена на рис.2.

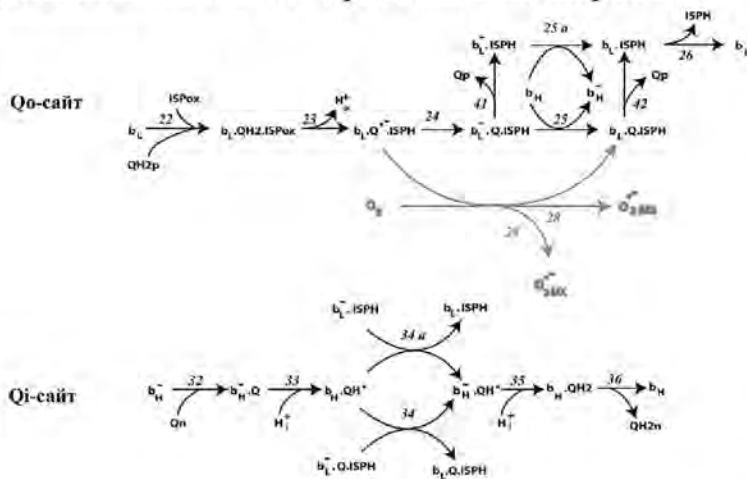


Рисунок 2. Кинетическая схема переноса электронов и образования супероксида в комплексе III с поздней диссоциацией восстановленного ISPH.

Все реакции такие же, как на рис. 1В, за исключением реакций (24) и (26).

Диссоциация восстановленного ISPH с Q<sub>o</sub>-сайта (реакция (26)), наступает позднее, чем на рис.

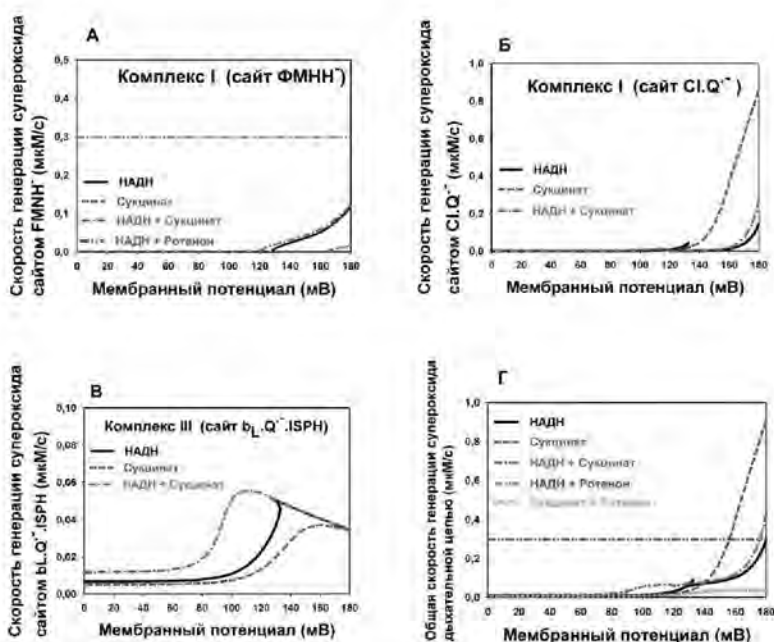
IV, на котором ISPH диссоциирует в реакции (24). Кроме того, в данной кинетической схеме связывание (диссоциация) окисленного убихинона с Qo-сайтом может происходить, когда цитохром bL находится в восстановленном состоянии (реакция (41)). Все реакции такие же, как на рис. IV, за исключением реакций (25), (25A), (26), (34a), (41) и (42).

Кроме того, мы рассмотрим гипотезу Друза и Брандта [11], что окисленный убихинон Q может покидать Qo-сайт до того, как происходит перенос электрона от цитохрома bL на bII (реакция (41) в модифицированной кинетической схеме, представленная на рис. 2). Эта разветвленная кинетическая схема учитывает последовательную диссоциацию Q и ISPH с Qo-сайта и отличается от кинетической схемы, представленной на рис. IV дополнительными реакциями (41), (42), (25A) и (34a). Мы проанализируем все три гипотезы для того, чтобы выявить, которая из них может более эффективно объяснить имеющиеся экспериментальные данные о производстве АФК. На основе прямых экспериментальных наблюдений [31] общепризнано, что нестабильный семихинон Qo-сайта (комплексе bL, Q•-, ISPH) является местом формирования супероксида в комплексе III. Этот супероксид может освобождаться как в митохондриальной матрике, так и в межмембранное пространство (ММII) митохондрий (реакции (28) и (29)) [32]. Механизм разделения потоков супероксида в эти компартменты на Qo-сайте остается неясным. Для простоты мы предположили, что константы скорости выхода супероксида в ММII и матрике одинаковы.

#### **ΔΨ и ΔpH зависимость скорости образования АФК с различными субстратами дыхательной цепи**

*Зависимость от ΔΨ.* Экспериментальные наблюдения показывают, что скорость генерации АФК комплексами I и III зависит от дыхательных субстратов, которые служат в качестве топлива для комплексов I и III (см. обзор [6]). Как правило, скорость производства АФК низкая, когда только НАДН-связанные субстраты доступны, но она может значительно увеличиваться в присутствии ротенона, ингибитора дыхания на уровне комплекса I. Гораздо более высокая скорость производства АФК наблюдается в присутствии только сукцината, за счет обратного переноса электронов, которая уменьшается в присутствии ротенона. Сочетание сукцината и НАДН-связанных субстратов приводит к увеличению скорости образования АФК по сравнению с только НАДН, но снижению продукции АФК по сравнению только с сукцинатом. В общем, скорость образования АФК в различных условиях изменяется следующим образом: (сукцинат + ротенон) < НАДН < НАДН + ротенон < НАДН + сукцинат < сукцинат < сукцинат - Антимцин А. Тем не менее, некоторые экспериментальные наблюдения показывают, что эти отношения могут изменяться. Например, в митохондриях мозга крысы производство АФК в присутствии только сукцината меньше, чем с НАДН + ротенон [33], в субмитохондриальных частицах сердца быка, скорость образования АФК в присутствии только сукцината и НАДН + сукцината меньше, чем в присутствии НАДН + ротенон [34]. Одной из причин этих различий может быть очень высокая чувствительности скорости образования АФК к изменениям мембранного потенциала ΔΨ, наблюдаемая в экспериментах [35-37]. Наши

результаты численного моделирования подтверждают высокую  $\Delta\psi$  чувствительность скорости производства АФК и предсказывают, что отношения, упомянутые выше при использовании различных субстратов дыхания, могут меняться в связи с изменением  $\Delta\psi$ . На рис. 3 представлены результаты вычисленных из модели зависимостей от  $\Delta\psi$  скорости образования АФК (супероксида) во всей дыхательной цепи (фиг.3Г), а также на разных сайтах комплексов I (Рис.3А, Б) и III (Рис.3В). Эти теоретические результаты совпадают с недавно опубликованными результатами моделирования для сердечных митохондрий [16] и экспериментальными данными по  $\Delta\psi$  зависимости скорости образования АФК в изолированных митохондриях при окислении только сукцината [37] и НАДН-связанных субстратов [7, 35, 36] и изолированными комплексами III (цит. bc1 комплекс), встроенными в фосфолипидные везикулы [36].



**Рисунок 3.** Смоделированные на компьютере стационарные скорости производства супероксида в ЭТЦ при изменении мембранного потенциала в присутствии различных субстратов дыхания. (А-В) Скорость генерации супероксида на разных сайтах комплексов I и III: (А) восстановленный флавин моноклеотид комплекса I (сайт ФМНН); (Б) семихинон комплекса I (сайт CI.Q<sup>-</sup>); (В) нестабильный семихинон комплекса III (сайт bL.Q<sup>-</sup>.ISPH). (Г) общая скорость генерации супероксида обоими комплексами I и III. Различные кривые соответствуют различным дыхательным субстратам ± ротенон: черная сплошная кривая – только НАДН; пунктирная синяя кривая – только сукцинат; красная

черточка-точка – НАДН + сукцинат; темно-зеленая тире-точка-точка кривая – НАДН + ротенон; голубая пунктирная кривая – сукцинат + ротенон.

Например, смоделированные на компьютере зависимости общей скорости генерации супероксида от мембранного потенциала при окислении только НАДН, представленные на рис.3Г очень близко качественно и количественно совпадают с экспериментально наблюдаемыми зависимостями скорости производства  $H_2O_2$  от  $\Delta\psi$  при окислении глутамата + малата или  $\alpha$ -кетоглутарата в изолированных митохондриях мозга (Рис. 1 в [35]).

Следует отметить, что для того, чтобы сравнивать смоделированные на компьютере скорости дыхания и АФК продукции, представленные в данной статье в мкМ/с, с экспериментально наблюдаемыми скоростями, выраженными в пмоль/мин/мг белка, необходимо смоделированные скорости умножить на коэффициент 220 [18], т. е. 1 мкМ/с = 220 пмоль/мин/ мг митохондриального белка. Экспериментально наблюдаемые приблизительные значения  $95 \pm 5$  и  $40 \pm 5$  пмоль/мин / мг прот. при  $\Delta\psi$  равной 180 и 160 мВ, соответственно, в присутствии глутамата + малата (Рис.1 в [55]) близки к модельным значениям, так как 0,4 и 0,15 мкМ/с соответствуют 88 и 33 пмоль/мин / мг прот. при  $\Delta\psi$



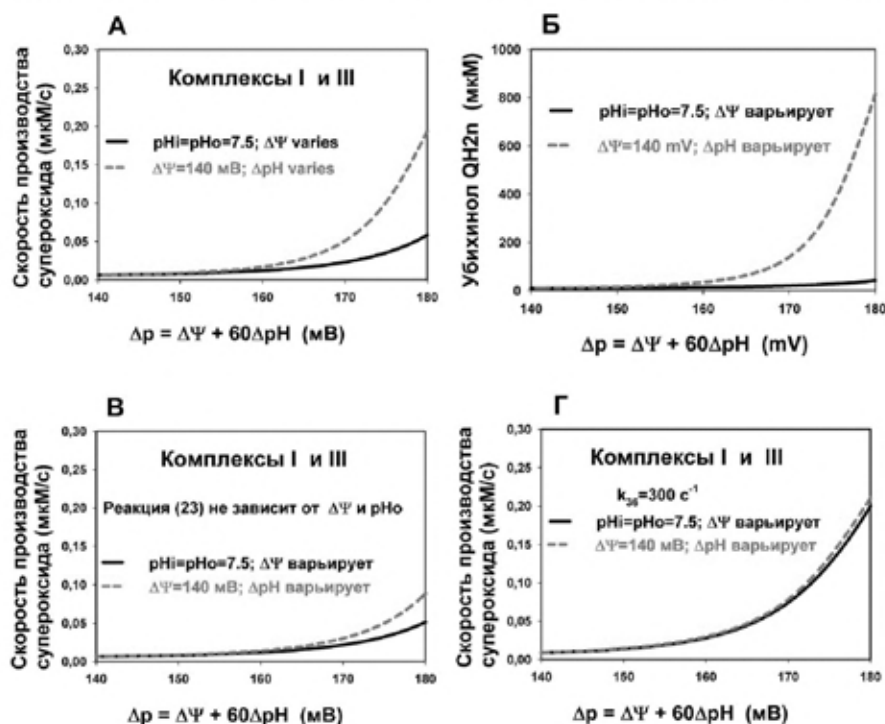
равном 180 и 160 мВ в НАДН-поддерживаемом производстве супероксида на рис. 3Г.

Кроме того, рис. 3А и 3Г показывают, что скорость производства АФК при окислении НАДН становится независимой от АФ в присутствии ротенона, что полностью согласуется с экспериментальными наблюдениями [28]. Этот результат отражает тот факт, что АФ зависимая реакция (13) переноса электрона и протонов в комплексе I ингибируется ротеноном. При компьютерном моделировании для количественного объяснения экспериментальных данных мы были должны учитывать дополнительный сайт производства супероксида в комплексе I (кроме восстановленного флавин мононуклеотида, ФМНН<sup>-</sup>), а именно, семихинон-радикал (сайт С1.Q<sup>•-</sup> на рис.1А), который генерирует супероксид во время обратного переноса электронов при очень высоких значениях мембранного потенциала (Рис.3Б). В частности, это предположение позволило количественно объяснить экспериментальные данные по генерации АФК в митохондриях из скелетных мышц при окислении сукцината [7]. Исключение этого сайта из рассмотрения при генерации АФК в присутствии только сукцината привело бы к очень незначительной скорости производства АФК комплексом I, как представлено на рис.3А (только ФМНН<sup>-</sup> сайт участвует в образовании супероксида), что противоречит экспериментальным наблюдениям [7].

Абсолютные величины скорости продукции АФК митохондриями в различных экспериментальных исследованиях сильно варьируют в разных тканях и в одних и тех же тканях в различных условиях (обзор [6]). Это касается исследований АФК продукции при прямом и обратном переносе электронов, а также в присутствии и без различных ингибиторов ЭТЦ. Например, максимальные значения скорости образования АФК могут варьировать от 130 пмоль/мин/мг белка в митохондриях коры головного мозга человека до 2650 пмоль/мин/мг белка митохондрий из скелетных мышц крысы, когда только сукцинат был использован в качестве дыхательного субстрата и от 3 пмоль/мин/мг прот. в митохондриях печени крыс до 174 пмоль/мин/мг прот. в митохондриях из мозга крысы в присутствии сукцинат + ротенон (все данные взяты из табл. 1 обзора [6]). Поэтому главной целью данной работы было в первую очередь представить анализ возможных качественных особенностей производства АФК в различных кинетических моделях, представленных на рис. 1 и 2, а не количественное описание скорости образования АФК в отдельных конкретных экспериментальных условиях. Относительные изменения скорости производства АФК при различных условиях (разных дыхательных субстратов и ингибиторов и т. д.) в одних и тех же экспериментах было более важно для данного исследования. Тем не менее, значения кинетических параметров производства супероксида разными сайтами ЭТЦ в нашей модели были выбраны так, чтобы моделируемые на компьютере скорости генерации супероксида были близки к тем, которые наблюдаются в митохондриях печени [38,39].

*АрН зависимость.* Как отмечали Ламберт и Бранд [37] скорость производства АФК в митохондриальной ЭТЦ должна в равной степени зависеть от АрН и АФ. Однако их экспериментальные исследования неожиданно показали гораздо более сильную чувствительность скорости образования АФК

комплексом I к  $\Delta pH$ , чем к  $\Delta\psi$  в присутствии сукцината [37]. Важно отметить, что эта особенность наблюдается также в нашей расчетной модели (Рис.4А).



**Рисунок 4.** Компьютерное моделирование стационарной скорости образования супероксида и концентрации убихинола QH2p при различных значениях электрохимического градиента протонов (в мВ) в присутствии сукцината. (А) сплошные черные кривые изменения суммарной скорости образования супероксида комплексами I и III при различных значениях мембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) и фиксированном  $\Delta pH = 0$  ( $pHi = pHo = 7.5$ ). Красные штриховые кривые представляют общую скорость производства супероксида при изменении  $\Delta pH$  и фиксированном  $\Delta\psi = 140$  мВ. Изменения  $\Delta pH$  осуществлялись путем изменений  $pHo$  при постоянном  $pHi = 7.5$ . Все значения параметров в модели такие же, как и для рис.3, за исключением константы скорости выхода QH2 с Qi-сайта,  $k_{36} = 900\text{ s}^{-1}$ . (Б) Сплошные черные и красные штриховая кривые показывают концентрации убихинола QH2p при тех же условиях, что и на рис.А. (В) Моделирование скорости при тех же условиях, что и на рис.А, за исключением константы равновесия реакции (23) в которой исключена зависимость от  $\Delta\psi$  и  $\Delta pH$ . (Д) Скорость образования супероксида в модели при тех же условиях, что и на рис.А за исключением константы скорости  $k_{36}$ , которая была снижена с 900 до  $300\text{ s}^{-1}$ .

Численный анализ модели объясняет это явление тем, что торможение скорости переноса электронов в комплексе III гораздо сильнее при увеличении  $\Delta pH$ , чем в  $\Delta\psi$ , вследствие более сильного ингибирования скорость-лимитирующей стадии окисления QH2 в комплексе III (реакция (23)) в результате диссоциации  $H^+$  в межмембранное пространство в реакции (23). Это приводит к гораздо более медленной скорости окисления QH2 в комплексе III и большее увеличение концентрации QH2p с увеличением  $\Delta pH$ , чем  $\Delta\psi$  (Рис. 4Б). В результате избыток QH2p усиливает обратный перенос электронов в комплексе I и увеличивает скорость производства АФК в этом комплексе. Компьютерное моделирование показывает (Рис. 4В), что этот эффект был ослаблен, когда анализ проводился в предположении, что реакция (23) не зависит от  $\Delta pH$  и  $\Delta\psi$ . Однако, некоторые экспериментальные наблюдения [38] показывают отсутствие различий в  $\Delta pH$  и  $\Delta\psi$  чувствительности скорости генерации АФК. Наш компьютерный анализ объясняет эти экспериментальные данные взаимоотношением скоростей, лимитирующих реакции на Qo- и Qi-сайтах Q-цикла.

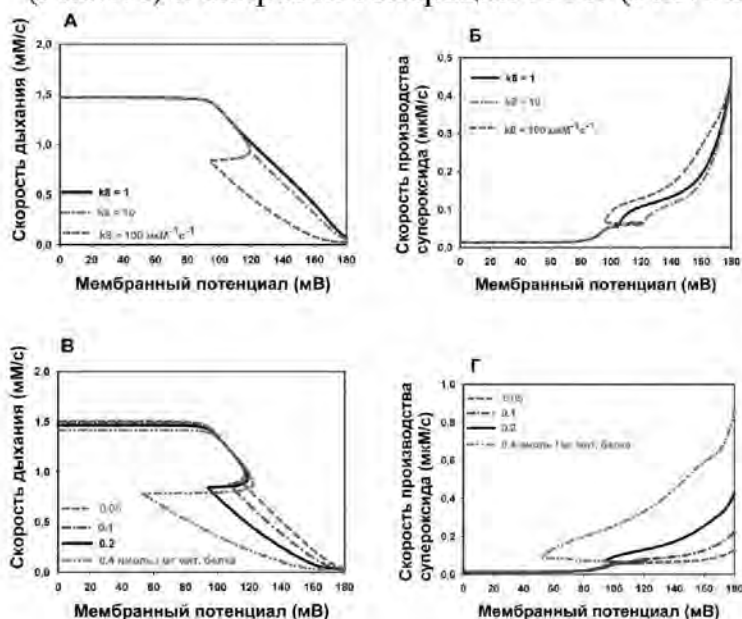
Другими словами, это зависит от того, какой из этих сайтов  $Q_i$  или  $Q_o$ , лимитирует скорость переноса электронов в Q-цикле. Уменьшение в 3 раза (от 900 до 300  $s^{-1}$ ) константы скорости диссоциации  $QH_2$  от  $Q_i$ -сайта (реакция (36)) делает эту реакцию лимитирующей в Q-цикле и приводит к равной чувствительности скорости образования АФК производства к  $\Delta pI$  и  $\Delta \Psi$  (Рис.4Г). Таким образом, путем частичного ингибирования сайтов  $Q_o$  или  $Q_i$  можно контролировать  $\Delta pH$  и  $\Delta \Psi$  чувствительность скорости производства АФК. Резюмируя, можно сказать, что компьютерный анализ математической модели количественно объясняет характерные особенности  $\Delta pH$  и  $\Delta \Psi$  зависимостей формирования АФК в электрон-транспортной цепи.

### **Гистерезис и бистабильность в кинетике переноса электронов и продукции АФК в дыхательной цепи**

*Гистерезис и бистабильность это внутренние свойства дыхательной цепи.* Селиванов и коллеги [12], анализируя аноксия-индуцированную продукцию АФК в дыхательной цепи, снабжаемой только сукцинатом как субстратом ЭТЦ, теоретически предсказали и экспериментально доказали существование двух устойчивых режимов (бистабильность) работы комплекса III. Они подтвердили недавно [13] наличие бистабильности в работе дыхательной цепи также при окислении НАДН-связанных субстратов с помощью математической модели, называемой как «модель, основанная на определенных правилах» (“rule-based model”). Компьютерный анализ бистабильности в их модели [12,13] был сделан с помощью численного интегрирования уравнений модели. В настоящем исследовании, анализируя гистерезис и бистабильность в дыхательной цепи мы решаем напрямую системы алгебраических уравнений, соответствующих стационарным состояниям системы дифференциальных уравнений, входящих в состав «явной» компьютерной модели, разработанной нами ранее [18, 19] и анализируем широкий спектр стационарных решений в модели (“rule-based model” не позволяет провести такое исследование). Прежде всего, мы количественно анализировали механизм возникновения гистерезиса в стационарных характеристиках и условия наличия бистабильности в дыхательной цепи с помощью явной компьютерной модели сети переноса электронов.

Как мы уже упоминали выше, сравнение результатов по производству АФК в изолированных митохондриях различных тканей показывает очень высокую степень изменчивости скорости производства АФК [6]. Поэтому мы предполагаем, что некоторые константы скорости и концентрации белка в модели могут зависеть от условий эксперимента и тканей. Прежде всего, это относится к константам скорости связывания Q и  $QH_2$  с комплексами I и III. Анализ численного моделирования показал, что при модельных изменениях констант связывания Q и  $QH_2$  с комплексами I и III можно получить такие важные свойства, как бистабильность [12, 13] в кинетике переноса электронов и продукции АФК в дыхательной цепи при окислении различных субстратов. В частности, мы проанализировали гистерезис и бистабильность в работе дыхательной цепи при окислении только НАДН или НАДН + сукцинат. Рис. 5А, Б показывает, что смоделированное на компьютере увеличение константы скорости к8 ассоциации Q с комплексом I (реакция (8) на рис.1А) от 1 до 100

$\text{мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$  приводит к гистерезису в зависимости стационарной скорости дыхания (Рис. 5А) и скорости генерации АФК (Рис. 5Б) от мембранного потенциала.



**Рисунок 5.** Возникновение гистерезиса и бистабильности в зависимости стационарных характеристик дыхательной цепи от мембранного потенциала в математической модели, соответствующей кинетической схеме на рис.1. (А, Б) смоделированные на компьютере скорость дыхания (А) и общая скорость образования АФК в комплексах I и III (Б) при различных значениях константы скорости ( $k8$ ) связывания Q с комплексом I; черные сплошные кривые соответствуют  $k8=1 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ ; красные пунктирные черточка-точка кривые -  $k8=10 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ ; синяя пунктирная кривые -  $k8=100 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ . НАДН + сукцинат были смоделированы в качестве дыхательных субстратов. (В, Г) теоретические скорость дыхания (В) и общая скорость продукции

АФК комплексами I и III (Г) при изменении содержания комплекса I во внутренней мембране [CI] (измеряется в нмоль/мг мит. белка). Синяя штриховая кривая соответствует [CI] = 0.05; зеленая тире-точка кривая - [CI] = 0.1; черная сплошная линия - [CI] = 0.2; красная тире-точка-точка кривая - [CI]=0.4 нмоль/мг мит. белка.

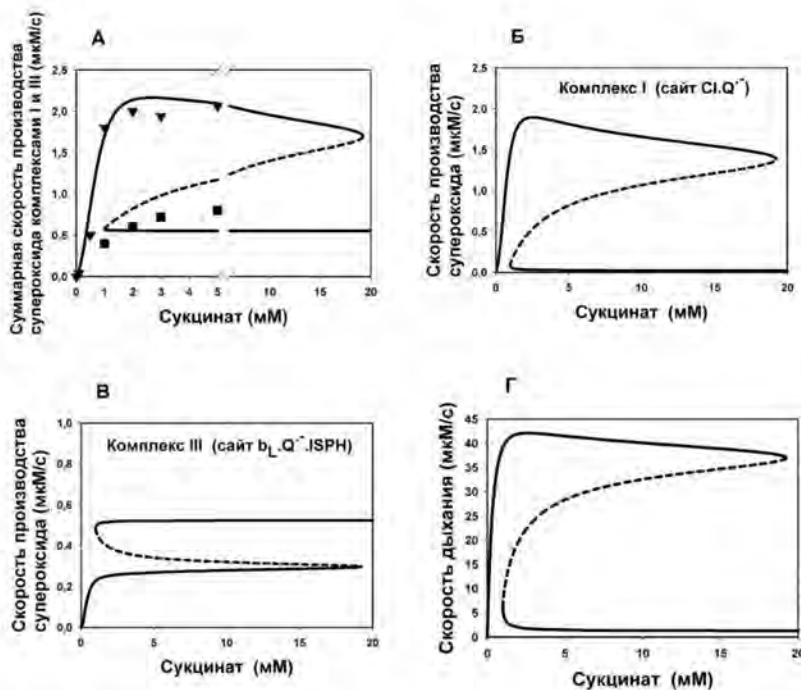
дефицитом Q при высокой концентрации QH2 за счет сохранения общего количества пула убихинонов во внутренней мембране. Согласно приведенному в [12] объяснению дефицит окисленного Q приводит к угнетению вторичного окисления (реокисления) цитохрома bH на Qi-сайте и, как следствие, угнетению скорости дыхания. По сути тот же аргумент дефицита Qp при высокой концентрации QH2p, приводящий к торможению потока электронов на Qi-сайте может объяснить ингибирование субстратом скорости квазистационарного потребления QH2p в нашей модели при окислении только НАДН и НАДН + сукцинат. Ингибирование субстратом биохимических реакций может привести к бистабильности в метаболических путях [40]. Однако это не достаточное условие возникновения бистабильности в работе дыхательной цепи. Устойчивое состояние в модели возникает, когда квазистационарные скорости потребления убихинола QH2p ( $v22$ ) и его генерации ( $v20$ ) равны. Поэтому, гистерезис и бистабильность, возникающие в работе дыхательной цепи, также зависят от кинетических свойств генерации QH2p, которые отличаются при окислении НАДН и сукцината, т. е. для генерации QH2 комплексами I и II (см. подробно [19]). Анализ результатов компьютерного моделирования показывает, что ассоциация Q с комплексом I должна быть достаточно быстрой для возникновения бистабильности в дыхательной цепи при окислении НАДН или НАДН + сукцинат (Рис. 5А, Б). Высокая скорость ассоциации Q с комплексом I приводит к очень крутому, резкому увеличению скорости генерации QH2 комплексом I ( $v14$ ) при увеличении Q и, соответственно, резкому падению  $v14$  при повышении QH2, что очень важно для существования трех альтернативных стационарных состояний и бистабильности в дыхательной цепи при окислении НАДН. Таким образом, мы обнаружили, что, в частности, константа скорости  $k8$  ассоциации Q с комплексом I очень важный параметр для возникновения

гистерезиса и бистабильности в дыхательной цепи при окислении НАДН и НАДФ – сукцината.

### **Внешние параметры контроля гистерезиса и бистабильности в дыхательной цепи**

Наиболее важные параметры, которые могут контролироваться в эксперименте и которые оказывают существенное влияние на существование гистерезиса и бистабильности в работе ЭТЦ и продукции АФК являются концентрации переносчиков электронов и, в частности, концентрации комплексов I и III, и убихинона во внутренней мембране митохондрий. На рис.5В, Г представлены смоделированные на компьютере стационарные скорости дыхания (Рис.5В) и суммарные скорости образования супероксида в комплексах I и III (Рис.5Г) при различных значениях концентрации комплекса I,  $[C1]$ , во внутренней мембране. Можно видеть, что 2-, 4-, 8-кратное увеличение  $[C1]$  приводит к сильному расширению области существования гистерезиса. Следует отметить, что практически к такому же сильному расширению гистерезиса приводит и 2-, 4-, 8-кратное падение в общей концентрации убихинона  $[Q]_{tot}$  в мембране (данные не показаны). Таким образом, реальный управляющий параметр гистерезиса в условиях окисления НАДФ + сукцинат является отношение  $[C1]/[Q]_{tot}$ . Гистерезис исчезает при низких значениях  $[C1]/[Q]_{tot}$  (около 0,01) и становится чрезвычайно широким при  $[C1]/[Q]_{tot} > 0.1$ .

Подтверждение результатов моделирования гистерезиса и бистабильности в ЭТЦ экспериментальными данными, имеющимися в литературе. Наши смоделированные на компьютере результаты по общей скорости генерации АФК во всей электронно-транспортной цепи совпадают с экспериментальными наблюдениями Селиванова и коллег [12] производства АФК в ЭТЦ при окислении только сукцината (Рис. 6). Теоретические зависимости суммарной скорости продукции АФК (Рис. 6А) и скорости генерации супероксида семихиноном в комплексе I (Рис. 6Б) и нестабильным семихиноном в комплексе III (Рис. 6В), а также скорости дыхания (Рис. 6Г) от концентрации сукцината имеют гистерезисную форму с одной неустойчивой ветвью (пунктирные кривые на рисунках) и двумя стабильными ветвями, которые показаны сплошными линиями. Стационарная скорость генерации супероксида восстановленным флавином в комплексе I не показана, потому что она очень мала по сравнению со скоростями продукции АФК на других сайтах.



**Рисунок 6.** Компьютерное моделирование и экспериментальное наблюдение бистабильной зависимости скорости дыхания и продукции АФК в ЭТЦ от концентрации сукцината. (А) Сравнение результатов численного моделирования (линии) и экспериментальных данных (символы) по общей скорости производства АФК в дыхательной цепи переноса электронов. Экспериментальные данные были взяты из [19]. (Б, В) Зависимость теоретической скорости генерации супероксида в семихиноами комплекса I (Б) и III (В) от концентрации сукцината. (Г) Зависимость теоретической скорости дыхания от концентрации

сукцината. Сплошные линии соответствуют устойчивым стационарным состояниям в расчетной модели, штриховые линии-неустойчивые стационарные состояния.

Экспериментальные данные по скорости производства АФК ( $H_2O_2$ ), показанные на рис.6А треугольниками и квадратами воспроизведены с рис.4В работы Селиванова и коллег [12] с некоторой модификацией. Оригинальные экспериментальные данные были представлены в [12] в качестве безразмерной скорости производства АФК. Для того, чтобы сопоставить эти данные с результатами моделирования они были умножены на коэффициент 2 мкМ/с. Разрыв на рис.6А был введен для более расширенного представления части теоретической кривой, которая соответствует экспериментальным данным.

Наиболее важная особенность теоретических результатов, представленных на рис.6 заключается в следующем. Скорость генерации супероксида семихиноном в комплексе I (рис.6Б) следует за скоростью дыхания (Рис.6Г), т. е. стабильная ветвь с высоким уровнем продукции АФК этим семихиноном соответствует высокой скорости дыхания и, следовательно, окисленному состоянию электрон-транспортной цепи. И наоборот, чем меньше скорость дыхания, т. е. более восстановленное состояние дыхательной цепи, тем меньше скорость производства супероксида семихиноном в комплексе I (рис.6Б). Это теоретическое предсказание, которое противоречит мнению, что более восстановленная электрон-транспортная цепь генерирует больше супероксида, можно объяснить высокой чувствительностью концентрации семихинона в комплексе I к окисленному убихинону, Q, который расположен выше этого семихинона, как показано в кинетической схеме на рис.1А. Более высокая скорость дыхания приводит к более высокой скорости окисления убихинола QH<sub>2</sub> в комплексе III и более высокой концентрации окисленного убихинона Q. Это, в свою очередь, приводит к более высокой скорости генерации семихинона в реакциях (8) и (9) на рис. 1А и, соответственно, к более высокой скорости генерации супероксида этим семихиноном в комплексе I. Наоборот, производство АФК нестабильным семихиноном в комплексе III (Рис.6В) гораздо более чувствительны к убихинолу, QH<sub>2</sub>p, расположенном выше по течению электронов от нестабильного семихинона (реакция (22) на рис.1В).

Это значит, что скорость производства АФК в комплексе III выше при более восстановленном состоянии ЦТЦ, т. е. высокая скорость генерации супероксида нестабильным семихиноном в комплексе III (Рис.6В) соответствует низкой скорости дыхания (Рис.6Г). При этом, максимальная скорость генерации АФК семихиноном в комплексе I (фиг.6Б) выше, чем нестабильным семихиноном в комплексе III (Рис.6Г) при окислении только сукцината. Таким образом, суммарная скорость производства АФК во всей электрон-транспортной цепи при окислении сукцината следует за скоростью дыхания как это делает скорость генерации АФК семихиноном комплекса I.

Другой важный вывод из результатов компьютерного моделирования состоит в следующем. Противоположная зависимость бистабильных переключений в продукции АФК семихинонами комплексов I и III от скорости дыхания дает возможность контролировать бистабильные переключения в производстве АФК в умеренных физиологических пределах в течение бистабильных переключений в скорости дыхания. Действительно, бистабильное переключение из стационарного состояния с высокой на низкую скорости дыхания приводит к переходу в производстве АФК от комплекса I к комплексу III. Это позволяет предотвратить цепь переноса электронов от избыточной генерации АФК и, в другой стороны, сохранить объем производства АФК на уровне, достаточном для физиологических потребностей.

#### **Влияние ингибирования различных сегментов дыхательной цепи на скорость производства АФК**

*Ингибирование комплекса I.* Способность ротенона увеличивать продукцию АФК комплексом I за счет ингибирования связывания Q с комплексом I довольно хорошо изучено экспериментально (см. обзор [6]). Наши результаты компьютерного моделирования по стимулированию производства АФК в присутствии ротенона (Рис.3А, Г) количественно совпадают как с опубликованными экспериментальными наблюдениями, которые показывают, 3-10-кратное увеличение генерации АФК ротеноном при окислении НАДН-связанных дыхательных субстратов [6], так и с результатами компьютерного моделирования для сердечных митохондрий [16]. Такая высокая стимуляция продукции АФК ротеноном наблюдается в нашей модели в диапазоне изменений мембранного потенциала ниже примерно 160 мВ при окислении НАДН и НАДН+сукцинат (Рис.3А, Г). Причину сильного увеличения производства АФК в присутствии ротенона легко понять, если учесть, что при ингибировании Q-связывающего сайта комплекса I ингибируется перенос электронов от НАДН на убихинон (скорости реакций (8-9) и (13-14) равны 0) и в этом случае электроны от НАДН через восстановленный флаavin моноклеотид ФМНН<sup>-</sup> переходят на кислород с образованием супероксида [5].

В дальнейшем анализе влияние различных ингибиторов комплексов III и IV на скорость производства АФК было смоделировано для того, чтобы дискриминировать различные модели, соответствующие кинетическим схемам с различными механизмами окисления QH<sub>2</sub> на Qo-сайте, представленных на рис. 1 и 2 с ранней и поздней ISPН диссоциацией и учитывающими связывание окисленного хинона восстановленным цитохромом bL.

*Ингибирование Q<sub>i</sub>-сайта комплекса III.* Антимидин А (АА) является наиболее широко используемым ингибитором Q<sub>i</sub>-сайта в комплексе III при экспериментальных [41] и теоретических [16] исследованиях генерации АФК в дыхательной цепи из-за его способности усиливать продукцию АФК. АА, связываясь с Q<sub>i</sub>-сайтом вблизи цитохрома b<sub>L</sub>, ингибирует перенос электронов от цитохрома b<sub>H</sub> к убихинону на Q<sub>i</sub>-сайте. Однако точный механизм этого угнетения не понятен, потому что широко принятая гипотеза о конкуренции между АА и Q при связывании с Q<sub>i</sub>-сайтом противоречит ряду экспериментальных наблюдений [42]. Для того, чтобы моделировать ингибирующее влияние АА на Q<sub>i</sub>-сайт мы применили минимальную гипотезу о том, что АА полностью подавляет скорость переноса электронов от цитохрома b<sub>L</sub> на b<sub>H</sub> на Q<sub>i</sub>-сайте (реакция (34) на рис.1С), т. е.  $v_{34} = 0$  в присутствии АА. Следует отметить, что  $v_{34}=0$  автоматически приводит к подавлению реакций переноса электрона от семихинона к цитохрому b<sub>L</sub> и от цитохрома b<sub>L</sub> к цитохрому b<sub>H</sub> на Q<sub>o</sub>-сайте, т. е.  $v_{24} = 0$  и  $v_{25} = 0$  в стационарном состоянии по следующим причинам. Во-первых, ингибирование реакции (34) приводит к ингибированию всех реакций переноса электронов на Q<sub>i</sub>-сайте в стационарном состоянии, т. е.  $v_{32} = v_{33} = v_{34} = v_{35} = v_{36} = 0$ . Во-вторых, ингибирование Q<sub>i</sub>-сайта приводит к подавлению реакций переноса электронов на Q<sub>o</sub>-сайте в стационарном состоянии из-за разрыва Q-цикла.

Наши результаты компьютерного моделирования предсказывают очень большое увеличение скорости производства АФК в присутствии АА при снижении мембранного потенциала (данные не показаны), которые согласуются с экспериментально наблюдаемой [41] сильной стимуляцией производства H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в присутствии АА в митохондриях сердца крысы и голубя при добавлении протонофоров и ионофоров. Численный анализ показывает, что увеличение производства АФК АА-ингибируемым комплексом III при деполяризации внутренней мембраны митохондрий происходит за счет ΔΨ-зависимого выхода первого H<sup>+</sup> от QH<sub>2</sub> в межмембранное пространство (ММП) в реакции (23) на Q<sub>o</sub>-сайте (Рис.1 и 2). Деполяризация облегчает высвобождение H<sup>+</sup> в ММП и сдвигает равновесие в этой реакции в сторону образования нестабильного семихинона в комплексе b<sub>L</sub>Q<sup>-</sup>ISP<sub>H</sub>. Эффективность ΔΨ-зависимого переноса H<sup>+</sup> зависит от того, как легко H<sup>+</sup> диффундирует через мембрану в ММП после своего выхода с Q<sub>o</sub>-сайта. Наши модельные результаты и экспериментальные наблюдения показывают, что производство АФК в АА-ингибируемых митохондриях могут стимулироваться в 10-15 раз за счет добавления протонофоров [41]. Следует отметить, что наши расчеты предсказывают снижение общего производства АФК в присутствии АА по сравнению с контролем при ΔΨ > 145 мВ при окислении сукцината, хотя увеличение скорости генерации АФК нестабильным семихиноном Q<sub>o</sub>-сайта комплекса III наблюдается во всем диапазоне изменения мембранного потенциала (данные не показаны). АА-индуцированное снижение общей скорости производства АФК при ΔΨ > 145 мВ объясняется сильным снижением скорости генерации АФК семихиноном комплекса I при ингибировании комплекса III (данные не показаны). Этот эффект будет рассмотрен ниже более подробно при ингибировании цитохром c оксидазы и Q<sub>o</sub>-сайта комплекса III. Кроме того, наши расчеты показывают увеличение общей скорости образования АФК во всем диапазоне ΔΨ при торможении Q<sub>i</sub>-сайта АА



при окислении НАДН<sup>+</sup>сукцинат. Этот эффект происходит из-за сильного повышения уровня образования АФК восстановленным флавиин мононуклеотидом комплекса I при ингибировании комплекса III и напоминает действие ротенона.

*Ингибирование Qo-сайта комплекса III.* Стигмателлин и миксотиазол хорошо известные ингибиторы Qo-сайта комплекса III, которые по-разному влияют на уровень производства АФК [35, 43-45]. Кристаллографические исследования комплекса III [46] показывают, что эти ингибиторы занимают убихинол связывающий карман Qo-сайта, таким образом, они могут конкурировать с убихинолом за связывание к Qo-сайту [9]. С другой стороны, стигмателлин и миксотиазол связываются с разными доменами убихинол связывающего кармана (см. обзоры [9, 30, 47]). Стигмателлин связывается с дистальным доменом у 2Fe2S кластера ISP белка, так что он фиксирует внешний домен в цитохром b положении, в то время как миксотиазол занимает проксимальный домен, близкий к bL гему, и не влияет на перемещения ISP-ED домена [48].

Несмотря на достигнутые успехи в понимании структурно-функциональных взаимосвязей в комплексе III, отсутствует консенсус по конкретным стадиям окисления QH<sub>2</sub> на Qo-сайте, которые ингибируются стигмателлином и миксотиазолом. Различные эффекты стигмателлина и миксотиазола на продукцию АФК комплексом III могут помочь прояснить эту ситуацию. Экспериментальные наблюдения показывают [43], что изолированные bc<sub>1</sub> комплексы (комплексы III) генерируют супероксид в присутствии миксотиазола, а стигмателлин полностью подавляет продукцию АФК комплексом bc<sub>1</sub>. Кроме того, показано, что миксотиазол стимулирует продукцию АФК в митохондриях, хотя меньше, чем AA [43]. В целях уточнения основных стадий переноса электронов в комплексе III в присутствии миксотиазола или стигмателлина, мы смоделировали скорость продукции АФК в дыхательной цепи, используя ответ на имитацию ингибирования первого и второго переноса электронов в Qo-сайте. Мы предположили, что скорость реакций (23) и (24) равна 0 в присутствии, соответственно, стигмателлина и миксотиазола.

*Ингибирование переноса первого электрона в Qo-сайте комплекса III ( $v_{23} = 0$ ).* Результаты моделирования показывают, что ингибирование переноса первого электрона ( $v_{23} = 0$ ) в присутствии стигмателлина приводит к значительному снижению общей скорости производства АФК благодаря сильному ингибированию генерации супероксид аниона семихиноном комплекса I и полному выключению образования супероксида нестабильным семихиноном Qo сайта комплекса III. Значительное увеличение скорости формирования супероксида восстановленным флавиин мононуклеотидом комплекса I когда  $v_{23}=0$  не может компенсировать общее снижение скорости производства АФК всей дыхательной цепью. Эти результаты компьютерного моделирования согласуются с экспериментально наблюдаемыми эффектами стигмателлина на уровень производства АФК в цитохром bc<sub>1</sub> комплексах, выделенных из сердца быка и дрожжей [35, 44, 45].

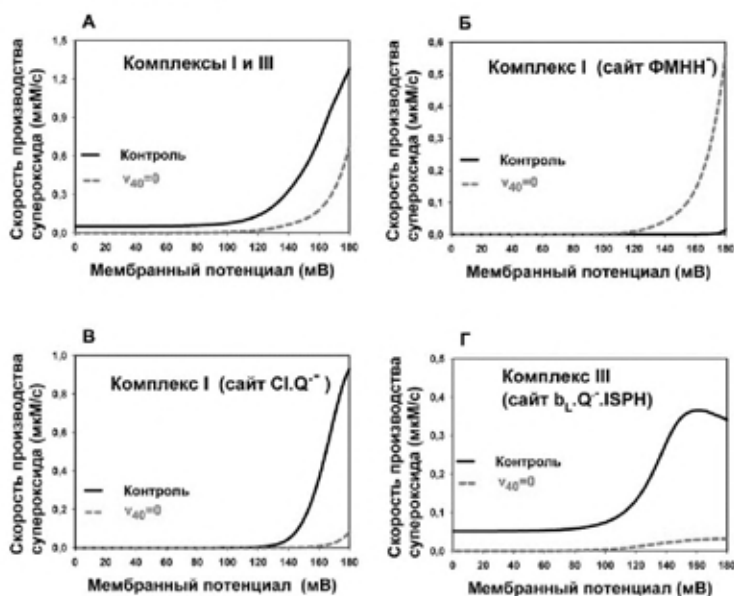
*Ингибирование переноса второго электрона в Qo-сайте комплекса III ( $v_{24} = 0$ ).* Результаты компьютерного моделирования скорости продукции

АФК при ингибировании переноса второго электрона в сайте Q<sub>o</sub> ( $v_{24}=0$ ) в присутствии миксотиазола показывают, что скорость производства АФК идентична скорости, полученной в условиях, моделирующих наличие АА ( $v_{34}=0$ ). Общий уровень производства АФК в этих условиях очень высока (гораздо выше по сравнению с контролем в отсутствие ингибиторов) во всем диапазоне изменения мембранного потенциала ниже  $\Delta\Psi$  примерно 145 мВ (данные не показаны). Этот высокий общий уровень производства АФК связан с очень сильным увеличением скорости формирования супероксида нестабильным семихиноном комплекса III. Снижение общей скорости продукции АФК по сравнению с контролем при  $\Delta\Psi > 145$  мВ (данные не показаны) возникает из-за сильного снижения скорости формирования супероксида семихиноном комплекса I. Эти смоделированные на компьютере результаты согласуются с экспериментальными наблюдениями, в которых миксотиазол стимулирует выработку АФК в митохондриях мозга [43] и печени [44], хотя и в меньшей степени, чем АА.

Следует отметить, что общее производство АФК возрастает во всем диапазоне  $\Delta\Psi$  при ингибировании переноса второго электрона в Q<sub>o</sub> сайте при окислении только НАДН или НАДН + сукцинат (данные не показаны).

*Ингибирование цитохром c оксидазы ( $v_{40}=0$ ).* На основе экспериментальных наблюдений повреждения клеток, вызванного окислительным стрессом при ишемии и реперфузии, которые сопровождаются уменьшением активности цитохром c оксидазы, некоторые авторы [49, 50] предположили, что ингибирование цитохром c оксидазы может способствовать продукции АФК в дыхательной цепи. Однако, прямое экспериментальное измерение образования АФК в интактных митохондриях сердца крысы и соответствующих субмитохондриальных частиц (СМЧ) [50] показали, что увеличение продукции АФК при ингибировании цитохром c оксидазы в присутствии азида наблюдался только в СМЧ при окислении НАДН.

Для того, чтобы понять какие изменения в скорости образования АФК возникают в различных участках дыхательной цепи при ингибировании цитохром c оксидазы, мы использовали компьютерное моделирование, имитирующее ингибирование цитохромc оксидазы, предположив, что скорость  $v_{40}=0$  (Рис. 1Г).



**Рисунок 7.** Компьютерная имитация эффекта ингибирования цитохром c оксидазы на скорость производства АФК при окислении сукцината. (А-Г) Смоделированные на компьютере скорости образования АФК на различных сайтах ЭТЦ при ингибировании цитохром c оксидазы ( $v_{40}=0$ ). Только сукцинат моделируется в качестве субстрата дыхания. (А) Общая скорость генерации АФК обоими комплексами I и III. (Б-Г) Скорости образования супероксида на разных сайтах комплексов I и III: (Б) ФМНН-сайт комплекса I; (В) Семихинон комплекса I (комплекс CI.Q<sup>-</sup>); (Г) нестабильный семихинон в комплекса

III (комплекс bL-Q<sup>-</sup>-ISPН). Черные сплошные кривые соответствуют смоделированным на компьютере скоростям производства АФК в отсутствие ингибиторов, а красные пунктирные кривые — это скорости производства супероксида в модели при скорости  $v_{40}$ , принятой равной 0 для имитации эффекта ингибирования цитохром *c* оксидазы. Только сукцинат был смоделирован как субстрат дыхательной цепи ( $V_{\max 19} = 4270$  мкм/с;  $k_{15} = 0$ ).

Результаты компьютерного моделирования скорости производства АФК при полном ингибировании цитохром *c* оксидазы ( $v_{40}=0$ ) с НАДН в качестве субстрата дыхательной цепи, показывает, что общая скорость производства супероксида комплексами I и III в модели существенно увеличивается при ингибировании по сравнению с контролем при низких значениях мембранного потенциала ( $\Delta\Psi < 120$  мВ) и практически нет никаких изменений в генерации АФК не происходит на  $\Delta\Psi > 120$  мВ (данные не показаны). Это повышение уровня в общем объеме производства АФК полностью приходится на очень сильное увеличение скорости образования АФК комплексом I в ФМНН<sup>-</sup> сайте во всем диапазоне изменения мембранного потенциала. В этом случае ингибирование цитохром *c* оксидазы приводит к идентичным изменениям в продукции АФК комплексом I в ФМНН<sup>-</sup> сайте как и ингибирование ротеноном (Рис. 3А, Б).

Интересно, что в отличие от окисления НАДН, использование сукцината в качестве субстрата в дыхательной цепи приводит к тому, что почти все скорости образования АФК уменьшаются в результате ингибирования цитохром *c* оксидазы ( $v_{40}=0$ ) по сравнению с контролем, в том числе, общая скорость генерации АФК всей дыхательной цепью (Рис.7А), скорость формирования супероксида семихиноном комплекса I (Рис.7В) и нестабильным семихиноном комплекса III (Рис.7Г). Только скорость генерации АФК восстановленным флаavin мононуклеотидом комплекса I существенно возрастает при  $v_{40}=0$  в присутствии сукцината (Рис.7Б). Однако этот рост не компенсирует снижение производства супероксида на двух других сайтах. Следует отметить, что снижение скорости производства АФК комплексом III при угнетении цитохром *c* оксидазы синильной кислотой при использовании только сукцината как субстрата дыхания наблюдались в недавно опубликованной работе [16].

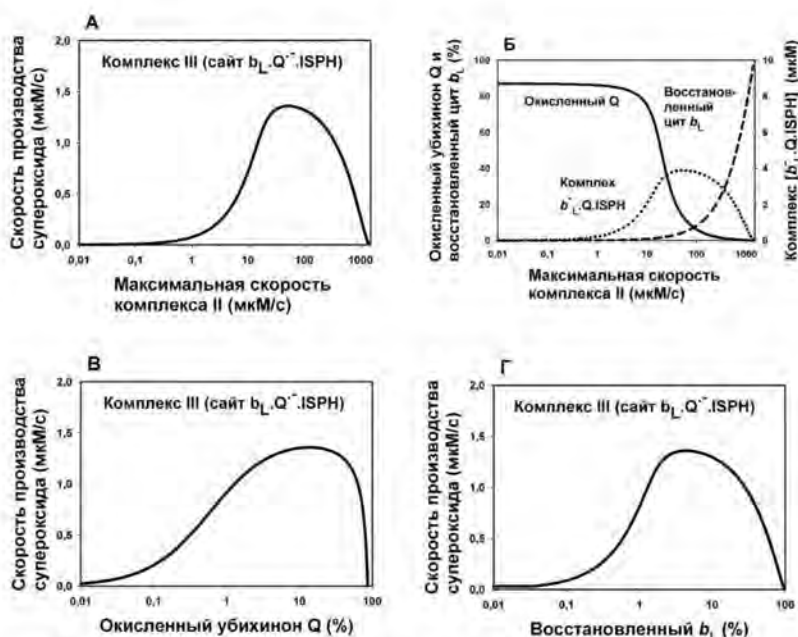
Сильное снижение скорости генерации АФК семихиноном комплекса I при угнетении цитохром *c* оксидазы при окислении только сукцината (Рис.7В) заслуживает особого внимания. Этот дополнительный сайт генерации АФК в комплексе I обычно связывают с избыточной продукцией АФК в процессе обратного переноса электронов (ОПЭ). Поэтому, на первый взгляд, ингибирование цитохром *c* оксидазы, которое как бы усиливает ОПЭ в комплексе I, должно привести к увеличению генерации АФК на этом сайте. Однако этого в модели не наблюдается по следующей причине. Концентрация семихинона в комплексе I удерживается в равновесии с Q и QH<sub>2</sub>. При угнетении цитохром *c* оксидазы при окислении сукцината концентрация окисленного убихинона Q приближается к нулю, поскольку нет дыхания и нет окисления QH<sub>2</sub> в комплексе III. Это приводит к сильному снижению концентрации семихинона в комплексе I и в этом случае практически весь супероксид в комплексе I генерируется восстановленным ФМНН<sup>-</sup> (Рис.7Б). Этот результат может объяснить недавние экспериментальные наблюдения [51], что в присутствии сукцината при угнетении цитохром *c* оксидазы цианистым калием формирование супероксида в комплексе I происходит только на сайте ФМНН<sup>-</sup>.

Но это вовсе не значит, что семихинон комплекса I не участвует в формировании супероксида вообще, как утверждают авторы [51], просто, как показывает наше исследование, его концентрация исчезающе мала при условии ингибирования цитохром *c* оксидазы.

### **Q-зависимость скорости генерации АФК антимицин-ингибированным комплексом III**

Наш предыдущий анализ математической модели был посвящен, главным образом, стационарным зависимостям скоростей дыхания и производства АФК в различных участках ЭТЦ от мембранного потенциала. Однако, последние экспериментальные наблюдения неожиданных немонотонных зависимостей производства АФК комплексом III в присутствии антимицина А (АА) от активности сукцинатдегидрогеназы (комплекс II) [10] и концентрации окисленного убихинона Q [11] предполагают, что важно обращать больше внимания на зависимость производства АФК от редокс состояния различных переносчиков электронов в ЭТЦ. Следуя Крофту и его коллегам [9], мы предположили в нашей текущей модели, что QH<sub>2</sub> и Q связываются с Q<sub>o</sub> сайтом только когда цитохром bL окислен, т. е. мы исключили из рассмотрения ветвь окисления QH<sub>2</sub> на Q<sub>o</sub>-сайте, в которой цитохром bL восстановлен. Это предположение частично поддерживается также экспериментальными результатами работы [10], опубликованной недавно. В ней показано, что окисление QH<sub>2</sub> ветвью дыхательной цепи, в которой QH<sub>2</sub> связывается с Q<sub>o</sub>-сайтом при восстановленном цитохроме bL должно происходить с очень медленной скоростью для того чтобы объяснить их экспериментальные данные [10]. Например, связывание Q с Q<sub>o</sub>-сайтом при восстановленном цитохроме bL должно быть принято во внимание для того, чтобы объяснить некоторые экспериментальные данные по производству АФК в АА-ингибированном комплексе III, особенно, немонотонные зависимости генерации АФК от концентрации субстратов дыхания и окисленного убихинона Q. В предыдущих экспериментальных работах [10, 11] было показано, что скорость производства АФК АА-ингибированным комплексом III увеличивалась в присутствии малоната, конкурентного ингибитора сукцинатдегидрогеназы при высокой концентрации сукцината. Кроме того, отмечалась немонотонная зависимость продукции АФК АА-ингибированным комплексом III от концентрации различных субстратов для дыхательных комплексов I и III, и редокс состояния цитохрома bL [10] и убихинона Q [11]. Первоначальный рост в скорости производства АФК АА-ингибированным комплексом III при увеличении концентрации различных субстратов дыхания и, соответственно, убихинола QH<sub>2</sub> интуитивно можно понять, потому что добавка дыхательных субстратов обеспечивает окислительно-восстановительные центры комплекса III, в том числе АФК производящий нестабильный семихинон Q<sub>o</sub>-сайта, электронами и концентрация этого нестабильного семихинона должна увеличиваться с увеличением концентрации субстратов дыхания. Однако дальнейшее неожиданное снижение скорости производства АФК при высокой концентрации субстратов дыхания, т. е. при высоком отношении QH<sub>2</sub>/Q, это сложно объяснить в рамках общепринятой концепции, что нестабильный семихинон формируется только во время прямого переноса электронов в комплексе III, то есть в течение окисления убихинола. Поэтому, чтобы учесть снижение скорости производства

АФК АА-ингибированным комплексом III при увеличении отношения QH<sub>2</sub>/Q Друз и Брандт [11] предположили, что окисленный убихинон поддерживает формирование семихинона и, соответственно, формирование супероксида на Qo-сайте благодаря переносу электронов от восстановленного цитохрома bL на Q в обратной реакции Qo-сайта. Это обратное направление реакции (24) представлено на рис. 1B. Это означает, что для того, чтобы усилить эту обратную реакцию переноса электрона от восстановленного цитохрома bL на окисленный Q и увеличить тем самым скорость продукции супероксида, свободный окисленный убихинон Q должен поддерживать формирование комплекса Q с восстановленным цитохромом bL, т. е. комплекса bL-Q на рис. 1B, как субстрата реакции (24), взятой в обратном направлении. В модели, представленной на рис. 1B, это невозможно по следующей причине. Связывание свободного окисленного убихинона Q с сайтом Qo происходит в обратном направлении реакции (26) на рис. 1B, то есть ниже реакции (25) переноса электронов от цитохрома bL к цитохрому bH. Это означает, что, увеличение концентрации свободного окисленного убихинона приведет к увеличению концентрации комплекса bL-Q, только тогда, когда перенос электрона с цитохрома bH к цитохрому bL в обратном направлении реакции (25) на рис. 1B будет происходить. Однако, мы предположили, что реакция (25) ингибируется в прямом и обратном направлениях в присутствии АА, то есть  $v_{25}=0$ . Это означает, что в модели, представленной на рис. 1B увеличение свободного окисленного убихинона Q не может привести к увеличению образования неустойчивого семихинона на Qo-сайте и продукции АФК этим сайтом в АА-ингибируемом комплексе III благодаря обратной реакции (24). Поэтому, мы расширили нашу модель и предположили, что свободный убихинон Q может связываться с Qo-сайтом даже когда цитохром bL находится в восстановленном состоянии (Рис. 2). То есть мы рассматриваем новую разветвленную модель, в которой убихинон Q может связаться/покинуть Qo-сайт до переноса электронов от цитохрома bL к цитохрому bH (обратимая реакция (41) представлена в модифицированной кинетической схеме на рис. 2). Разветвленная кинетическая схема Q-цикла, представленная на рис. 2, учитывает последовательное освобождение Q и ISP11 с Qo-сайта и отличается от кинетической схемы, представленной на рис. 1B, дополнительными реакциями (41), (42), (25A) и (34a). Некоторые стационарные характеристики математической модели, соответствующей разветвленной кинетической схеме на рис. 2 в предположения о том, что  $v_{34}=v_{34a}=0$  в присутствии АА представлены на рис. 8.



**Рисунок. 8.** Компьютерное моделирование стационарных скоростей производства супероксида антимицин-ингибированным комплексом III при угнетении сукцинатдегидрогеназы.

(А) Зависимость скорости производства супероксида от максимальной скорости ( $V_{max19}$ ) сукцинатдегидрогеназы. (Б) Зависимость фракции окисленного Q и восстановленного цитохрома  $bL$ , а также концентрации комплекса  $bL \cdot Q \cdot ISP$  от максимальной скорости сукцинатдегидрогеназы. (С) Зависимость скорости производства супероксида от окисленного Q. (Г) Зависимость скорости образования АФК от восстановленного цитохрома  $bL$ . Скорости  $v_{34}$  и  $v_{34a}$  были приняты

равными 0 для имитации эффекта АА. Все компьютерные расчеты проводились с моделью согласно кинетической схеме, представленной на рис.2 при окислении сукцината как субстрата дыхательной цепи.

Рис. 8А показывает, что модифицированная разветвленная модель качественно описывает экспериментально наблюдаемую немонотонную зависимость продукции АФК от активности сукцинатдегидрогеназы (комплекс II) [10], которая моделируется как изменения максимальной скорости комплекса II. Механизм возникновения такой колоколообразной зависимости можно понять из рис. 8В, который показывает связь между максимальной скоростью сукцинатдегидрогеназы (комплекса II) и фракциями окисленного убихинона Q и восстановленного цитохрома  $bL$ , и концентрацией комплекса  $bL \cdot Q \cdot ISP$ , который является субстратом для формирования нестабильного семихинона на Qo-сайте в обратном направлении реакции (24). Тройной комплекс  $bL \cdot Q \cdot ISP$  является продуктом трех одновременных событий, а именно, железо-серный белок Риске (ISP) и цитохром  $bL$  должны быть в восстановленном ( $ISP$  и  $bL$ ) и убихинон Q в окисленном состоянии. Рассмотрим только изменения фракций восстановленного цитохрома  $bL$  и окисленного убихинона Q, как пары донор-акцептор в этом комплексе, когда максимальная скорость комплекса II изменяется. Рис. 8Б показывает, что фракции восстановленного цитохрома  $bL$  и окисленного убихинона Q изменяются реципрокно при изменении максимальной скорости комплекса II. Эта особенность является основной причиной немонотонной колоколообразной зависимости производства супероксида от максимальной скорости комплекса II, представленной на рис. 8А. При малых значениях максимальной скорости комплекса II когда пулы Q и цитохрома  $bL$  находятся в основном в окисленном состоянии, концентрация комплекса  $bL \cdot Q \cdot ISP$  очень низкая из-за малого значения  $bL$  (рис. 8Б). По аналогии, концентрация комплекса  $bL \cdot Q \cdot ISP$  стремится к 0 при очень высоких значениях максимальной скорости комплекса II из-за очень малой фракции окисленного Q. Поэтому зависимость концентрации комплекса  $bL \cdot Q \cdot ISP$  от максимальной скорости комплекса II носит немонотонный характер с максимумом концентрации около 4 мкМ при значениях максимальной скорости

комплекса II около 60 мкМ/с, расположенной близко к точке пересечения кривых для фракций Q и bL<sup>-</sup> (Рис. 8Б). По аналогичной причине, из-за реципрокного изменения концентрации, окисленного цитохрома bL и восстановленного убихинола QH<sub>2</sub> при изменении максимальной скорости комплекса II, зависимость концентрации комплекса bL.QH<sub>2</sub>.ISPox, субстрата для формирования нестабильного семихинона в ходе окисления убихинола в прямом направлении реакции (23) (Рис. 2Б), также является немонотонной с пиковыми значениями около 240 мкМ (данные не показаны). Принимая во внимание, что концентрация нестабильного семихинона на Q<sub>o</sub>-сайте (комплекс bL.Q<sup>-</sup>.ISP<sub>H</sub>) удерживается в равновесии с обоими комплексами bL.QH<sub>2</sub>.ISPox и bL.Q<sup>-</sup>.ISP<sub>H</sub>, то нетрудно понять, что концентрация комплекса bL.Q<sup>-</sup>.ISP<sub>H</sub> и, соответственно, скорость формирования супероксида этим комплексом немонотонно зависят от активности сукцинатдегидрогеназы или максимальной скорости комплекса II, как показано на рис. 8А. Кроме того, компьютерное моделирование показало также колоколообразную зависимость продукции супероксида AA-ингибированным комплексом III от относительной доли окисленного убихинона Q (Рис. 8В) и восстановленного цитохрома bL (Рис. 8Г), в полном соответствии с экспериментальными данными [10,11].

### Заключение

В заключение необходимо отметить, что мы разработали и проанализировали математическую модель генерации супероксида в митохондриальной электрон-транспортной цепи на основе детальной кинетической схемы реакций переноса электронов в комплексах I и III (Рис. 1,2). Модель обладает достаточной гибкостью, чтобы учитывать многочисленные, нередко противоречивые экспериментальные данные по эффекту ΔΨ и ΔрН, а также влияние различных субстратов и ингибиторов на продукцию АФК, имеющиеся в литературе.

Таблица 1 суммирует результаты компьютерного моделирования скорости генерации АФК в митохондриях на трех сайтах дыхательной цепи при окислении различных субстратов и ингибировании различных стадий транспорта электронов в ЭТЦ.

Основные важные выводы нашего компьютерного анализа математической модели можно резюмировать следующим образом. Модель учитывает экспериментально наблюдаемую зависимость от ΔΨ скорости производства АФК с разными субстратами дыхательной цепи и поддерживает гипотезу о том, что семихинон комплекса I является дополнительным сайтом генерации супероксида в дыхательной цепи митохондрий. Наши результаты компьютерного моделирования подтверждают очень высокую ΔΨ чувствительность образования АФК, наблюдаемую экспериментально [7, 35-37] и теоретически [16] в митохондриях с использованием сукцината и НАДН-связанных субстратов дыхательной цепи и предсказывают также сильную ΔΨ-зависимость АФК производства при окислении НАДН + сукцинат (Рис. 3). Кроме того, компьютерное моделирование показывает (Рис. 3А, Б), что генерация АФК комплексом I при окислении НАДН становится независимой от ΔΨ в присутствии ротенона, что согласуется с экспериментальными наблюдениями [28], которые показывают, что разобидители окислительного

**Таблица 1.**

Скорости генерации супероксида разными сайтами ЭТЦ при варьировании субстратов окисления и ингибиторов ЭТЦ

Ингибитор	Ингиби- руемая реакция	НАДН			Сукцинат			НАДН + Сукцинат		
		FMN II	Cl <sub>2</sub> Q	b <sub>l</sub> Q ISP11	FMNII	Cl <sub>2</sub> Q	b <sub>l</sub> Q ISP11	FMNII	Cl <sub>2</sub> Q	b <sub>l</sub> Q ISP11
Нет		+++	•	++	≈0	++•	•	++•	+	+++
Ротенон	v <sub>8</sub> - 0 v <sub>14</sub> - 0	+++	---	---	---	---	0	+++	---	-
Ангимиц ин А	v <sub>14</sub> - 0	++	0	--	+++	---	+++	+++	---	+++
Миксо- тиазол	v <sub>24</sub> - 0	+++	0	--	+++	---	+++	+++	---	+++
Стигма- теллин	v <sub>23</sub> - 0	+++	0	---	+++	---	---	+++	---	---
Azide, KCN	v <sub>10</sub> - 0	+++	0	--	+++	---	--	+++	---	--
Удаление цитохром a c		+++	0	--	+++	---	+/-	+++	---	--
Деполь- ризация мембраны		--	--	+/-	--	---	+/-	--	--	+/-

\*Символы +, ++, +++ и -, --, --- указывают слабое, среднее, или сильное увеличение и уменьшение в скорости производства АФК, соответственно.

\*\*Символ +/- указывает переменный эффект, зависящий от мембранного потенциала.

фосфорилирования не влияют на скорость образования АФК при окислении НАДН-связанных дыхательных субстратов в присутствии ротенона. Сильное увеличение производства АФК при окислении различных дыхательных субстратов при высоких значениях ΔΨ объясняется в основном увеличением концентрации семихинон радикала в комплексе I (Рис. 3В), который имеет очень высокую ΔμH чувствительность, наблюдаемую экспериментально [27]. Рассмотрение семихинон радикала (комплекс Cl<sub>2</sub>Q<sup>-</sup> на рис. 1А) в качестве дополнительного сайта генерации АФК в комплексе I не поддерживается прямыми экспериментальными наблюдениями, хотя наши результаты компьютерного моделирования и многочисленных экспериментальных данные [6, 7] косвенно поддерживают эту гипотезу. Игнорирование этого сайта в нашей компьютерной модели предсказывает очень низкий уровень генерации АФК в присутствии только сукцината, т. е. в ходе обратного переноса электронов (ОПЭ), что противоречит экспериментальным наблюдениям [6, 7]. Однако, при некоторых особых условиях ОПЭ, например, при ингибировании комплекса III или/и цитохром c оксидазы, при окислении только сукцината происходит сильное уменьшение генерации АФК семихиноном комплекса I (Рис.7В). Поэтому, почти весь супероксид в комплексе I генерируется восстановленным флавин мононуклеотидом ФММН<sup>-</sup> (Рис.7А, Б). Эти результаты полностью согласуются с НАДН - и ОПЭ-индуцированной продукцией АФК, наблюдаемой экспериментально [51]. В этом контексте следует также указать на сильное ингибирование продукции АФК свободными жирными кислотами (СЖК) в присутствии только сукцината [52]. Авторы [52] отмечают, что СЖК имеют двойной эффект: во-первых, депольризуют внутреннюю мембрану митохондрий



за счет эффекта разобщения и, во-вторых, частично блокируют дыхательную цепь и предполагают, что СЖК снижают генерацию АФК в связи с их разобщающим эффектом. Это согласуется с результатами нашего моделирования, представленных на рис. 3В, что образование супероксида семихинон радикалом комплекса I в условиях СЖК сильно угнетается при деполяризации внутренней мембраны. При этом, следует отметить, что блокирование комплексов III и IV также сильно угнетает продукцию АФК семихиноном комплекса I (Рис. 7В) во время СЖК.

*Гистерезис и бистабильность в работе дыхательной цепи при окислении НАДН и субстрата имеют один и тот же кинетический механизм, а именно, кажущееся субстратное угнетение при окислении QH<sub>2</sub> на Q<sub>o</sub>-сайте комплекса III.* Хорошо известно, что гистерезис и бистабильность могут возникнуть при продуктивной активации или субстратном угнетении в биохимических реакциях или метаболических путях [40], а также при многосайтовом фосфорилировании-дефосфорилировании белков в сигнальных путях [53].

Механизм, с помощью которого бистабильность возникает в дыхательной цепи имеет иную природу и связан с особенностью Q-цикла Митчелла, в котором Q<sub>o</sub>- и Q<sub>i</sub>-сайты комплекса III конкурируют за субстрат убихинон (убихинол) в связи с законом сохранения пула убихинона во внутренней мембране, как было замечено ранее Селивановым и коллегами [12]. Увеличение убихинола QH<sub>2</sub>, субстрата Q<sub>o</sub>-сайта, приводит автоматически к уменьшению окисленного убихинона Q, субстрата для Q<sub>i</sub>-сайта, из-за сохранения общего пула убихинона. Как результат, восстановление Q в Q<sub>i</sub>-сайте тормозится при увеличении QH<sub>2</sub>, в результате чего происходит разрыв Q-цикла и ингибирование реакций на Q<sub>o</sub>-сайте в стационарном состоянии. В свою очередь, увеличение Q приводит к уменьшению QH<sub>2</sub> и торможение реакций на Q<sub>o</sub>-сайте, также приводящих к разрыву Q-цикла и ингибированию восстановления Q на Q<sub>i</sub>-сайте. Таким образом, зависимость реакций на Q<sub>o</sub>- и Q<sub>i</sub>- сайтах от субстратов QH<sub>2</sub> и Q, соответственно, имеет колоколообразную форму, аналогичную реакциям с субстратным угнетением, что приводит к гистерезису и бистабильности в их протекании [40]. Эти особенности являются основной причиной для Q-цикла и дыхательной цепи, чтобы функционировать в качестве триггера переключения между двумя устойчивыми состояниями с низким и высоким уровнем дыхания и производства АФК, а также восстановленного и окисленного состояния разных переносчиков электронов ЭЦ.

Следует отметить, что наши результаты компьютерного моделирования продукции АФК в дыхательной цепи при помощи модели с явным представлением путей переноса электронов в ЭЦ и результаты модели, основанной на некоторых правилах с применением принципа независимости в ЭЦ ("the rule-based model"), недавно разработанной Селивановым и коллегами [12, 13] практически совпадают. Прежде всего, это связано с общими кинетическими свойствами дыхательной цепи и, в частности, наличием бистабильности в работе комплекса III, а также возможностью значительного увеличения продукции АФК при гипоксии-реоксигенации, связанного с этой бистабильностью. Однако, некоторые особенности производства АФК в антимицин-ингибируемом комплексе III [10] могут быть проанализированы только в модели с явным представлением путей переноса электронов в ЭЦ.

потому что они могут быть объяснены лишь в предположении, что константы скорости окисления QH<sub>2</sub> на Qo-сайте работе комплекса III сильно зависят от редокс-состояния цитохрома b.

*Комментарий по изменению мембранного потенциала митохондрий.* Компьютерный анализ стационарных характеристик производства АФК в ЭТЦ в контроле и при ингибировании различных сегментов дыхательной цепи был проведен нами при фиксированных значениях мембранного потенциала. Мы не рассматривали каким образом происходят изменения мембранного потенциала при том или ином ингибировании дыхательной цепи. Изменения митохондриального мембранного потенциала в естественных условиях зависит от активности многочисленных электрогенных транспортных систем во внутренней митохондриальной мембране, таких как Ca<sup>2+</sup>- и K<sup>+</sup>-каналы, аденин нуклеотид транслоказа, электрогенные H<sup>+</sup> транспортные системы, в том числе, H<sup>+</sup> утечки и H<sup>+</sup> насосы FoF<sub>1</sub>-АТФазы и комплексов I, III и IV дыхательной цепи. Поэтому можно ожидать, что снижение мембранного потенциала происходит при ингибировании дыхательной цепи и H<sup>+</sup> - насосов, если ΔΨ не поддерживается за счет других реакций. Тем не менее, реальные изменения мембранного потенциала трудно оценить, потому что они зависят от активности многих электрогенных митохондриальных транспортных систем помимо электрон-транспортной цепи. Поэтому мы анализировали стационарные характеристики производства АФК в широком диапазоне ΔΨ для того, чтобы учитывать возможные изменения в ΔΨ при ингибировании дыхательной цепи и экстраполировать скорость производства АФК под различные условия при любых значениях ΔΨ.

*Проверяемые предсказания модели.* В целом, компьютерная модель, разработанная здесь, может быть использована чтобы сделать экспериментально проверяемые предсказания о том, как скорость образования АФК в различных участках дыхательной цепи зависит от различных условий. Наши результаты расчетов предсказывают, что образование супероксида в комплексе I при окислении сукцината происходит преимущественно при взаимодействии кислорода с семихиноном комплекса I, если нет ингибиторов дыхательной цепи (Рис. 3). Поэтому, ингибирование флавинового сайта в комплексе I вообще не должно влиять на продукцию АФК при окислении сукцината, при отсутствии каких-либо ингибиторов комплексов III и IV. Напротив, ингибиторы флавинового сайта должны сильно уменьшать производство АФК в присутствии ингибиторов комплексов III и IV (цитохромоксидазы). Скорость производства АФК семихиноном комплекса I может быть определена количественно с использованием ингибиторов обоих флавинов и Q-связывающих сайтов комплекса I. В соответствии с нашей моделью, формирование супероксида происходит только на семихинонах комплексов I и III в присутствии ингибиторов флавинового сайта (например, НАДН-ОН, АДФ-рибозы). Скорость генерации супероксида в комплексе III при окислении сукцината можно найти в присутствии ротенона, ингибитора комплекса I. Поэтому для того, чтобы найти скорость производства АФК который генерируется семихиноном комплекса I во время обратного переноса электронов скорость производства АФК в

присутствии ротенона должна быть вычтена из скорости производства АФК в присутствии ингибитора флавина комплекса I.

Модель также может быть использована для прогнозирования производства митохондриального АФК при изменении уровня экспрессии или активности отдельных компонентов электроно-транспортной цепи, например, вследствие сигнальных процессов, влияющих на дыхательные комплексы, или связанных со специфическими условиями различных болезней. Важно подчеркнуть, что в наших исследованиях мы фокусировали внимание на ОЦ-зависимой генерации супероксида. На самом деле, полная скорость производства АФК в интактных клетках и тканях сильно зависит от активности как других АФК-генерирующих систем, так и систем защиты от окислительного стресса, которые утилизируют АФК как в матриксе митохондрий, так и в других частях клетки. При детальном изучении баланса продукции митохондриального АФК и его биологических эффектов необходимо учитывать и вклад антиоксидантов в нетто производство АФК (см., например, [16]).

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение #14.Z50.31.0028).

#### Список литературы

1. Dröge W (2002). *Physiol Rev.* 82, 47-95
2. Schieber M, Chandel NS (2014). *Curr Biol.* 24, R453-462.
3. Vianello A, Casolo V, Petrucci E, Peresson C, Patni S, Bertolini A, Passanonti S, Braidot F, Zancani M (2012). *Biochim Biophys Acta.* 1817, 2072-2086
4. Boveris A, Chance B (1973). *Biochem J.* 134, 707-716.
5. Hirst J (2013). *Annu Rev Biochem.* 82, 551-575.
6. Hirst J, King MS, Pryde KR (2008). *Biochem Soc Trans.* 36, 976-980.
7. Lambert AJ, Brand MD (2004). *J Biol Chem.* 279, 39414-39420
8. Treberg JR, Quinlan CL, Brand MD (2011). *J Biol Chem.* 286, 27103-27110.
9. Crofts AR, Barquera B, Gennis RB, Kurus R, Guergova-Kuras M, Berry EA (1999). *Biochemistry.* 38, 15807-15826.
10. Quinlan CL, Gerencsér AA, Treberg JR, Brand MD (2011). *J Biol Chem.* 286, 31361-31372
11. Drose S, Brandt U (2008). *J Biol Chem.* 283, 21649-21654
12. Selivanov VA, Votyakova TV, Zeak JA, Trucco M, Roca J, Cascante M (2009). *PLoS Comput Biol.* 5, e1000619.
13. Selivanov VA, Votyakova TV, Pivtorako VN, Zeak J, Sukhomlin T, Trucco M, Roca J, Cascante M (2011). *PLoS Comput Biol.* 7, e1001115.
14. Demin OV, Kholodenko BN, Skulachev VP (1998). *Mol Cell Biochem.* 184, 21-33.
15. Orii Y, Miki T (1997). *J Biol Chem.* 272, 17594-17604.
16. Gauthier J-D, Greenstein JL, Cortassa S, O'Rourke B, Winslow RL (2013). *Biophys J.* 105, 1045-1056
17. Bazil JN, Vinnakota KC, Wu F, Beard DA (2013). *Biophys J.* 105, 343-355
18. Markevich NI, Hoek JB (2015). *Biochim Biophys Acta.* 1847, 656-679
19. Markevich NI, Hoek J (2014). *Math Biol Bioinformatics.* 9, 89-111.
20. Kussmann L, Hirst J (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 7607-7612.
21. Vinogradov AD (2008). *Biochim Biophys Acta.* 1777, 729-734.
22. Birrell JA, Yakovlev G, Hirst J (2009). *Biochemistry.* 48, 12005-12013.
23. Rausac S, Heiske M, Mazat JP (2012). *Biochim Biophys Acta.* 1817, 1958-1969.
24. Verkhovskaya ML, Belevich N, Euro L, Wikstrom M, Verkhovskiy MI (2008). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 3763-3767.
25. Rausac S, Arnarez C, Mazat JP (2010). *Biochim Biophys Acta.* 1797, 641-648.
26. Efremov RG, Burdakov R, Sazanov LA (2010). *Nature.* 465, 441-445.
27. Mignitsky S, Touloukianova L, Yano T, Sted VD, Hagerhall C, Grivennikova VG, Burbaev DS, Vinogradov AD, Ohnishi T (2002). *J Bioenerg Biomembr.* 34, 193-208.
28. Votyakova TV, Reynolds U (2001). *J Neurochem.* 79, 266-277.
29. Mitchell P (1975). *FEBS Lett.* 56, 1-6.
30. Yu CA, Cen X, Ma HW, Yin Y, Yu L, Esser L, Xia D (2008). *Biochim. Biophys. Acta.* 1777, 1038-1043.
31. Cape JL, Bowman MK, Krumer DM (2007). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 7887-7892.
32. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H (2004). *J Biol Chem.* 279, 49064-49073.
33. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004). *J Biol Chem.* 279, 4127-4135.

34. Grivennikova VG, Vinogradov AD (2006). *Biochim Biophys Acta*. 1757, 553-561.
35. Starkov AA, Fiskum G (2003). *J Neurochem*. 86, 1101-1107.
36. Rotenberg H, Covian R, Trumpower BL (2009). *J Biol Chem*. 284, 19203-19210.
37. Lambert AJ, Brand MD (2004). *Biochem J*. 382, 511-517.
38. Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoutet M, Leverve XM (2006). *J Bioenerg Biomembr*. 38, 33-42.
39. Hoffman DL, Brookes PS (2009). *J Biol Chem*. 284, 16236-16245.
40. Sel'kov EE (1975). *Eur J Biochem*. 59, 151-157.
41. Cadenas E, Boveris A (1980). *Biochem J*. 188, 31-37.
42. Tsai AL, Palmer G (1986). *Biochim Biophys Acta*. 852, 100-105.
43. Starkov AA, Fiskum G (2001). *Biochem Biophys Res Commun*. 281, 645-650.
44. Young TA, Cunningham CC, Bailey SM (2002). *Arch Biochem Biophys*. 405, 65-72.
45. Sun J, Trumpower BL (2003). *Arch Biochem Biophys*. 419, 198-206.
46. Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J (1997). *Science*. 277, 60-66.
47. Link TA, Haase U, Brandt U, von Jagow G (1993). *J Bioenerg Biomembr*. 25, 221-232.
48. Kim H, Xia D, Yu CA, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 8026-8033.
49. Dawson TL, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ (1993). *Am J Physiol*. 264, C961-967.
50. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003). *J Biol Chem*. 278, 36027-36031.
51. Pryde KR, Hirst J (2011). *J Biol Chem*. 286, 18056-18065.
52. Schonfeld P, Wojteczak I (2007). *Biochim Biophys Acta*. 1767, 1032-1040.
53. Markevich NI, Hoek JB, Kholodenko BN (2004). *J Cell Biol*. 164, 353-359.

## **Глава 8. ВЛИЯНИЕ УРИДИНА НА СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ NF-κB И ЭКСПРЕССИЮ HSP72 В ЛИМФОЦИТАХ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ, ПРИ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ, ВЫЗВАННОМ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ТОКСИНОМ**

Миронова Г.Д.<sup>1,2</sup>, Белослудцева Н.В.<sup>1,2</sup>, Хренов М.О.<sup>3</sup>, Галанов Е.Ю.<sup>2</sup>, Глушкова О.В.<sup>3</sup>, Парфенюк С.Б.<sup>3</sup>, Новоселова Т.В.<sup>3</sup>, Лунин С.М.<sup>3</sup>, Новоселова Ж.А.<sup>3</sup>, Лемастерс Дж.Дж.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

<sup>2</sup>Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия;

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия;

<sup>4</sup>Университет Северной Каролины, Чарльстон, США.

### **Аннотация**

В работе изучено влияние уридина на цитокиновый профиль в крови, экспрессию белка теплового шока HSP72 и активность сигнального пути NF-κB в клетках селезенки мышей линии Balb/c с острым воспалением, вызванном внутрибрюшинным введением липополисахарида (ЛПС) из грамотрицательных бактерий *E.coli*. Уридин вводился внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг веса животного за час до внутрибрюшинного введения липополисахарида. Показано, что предварительное введение мышам уридина уменьшало цитокиновый ответ (TNF-α, IFN-γ, ИЛ-1α, ИЛ-2, and ИЛ-6) животных на введение ЛПС. С помощью Вестерн блот анализа показано многократное возрастание продукции Hsp72 в клетках селезенки опытных животных, тогда как введение уридина в условиях острой интоксикации вызывало полную блокировку продукции этого белка. Обнаружено, что при введении ЛПС повышается уровень фосфорилированной формы NF-κB и активность киназы IKK, способной фосфорилировать свободные субъединицы ингибиторного белка IκB, а применение уридина снижало наблюдаемые эффекты. Мы предполагаем, что противовоспалительные эффекты могут быть вызваны либо самим уридином, либо или уридинфосфатами, которые, как мы обнаружили, образуются в клетках в течение 1 часа после обработки уридином. Таким образом, в работе впервые установлена противовоспалительная активность уридина при остром воспалении, вызванном обработкой эндотоксина *in vivo*. В работе обсуждается возможный механизм действия уридина и его производных, а также перспективы для разработки новых лекарственных средств на его основе, способных снять развитие бактериальной интоксикации.

### **Введение**

Развитие в организме воспаления, вызванного токсинами из грамотрицательных бактерий, характеризуется, как известно, повышением продукции провоспалительных цитокинов и их накоплением в крови человека и животных. Известно, что экспрессия ряда генов, контролирующей продукцию цитокинов, осуществляется при участии сигнального каскада NF-κB [1]. Установлено, что NF-κB сигнальный путь быстро и эффективно активируется H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [2], и активация каскада указывает на развитие окислительного стресса [3].

Окислительный стресс, как известно, связан с накоплением активных форм кислорода (АФК) в клетке в том случае, когда система, в которую входят ферменты-антиоксиданты и низкомолекулярные соединения, оказывается неспособной к их нейтрализации. Избыточные количества АФК могут повреждать ДНК, РНК, липиды, белки и клеточные мембраны. Эти повреждения ведут к старению организма, а также являются причиной многих болезней, таких как сепсис, рак, диабет, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания. Основным источником АФК являются митохондрии [4] и, хотя механизмы их вовлечения в развитие заболеваний, связанных с окислительным стрессом, до конца не выяснены, роль митохондрий в окислительном стрессе неоспорима.

Известно, что воспаление, индуцируемое эндотоксином (основным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий), также приводит к увеличению продукции АФК [5] и многие исследователи полагают, что именно увеличение АФК является причиной развития патологии при бактериальной интоксикации [6]. При сепсисе существует несколько источников АФК, включая дыхательную электронно-транспортную цепь митохондрий, окислительный взрыв нейтрофилов и активацию ксантиноксидазы.

При исследовании патогенеза воспаления большое внимание, как уже упоминалось выше, уделяется транскрипционному ядерному фактору NF- $\kappa$ B, который чувствителен к изменению окислительно-восстановительного баланса в клетке. Основная роль сигнального пути NF- $\kappa$ B заключается в регуляции экспрессии различного рода провоспалительных цитокинов и анти-апоптотических белков. Ключом к активации NF- $\kappa$ B каскада являются процессы, происходящие внутри клетки. Известен уже целый ряд ингибиторов воспаления, таких как IL-10, глюкокортикоиды, аспирин и другие, которые регулируют активность NF- $\kappa$ B [7].

Недавно нами было показано, что развитие окислительного стресса при моделировании инфаркта миокарда эффективно предупреждается уридином и УМФ [8]. Эти препараты снижают также скорость накопления АФК в митохондриях и регулируют функционирование в миокарде антиоксидантных ферментов [9].

Защитный эффект уридин-содержащих соединений на этой модели мы связываем с активацией митохондриального АТФ-зависимого  $K^+$  канала (митоK<sub>ATP</sub>), так как уридин и УМФ являются метаболитами предшественниками активатора данного канала – уридин-5'-дифосфата, а ингибиторы канала устраняют положительный эффект уридина и УМФ [8]. Известно, активация канала через ряд последовательных событий ведёт к снижению чрезмерного образования АФК, наблюдаемого при гипоксии.

В данной работе исследовали участие уридина в защите организма от окислительного стресса при воспалении, индуцированном липополисахаридом из грамотрицательных бактерий *E.coli*. Исследовали цитокиновый профиль в плазме периферической крови, а также экспрессию белка теплового шока 70, а именно, белка Hsp72 в лимфоцитах селезенки мышей. Кроме того, в работе оценивалась активность NF- $\kappa$ B сигнального каскада в лимфоцитах в ответ на введение ЛПС в отсутствие и присутствии уридина. Для понимания механизма действия уридина в работе было проверено, накапливаются ли уридиновые

фосфонуклеотиды в тканях животных, через 1 час после введения уридина, т.е. к тому времени, когда вводится эндотоксин.

### **Влияние уридина на концентрацию провоспалительных цитокинов в периферической крови мышей в условиях острого воспаления**

Работа была выполнена на модели острого токсического воспаления мышей. Для этого животным внутрибрюшинно был введен липополисахарид из грамотрицательных бактерий *E.coli*. (Sigma, США) в концентрации 2.5 мг/кг массы тела животного. Эта сублетальная доза ЛПС приводит к острому воспалению. Уридин вводился внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг веса животного за час до внутрибрюшинного введения липополисахарида. Измерение концентрации цитокинов в сыворотке крови проводили методом гетерогенного твердофазного иммуноферментного анализа.

В таблице 1 представлены результаты измерения концентрации цитокинов в крови мышей, получавших эндотоксин, а также в крови животных, которым вводили уридин за 1 час до введения ЛПС. Показано ожидаемое накопление почти всех измеряемых провоспалительных цитокинов в крови мышей, получивших эндотоксин.

Как видно из представленной таблицы, в условиях острого воспаления наблюдается двукратное увеличение уровня TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , а также не такое сильное, но достоверное повышение концентрации IL-1 $\alpha$ , IL-2 и IL-6.

**Таблица 1.** Влияние уридина на концентрации цитокинов в плазме мышей, обработанных эндотоксином (ЛПС).

Цитокины	Контроль	ЛПС	Уридин-ЛПС
TNF- $\alpha$	0.23 $\pm$ 0.03	*0.5 $\pm$ 0.06	§0.31 $\pm$ 0.03 (62)
IFN- $\gamma$	0.36 $\pm$ 0.04	*0.7 $\pm$ 0.08	§0.26 $\pm$ 0.03 (37)
IL-1 $\alpha$	1.0 $\pm$ 0.01	*1.7 $\pm$ 0.02	§0.68 $\pm$ 0.07 (40)
IL-2	1.43 $\pm$ 0.02	*2.4 $\pm$ 0.03	§1.5 $\pm$ 0.02 (62)
IL-6	3.5 $\pm$ 0.04	*8.1 $\pm$ 0.09	5.9 $\pm$ 0.07 (72)
IL-10	0.9 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.02	§0.8 $\pm$ 0.01 (53)

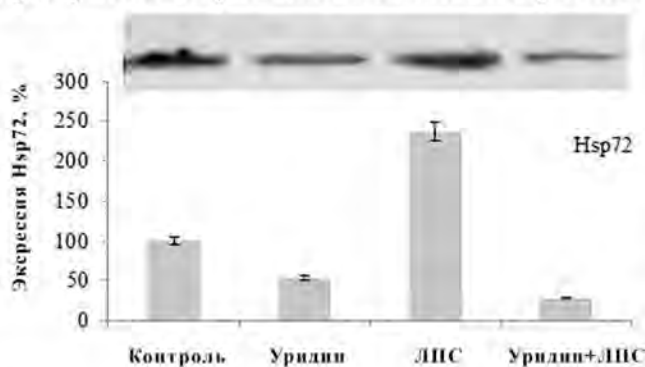
Данные представлены как среднее значение  $\pm$  ошибка средней и выражены в нг / мл. \*P<0.05, §P<0.05, по сравнению с контролем (n=6).

Концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 также имела тенденцию к увеличению, хотя изменения не были статистически достоверными. Предварительное введение мышам уридина уменьшало цитокиновый ответ животных на ЛПС, так как наблюдалось достоверное снижение концентрации всех исследованных цитокинов, за исключением IL-6.

### **Действие уридина на продукцию белка теплового шока Hsp72 в лимфоцитах селезенки мышей, получавших бактериальный эндотоксин**

Для того, чтобы оценить влияние уридина на состояние защитной системы клеток в условиях острого воспаления, измеряли продукцию лимфоцитами селезенки индуцированной формы белка теплового шока 70 (Hsp72) методом SDS-PAGE электрофореза и последующего иммуоблот анализа. Выделение лимфоцитов из селезенки мышей проводилось общепринятым методом. Известно, что Hsp72 обычно экспрессируется в условиях стрессовых воздействий для защиты внутриклеточных структурных белков. Проведенный

Вестерн блот анализ показал, что при введении сублетальной дозы ЛПС продукция Hsp72 значительно возрастала (приблизительно в 2,5 раза) (рис. 1).



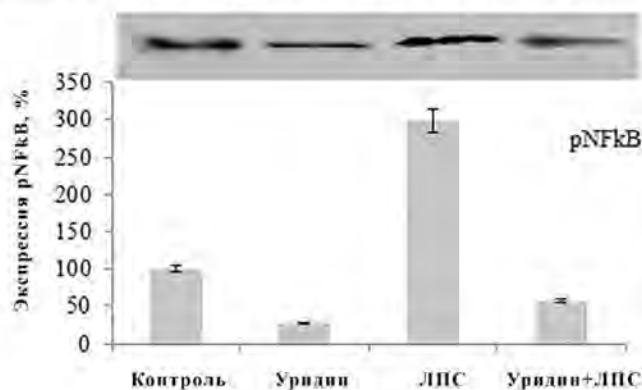
**Рисунок 1.** Продукция Hsp72 в лимфоцитах селезенки мышей. Вестерн блот анализ (верхняя панель) и количественная оценка изменения уровня Hsp72. Вестерн блот анализ изолированных лимфоцитов мышей проводился с использованием антител к белку Hsp72. Результаты являются репрезентативными для четырех независимых экспериментов. Порядок пятен соответствует столбцам гистограммы. На гистограмме, рассчитанной в процентах от контрольных значений, представлены результаты

денситометрии пятен с помощью программы QARA из четырех независимых экспериментов.

Таким образом, предварительное введение уридина в условиях острой интоксикации вызывало полную блокировку продукции Hsp72, понижая при этом уровень экспрессии этого стрессового белка ниже контроля.

### Роль уридина в предупреждении активации каскада NF-κB при воздействии острого токсического стресса

Учитывая способность уридина снижать продукцию провоспалительных цитокинов и белка теплового шока Hsp72, мы попытались оценить также роль уридина в активации каскада NF-κB у мышей, находящихся в условиях острого токсического стресса. Оценка продукции pNFκB в лимфоцитах селезенки мышей проводилась методом Вестерн блот анализа. В этой серии экспериментов мы показали, что токсический стресс, вызванный внутрибрюшинным введением липополисахарида, сопровождается повышением фосфорилированной формы этого белка в спленоцитах мышей (рис. 2).



**Рисунок 2.** Влияние уридина на продукцию pNFκB в лимфоцитах селезенки мышей. Вестерн блот анализ (верхняя панель) и количественная оценка изменения уровня pNFκB. Вестерн блот анализ изолированных лимфоцитов мышей проводился с использованием антител к белку pNFκB. Порядок пятен соответствует столбцам гистограммы. На гистограмме, рассчитанной в процентах от контрольных значений, представлены результаты денситометрии пятен с помощью программы QARA из пяти независимых экспериментов.

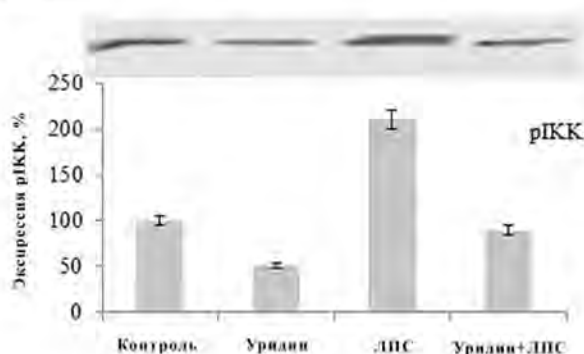
Полученные данные указывают на то, что острый токсический стресс, вызванный введением ЛПС, вызывает резкое повышение активности NF-κB каскада. При этом введение уридина предотвращало эту активацию (рис. 2).

Мы обнаружили также, что при токсическом стрессе происходило увеличение активности киназы pIKK, которая способна фосфорилировать свободные субъединицы ингибиторного белка IκB, а введение уридина снижало экспрессию pIKK (рис. 3).

Таким образом, активация каскада NF-κB по классическому пути и, соответственно, возможность транслокации фосфорилированной формы NF-κB в ядро через активацию киназы pIKK в условиях острого токсического стресса,

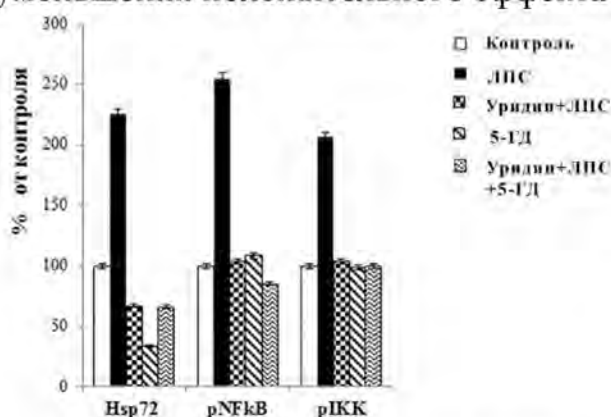


вызванного ЛПС, в значительной степени предотвращается при введении уридина.



**Рисунок 3.** Продукция pIKK в лимфоцитах селезенки мышей. Вестерн блот анализ (вставка сверху) и количественная оценка изменения уровня pIKK. Вестерн блот анализ изолированных лимфоцитов мышей проводился с использованием антител к белку pIKK $\alpha/\beta$ . Порядок пятен соответствует столбцам гистограммы. На гистограмме, рассчитанной в процентах от контрольных значений, представлены результаты денситометрии пятен с помощью программы QARA из пяти независимых экспериментов.

Для уточнения механизма действия уридина, мы использовали специфический ингибитор митохондриального АТФ, 5-гидроксидеканонат (5-ГД) (рис. 4), который применялся нами ранее для уменьшения положительного эффекта уридина на других моделях стресса.



**Рисунок 4.** Влияние 5-гидроксидеканоната (5-ГД) на продукцию сигнальных белков и защитные эффекты уридина. Объект - самцы Balb/c мышей (возраст 8-10-неделя, 25-30 г). Инъекцию ЛПС (7,5 мг на кг массы тела мышей) проводили через час после внутрибрюшинного введения уридина (30 мг на 1 кг веса мыши). Животные были обезглавлены через 6 часов после введения ЛПС. Инъекцию солевого раствора 5-ГД (5 мг на 1 кг веса мыши) проводили за 5 мин до введения уридина. Контрольным животным вводили физиологический раствор.

Как видно из рисунка, 5-ГД не отменяет защитные эффекты уридина на уровень продукции сигнальных белков, наблюдаемый на фоне острого токсического стресса животных, вызванного введением ЛПС.

### Накопления фосфонуклеотидов в тканях животных, получающих уридин

Известно, что уридин постоянно присутствует в сыворотке крови человека и животных [11]. Он достаточно легко проходит через клеточную мембрану и является предшественником биологически активных уридиновых нуклеотидов [12].

В настоящей работе было оценено содержание уридиновых нуклеотидов в миокарде после внутрибрюшинного введения уридина. Измерения проводились с помощью колонки «ProPac PA 1» (4 × 250 мм, 10 мкм) (США) с применением хроматографа марки «Knauer» (Германия) для HPLC определения.

Изменение концентрации уридиновых нуклеотидов в ткани миокарда при введении уридина представлено в Таблице 2.

**Таблица 2.** Изменение содержание уридиновых нуклеотидов в миокарде мыши через 60 мин после введения уридина и УМФ.

Группы животных, число животных	Концентрация, нмоль/г ткани			
	УМФ	УДФ	УТФ	Сумма нуклеотидов
Интактные (n=10)	15,63±0,90	37,79±1,81	96,51±10,72	149,93±7,42
Интактные + уридин, (n=10)	24,77±3,00*	74,37±5,19*	248,56±18,41*	347,71±18,5*

Представлено среднее значение ± ошибка средней. \* p<0.05

Из таблицы видно, что через 65 мин после его введения наблюдается значительное увеличение содержания всех уридиновых фосфонуклеотидов (УМФ, УДФ и УТФ) в миокарде, т.е. к моменту введения эндотоксина введённый уридин может быть уже источником уридиновых фосфонуклеотидов в клетке.

### Заключение

В настоящей работе было установлено, что уридин обладает выраженным противовоспалительным свойством, что проявляется в снижении продукции провоспалительных цитокинов и уменьшении реакции иммунных клеток на бактериальный токсин. Известно, что воспаление, вызванное этим токсином, проявляется в развитии окислительного стресса [13]. Недавно мы показали, что диета, обогащенная антиоксидантами, значительно снижает образование АФК в тканях мышечной, получавших ЛПС. При этом наблюдалось снижение активации пути NF-κB и уменьшение цитокинового ответа [14]. С другой стороны, нами было показано, что развитие окислительного стресса, вызванного перевязкой желудочковой артерии сердца, предупреждается уридином и его фосфонуклеотидами [8].

Данные настоящей работы показывают, что уридин устраняет также окислительный стресс, вызванный бактериальным токсином. Проявляется это не только в снижении продукции провоспалительных цитокинов, увеличивающейся при введении токсина (таблица 1), но и в способности уридина предупреждать в лимфоцитах повышенную экспрессию белка теплового шока 72 (Hsp70), а также белка NF-κB, ответственного за экспрессию ряда цитокинов (рис. 1 и 2).

Кроме того, при внутрибрюшинном введении уридина в лимфоцитах предупреждается и чрезмерное увеличение скорости фосфорилирования белка NF-κB, а также повышение активности IKK, которая регулирует фосфорилирование субъединиц ингибиторного белка IκB (рис. 3 и 4). Таким образом, в работе обнаружено новое, чётко выраженное свойство уридина защищать клетки от чрезмерной активации NF-κB сигнальной системы, наблюдаемой при острой интоксикации, вызванной введением бактериального токсина.

Следует подчеркнуть, что уридин в эксперименте снижает уровень экспрессии Hsp72 и белка NF-κB в лимфоцитах животных, получавших ЛПС, до значений, существенно ниже, чем в лимфоцитах контрольных животных (рис. 1, 2). На основании этих данных можно предположить, что уридин способствует нормализации даже тех малых последствий окислительного стресса, которые появляются в результате процедур, связанных с работой с животными, а также с выделением клеток, а именно, влиянием кислорода воздуха, изменением температуры и др.

Таким образом, величина концентрации уридина в крови может в какой-то степени определять иммунный статус организма. Известно, что эта величина в норме является довольно постоянной [11]. Однако пока не ясно, какие системы поддерживают это постоянство и что влияет на его изменение. В работе показано, что введённый в кровь уридин, уже через 1 час увеличивает содержание уридиновых нуклеотидов в тканях (таблица 2). Поэтому при

введении эндотоксина через час после уридина действующим началом в клетки может быть как сам уридин, так и его фосфонпроизводные.

Каков же возможный механизм действия уридина и его производных на клетки, инфицированные бактериальным токсином? Для того чтобы разобраться в этом вопросе, необходимо остановиться на данных по влиянию уридина и его производных на метаболизм клетки. Так как эксперименты по влиянию уридина на разные показатели обмена проводились, в основном, на целом организме [8, 15], не совсем ясно, связаны ли они с действием самого уридина или образовавшихся из него фосфонуклеотидов. На модельных же системах, в основном, были изучены эффекты его фосфонуклеотидных производных.

Известно, что одно из производных уридина - УДФ-глюкоза, например, участвует в ресинтезе гликогена, активируя гликозилирование белков, ответственных за этот синтез [15]. В свою очередь синтез гликогена способствует сохранению энергетических резервов клетки.

Другое производное уридина - УДФ, как было показано нами ранее, является активатором митохондриального АТФ-зависимого канала (миток-АТФ) [10]. Активация этого канала предупреждает развитие окислительного стресса в миокарде [8, 9] и способствует адаптации организма к гипоксии, приводя к снижению скорости образования в митохондриях печени АФК [16]. Мы объясняем это тем, что активация миток<sub>АТФ</sub> приводит к активации рециклизации калия в митохондриях, что приводит к их мягкому разобщению, которое, в свою очередь, ведёт к снижению скорости образования АФК в митохондриях. Следовательно, можно предположить, что уридин, активируя миток-АТФ, снижает скорость образования в митохондриях повышенного количества АФК, что предупреждает вызванную интоксикацией чрезмерную активацию сигнальных каскадов клетки. В пользу такого предположения свидетельствуют новые сведения, показывающие, что инфламасома NLRP3, активность которой регулируется АФК, способна воспринимать митохондриальную дисфункцию, что может объяснить тесную связь между нарушениями в митохондриях и воспалительными процессами [17]. 5-ГД является специфическим ингибитором миток-АТФ канала. Он не снимал эффекты уридина в наших экспериментах (рис. 4). Мы предполагаем, что в модели ЛПС положительный эффект уридина, скорее всего, не связан с функционированием миток-АТФ.

Вполне возможно также, что действие уридина или образовавшихся из него фосфонуклеотидов связано со стимуляцией специальных рецепторов. Недавно было установлено существование в клетке рецепторов на УТФ и УДФ (группа P<sub>2</sub> рецепторов), активация которых может влиять, например, на кальциевый обмен в клетке [18]. Наличие рецепторов для уридиннуклеотидов, а возможно и для самого уридина, делает, по мнению ряда исследователей, этот класс молекул кандидатами на разработку новых лекарственных препаратов [15]. Представленная здесь работа подтверждает перспективность использования уридина в качестве лекарственного препарата и, в частности, при действии бактериальных токсинов.

Работа поддержана Правительством РФ (договор № 14.750.31.0028), грантами РНФ №16-15-00157, РФФИ № 16-04-00692 и РФФИ № 16-34-00408.

## Список литературы

1. Blackwell TS, Blackwell TR, Holden ER, Christman BW, Christman JW (1996). *J Immunol.* 157,1630-1637.
2. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991). *EMBO J.* 10,2247-2258.
3. Schreck R, Baeuerle PA (1991). *Trends Cell Biol.* 1,39-42.
4. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004). *J Biol Chem.* 279,4127-4135.
5. Macdonald J, Galley HF, Webster NR (2003). *Br J Anaesth.* 90,221-232.
6. Bochkov VN, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR, Leitinger N (2002). *Nature.* 419,77-81.
7. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS (1996). *Jr. Science.* 274(5288),784-7.
8. Krylova IB, Kachaeva EV, Rodionova OM, Negoda AE, Evdokimova NR, Balina MI, Saproнов NS, Mironova GD (2006). *Exp Gerontol.* 41,697-703.
9. Бульон В.В., Крылова И.Б., Селина Е.Н., Емельянова Л.В., Мironova Г.Д., Сапронов Н.С. 2010. *Мед. акад. журн.* 3,89-94.
10. Mironova GD, Negoda AE, Marinov BS, Paucsek P, Costa AD, Grigoriev SM, Skarga YY, Garlid KD (2004). *J Biol Chem.* 279,4127-4135.
11. Traut TW (1994). *Mol Cell Biochem.* 140,1-22.
12. Anderson CM, Parkinson FE (1997). *Trends Pharmacol. Sci.* 18,387-392.
13. Macdonald J, Galley HF, Webster NR (2003). *Br J Anaesth.* 90,221-232.
14. Novoselova EG, Lumin SM, Novoselova TV, Khronov MO, Glushkova OV, Avklacheva NV, Safonova VG, Fesenko EE (2009). *Eur J Pharmacol.* 615,234-240.
15. Connolly GP, Duley JA (1999). *TIPS.* 20,218-225.
16. Mironova GD, Shigayeva MI, Critsenko EN, Murzaeva SV, Gorbacheva OS, Germanova EL, Lukyanova LD (2010). *J Bioenerg Biomembr.* 42,473-481
17. Zhou R, Yazdi AS, Menn P, Tschopp J (2011). *Nature.* 469,221-225
18. Barnard EA, Simon J, Webb TE (1997). *Mol Neurobiol.* 15,103-129.

## ***Глава 9. LINK BETWEEN LISOSOMAL IRON AND MITOCHONDRIA ENHANCES PHOTODYNAMIC THERAPY***

Anna-Liisa Nieminen<sup>1,5</sup>, Hsin-I Hung<sup>1</sup>, and John J. Lemasters<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Center for Cell Death, Injury & Regeneration, Departments of Drug Discovery & Biomedical Sciences and Biochemistry & Molecular Biology and Hollings Cancer Center, Medical University of South Carolina, Charleston, SC,

<sup>5</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, Russian Federation.

### **Localization of the photosensitizer is critical in effective photodynamic therapy**

Photosensitizers are usually highly hydrophobic molecules that preferentially accumulate in one or more cellular membranes. Photosensitizers tend to target three main organelles - mitochondria, endoplasmic reticulum and lysosomes [1]. The most effective photosensitizers tend to localize to mitochondria, suggesting that depriving cells of a primary energy source is an effective way to kill cells. Porphyrins and porphyrin-related macromolecules are examples of mitochondria-targeted photosensitizers that accumulate in cellular membranes [2]. Since porphyrins are precursors in the biosynthetic pathway to heme they accumulate into mitochondria. Endogenous mitochondrial fluorescent photosensitizer protoporphyrin IX (PPIX) accumulates into mitochondria via the 18 kDa translocator protein (TSPO) in the mitochondrial outer membrane [3]. Phthalocyanine 4 (Pc 4) is an example of a non-porphyrin mitochondria-targeted photosensitizer. Pc 4 binds preferentially to mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi complex but not to plasma membrane [4, 5].

We have extensively studied photodynamic therapy (PDT) with Pc 4 over the years [1, 4-12]. The initial response to Pc 4-PDT is production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) detected by confocal microscopy from conversion of non-fluorescent dichlorofluorescein (H<sub>2</sub>DCF) to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF). Initially light activates Pc 4 to produce singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) with a very short lifetime due its reaction with a variety of other chemicals. Since H<sub>2</sub>DCF itself does not detect <sup>1</sup>O<sub>2</sub> but rather reacts with hydroperoxides [13]. Therefore, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> formed during Pc 4-PDT initiates lipid peroxidation chain reactions resulting in conversion of dichlorofluorescein to green-fluorescing DCF.

Mitochondrial ROS formed during Pc 4-PDT further induced mitochondrial inner membrane permeabilization [4]. Desferal, an iron chelator, almost completely prevented Pc 4-PDT-induced mitochondrial inner membrane permeabilization. Inner membrane permeabilization was also accompanied by collapse of the mitochondrial membrane potential, the event that was assessed by membrane potential-indicating probes rhodamine 123 (Rh123) and tetramethylrhodamine methylester (TMRM). Inner membrane permeabilization was followed by mitochondrial swelling, as assessed by MitoTracker Red and ultimately cell death[4]. Thus, early mitochondrial ROS formation plays a crucial role in Pc 4-PDT-induced cell death.

In general, direct targeting of photosensitizers to mitochondria produces an effective PDT response. However, one can argue that engaging other organelles in the killing pathway would produce even stronger PDT killing. PDT sensitized by N-aspartyl chlorin e6 (NPe6), a photosensitizer that accumulates in lysosomes, also

initiates the mitochondrial pathway of apoptosis through release of cytochrome *c* from mitochondria and subsequent activation of procaspases-9/3 [14, 15]. The Bcl2-only protein Bid was cleaved concomitantly with cytochrome *c* release, presumably by proteases released from lysosomes. Thus, truncated Bid (t-Bid) likely triggered the mitochondrial pathway of apoptosis. Interestingly, the kinetics of apoptotic cell death was slower than with photosensitizers directly targeted to mitochondria. Similar results were observed by Oleinick's group with the Pc 4 analogs that preferentially bind to lysosomes as assessed by confocal microscopy [9]. One of these analogs, Pc 181, was studied in more detail. Pc 181 was taken up by cells more efficiently and produced greater photodynamic cell killing than Pc 4, as judged by a colony-formation assay [9]. Pc 181-PDT-induced lysosomal membrane damage activated the mitochondrial cell death pathway mediated by cleavage of Bid as a consequence of the release of proteases from lysosomes. The studies from Kessel's group have further examined whether sequential low dose of lysosomal and mitochondrial PDT enhances the overall PDT response [16]. Synergistic killing resulted when the lysosomal targeting photosensitizers 5-ethylamino-9-diethylaminobenzo [a]phenothiazinium chloride (EtBNS) and galactose conjugate of 3-(1-hexyloxyethyl)-3-devinyl pyropheophorbide- $\alpha$  (HPPHgal) were each sequentially combined with a mitochondria-targeting benzoporphyrine derivative (BPD) photosensitizer [16]. Cell death ultimately involved loss of mitochondrial membrane potential, suggesting that lysosome-derived constituents were contributing to mitochondrial damage. E-64d, an inhibitor of cysteine proteases, provided partial cytoprotection suggesting at least partial involvement of such proteases in cell killing.

### **Iron contributes to PDT killing**

Mitochondrial ROS formed during Pc 4-PDT further induced mitochondrial inner membrane permeabilization. Lysosomes contain numerous hydrolytic enzymes, and some of these enzymes may be involved in subsequent mitochondrial damage [15-17]. Mitochondrial ROS formed during Pc 4-PDT further induced mitochondrial inner membrane permeabilization [18].

#### ***Cellular iron homeostasis***

Iron is an essential nutrient needed for oxygen-binding and redox active prosthetic groups (heme and iron-sulfur clusters). Thus, a major consequence of iron deficiency is microcytic anemia due to inadequate heme synthesis for hemoglobin in erythrocytes. After iron absorption by the gut, transferrin protein in the plasma distributes iron throughout the body [19]. Transferrin has two binding sites for ferric iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) and keeps the bound iron in a redox-inactive state. Transferrin concentration in serum is 30-40  $\mu\text{M}$ . Total serum transferrin-bound iron is 20-30  $\mu\text{M}$ . Transferrin circulates until it binds transferrin receptor 1 on the surface of plasma membranes and is then internalized by receptor-mediated endocytosis [20, 21]. As the proton-pumping vacuolar ATPase (V-ATPase) acidify endosomes to a pH of  $\sim 6$ , transferrin releases its  $\text{Fe}^{3+}$  [22]. Transferrin and its receptor are then recycled back to the cell surface. Subsequently, endosomes fuse with lysosomes that are more acidic (pH  $\sim 4.5$ ) [23]. Autophagy also recycles iron into the lysosomes. Therefore, lysosomes constitute to the major cellular reservoir of mobilizable iron. Iron remains trapped inside lysosomes as ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) iron. However, cytosolic NADPH reduces  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$  by a ferrireductase called six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3 (Steap3) in the

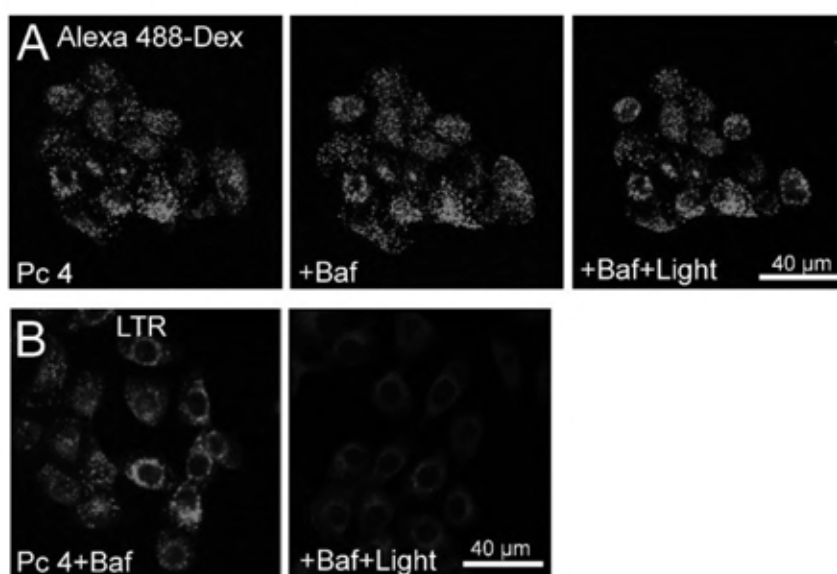
lysosomal membrane [24]. Controlled release of  $\text{Fe}^{2+}$  into the cytosol then occurs through divalent metal transporter-1 (DMT1) that is also located in the lysosomal membrane [25].

### ***Chelatable versus nonchelatable iron***

Intracellular iron exists in two different pools. “Nonchelatable” iron is inaccessible to iron chelators such as desferal and resides in ferritin, hemosiderin, and iron-containing prosthetic groups of proteins (e.g., heme, iron-sulfur complexes). In contrast, “chelatable” iron comprises free iron and iron loosely bound to anionic metabolites such as ATP and citrate. Chelatable iron is also accessible to desferal and other iron chelators. In hepatocytes, chelatable iron concentration can reach to 5-15  $\mu\text{M}$  [26, 27]. Chelatable iron can also promote oxidative stress by catalyzing the Fenton reaction, which produces highly reactive hydroxyl radicals ( $\text{OH}\cdot$ ) from  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{O}_2^{\cdot-}$  to damage DNA, proteins and membranes [28].

### ***Lysosomal iron release enhances PDT***

Lysosomes are a source of rapidly mobilized chelatable iron. When released from lysosomes iron is taken up by mitochondria. After PDT using the mitochondria-targeted photosensitizer Pc 4, mitochondria are major source of ROS formation leading to onset of the mitochondrial permeability transition [4]. Increased mitochondrial iron can catalyze ROS cascades. Therefore, we hypothesized that iron translocation from lysosomes to mitochondria enhances PDT-induced cell killing using mitochondria-targeted photosensitizers. We used bafilomycin, a specific inhibitor of the vacuolar proton-pumping ATPase (V-ATPase), to release iron from lysosomes [18]. Bafilomycin collapses acidic lysosomal and endosomal pH gradients resulting in release of lysosomal iron into the cytosol [18]. Bafilomycin accelerated mitochondria-specific Pc 4-PDT-mediated cell killing, and this toxicity was mediated through mitochondrial depolarization and inner membrane [7, 8, 29]. Chloroquine, which is a weak base that causes lysosomal alkalinization gave similar results [29; 30]. Confocal microscopy showed that lysosomal membranes did not rupture after bafilomycin and Pc 4-PDT (Fig. 1A) [29].



**Figure 1.** Bafilomycin collapses the lysosomal pH gradient but does not induce lysosomal membrane permeabilization. In **A**, human epidermoid carcinoma A431 cells were loaded with 10 kDa Alexa 488-dextran (Alexa 488-Dex) and incubated with 25 nM Pc 4. Alexa 488-Dex is taken up by cells *via* endocytosis. Images show retention of green Alexa 488-Dex fluorescence after treatment with bafilomycin (50 nM, +Baf) and even after Pc 4-PDT (+Baf+Light). In **B**, cells were loaded with LysoTracker Red (500 nM, LTR), which accumulates into acidic compartments, and then

incubated with Pc 4. Baf caused virtually complete release of LTR from lysosomes indicating collapse of the lysosomal pH gradient (panel **B**). Modified from Shalini Saggi, Hsin-I Hung, Geraldine Quiogue, John J.

Lemasters, and Anna-Liisa Nieminen. Lysosomal signaling enhances mitochondria-mediated photodynamic therapy in A431 cancer cells: Role of iron. *Photochem. Photobiol.* 88, 461–468, 2012.

Since Alexa 488 dextran fluorescence is pH-independent, loss of Alexa 488 dextran fluorescence would indicate specific lysosomal disintegration rather than a change in lysosomal pH. LysoTracker Red is a weak base which accumulates into lysosomes in response to acidic pH [31]. After bafilomycin, LysoTracker Red was released from lysosomes, as expected, confirming that bafilomycin was penetrating cells (Fig. 1B) [29].

Desferal, which is an iron chelator, protected against PDT plus bafilomycin-induced mitochondrial depolarization and cell killing [29]. Desferal poorly crosses membranes, and therefore millimolar concentrations were required to protect. Desferal may also be taken up by endocytosis resulting in its accumulation in endosomes/lysosomes [32, 33]. Thus, cytoprotection with desferal may partly be explained by chelation of redox-active iron inside lysosomes. To assess whether chelation of lysosomal iron is critical for bafilomycin plus Pc 4-PDT-induced toxicity, the effect of starch-desferal (1 mM desferal equivalency) was evaluated. ~10 kDa starch-desferal only enters cells by endocytosis and accumulates in lysosomes. Like desferal, starch-desferal also protected against bafilomycin plus Pc 4-PDT-induced mitochondrial depolarization and cell killing [29]. These results demonstrate that lysosomes/endosomes release redox-active iron after bafilomycin and that desferal and starch-desferal prevent this release by chelating intraluminal iron of these organelles.

### ***Mitochondrial iron uptake in cells***

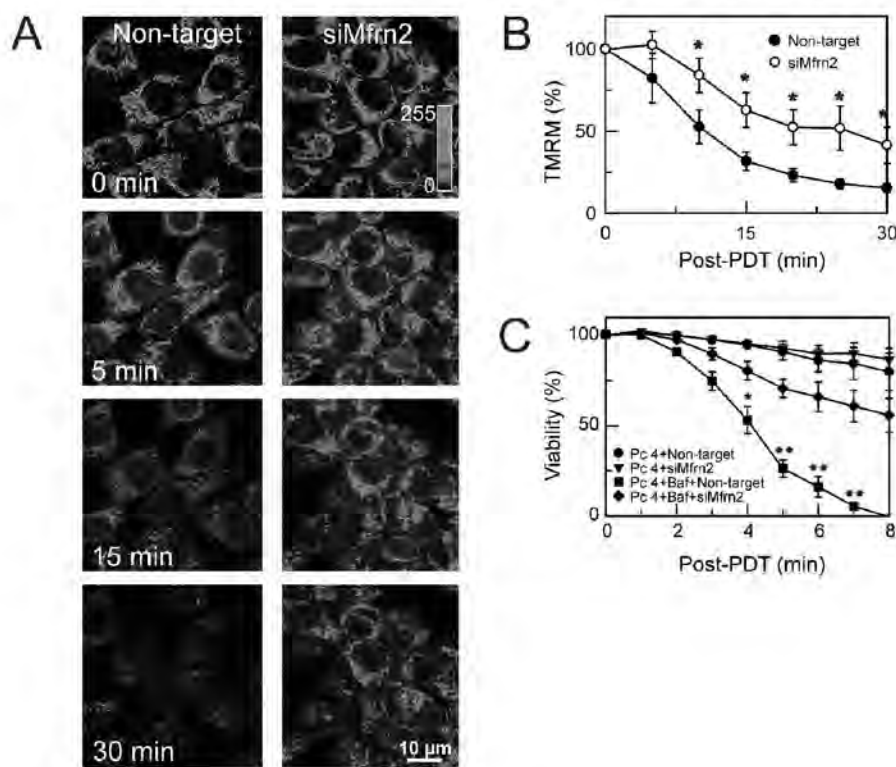
Under physiological conditions, chelatable iron is mostly stored in lysosomes and therefore free iron concentration in the cytosol is normally low. When lysosomal iron is released due to bafilomycin exposure or a pathological condition disrupting lysosomal pH or membrane integrity, then cytosolic iron concentration can reach to 200-300  $\mu\text{M}$  [18, 34]. Where does this iron then go? Studies from Flatmark and co-workers show that the classical mitochondrial calcium uniporter (MCU) catalyzes uptake of  $\text{Fe}^{2+}$  but not  $\text{Fe}^{3+}$  and that this uptake is driven by mitochondrial membrane potential [35]. Recently, the molecular identity of the MCU was identified as the 40 kDa CCDC109A gene product called MCU that forms tetrameric or high order oligomers in the mitochondrial inner membrane [36, 37]. MCU has two highly conserved transmembrane domains and an intervening loop enriched in acidic residues that binds Ru360, a highly specific inhibitor that blocks electrogenic mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake at nanomolar concentrations and which does not inhibit plasmalemmal  $\text{Ca}^{2+}$  channels or sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  release pathways [38-40]. Interestingly, Ru360 protected human head and neck squamous carcinoma cells against bafilomycin-enhanced PDT toxicity [7]. Furthermore, Ru360 provided even greater protection than iron chelators desferal and starch-desferal [7]. Desferal and starch-desferal-sensitive mitochondrial iron uptake through MCU also occurs in other pathological situations [18, 35, 41]. These results demonstrate that Ru360 protection against bafilomycin toxicity during PDT is likely due to prevention of ferric iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) uptake into mitochondria through MCU.

Besides MCU, mitoferrin (Mfn) mediates iron transport across the mitochondrial inner membrane [42-44]. Mfm1 (SLC25A37) is expressed primarily in erythroid cells and Mfm2 (SLC25A28) expressed in non-erythroid tissues [45-48]. There is no sequence homology between MCU and Mfm [36, 37]. Relative contribution of MCU and Mfm to mitochondrial iron uptake is still poorly understood.



As expected, head and neck squamous carcinoma cells express predominantly Mfn2 and very little Mfn1. Cell lines expressing more Mfn2 were more sensitive to bafilomycin-enhanced PDT toxicity than lines expressing less Mfn2 [7].

To establish a causal link between Mfn2 and mitochondrial membrane potential, Mfn2 was silenced in high Mfn2-expressing head and neck cancer cells. Decreased expression of Mfn2 correlated with decreased rates of mitochondrial Fe<sup>2+</sup> uptake in permeabilized cells. Further, Mfn2 knockdown delayed mitochondrial depolarization and cell death after bafilomycin plus PDT (Fig. 2) [7].



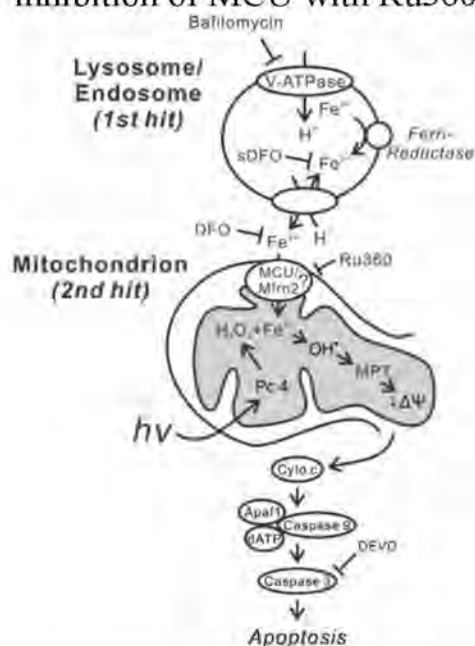
**Figure 2.** Mfn2 knockdown confers resistance to mitochondrial depolarization and cell killing after PDT. UMSSC22A cells were transfected with siRNA against Mfn2 and non-target siRNA for 6 days followed by Pc 4-PDT in the presence of bafilomycin (50 nM). In **A**, mitochondrial membrane potential was monitored using TMRM by confocal microscopy. Image intensities were pseudo-colored according to the reference bar. In **B**, After background subtraction TMRM fluorescence was plotted as percentage of TMRM fluorescence at 0 min. \*,  $p < 0.05$  compared to non-target siRNA. In **C**, cell viability under the same conditions as **A** was determined by propidium iodide fluorometry. \*,  $p < 0.05$  compared to non-target siRNA.

"This research was originally published in Journal of Biological Chemistry. Hsin-I Hung, Justin M. Schwartz, Eduardo N. Maldonado, John J. Lemasters, and Anna-Liisa Nieminen. Mitoferrin-2-dependent mitochondrial iron uptake sensitizes human head and neck squamous carcinoma cells to photodynamic therapy. J. Biol. Chem. 2013; Vol 288:677-686. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology."

Therefore, we conclude that lysosomal iron release and mitochondrial iron uptake act synergistically to induce PDT-mediated and iron-dependent mitochondrial dysfunction and subsequent cell killing. Pc 4 localized to mitochondria is activated by light to produce intramitochondrial ROS. Iron released from lysosomes by bafilomycin is taken up by mitochondria in a Mfn2-dependent fashion. In mitochondria, iron participates in Fenton reaction and further enhances ROS-mediated cell death.

Lysosomal iron chelation with starch-desferal protects against mitochondrial depolarization and cell death. Knockdown of Mfn2 by decreasing mitochondrial iron uptake also delays mitochondrial depolarization and cell death after Pc 4-PDT. Mfn2-

dependent mitochondrial iron uptake may also involve MCU, since Ru360, a specific inhibitor of MCU, also blocks Mfn2-dependent iron uptake and protects against PDT toxicity [7]. Since Mfn2 does not have any known binding site for Ru360, then Ru360 does not directly inhibit Mfn2. Mfn2 may act as a regulator of MCU and part of a larger MCU-containing  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$ -transporting complex. Silencing of Mfn2 and inhibition of MCU with Ru360 both inhibit mitochondrial  $\text{Fe}^{2+}$  uptake (Fig. 3).



**Figure 3.** Mfn2 contributes to PDT-induced cell death. Pc 4-PDT induces mitochondrial ROS production and apoptotic cell death. Pc 4 localizes to mitochondria and is activated by light ( $h\nu$ ) to produce formation of intramitochondrial ROS, including  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Iron released from lysosomes by bafilomycin is taken up by mitochondria in Mfn2-dependent fashion. Iron inside mitochondria participates in Fenton chemistry to further enhance the ROS-mediated MPT, mitochondrial depolarization, cytochrome *c* release and apoptotic cell death. Cytotoxicity is decreased by the iron chelators desferal and starch-desferal and by Ru360 that prevents mitochondrial iron uptake. Knockdown of Mfn2 delays mitochondrial depolarization and cell death induced by bafilomycin during PDT.

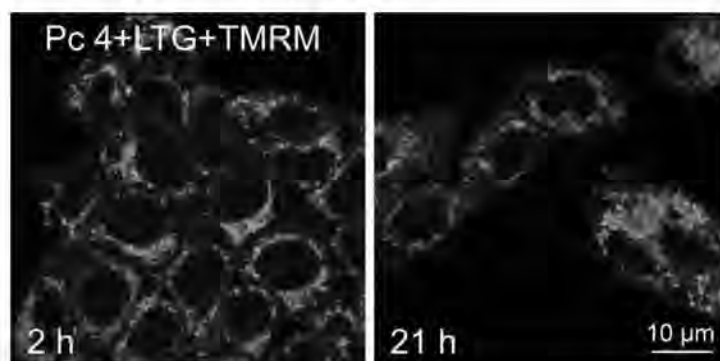
"This research was originally published in Journal of Biological Chemistry. Hsin-I Hung, Justin M. Schwartz, Eduardo N. Maldonado, John J. Lemasters, and Anna-Liisa Nieminen. Mitoferrin-2dependent mitochondrial iron uptake sensitizes human head and neck squamous carcinoma cells to photodynamic therapy. J. Biol. Chem. 2013; Vol 288:677-686. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology."

### Improved delivery of photosensitizer to lysosomes via a nanoparticle carrier

Drug concentration, light exposure and oxygenation of the tissue determine PDT efficacy. To maximize treatment efficacy, optimization of photosensitizer concentration and selective targeting of the photosensitizer to diseased tissue (*e.g.*, tumor cells) are important goals. Use of nanoformulations whereby the photosensitizer is packaged within biocompatible nanoparticle constructs that are selectively taken up tumor cells has gained increasing interest. To enhance tumor-specific accumulation of the drug, nanoparticles are often designed to contain ligands for tumor specific internalizing surface receptors. Photosensitizer-loaded nanoparticles surface-modified by receptor-specific ligands or antibodies bind to such receptors and undergo cellular internalization *via* receptor-mediated endocytosis. Subsequently, nanoparticles undergo degradation inside endosomes/lysosomes leading the intracellular release of the photosensitizer cargo. The released photosensitizer then binds to its own target organelles to produce a therapeutic effect.

Numerous nanoformulations of the photosensitizers have been described in the literature. Pc 4 has been encapsulated in nanoparticles by number of research groups [6, 49-51]. Gupta's group formulated Pc 4 in micelles that were further surface-modified with epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeting GE11 peptides for targeting to EGFR-overexpressing cancer cells [50, 51]. Basilion's group used a similar strategy but formulated Pc 4 in EGF peptide-targeted gold nanoparticles [52]. Nanoparticles enhanced Pc 4 uptake into cultured cells and Pc 4 accumulation in tumors [6, 50-52]. Expansile nanoparticles, which enlarge their size in response to acidic pH, have been used as drug carriers for controlled drug release at targeted sites for enhanced therapeutic effect [53-56]. Since sigma-2 receptor is overexpressed in many types of cancers, including skin, lung, and breast tumors, it has been explored as

a target for tumor specific drug delivery [57-60]. Human tissue array analysis revealed increased expression of sigma-2 receptor also in head and neck tumors compared to normal tissue, making sigma-2 a valid target for these tumors as well [6]. Head and neck tumors are also well suited for PDT treatment because of the relatively easy access of the laser beam to the tumor. Accordingly, we conjugated Pc 4 into expansile nanoparticles that contained sigma-2 receptor targeted ligand. After incubation of cells with Pc 4-conjugated nanoparticles, confocal microscopy revealed that Pc fluorescence appeared in endosomes/lysosomes (Fig. 4) [6].



**Figure 4.** Sub-cellular localization of Pc 4-loaded nanoparticles. UMSCC22A cells were incubated with Pc 4-loaded nanoparticles (far red-fluorescing pseudo-colored in blue) for 2 and 21 h followed by co-loading with LysoTracker Green (LTG, pseudo-colored in green) and TMRM (pseudo-colored in red) to label lysosomes and mitochondria, respectively. Subsequently, confocal images were collected at indicated time points. At 2 h after addition of the nanoparticles, small round green/light cyan spheres were observed in the cytoplasm representing co-localization of lysosome-specific LTR with Pc 4. At 21 h after nanoparticle addition, Pc 4 began to co-localize with mitochondria as shown by magenta representing co-localization of blue Pc 4 and red TMRM. Modified from Huacheng He, Alexander W. Cattran, Tu Nguyen, Anna-Liisa Nieminen, and Peisheng Xu. Triple-responsive expansile nanogel for tumor and mitochondria targeted photosensitizer delivery. *Biomaterials* 35, 9546-9553, 2014.

After longer incubation period, Pc 4 fluorescence appeared more in mitochondria, as assessed by co-localization of Pc 4 fluorescence with the mitochondrial membrane potential-indicating probe TMRM. These results indicated that Pc 4 was released from lysosomes and transported to mitochondria (Fig. 4) [6]. Incorporating sigma-2 targeting ligand to Pc 4-conjugated nanoparticles greatly enhanced cellular uptake and subsequent PDT toxicity in head and neck cancer cells [6]. This strategy is potentially an effective way to treat head and neck cancers without systemic side effects.

### Conclusions

Although PDT is an effective way to kill cells the mechanisms of cell killing vary depending on the site of initial damage within cells. Mitochondria are generally the most important targets for photosensitizers to produce effective PDT responses. Light of appropriate wavelength activates photosensitizers localized in mitochondria to produce intramitochondrial ROS. However, engaging lysosomes in cell death signalling pathways can enhance mitochondria-mediated cell killing. Collapse of lysosomal pH gradients without lysosomal membrane damage induces lysosomal iron release. Iron released from lysosomes can then be taken up by mitochondria in an Mfn2- and MCU-dependent fashion, where it catalyzes the Fenton reaction and further enhances ROS-mediated mitochondrial inner membrane permeabilization, mitochondrial depolarization, and both apoptotic and necrotic cell death. Therefore,

agents that are capable of mobilizing lysosomal iron could potentially be used clinically as adjuvants with mitochondria-targeted photosensitizers.

#### List of references

1. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I (2002). *Photochem Photobiol Sci.* 1,1-21.
2. Roberts WG, Berns MW (1989). *Lasers Surg Med.* 9,90-101.
3. Anholt RR, Pedersen PL, De Souza EB, Snyder SH (1986). *J Biol Chem.* 261,576-583.
4. Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL (2001). *J Biol Chem.* 276,47379-47386.
5. Trivedi NS, Wang HW, Nieminen AL, Oleinick NL, Izatt JA (2000). *Photochem Photobiol.* 71,634-639.
6. He H, Cattran AW, Nguyen T, Nieminen AL, Xu P (2014). *Biomaterials.* 35,9546-9553.
7. Hung HI, Schwartz JM, Maldonado EN, Lemasters JJ, Nieminen AL (2013). *J Biol Chem.* 288,677-686.
8. Quiogue G, Saggi S, Hung HI, Kenney ME, Oleinick NL, Lemasters JJ, Nieminen AL (2009). *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 7380,1-8.
9. Rodriguez ME, Zhang P, Azizuddin K, Delos Santos GB, Chiu SM, Xue LY, Berlin JC, Peng X, Wu H, Lam M, Nieminen AL, Kenney ME, Oleinick NL (2009). *Photochem Photobiol.* 85,1189-1200.
10. Usuda J, Azizuddin K, Chiu SM, Oleinick NL (2003). *Photochem Photobiol.* 78,1-8.
11. Usuda J, Chiu SM, Azizuddin K, Xue LY, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL (2002). *Photochem Photobiol.* 76,217-223.
12. Usuda J, Chiu SM, Murphy ES, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL (2003). *J Biol Chem.* 278,2021-2029.
13. Taguchi H, Ogura Y, Takahashi T, Hashizoe M, Honda Y (1996). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37,1444-1450.
14. Kessel D, Castelli M, Reiners JJ, Jr. (2002). *Photochem Photobiol.* 76,314-319.
15. Kessel D, Reiners JJ, Jr. (2014). *Photochem Photobiol.* 90,889-895.
16. Kessel D, Reiners JJ, Jr. (2015). *Photochem Photobiol.* 91,931-936.
17. Chiu SM, Xue LY, Lam M, Rodriguez ME, Zhang P, Kenney ME, Nieminen AL, Oleinick NL (2010). *Photochem Photobiol.* 86,1161-1173.
18. Uchiyama A, Kim JS, Kon K, Jaeschke H, Ikejima K, Watanabe S, Lemasters JJ (2008). *Hepatology.* 48,1644-1654.
19. Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC (1999). *Nat Genet.* 21,396-399.
20. Aisen P (2004). *Int J Biochem Cell Biol.* 36,2137-2143.
21. de Figueiredo P, Doody A, Polizotto RS, Drecktrah D, Wood S, Banta M, Strang MS, Brown WJ (2001). *J Biol Chem.* 276,47361-47370.
22. Lee DA, Goodfellow JM (1998). *Biophys J.* 74,2747-2759.
23. Baravalle G, Schober D, Huber M, Bayer N, Murphy RF, Fuchs R (2005). *Cell Tissue Res.* 320,99-113.
24. Lambe T, Simpson RJ, Dawson S, Bouriez-Jones T, Crockford TL, Lephord M, Latunde-Dada GO, Robinson H, Raja KB, Campagna DR, Villarreal G, Jr., Ellory JC, Goodnow CC, Fleming MD, McKie AT, Cornall RJ (2009). *Blood.* 113,1805-1808.
25. Tabuchi M, Yoshimori T, Yamaguchi K, Yoshida T, Kishi F (2000). *J Biol Chem.* 275,22220-22228.
26. Petrat F, de Groot H, Rauen U (2001). *Biochem J.* 356,61-69.
27. Rauen U, Springer A, Weisheit D, Petrat F, Korth HG, de Groot H, Sustmann R (2007). *Chembiochem.* 8,341-352.
28. Kehrer JP (2000). *Toxicology.* 149,43-50.
29. Saggi S, Hung HI, Quiogue G, Lemasters JJ, Nieminen AL (2012). *Photochem Photobiol.* 88,461-468.
30. Poole B, Ohkuma S (1981). *J Cell Biol.* 90,665-669.
31. Griffiths G, Hoffack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S (1988). *Cell.* 52,329-341.
32. Cable H, Lloyd JB (1999). *J Pharm Pharmacol.* 51,131-134.
33. Persson HL, Yu Z, Tirosh O, Faton JW, Brunk UT (2003). *Free Radic Biol Med.* 34,1295-1305.
34. Kurtz T, Gustafsson B, Brunk UT (2011). *Free Radic Biol Med.* 50,1647-1658.
35. Flatmark T, Ronislo I (1975). *J Biol Chem.* 250,6433-6438.
36. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovnicki M, Belcher-Tinne CA, Sincak Y, Buo XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogard RL, Kotliansky V, Mootha VK (2011). *Nature.* 476,341-345.
37. De Stefani D, Raffiello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011). *Nature.* 476,336-340.
38. Matlib MA, Zhou Z, Knight S, Ahmed S, Choi KM, Krause-Bauer J, Phillips R, Altschuld R, Katsube Y, Sperelakis N, Bers DM (1998). *J Biol Chem.* 273,10223-10231.
39. Sanchez JA, Garcia MC, Sharma VK, Young KC, Matlib MA, Shen SS (2001). *J Physiol.* 536,387-396.
40. Zhou Z, Matlib MA, Bers DM (1998). *J Physiol.* 507 ( Pt 2),379-403.
41. Kon K, Kim JS, Uchiyama A, Jaeschke H, Lemasters JJ (2010). *Toxicol Sci.* 117,101-108.
42. Froeschner EM, Schweyen RJ, Wiesenberger G (2009). *Biochim Biophys Acta.* 1788,1044-1050.
43. Satre M, Matter S, Aubry L, Gaudet P, Pelosi L, Brandolin G, Klein G (2007). *Biochimie.* 89,1058-1069.
44. Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, Gwynn B, Lambert AJ, Wingert RA, Traver D, Trede NS, Barut BA, Zhou Y, Minet E, Donovan A, Brownlie A, Balzan R, Weiss MJ, Peters LL, Kaplan J, Zou L, Paw BH (2006). *Nature.* 440,96-100.
45. Anigo JD, Yu M, Troadee MB, Gwynn B, Cooney JD, Lambert AJ, Chi NC, Weiss MJ, Peters LL, Kaplan J, Cantor AB, Paw BH (2011). *Mol Cell Biol.* 31,1344-1356.
46. Purohitkar PN, Zumbrennen KB, Paw BH, Ward DM, Kaplan J (2009). *Mol Cell Biol.* 29,1007-1016.

47. Ren Y, Yang S, Tan G, Ye W, Liu D, Qian X, Ding Z, Zhong Y, Zhang J, Jiang D, Zhao Y, Lu J (2012). *PLoS One*. 7:e29666.
48. Troadee MB, Warner D, Wallace J, Thomas K, Spangrude GJ, Phillips J, Khalimonchuk O, Paw BH, Ward DM, Kaplan J (2011). *Blood*. 117:5494-5502.
49. Cheng G, Wessels A, Gourdie RG, Thompson RP (2002). *Dev Dyn*. 223:119-133.
50. Master AM, Livingston M, Oleinick NL, Sen Gupta A (2012). *Mol Pharm*. 9:2331-2338.
51. Master AM, Qi Y, Oleinick NL, Gupta AS (2012). *Nanomedicine*. 8:655-664.
52. Cheng Y, Meyers JD, Broome AM, Kenney ME, Basilion JP, Burda C (2011). *J Am Chem Soc*. 133:2583-2591.
53. Griset AP, Walpole J, Liu R, Gaffey A, Colson YL, Grinstaff MW (2009). *J Am Chem Soc*. 131:2469-2471.
54. Liu R, Gilmore DM, Zubris KA, Xu X, Catalano PJ, Padera RF, Grinstaff MW, Colson YL (2013). *Biomaterials*. 34:1810-1819.
55. Liu R, Wolinsky JB, Catalano PJ, Chiriac LR, Wagner AJ, Grinstaff MW, Colson YL, Raut CP (2012). *Ann Surg Oncol*. 19:199-206.
56. Zubris KA, Liu R, Colby A, Schulz MD, Colson YL, Grinstaff MW (2013). *Biomacromolecules*. 14:2074-2082.
57. Chono S, Li SD, Conwell CC, Huang L (2008). *J Control Release*. 131:64-69.
58. Kashiwagi H, McDunn JE, Simon PO, Jr., Goedegebuure PS, Xu J, Jones L, Chang K, Johnston F, Trinkaus K, Hotchkiss RS, Mach RH, Hawkins WG (2007). *Mol Cancer*. 6:48.
59. Mach RH, Smith CR, al-Nabulsi I, Whirnett BR, Childers SR, Wheeler KT (1997). *Cancer Res*. 57:156-161.
60. Yang Y, Hu Y, Wang Y, Li J, Liu F, Huang L (2012). *Mol Pharm*. 9:2280-2289.

## **Глава 10. НАДН-ЗАВИСИМАЯ РЕДУКТАЗА ВНЕШНИХ ОТДЕЛОВ МИТОХОНДРИЙ: МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АКТИВАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ**

Никифорова А.Б.<sup>1</sup>, Круглов А.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН)

### **Введение**

Ксенобиотики и многие лекарственные препараты, попадая в организм, кроме прямого лечебного воздействия оказывают повреждающие эффекты на клетки. Механизмы побочного действия не всегда понятны. Известно, что лекарственные препараты (например, противоопухолевые доксорубицин, даунорубицин, митомин С, противовоспалительный нитрофурантоин, аналог витамина К – менадион) могут восстанавливаться в клетке различными цитозольными НАДН оксидоредуктазами, а также НАДН оксидоредуктазами внешней и внутренней мембраны митохондрий [1]. Восстановленные ксенобиотики способны вызывать окислительный стресс, повреждение ДНК и, как следствие, апоптоз или некроз [2]. По данным ряда авторов, мощный кардио- и нефротоксический эффект некоторых групп противоопухолевых препаратов связан с неидентифицированной тканеспецифичной ротенон-чувствительной НАДН оксидоредуктазой внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий, способной окислять цитозольный НАДН и активировать препараты, которые, в свою очередь, повреждают ДНК кардиомиоцитов [6]. Кроме того, высказывались предположения, что ответственными за восстановление ксенобиотиков митохондриями могут быть белки VDAC1, AIF или неизвестная НАДН оксидоредуктаза внешней мембраны митохондрий [3, 4]. Однако природа НАДН-зависимой редуктазы ксенобиотиков внешних отделов митохондрий в настоящее время не установлена, а ее свойства и биологическая роль не изучены. Для эффективной модуляции побочных эффектов лекарственных препаратов необходимо выяснение механизмов их активации.

В данной главе будут рассмотрены способы оценки активности НАДН-зависимой редуктазы внешних отделов митохондрий, предложен метод, позволяющий исследовать активность НАД(Ф)Н оксидоредуктаз в различных объектах (гомогенаты, суспензии органелл, культуры клеток, срезы тканей), а также определять локализацию ферментов. Метод позволяет оценивать активность широкого ряда НАД(Ф)Н оксидоредуктаз при использовании специфических ингибиторов, субстратов и маркеров внутриклеточных структур.

Основной НАДН-зависимой редуктазой ксенобиотиков во внешних отделах митохондрий является цитохром *b<sub>5</sub>* редуктаза (*Cy**b**<sub>5</sub>R3*), а не VDAC1, ротенон-чувствительная хинон редуктаза или AIF. За счет цитозольного НАДН *Cy**b**<sub>5</sub>R3* эффективно восстанавливает редокс-активные ксенобиотики, если их стандартный редокс-потенциал  $\geq -270$  мВ (например, люцигенин, менадион, нитрофурантоин). Радикалы ксенобиотиков, в свою очередь, способны увеличивать продукцию АФК и непосредственно индуцировать мРТР. Известные ингибиторы *Cy**b**<sub>5</sub>R3* подавляют окисление НАДН, восстановление ксенобиотиков и продукцию АФК митохондриями.

### **Методы оценки активности НАДН-зависимых редуктаз, ответственных за восстановление ксенобиотиков во внешних отделах митохондрий**

Для измерения НАДН оксидоредуктазной активности существует три принципиальных возможности: 1) регистрация окисления доноров электронов (НАДН), 2) регистрация восстановления акцепторов и 3) регистрация образования АФК, если акцептор способен автоокисляться. Каждый подход имеет свои особенности и ограничения, не все возможно применять для изучения активности редуктаз ксенобиотиков внешних отделов митохондрий в различных биологических системах.

Обычно оценку активности НАДН оксидоредуктаз проводят по окислению НАДН флуориметрическим или спектрофотометрическим методами. Однако спектры поглощения НАДН перекрываются со спектрами различных акцепторов и ингибиторов, используемых при тех или иных исследованиях. Повреждение митохондрий восстановленными акцепторами вызывает набухание митохондрий и окисление эндогенного НАДН, что искажает результаты эксперимента. Кроме того, флуоресцентные характеристики НАДН и некоторых акцепторов не аддитивно изменяются при смешивании. Поэтому спектральные методы регистрации окисления НАДН не могут быть основными методами регистрации НАДН оксидоредуктазной активности.

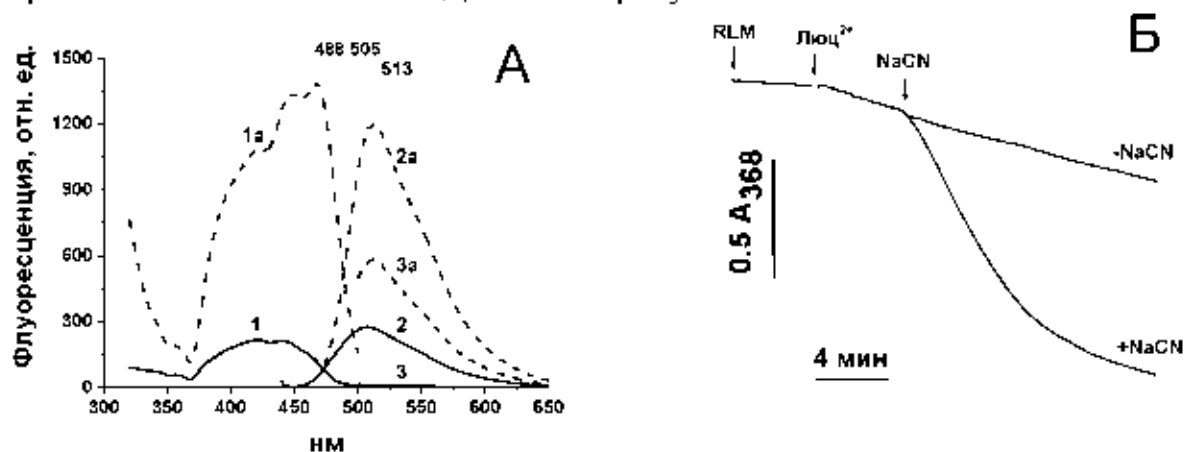
### **Определение активности НАДН оксидоредуктаз внешних отделов митохондрий по восстановлению люцигенина до диметилбиакридена (ДБА)**

*В изолированных митохондриях.* Для оценки активности НАДН оксидоредуктаз по восстановлению акцептора необходимо подобрать соединение. Основные требования к акцептору - это, во-первых, резкое различие измеряемых характеристик окисленной и восстановленной форм. Во-вторых, акцептор должен быть специфичным по отношению к НАДН оксидоредуктазам внешних отделов митохондрий или его свойства должны позволять вычлнять сигнал этих систем из общего сигнала митохондрий и клеток. В-третьих, метод регистрации восстановленного акцептора не должен «конфликтовать» со способами оценки других митохондриальных показателей.

В качестве акцептора НАДН оксидоредуктаз внешних отделов митохондрий был выбран люцигенин. Как показано на рис. 1А, инкубация митохондриальной суспензии в течение 30 мин в стандартной среде, содержащей AntA (1 мкг/мл), НАДН, Люц и NaCN, приводила к тому, что интенсивность флуоресценции (500–560 нм) при возбуждении при 430 и 488 нм возрастала в ~4–5 и 50 раз соответственно (кривые 2, 2а и 3, 3а). Максимум эмиссии смешался с ~505 нм к 511–513 нм. В спектре возбуждения (кривая 1а) (эмиссия 520 нм) появлялся пик при длине волны >450 нм. Эти изменения свидетельствуют о накоплении в митохондриальной суспензии продукта двухэлектронного восстановления Люц - водонерастворимого флуоресцирующего диметилбиакридена (ДБА). В отсутствие НАДН накопления ДБА не происходит (не показано).

Важно, что добавление цианида к гомогенату печени, инкубируемому в стандартной среде, содержащей AntA (1 мкг/мл), НАДН и Люц (рис. 1Б, кривая

2), приводит к резкому ускорению снижения концентрации Люц ( $A_{368}$ ) в среде. Этот эффект в дальнейшем позволил разработать специфичный метод определения активности НАДН оксидоредуктаз внешних отделов митохондрий.



**Рисунок 1.** Накопление ДБА (А) и снижение концентрации люцигенина (Б) в RLM, вызванное добавлением 1 мМ NaCN. А. Спектры возбуждения (1, 1а) и эмиссии (2, 2а и 3, 3а) митохондриальных суспензий сразу после добавления цианида (1-3) и через 30 мин инкубации (1а-3а) в среде с AntA и НАДН. Б. Люцигенин (Люц<sup>2+</sup>), митохондрии (RLM).

Поскольку Люц близок по структуре к флавинам, его восстановление в митохондриях и клетках может осуществляться различными оксидоредуктазами. Для решения проблемы селективности, исследовался вклад различных НАДН оксидоредуктаз митохондрий и клеток в образование ДБА в различных условиях.

При сравнении НАДН-зависимого восстановления люцигенина до ДБА в интактных и пермеабелизованных аламетицином митохондриях, а также использования ингибиторов комплекса I дыхательной цепи (ДЦ) ротенона и MPP-, было установлено, что скорость восстановления люцигенина НАДН дегидрогеназами матрикса и внутренней мембраны составляет не более 30% от скорости восстановления во внешних отделах. Следовательно, в интактных митохондриях эта скорость близка к нулю.

Исследование вклада оксидоредуктаз микросом и цитозоля в образование ДБА (Таблица 1) показало, что они способны восстанавливать люцигенин до ДБА, однако цианид не оказывает влияния на это восстановление. В Таблице 1 представлены данные по накоплению ДБА в различных препаратах митохондрий (гомогенат, грубая цитозольная фракция (Микросомы<sub>1</sub>), микросомальная фракция (Микросомы<sub>2</sub>), грубая митохондриальная фракция (RLM<sub>0</sub>) и RLM отмытых 1 и 3 раза (RLM<sub>1,3</sub>)) в присутствии или отсутствии НАДН и ингибиторов дыхательной цепи. Как видно из данных таблицы, в отсутствие НАДН накопление ДБА в суспензиях, содержащих активные по дыханию RLM (Люц) и RLM с заблокированной дыхательной цепью (Люц-AntA+NaCN) минимальное во всех препаратах. НАДН-зависимое накопление ДБА в микросомальной фракции в присутствии одного AntA и AntA в комбинации с NaCN практически одинаково. Во фракциях RLM накопление ДБА в присутствии обоих ингибиторов существенно выше, чем в присутствии одного AntA, и доля AntA-зависимого накопления ДБА снижается с повышением степени очистки митохондриального препарата. В RLM<sub>3</sub>, содержащих лишь незначительное количество микросом, она составляет около 10% от накопления в присутствии



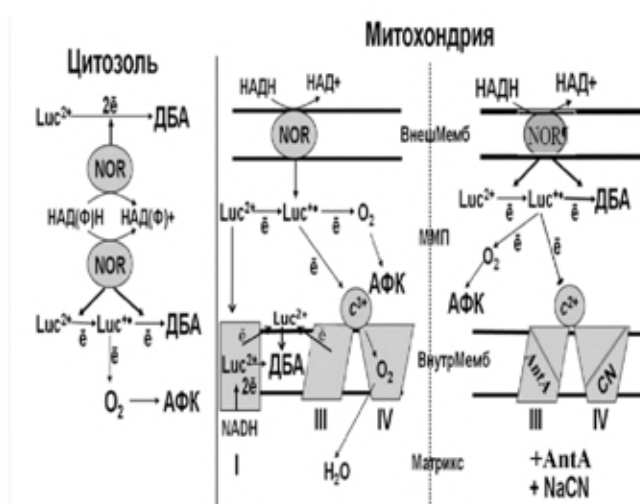
обоих ингибиторов. Пересчет накопления ДБА на количество белка во фракциях показывает, что митохондрии вносят основной вклад в двухэлектронное восстановление Люц (см. табл. 1). Представленные данные показывают, что цианид достаточно специфично активирует продукцию ДБА НАДН оксидоредуктазой внешних отделов митохондрий, но не другими оксидоредуктазами. Механизм активации связан с блокированием одноэлектронного окисления катион-радикала Люц цитохром *c* оксидазой.

**Таблица 1.** Накопление ДБА в препаратах митохондрий в различных условиях инкубации

Условия инкубации	Накопление ДБА, % (УЕ/мг белка/ч)					
	Гомогенат	Микросомы <sub>1</sub>	Микросомы <sub>2</sub>	RLM <sub>0</sub>	RLM <sub>1</sub>	RLM <sub>3</sub>
Люц	0.62 ± 0.91	0.56 ± 0.25	1.16 ± 3.6	0.67 ± 0.32	1.84 ± 1.56	0.64 ± 0.15
+AntA+NaCN	ND	0.4 ± 0.08	ND	ND	ND	0.7 ± 0.12
+AntA+НАДН	29.4 ± 6.0	22.0 ± 7.3	102 ± 17	44 ± 12.5	29.3 ± 4.8	11.6 ± 0.7
+AntA+NaCN +НАДН	100 (317 ± 57)	100 (178 ± 23)	100 (30.6 ± 8)	100 (730 ± 74)	100 (751 ± 65)	100 (789 ± 45)

**Примечания:** УЕ – условные единицы флуоресценции. 100% увеличение флуоресценции соответствует числу УЕ/мг белка/ч в скобках;

Механизмы восстановления люцигенина в клетке могут быть представлены схемой на рис. 2.

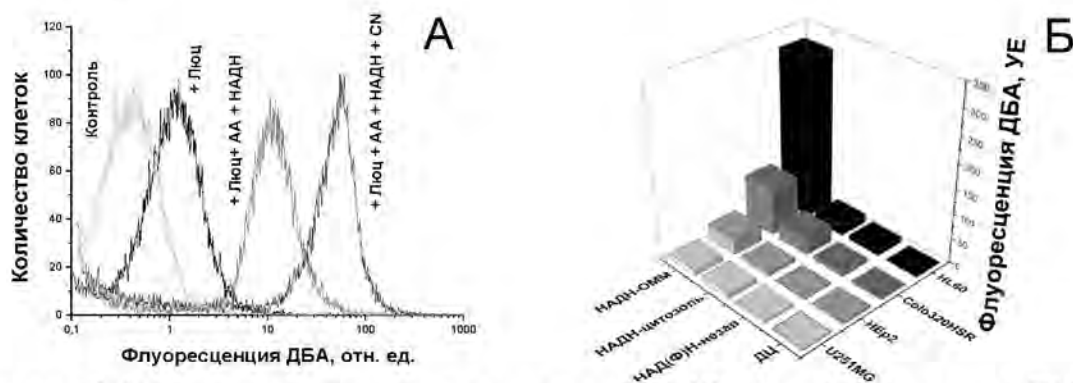


**Рисунок 2.** Схема возможных механизмов образования ДБА через восстановление люцигенина различными НАД(Ф)Н оксидоредуктазами клеточных компартментов. Luc<sup>2+</sup> - люцигенин, Luc<sup>2+•</sup> - катион радикал люцигенина, ДБА - диметилбиакриден, NOR - НАД(Ф)Н оксидоредуктазы, e<sup>-</sup> - электрон, I, III, IV -комплексы дыхательной цепи, с<sup>2+</sup> и с<sup>3+</sup> ферро- и феррицитохром *c*, соответственно, АФК-активные формы кислорода, AntA - антимицин А, CN - NaCN.

Таким образом, использование люцигенина в качестве акцептора НАДН оксидоредуктазы внешней мембраны митохондрий в присутствии антимицина А и цианида позволяет оценивать активность НАДН оксидоредуктазы внешней мембраны митохондрий в выделенных интактных митохондриях и гомогенатах.

**Метод для пермеабилizованных клеток.** Исследование применимости описанного выше способа для оценки активности НАДН оксидоредуктаз внешних отделов митохондрий в пермеабилizованных и интактных клетках.

Использование Люц и ингибиторов ДЦ позволяет оценить вклад не только НАДН оксидоредуктаз внешних отделов митохондрий, но и других систем двухэлектронного восстановления Люц в интактных и пермеабилizованных клетках. На рис. 3А приведены характерные кривые распределения пермеабилizованных клеток HEp-2 по интенсивности флуоресценции ДБА (Ex 488/Em 510–560 нм) (FL1 проточного флуориметра) при добавлении НАДН и указанных ингибиторов. На рис. 3Б показаны данные по люцигенин-редуктазной активности различных оксидоредуктаз в клетках линий HL 60, Colo 320 HSR, HEp-2 и U251 MG. Расчет активности проводился по медианам распределения клеток. Количество ДБА, произведенного НАДН оксидоредуктазой ОММ, определялся по разности между общим количеством накопленного ДБА (Люц+AntA+CN+НАДН) и ДБА, произведенного митохондриальными и цитозольными оксидоредуктазами (Люц+AntA+НАДН). Продукция ДБА в отсутствие НАДН отражает активность дыхательной цепи RLM с высоким  $\Delta\Psi_m$  (Люц) или активность цитозольных НАДН-независимых систем (Люц+AntA+CN).

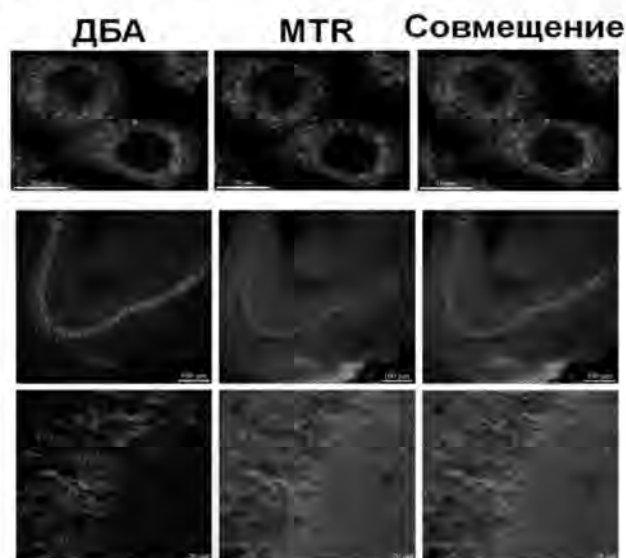


**Рисунок 3.** Стандартные кривые распределения клеток HEp-2 по флуоресценции ДБА (А) и данные по Люц-редуктазной активности клеточных оксидоредуктаз в различных клеточных линиях (Б). А. Образцы инкубировали с Люц (+Люц), AntA (AA), НАДН и NaCN (CN). Б. Люц-редуктазная активность дыхательной цепи (ДЦ), НАДН-зависимых цитозольных ферментов (НАДН-цитозоль) и НАДН оксидоредуктаз внешних отделов митохондрий (НАДН-ОММ), НАДН- и НАДФН-независимые системы (НАД(Ф)Н-незав) оценивали, как описано в тексте.

Полученные данные могут быть использованы для исследования роли НАДН оксидоредуктазы внешних отделов митохондрий в различных физиологических и патологических процессах, а также для оценки вклада этой системы в цитотоксический эффект некоторых ксенобиотиков. Метод может применяться для оценки НАДН оксидоредуктаз цитозоля и митросом в клетках.

*Анализ локализации продукции ДБА в клетках HEp-2 с помощью флуоресцентной микроскопии.* Использование Люц в качестве акцептора с добавлением внутриклеточных маркеров позволяет не только определить активность НАДН оксидоредуктаз, но и их локализацию в клетке. На рис. 4 представлены микрофотографии флуоресценции пермеабилizованных клеток HEp-2, обработанных митотрекером красным (MTR, митохондриальный маркер)

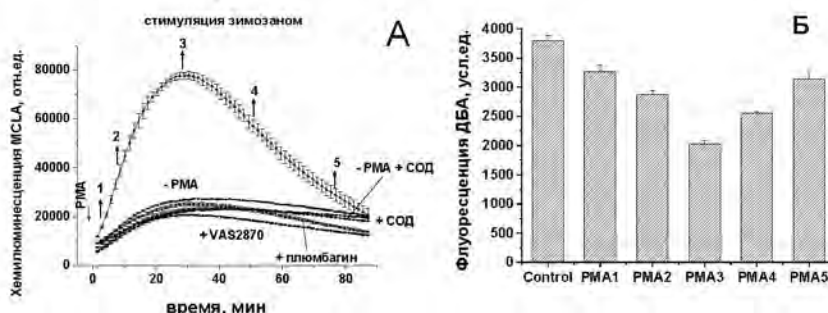
и люцигенином в присутствии НАДН, NaCN и Ant A. Видно, что НАДН оксидоредуктазная активность локализуется в митохондриях.



**Рисунок 4.** Верхний ряд. Визуализация активности НАДН оксидоредуктаз в пермеабилizованных клетках линии HEp-2. Визуализация участков с высокой НАДН оксидоредуктазной активностью на срезах гиппокампа мозга крысы пермеабилizованных дигитонином.

Таким образом, использование специфических маркеров клеточных органелл позволяет с помощью представленного метода определить локализацию НАДН оксидоредуктазной активности в клетках.

Применение разработанного метода для изучения НАДН оксидоредуктазной активности в клетках на срезах мозга. Описанный выше метод позволяет определять активность НАДН оксидоредуктаз на срезах мозга и других тканях, оценить гетерогенность НАДН оксидоредуктазной активности в тканях. Оксидоредуктазная активность была рассмотрена на срезах гиппокампа, пермеабилizованных дигитонином, проинкубированных с Люц, НАДН и MTR. Как следует из рис. 4, СА3-пирамидальные нейроны отличаются от окружающих клеток и структур яркой флуоресценцией ДБА, что говорит о высокой активности НАДН оксидоредуктаз. Таким образом, НАДН-зависимое восстановление Люц до флуоресцентного ДБА является удобным экспресс-методом для анализа и определения локализации НАДН оксидоредуктазной активности на срезах тканей.



**Рисунок 5.** Эффект ингибиторов NOX на продукцию супероксид-аниона (А.) и образование ДБА (Б) в макрофагах. А Стрелки с цифрами означают точки взятия клеток для оценки накопления в них ДБА (результаты на панели Б). Активатор NOX2 - форбол 12-миристал13 ацетат (PMA). Люминесценцию и флуоресценцию (Ex/Em 485/525 нм) измеряли при 37°C.

*Применение разработанного метода для анализа активности НАД(Ф)Н оксидаз фагоцитов (NOX2) и клеток почек (NOX4). Активность измерялась в фагоцитирующих клетках и почечной ткани, для которых характерна высокая экспрессия NOX2 и NOX4 (RenOx) соответственно. Важно, что NOX4 активна в виде гетеродимера с p22phox, тогда как NOX2 для активации требует ассоциации с p22phox, p67phox, p47phox, p40phox и Rac. Обнаружено, что образование ДБА в гомогенатах почек коррелирует с активностью NOX4 и подавляется ее специфическими ингибиторами (не показано). Напротив, как показано на рис. 5, повышение оксидазной активности NOX2 (образование  $O_2^*$ , MCLA) коррелирует со снижением продукции ДБА. По-видимому, это связано с ограниченной проницаемостью Люц к центру связывания собранного комплекса активной NOX2. Следовательно, по накоплению ДБА можно судить о соотношении активной/неактивной NOX2 в фагоцитах.*

Таким образом, разработан метод, который позволяет оценивать активность разнообразных НАД(Ф)Н оксидоредуктаз в различных системах: гомогенатах тканей, выделенных митохондриях, в живых и пермеабелизованных клетках, а также в срезах тканей. Использование специфических ингибиторов редуктаз и флуоресцентных маркеров клеточных компартментов позволяет определить местоположение НАД(Ф)Н оксидоредуктазной активности и связать ее с известными ферментами.

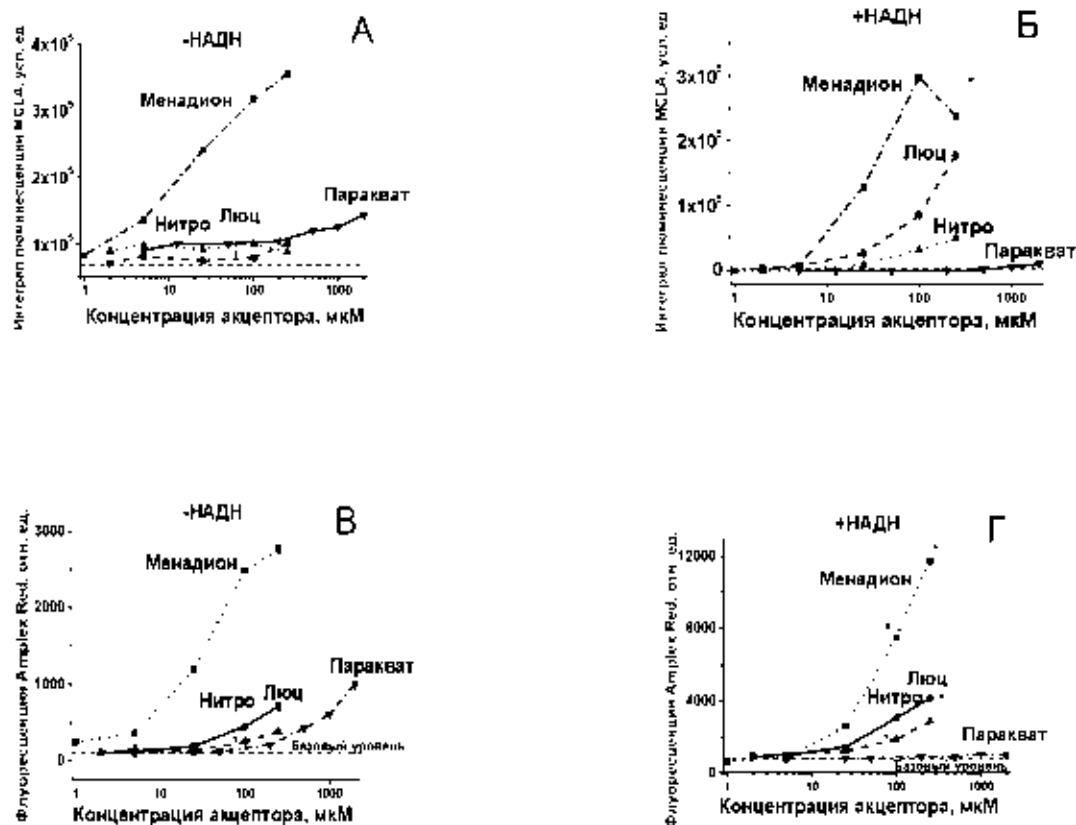
#### **НАДН оксидоредуктаза внешних отделов митохондрий индуцирует мРТР путем восстановления ксенобитиков. Роль АФК и радикалов ксенобитиков**

Известно, что НАДН оксидоредуктаза внешних отделов митохондрий в присутствии некоторых ксенобиотиков и НАДН способна продуцировать АФК с высокой скоростью. Известно также, что АФК являются индуктором мРТР. Далее рассмотрен эффект ряда ксенобиотиков и лекарственных препаратов на уровень АФК в митохондриях и скорость открывания мРТР.

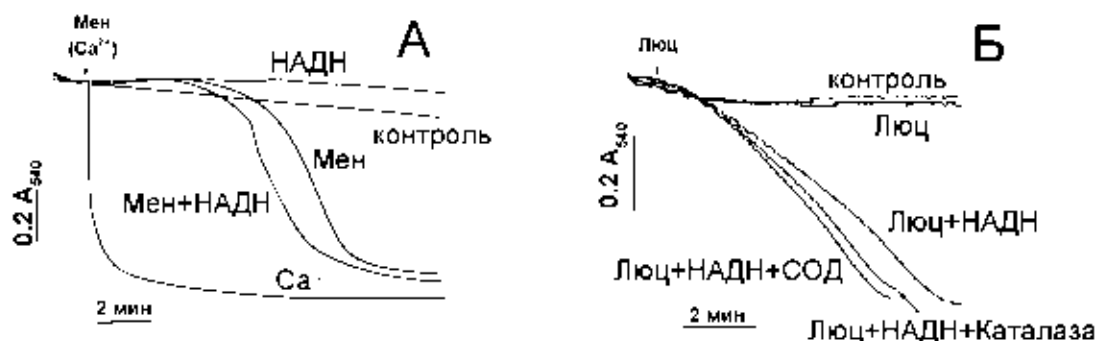
На рис. 6 показана продукция супероксид-аниона и гидропероксида интактными митохондриями в присутствии ксенобиотиков с добавлением и без добавления НАДН. Видно, что в присутствии ксенобиотиков продукция  $O_2^*$  и пероксида многократно увеличивается при добавлении НАДН, и при этом только менадион способен инициировать значительную продукцию АФК без НАДН. Паракват, как и другие ксенобиотики со стандартным редокс-потенциалом  $\leq 300$  мВ (арсеназо III, доксорубицин, даунорубицин (не показано)), активируется в основном внутренними дегидрогеназами, так как после добавления НАДН не увеличивается продукция ни  $O_2^*$ , ни гидропероксида. На рис. 7 показано открытие мРТР (набухание митохондрий) в присутствии внешнего НАДН и ксенобиотиков. Установлено, что менадион сам вызывает открытие мРТР, а НАДН лишь незначительно усиливает эффект. Напротив, слабый собственный эффект люцигенина и нитрофурантоина (не показано) сильно усиливался в присутствии внешнего НАДН. Важно, что ферменты антиоксидантной системы и условия аноксии не предотвращают набухание митохондрий при добавлении ксенобиотиков и НАДН (рис. 7, панель Б).

Данные результаты указывают на то, что НАДН оксидоредуктаза внешних отделов митохондрий восстанавливает ксенобиотики до радикалов, причем

последние не только усиливают продукцию АФК, но и индуцируют мРТР непосредственно. При этом АФК, образующиеся во внешних отделах, слабо влияют на формирование мРТР. Учитывая перенос электронов, описанный на рис. 2, можно заключить, что цитохром *c* межмембранного пространства играет важную роль в предотвращении окислительного повреждения митохондрий посредством АФК и радикалов ксенобиотиков, генерируемых НАДН редуктазой внешних отделов митохондрий.



**Рисунок 6.** Продукция  $O_2^{\cdot -}$  (А и Б) и пероксида водорода (В и Г) НАДН оксидоредуктазой внешних отделов митохондрий и внутренними дегидрогеназами митохондрий в присутствии редокс-активных ксенобиотиков интактными митохондриями. Люцигенин (Люц), нитрофурантонин (Нитро).



**Рисунок 7.** Эффект НАДН на набухание митохондрий в присутствии люцигенина и менадиона. Митохондрии (0,5 мг/мл) добавляли в стандартную среду инкубации, содержащую 250 мкМ НАДН, 5 мМ глутамат и 5 мМ малат, непосредственно перед началом измерения. Добавлены 100 мкМ люцигенин (Люц), 25 мкМ менадион (Мен), 250 мкМ CaCl<sub>2</sub> (положительный контроль индукции мРТР), СОД 30 U/мл, каталаза 100 U/мл. Представлены стандартные кривые одного из, как минимум, трех экспериментов.

Таким образом, НАДН оксидоредуктаза внешних отделов митохондрий в присутствии ксенобиотиков со стандартным редокс-потенциалом более  $-270$  мВ способна усиливать продукцию АФК и ускорять открывание мРТР посредством прямого действия радикалов ксенобиотиков на редокс-сенсоры мРТР.

### **Идентификация природы НАДН-зависимой редуктазы редокс-активных соединений и ксенобиотиков во внешних отделах митохондрий**

Согласно проведенным теоретическим исследованиям, на роль НАДН-зависимой оксидоредуктазы, ответственной за активацию ксенобиотиков во внешних отделах митохондрий, могут претендовать, в основном, четыре оксидоредуктазы: обсуждаемая в литературе ротенон-чувствительная НАДН оксидоредуктаза внешних отделов митохондрий кардиомиоцитов, потенциал-зависимый анионный канал (VDAC1), апоптоз индуцирующий фактор (AIF) и цитохром  $b_5$  оксидоредуктаза изоформа 3 (Cyt $b_5$ R3).

Ингибиторы AIF как оксидоредуктазы не известны, поэтому об участии AIF в редуктазной активности ксенобиотиков можно судить косвенно по эффектам блокаторов VDAC. AIF находится на внешней поверхности внутренней мембраны, поэтому блокаторы VDAC должны будут ингибировать продукцию АФК митохондриями в присутствии НАДН и ксенобиотиков, так как будут блокировать доступ доноров и акцепторов к активным центрам AIF. Но этого не было обнаружено при измерении продукции АФК митохондриями в присутствии НАДН, различных акцепторов и блокаторов VDAC. Таким образом пока не получено данных подтверждающих участие оксидоредуктаз межмембранного пространства (в частности AIF) в восстановлении ксенобиотиков.

### ***Ротенон-чувствительная НАДН оксидоредуктазная активность во внешних отделах митохондрий сердца***

Тканеспецифичная НАДН оксидоредуктаза сердца способна по литературным данным окислять цитозольный НАДН и при этом многократно увеличивать потребление кислорода [6]. Существование данной оксидоредуктазы проверялось с использованием падающей модели – кардиомиоцитов крыс, пермеабилizованных дигитонином. Добавки НАДН и НАДФН не стимулировали потребление кислорода. Этот результат указывает на то, что описанная в литературе тканеспецифичная НАДН оксидоредуктаза внешних отделов сердечных митохондрий, по-видимому, является артефактом, связанным с процедурой выделения митохондрий из плотной ткани. Зависимость НАДН оксидоредуктазной активности внешней мембраны митохондрий от ионной силы раствора указывает на то, что эта активность определяется Cyt $b_5$ R3, но не VDAC1.

Основными кандидатами на роль НАДН оксидоредуктазы внешней мембраны митохондрий являются VDAC1 и Cyt $b_5$ R3. Активность данных систем зависит от ионных взаимодействий. VDAC1 обладает анионной специфичностью, это дает основание предполагать, что по мере увеличения ионной силы (от 0 до нормальных значений в 150 мОсМ) будет увеличиваться доступ катионных акцепторов к активным центрам VDAC1. Поэтому, если

VDAC1 является НАДН оксидоредуктазой, следует ожидать увеличения восстановления катионных акцепторов с увеличением ионной силы среды. С другой стороны, ионные взаимодействия важны для функционирования  $Cyb_5R3$ , в частности, для связывания НАДН и передачи гидрид-иона на ФАД, для формирования, полностью восстановленного флавина (ФАДН<sup>-</sup>). Поэтому для  $Cyb_5R3$  при увеличении ионной силы следует ожидать ослабления взаимодействия катионных акцепторов с ферментом и снижение НАДН редуктазной активности. Как видно из представленных данных, восстановление нейтрального акцептора менадиона практически не зависело от ионной силы среды, восстановление анионного акцептора нитрофурантоина увеличивалось с увеличением ионной силы среды, а восстановление катионных акцепторов люцигенина и параквата значительно снижалось с увеличением ионной силы (Рис. 8, панель А).

Таким образом, представленные данные указывают на то, что НАДН оксидоредуктазная активность внешней мембраны митохондрий определяется ферментом  $Cyb_5R3$ , но не VDAC1.

### ***Специфические антитела к $Cyb_5R3$ подавляют НАДН оксидоредуктазную активность во внешних отделах митохондрий***

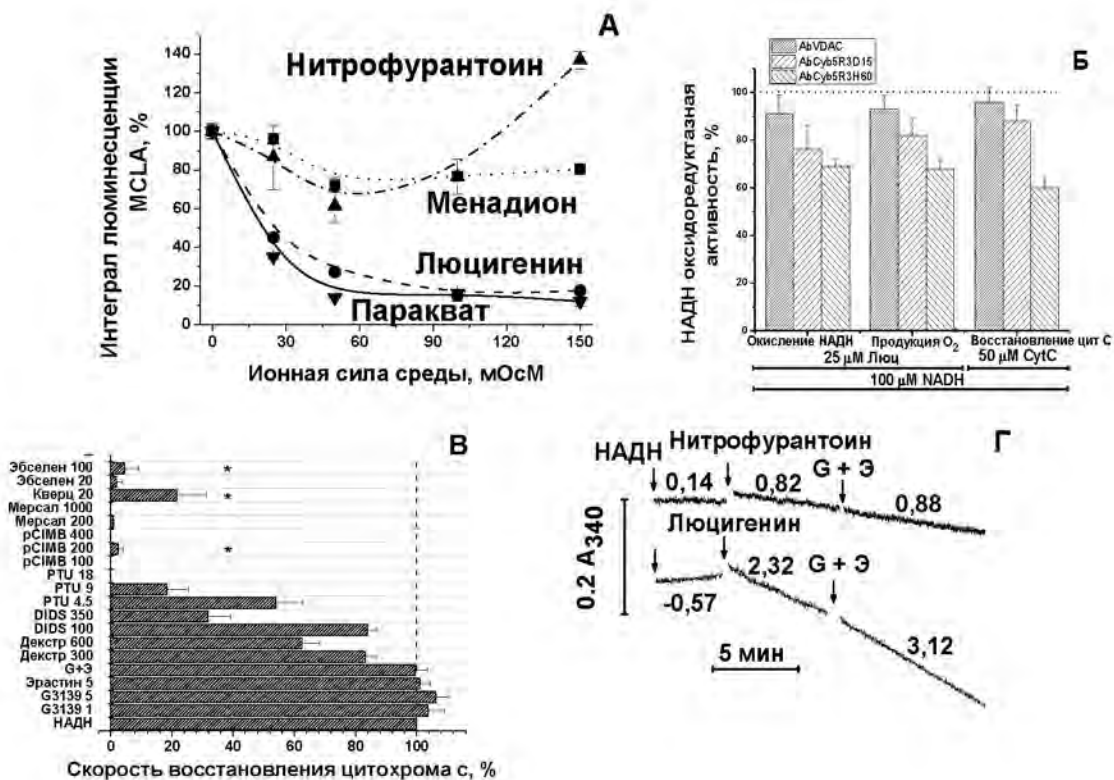
Исследовалось влияние антител к VDAC (изоформам 1-3) и к  $Cyb_5R3$  на Люц-зависимое окисление НАДН и продукцию  $O_2^{\cdot-}$ , а также на НАДН-зависимое восстановление добавленного цитохрома *c* в суспензии интактных митохондрий.

Антитела к VDAC имели аффинность к участку 185-197 аминокислотной последовательности, общему для всех изоформ. Антитела к  $Cyb_5R3$  были двух типов: первые были аффинны к N-концевому участку (остатки 1-60) (H-60), вторые - к аминокислотной последовательности, расположенной в середине цепи (остатки 150-200). Рис. 8, панель Б показывает, что только антитела к N-концевому эпитопу  $Cyb_5R3$  существенно подавляли все измеряемые НАДН-зависимые активности. Относительно низкая эффективность антител к внутренним эпитопам  $Cyb_5R3$ , предположительно, может объясняться низкой доступностью данных участков.

По многочисленным данным НАДН оксидоредуктаза внешних отделов митохондрий способна восстанавливать цитохром *c*. Эффект ингибиторов на НАДН-зависимое антимицин А-нечувствительное восстановление цитохрома *c*, представлено на рис.8, панель В.

Представленные результаты указывают, что G3139 и эрастин не имеют эффекта на восстановление цитохрома *c*, а ингибиторы  $Cyb_5R3$  эффективно подавляют НАДН-зависимое восстановление цитохрома *c*.

Полученные данные подтверждают определяющую роль  $Cyb_5R3$  как основной НАДН редуктазы внешней мембраны митохондрий, ответственной за активацию ксенобиотиков.



**Рисунок 8.** Панель А. Эффект ионной силы раствора на уровень  $O_2^{\cdot-}$ , генерируемого НАДН оксидоредуктазами внешних отделов митохондрий в присутствии катионных, анионных и нейтральных акцепторов. Панель Б. Эффект специфических антител к VDAC (изоформам 1-3) и к Cyt<sub>b</sub>3R3 на НАДН оксидоредуктазную активность внешних отделов митохондрий. Панель В. Эффект блокаторов VDAC и ингибиторов Cyt<sub>b</sub>3R3 на восстановление цитохрома с. Концентрации всех ингибиторов, кроме PTU, указаны в мкМ, PTU – в мМ. «G + Э» - 5 мкМ G3139 + 5 мкМ Эрастин. Скорость восстановления цитохрома с  $172 \pm 19,6$  нмол цитохром с в минуту на мг белка соответствует 100%. Звездочки показывают, что для полного подавления потребовался инкубационный период. Панель Г. Эффект блокаторов VDAC (G 3139 и Эрастина (G+Э)) на окисление внешнего НАДН, обусловленное редокс-активными соединениями в суспензии митохондрий. Числа над кривыми – скорость окисления, добавленного НАДН (нмоль/мин). Представлены графики одного из трех независимых экспериментов.

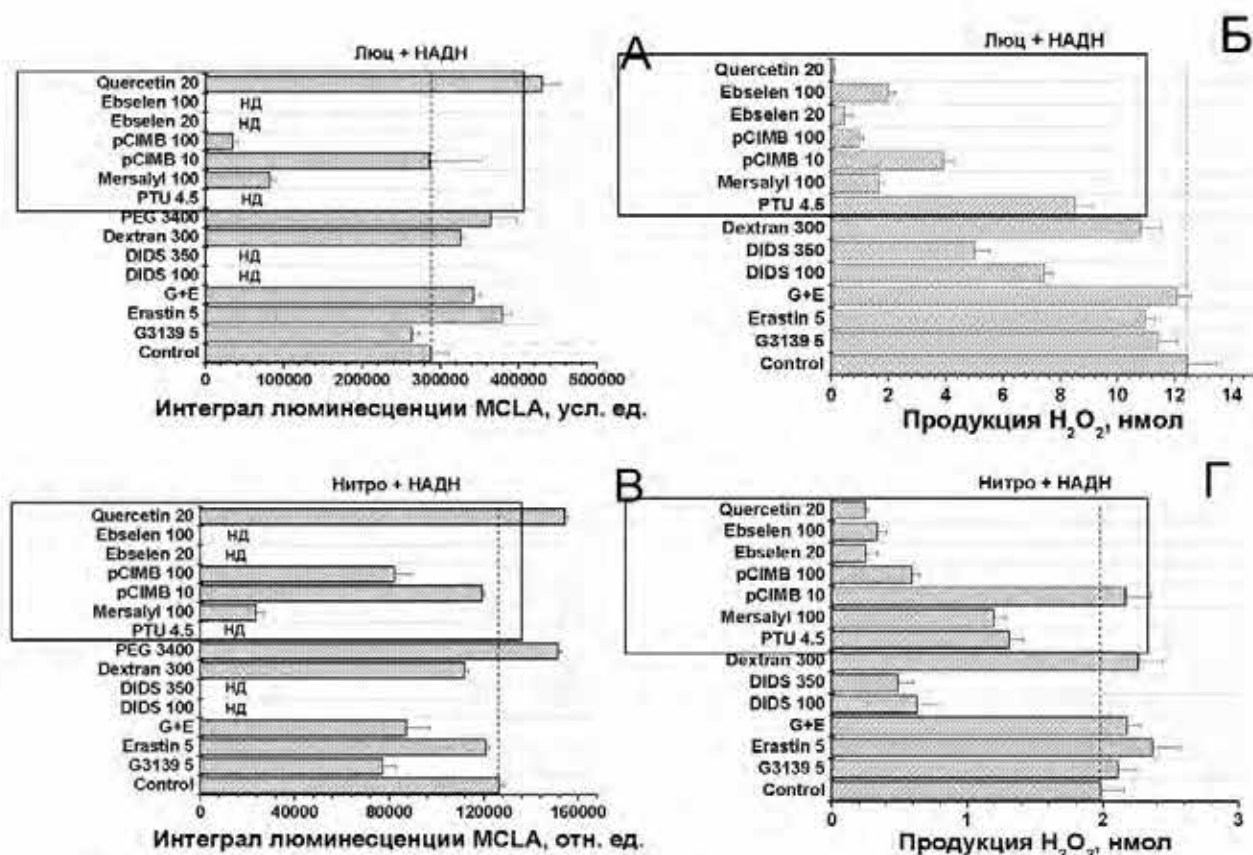
**НАДН оксидоредуктазная активность внешней мембраны митохондрий не связана с VDAC1, поскольку блокаторы VDAC1 не влияют на окисление НАДН в присутствии акцепторов**

Так как НАДН-связывающий сайт VDAC1 находится в просвете канала [3], блокаторы VDAC1 должны ингибировать окисление НАДН, вызванное редокс-активными соединениями, если VDAC1 отвечает за этот процесс. Как показано на рис. 8, панель Г, G3139 и эрастин в блокирующих концентрациях не способны ингибировать окисление НАДН в суспензии митохондрий в присутствии люцигенина и нитрофурантоина (ДЦ митохондрий была ингибирована антимицином А и миксотиазолом).

Таким образом, отсутствие ингибиторного эффекта комбинации G3139 и эрастина в концентрациях, соответствующих полной блокировке доступа субстратов и акцепторов к активному центру VDAC1, говорит о том, что VDAC1 не участвует в восстановлении редокс-активных соединений.



## Эффекты ингибиторов $Cyb_5R3$ и блокаторов VDAC на НАДН оксидоредуктазную активность



**Рисунок 9.** Эффект блокаторов VDAC1 и ингибиторов  $Cyb_5R3$  на продукцию  $O_2^{\bullet-}$  и гидропероксида НАДН оксидоредуктазой внешних отделов митохондрий в присутствии люцигенина (Люц) или нитрофурантоина (Нитро). Продукция  $H_2O_2$  митохондриями (0,4 мг. белка/мл) измерялась в течение 15 мин. с помощью Amplex Red. Обведены ингибиторы  $Cyb_5R3$ . Концентрации всех ингибиторов, кроме PTU, указаны в мкМ, PTU – в мМ.

Рисунок 9 демонстрирует эффекты блокаторов VDAC и ингибиторов  $Cyb_5R3$  на продукцию АФК НАДН оксидоредуктазой внешних отделов изолированных митохондрий в присутствии Люц и нитрофурантоина. Как видно из рис. 9, специфичные блокаторы VDAC G3139 и эрастин (отдельно или в комбинации) в концентрациях, достаточных для блокирования проницаемости VDAC, а также декстран, имели минимальный эффект на продукцию  $O_2^{\bullet-}$  (А, В) и гидропероксида (Б, Г) в присутствии Люц и нитрофурантоина. Напротив, ингибиторы  $Cyb_5R3$  (Эбселен, *p*,Cl-меркурий бензоат, мерсалиловая кислота, PTU) сильно подавляли генерацию АФК. Среди блокаторов VDAC только DIDS подавлял люцигенин-зависимую продукцию АФК, что ожидаемо, поскольку DIDS неселективный SH-агент, а значит может подавлять хемилюминесценцию используемого зонда на супероксидный анион [5].

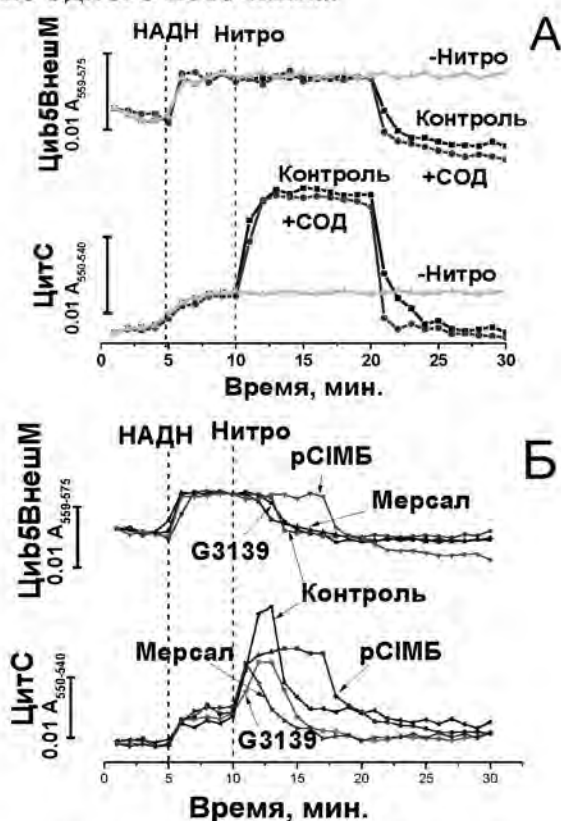
*Динамика окислительно-восстановительного состояния эндогенных цитохромов в присутствии акцепторов, ингибиторов  $Cyb_5R3$  и блокаторов VDAC1 указывает на участие  $Cyb_5R3$  в восстановлении ксенобиотиков*

Рассмотрена динамика окислительно-восстановительного состояния эндогенных цитохромов (цитохрома  $b_5$  внешней мембраны и цитохрома  $c$

межмембранного пространства) в процессе окисления внешнего НАДН и восстановления акцептора, для исследования механизма восстановления ксенобиотиков во внешних отделах митохондрий, а также для определения фермента, отвечающего за этот процесс. Использовали нитрофурантоин, так как он не образует нерастворимые продукты, как люцигенин (рис. 10).

Как следует из рисунка 10, добавление НАДН вызывало восстановление эндогенного цитохрома  $b_5$  (панель А). Добавление нитрофурантоина вызывало быстрое СОД-нечувствительное восстановление цитохрома  $c$ . Эндогенные цитохром  $c$  и  $b_5$  окислялись сразу после окисления НАДН.

Ингибиторы  $Cyb_5R3$  (добавлены перед измерениями) оказывали различное влияние на редокс-состояние эндогенного цитохрома  $b_5$  (панель Б): мерсалиловая кислота ускоряла окисление,  $pClMB$  и остальные ингибиторы (не показано) замедляют окисление цитохрома  $b_5$ . Важно, что эффект ингибиторов на восстановление цитохромов  $b_5$  и  $c$  был одинаковым. Следовательно, нитрофурантоин и цитохром  $b_5$  внешней мембраны митохондрий получают электроны из одного источника.



**Рисунок 10.** Эффект ингибиторов  $Cyb_5R3$  и блокаторов  $VDAC1$  на НАДН – и нитрофурантоин – зависимое изменение редокс-состояний внутренних цитохромов  $b_5$  и  $c$ . Нитрофурантоин (Нитро), мерсалиловая кислота (мерсал),  $pCl$ -меркурийбензоат ( $pClMB$ ).

Специфичные блокаторы  $VDAC1$  – G3139 и эрастин не оказывали какого-либо эффекта на восстановление цитохрома  $b_5$  или его нитрофурантоин-зависимое окисление. Уменьшение восстановления цитохрома  $c$  указывает, что  $VDAC$  является главным путем через внешнюю мембрану митохондрий для радикалов редокс-активных соединений, генерируемых НАДН оксидоредуктазой внешних отделов митохондрий.

Таким образом, представленные данные однозначно показывают, что  $VDAC1$  не участвует в восстановлении ксенобиотиков, а  $Cyb_5R3$  является

основной НАДН–зависимой редуктазой редокс-активных соединений во внешней мембране митохондрий.

### Заключение

В данной главе описан метод регистрации активности НАДН оксидоредуктазы внешних отделов митохондрий, основанный на восстановлении люцигенина до водонерастворимого флуоресцирующего продукта ДБА. Продемонстрированы возможности данного метода на различных объектах и для других ферментных систем.

Некоторые ксенобиотики способны вызывать продукцию  $O_2^{\cdot-}$  и формирование мРТР в митохондриях в присутствии НАДН. Среди исследуемых соединений, вещества со стандартным редокс-потенциалом более  $-270$  мВ усиливали продукцию АФК и ускоряли открывание мРТР посредством прямого действия радикалов ксенобиотиков на редокс-сенсоры мРТР. Цитохром *c* является скавенджером радикалов ксенобиотиков, оказывая, тем самым, протекторное действие.

НАДН-зависимой системой, отвечающей за активацию ксенобиотиков во внешних отделах митохондрий является  $Cy b_5R3$ . Этот результат очень важен, так как до сих пор механизм побочных действий некоторых ксенобиотиков был неизвестен, поэтому было невозможно искать способы предотвращения побочных эффектов.

### Материалы и методы исследования

**Объект исследования.** Работу проводили на культурах клеток (HEp-2, HL 60, Colo 320 HSR, U251MG), выделенных макрофагах и нейтрофилах, гомогенатах печени и почек, интактных митохондриях и срезах тканей.

**Нейтрофилы** выделяли из крови крыс с применением сочетания гипотонической обработки и центрифугирования в градиенте фекол-урографин [7].

**Макрофаги** выделяли из брюшной полости крыс после их активации путем инъекции зимозана [8].

**Кардиомиоциты** выделяли из сердец крыс путем разрушения ткани проназой и коллагеназой [9].

**Гомогенаты печени и почек** получали путем измельчения ткани в изотонической сахарозно-маннитольной среде с последующей очисткой от ядер центрифугированием (8 мин  $\times$  600g).

**Митохондрии (rat liver mitochondria, RLM)** выделяли из печени самцов крыс стандартным методом дифференциального центрифугирования [10]. Повреждение внешней митохондриальной мембраны моделировали аламетицином.

**Оценку количества повреждённых митохондрий** проводили путем сравнения скорости восстановления добавленного цитохрома *c* с условно интактными митохондриями и полностью пермеабелизованными.

**Количество белка** в полученных препаратах митохондрий и гомогенатов определяли биуретовым методом [11].

**Срезы мозга** крыс толщиной 150 мкм делали перпендикулярные оси головного мозга с помощью вибротома Leica VT1200S (Leica).

**Уровень супероксид-аниона** измеряли по СОД-зависимой хемилюминесценции высокоселективного и чувствительного зонда 2-метил-6-(p-

метоксифенил)-3,7-дигидроксиимидазол [1,2- $\alpha$ ]пирозин-3-он (MCLA) в концентрации 10-20 мкМ [12].

**Скорость продукции гидропероксида** измеряли флуоресцентными зондами 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетатом (DCFDA) [13] и Amplex Red [14] по накоплению флуоресцирующих продуктов.

**Набухание митохондрий** определяли по светорассеянию с помощью прибора Cary 100 Scan spectrophotometer (Varian Australia Pty LTD, Australia) при длине волны 540 нм.

**Для регистрации потребления кислорода, изменения трансмембранного потенциала митохондрий** использовали термостатируемую ячейку со встроенным ионоселективным электродом (TPP) и электродом Кларка для измерения кислорода в среде [15].

**Окисление добавленного НАДН** регистрировали по интенсивности флуоресценции (Ex 340/Em 460–480 нм), а также по уменьшению абсорбции при длине волны 340 нм.

**Восстановление эндогенного и экзогенного цитохрома c** регистрировали по увеличению абсорбции при длине волны 550 нм относительно таковой при 540 нм. Для оценки степени восстановленности цитохрома *b<sub>5</sub>* измеряли абсорбцию при 559 и 575 нм соответственно [16].

**Восстановление люцигенина** регистрировали по уменьшению абсорбции при длине волны 368 нм и по накоплению флуоресцентного восстановленного продукта ДБА (Ex 488нм/Em 513нм).

**Флуоресцентная микроскопия** использовалась для оценки клеточных культур и срезов мозга, применяли конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 (Leica, Германия).

#### **Статистическая обработка**

Результаты исследований представлены в виде среднего  $\pm m$ , где  $m$  - стандартная ошибка среднего. Достоверность отличия выборок экспериментальных данных, а также средних значений, оценивали с помощью критерия Уилкоксона для выборок с попарно связанными вариантами либо критерия Уитни-Манна для независимых выборок. Все эксперименты проводились не менее чем в трех повторах ( $n \geq 3$ ).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-34-01158 мол\_а и грантом Правительства РФ №14.Z50.31.0028.

#### **Список литературы**

1. Kruglov AG, Subbotina KB, Saris NE (2008). *Free Radic Biol Med*. 44(4),646-56.
2. Vásquez-Vivar J, Santos AM, Junqueira VB, Augusto O (1996). *Biochem J*. 314,869-76.
3. Baker MA, Ly JD, Lawen A (2004). *Biofactors*. 21(1-4),215-21
4. Mircvičienė L, Amsevičius Z, Salmuskas J, Sevrioukova IF, Černis N (2011). *Arch Biochem Biophys*. 512(2),183-9.
5. Kruglov AG, Nikiforova AB, Shatalin YV, Shubina VV, Fisyyuk AS, Akatov VS (2010). *Anal Biochem*. 406(2),230-232.
6. Nohl H, Schonheit K (1996). *Archives of biochemistry and biophysics*. 331,259–264.
7. Sienssen DW, Schepetkin IA, Kirpotina LN, Lei B, Quinn MT (2007). *Neutrophil Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. 412. 21–34.
8. Zhang X, Gomeslves R, Mosser DM (2008). *Curr. Protoc. Immunol*. 1,10–15.
9. Yang BC, Zander DS, Mehta JL (1999). *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 291,733-738.
10. Johnson CL, Mauritzen CM, Starbuck WC, Schwartz A (1967). *Biochemistry*. 6(4),1121-7.
11. Walker J (1994). *Methods Mol Biol*. 32,5-8.
12. Kambayashi Y, Ogino K (2003). *J. Toxicol. Sci*. 28,139–148.
13. LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC (1990). *Toxicol Appl Pharmacol*. 104(1),17-24.
14. Perschke H, Broda E (1961). *Nature*. 190,257-258.
15. Teplova VV, Mikkola R, Toushin AA, Saris NE, Salkinoja-Salonen MS (2006). *Toxicol Appl Pharmacol*. 210(1-2),39-46.
16. Nikiforova AB, Saris NE, Kruglov AG (2014). *Free Radic Biol Med*. 74,74-84.

## **Глава II. РОЛЬ СУБЪЕДИНИЦЫ c В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ НЕСЕЛЕКТИВНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ**

Одинокова И.В.<sup>1</sup>, Крестинина О.В.<sup>1</sup>, Бабурина Ю.Л.<sup>1</sup>, Азарашвили Т.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФАНО ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

### **Аннотация**

Известно, что открытие неселективной поры во внутренней мембране митохондрий (mPTP) является ключевым этапом гибели клеток, осуществляемой путем некроза или апоптоза. Многочисленные исследования подтверждают участие mPTP в развитии ишемии-реперфузии, мышечной дистрофии и нейродегенеративных заболеваний. Однако данные о структурной организации поры до сих пор оставались весьма противоречивыми. В последнее время появилось множество работ, показывающих, что в формировании проводящего канала в составе mPTP принимает участие субъединица c F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> АТФ-синтетазы – сложноорганизованного митохондриального комплекса, осуществляющего синтез АТФ. Наши исследования показали, что регуляция неселективной поры может осуществляться путем фосфорилирования/дефосфорилирования субъединицы c. Дефосфорилированная форма субъединицы c может индуцировать пассивный ионный транспорт через внутреннюю митохондриальную мембрану в результате нарушения взаимодействия F<sub>0</sub> и F<sub>1</sub> секторов F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФазы. Однако конкретный механизм превращения АТФазы из АТФ-синтезирующей машины в устройство разрушения митохондрий требует дальнейших исследований.

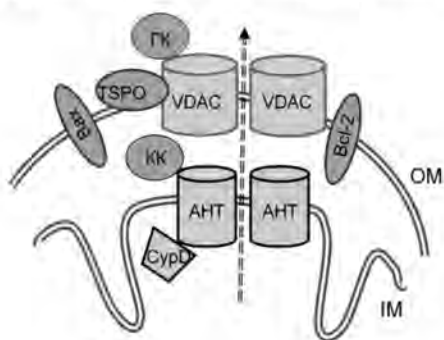
### **Введение**

Энергозависимая аккумуляция в матриксе митохондрий ионов Ca<sup>2+</sup> выше определенного критического уровня в присутствии повреждающих стимулов приводит к резкому изменению проницаемости митохондриальной мембраны вследствие открывания во внутренней мембране особой неспецифической поры, так называемой Permeability Transition Pore (mPTP). В результате открывания mPTP митохондриальная мембрана становится проницаемой для ионов и растворенных веществ с молекулярным весом до 1.5 кДа, происходит выравнивание ионных градиентов на внутренней мембране митохондрий, в том числе и выход из митохондриального матрикса, ранее аккумуляированного Ca<sup>2+</sup>, что приводит к коллапсу митохондриального мембранного потенциала, снижению синтеза АТФ митохондриями и, в конце концов, к набуханию митохондрий.

### **История исследования феномена PTP**

Впервые набухание изолированных митохондрий в присутствии ионов кальция и фосфата было описано в 50х годах прошлого века [1, 2], а сам термин в англоязычной литературе был введен в 1976 году, когда Хантер с коллегами [3] тщательно охарактеризовали это явление и предположили существование особенной неселективной поры во внутренней мембране митохондрий. На протяжении следующих десятилетий многие, в том числе и ведущие, митохондриологи занимались исследованиями регуляции открывания PTP, сс

механизма и структуры. Были установлены основные индукторы и ингибиторы поры, а к 90м годам группы Кромптона [4] и Пфайффера [5] обнаружили, что субмикромольные концентрации иммуномодулятора циклоспорина А (CsA)



**Рисунок 1.** Классическая схема строения ПТР. ОМ – внешняя мембрана, ИМ – внутренняя мембрана, VDAC – вольт-зависимый анионный канал, АНТ – транслокатор адениновых нуклеотидов, CypD – циклофилин Д, GK – гексокиназа, KK – креатинкиназа, TSPO – 18 кДа транслокаторный белок, Bcl-2, Bax – анти- и проапоптотические белки семейства Bcl-2.

существенно тормозят открытие мПТР, что вероятно связано с его взаимодействием с циклоспорином Д - матриксным белком, проявляющим цистранс пептидоизомеразную активность [6]. Ранняя белковая модель мПТР включала также транслокатор адениновых нуклеотидов (АНТ) из внутренней и вольт-зависимый анионный канал (VDAC) из внешней митохондриальной мембраны. Участие АНТ в формировании мПТР было предложено на основании наблюдений, что высокоаффинные и специфические лиганды АНТ, а именно, атрактилозид и карбоксиатрактилозид, бонгкрековая кислота, а также АДФ, ацил-CoA, пиридоксаль-5'-фосфат, связывающиеся с АНТ, влияют на мПТР [7]. В то же время на основании экспериментов, проводившихся на митопластах, предположили, что при использованных специфических условиях, увеличение проницаемости мембраны могло происходить из-за вовлечения молекул порина (VDAC) из внешней мембраны во внутреннюю, возможно, через участки контактов мембран, что было подтверждено в более поздних работах [8]. Гипотеза о образовании мПТР в особенных участках контакта внешней и внутренней мембраны, так называемых контактных сайтах, была сформулирована Брджикой и коллегами, они также показали, что в формировании поры принимают участие гексокиназа со стороны внешней мембраны и креатинкиназа из межмембранного пространства [9]. Кроме того, белок 18 кДа транслокаторный белок TSPO, или периферический бензодиазепиновый рецептор, который локализуется во внешней мембране митохондрий, был обнаружен во фракциях VDAC и АНТ при их выделении, а электрофизиологические эксперименты показали, что наномольные концентрации лигандов TSPO способны модулировать проводимость ионных каналов на внутренней митохондриальной мембране [10]. В то же время было продемонстрировано, что белки семейства Bcl-2 принимают участие в регуляции функционирования мПТР: антиапоптотические белки вызывали ингибирование открытия поры [11], а проапоптотические инициировали его [12]. Таким образом к концу 20 века на основании ингибиторного анализа и исследования проводимости мембран в присутствии различных белковых компонентов

сформировалось устойчивое представление о строении неселективной митохондриальной поры как комплекса, состоящего из VDAC, АНТ, циклофилина D, гексокиназы, креатинкиназы, TSPC и регуляторных белков семейства Bcl-2.

Однако с развитием молекулярно-генетических методов, приведших к возможности создания модельных клеток и даже организмов с заданной активностью тех или иных генов, привело к тому что ставшая было ясной модель поры снова усложнилась. Так одновременно в нескольких лабораториях были проведены эксперименты на митохондриях, изолированных из мышей с выключенным геном *ppif*, кодирующим циклофилин D. Эти эксперименты продемонстрировали, что в отсутствие циклофилина D митохондрии становятся менее чувствительны к  $Ca^{2+}$ , т.е. необходимы гораздо более высокие концентрации ионов  $Ca^{2+}$  для открывания поры, при этом циклоспорин А не оказывал своего ингибирующего действия [13-15]. Позднее было опубликовано множество работ, продемонстрировавших, что мыши с отсутствующим геном циклофилина D становятся более устойчивыми к патологиям, связанным с мРТР, таким как ишемия-реперфузия в разных типах тканей [13, 15], модель болезни Альцгеймера у мышей [16], дегенеративные явления, вызванные перегрузкой митохондрий кальцием, например, при мышечной дистрофии [17], а также при некрозе тканей поджелудочной железы при остром панкреатите [18]. Таким образом, циклофилин D и сейчас считается важнейшим регуляторным компонентом неселективной митохондриальной поры.

Выключение сразу двух генов, кодирующих разные изоформы АНТ (АНТ-1 и АНТ-2), в печени мышей, показало, что в митохондриях печени по-прежнему наблюдается индукция мРТР, которая тем не менее не зависит от ингибиторов транслоказы, ингибируется циклоспорином А и стимулируется большими количествами кальция, как и в случае с циклофилином D [19]. Поэтому было принято, что АНТ может являться только регуляторным, а не структурным компонентом поры. Также было показано, что у модельных мышей с инактивированными генами, кодирующими все три изоформы VDAC, характеристики мРТР не отличались от контрольных животных, а фибробласты с дефицитом VDAC под воздействием проапоптотических белков Bax и Bid проявляли тот же самый ответ (выход цитохрома, активация каспаз, клеточная гибель), что и контрольные клетки [20]. Эти исследования позволили исключить порин из кандидатов, определяющих структуру поры.

Еще одним кандидатом на роль белка с внутренней мембраны, формирующего пору, некоторое время считался фосфатный переносчик в силу того, что фосфат сильно повышает вероятность открывания поры [21]. Однако, генетические эксперименты показали, что и этот компонент внутренней митохондриальной мембраны не является структурообразующим элементом поры [22], оставаясь при этом ее регулятором.

Таким образом, к последнему десятилетию исследователи пришли с довольно большим числом доказанных кандидатур на роль регуляторов неселективной поры, но все еще не имея ни одного претендента на роль структурного компонента мРТР. Новейшая гипотеза, разрабатываемая в последние годы несколькими независимыми группами, предлагает считать ключевым пороформирующим элементом РТР митохондриальную  $F_0F_1$ -

АТФазу, либо в виде димера [23], либо в виде части домена  $F_0$  – мембранного кольца, состоящего из субъединиц  $c$  [24-27].

### **Митохондриальная $F_0F_1$ -АТФаза – строение и функционирование** **Субъединичная структура АТФазы**

АТФаза (или АТФ-синтетаза) – это макромолекулярный комплекс, присутствующий в мембране бактерий, хлоропластов и митохондрий, при работе которого энергия, аккумулированная в виде разности электрохимических потенциалов на мембране, используется для химического синтеза молекул АТФ из АДФ и фосфата. Комплекс АТФазы из разных организмов имеет несколько варьирующийся субъединичный состав, но общие принципы строения и работы. Митохондриальная АТФ-синтетаза встроена во внутреннюю мембрану и в ее состав входят около 15 отдельных полипептидов, формирующие два основных домена  $F_1$  и  $F_0$  с общей молекулярной массой около 600 кДа [28]. Фактор  $F_1$  прикреплен к мембране со стороны матрикса и является каталитической частью АТФазы, т.е. осуществляет собственно синтез АТФ, а фактор  $F_0$  представляет собой комплекс включенных в мембрану гидрофобных белков, формирующих протон-проводящие каналы. Методом рентгеноструктурного анализа была получена картина пространственной организации комплекса  $F_1$ , выделенного из митохондрий бычьего сердца [29]. Он состоит из девяти субъединиц пяти типов –  $3\alpha$ ,  $3\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ . Полипептидные цепи субъединиц  $\alpha$  и  $\beta$  уложены в сходные по строению белковые глобулы, которые все вместе образуют гексамер  $(\alpha\beta)_3$ . Этот ансамбль, состоящий из шести субъединиц, имеет вид сплюснутого шара, в центре которого находится субъединица  $\gamma$ , образованная двумя протяженными полипептидными цепями, представляющими собой N- и C-концевые  $\alpha$ -спирали. Другая часть субъединицы  $\gamma$  выступает в сторону мембранного домена, формируя так называемую «ножку», в состав которой входят также минорные субъединицы  $\delta$  и  $\epsilon$ . Субъединица  $\delta$  с  $\beta$ -складкой на N-конце и  $\alpha$ -спиральной шпилькой на C-конце располагается напротив N- и C-концевых спиралей субъединицы  $\gamma$ , а субъединица  $\epsilon$  – между двумя доменами субъединицы  $\delta$ , обеспечивая связь между ними [30]. Таким образом формируется единая центральная ось, связывающая  $F_1$  и  $F_0$  сектора АТФ-синтетазы.

Мембранный фактор  $F_0$  служит основанием, которое удерживает АТФазу в мембране. Наиболее точная пространственная структура этого комплекса расшифрована для бактерий, например, простейшее строение имеет  $F_0$  фактор *E. coli*, имеющий в своем составе полипептидные субъединицы трех типов –  $a$ , две копии  $b$  и  $b'$ , и 10 идентичных копий субъединиц  $c$ . Эти субъединицы универсальны по строению и входят в состав  $F_0F_1$ -АТФаз бактерий, хлоропластов и митохондрий, различия наблюдаются лишь в числе мономеров субъединицы  $c$ , формирующих мембранное кольцо, которое варьирует от 8 в митохондриях млекопитающих до 15 у цианобактерий [31]. Субъединица  $a$  гидрофобна и почти полностью погружена в мембрану; ее полипептидная цепь образует пять  $\alpha$ -спиральных участков, которые пересекают мембрану [32]. Каждая из 8-15 копий субъединицы  $c$  представляет собой относительно небольшой белок, состоящий из двух гидрофобных  $\alpha$ -спиралей, соединенных друг с другом короткой гидрофильной петлей, ориентированной в сторону  $F_1$



[33]. Субъединицы *c* образуют единый ансамбль, имеющий форму цилиндра, погруженного в мембрану. Выступающая из комплекса  $F_1$  в сторону  $F_0$  субъединица  $\gamma$  погружена внутрь этого цилиндра и достаточно прочно закреплена. Субъединицы *a* и *c* находятся в непосредственной близости друг к другу и образуют протон-проводящий путь [34]. Субъединица *b* содержит сравнительно короткий двухдоменный  $\alpha$ -спиральный участок на N-конце, который погружен в мембрану [35], остальная часть этой субъединицы, представляющая собой гидрофильный C-конец, заметно выступает из мембраны в матрикс и связывается с субъединицей OSCP (протеин, придающий чувствительность к олигомицину), которая располагается на вершине комплекса  $F_1$ , а также с субъединицами *d* и  $F_6$  [36], образуя так называемый периферический стержень. Кроме того,  $F_0$  сектор митохондриальной АТФазы содержит несколько небольших субъединиц: *e*, *f*, *g*, и A6L, значение которых для работы фермента пока точно не установлено, предполагается лишь, что субъединицы *e* и *g* принимают участие в димеризации  $F_0F_1$ -АТФазы [37]. Недавно были обнаружены еще две субъединицы – DAPIT, диабет-ассоциированный белок инсулин-чувствительных тканей, и 6.8 кДа субъединица, характерная для бычьей АТФазы [38]

### **Принципы работы АТФ-синтазы**

На основании структурных особенностей АТФазы исследователи нескольких независимых групп более 30 лет назад предположили, что она функционирует как некая электро-механохимическая молекулярная машина, работа которой связана с ее вращением. В составе фермента было выделено 2 группы субъединиц, одна из которых образует неподвижный относительно мембраны статор мотора, а другая – ротор, вращающийся внутри статора. К ротору относятся субъединицы  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$  сектора  $F_1$ , формирующие центральную ось мотора, а также субъединица *c* сектора  $F_0$  [37]. Статор включает в себя гексамер  $\alpha_3\beta_3$  и оставшиеся субъединицы  $F_0$  домена: *a*, *e*, *f*, *g*, A6L, DAPIT, 6.8 кДа, прочно закрепленные в мембране, а также *b*, *d*,  $F_6$  и OSCP, которые формируют периферический стержень, связывающий каталитический гексамер и транс-мембранную часть статора [39]. Эффектные и убедительные эксперименты, призванные доказать гипотезу вращения, были поставлены японскими учеными на единичном комплексе  $F_1$  [40]. С помощью микроскопа они наблюдали вращение меченого флуоресцентным красителем актинового филамента, присоединенного к субъединице  $\gamma$ , относительно иммобилизованного на стекле субдомена  $\alpha_3\beta_3$ . Было обнаружено, что это вращение является однонаправленным и зависит от режима работы АТФазы: при гидролизе АТФ происходит вращение против, при синтезе АТФ – по часовой стрелке. Также было показано, что вращение происходит дискретно с шагом в  $120^\circ$ , и в результате одного шага синтезируется/гидролизуется одна молекула АТФ.

На основании этих данных Junge продолжил модель механизма, с помощью которого АТФаза синтезирует АТФ [41]. Транспорт ионов  $H^+$  по градиенту электрохимического потенциала вызывает вращение ротора, в результате которого происходят конформационные изменения в статоре,

приводящие к синтезу АТФ из АДФ и  $\Phi_n$ , связанных с активными центрами фермента и освобождению АТФ в матрице митохондрий.

Ионы водорода движутся по градиенту электрохимического потенциала через специальный протонный канал АТФ-синтетазы, который расположен на границе между субъединицами  $a$  и  $c$ . Главную роль в работе протонного канала АТФазы играют консервативные аминокислоты субъединиц  $a$  и  $c$ , содержащие протонируемые группы, способные присоединять протон из кислоты и отдавать его в щелочную область. У *E. coli* ключевую роль в переносе протонов через АТФазу играет карбоксильная группа аспарагиновой кислоты, расположенной на субъединице  $c$  (асп61). Блокирование этой аминокислоты дициклокарбоксидимидом приводит к подавлению ферментативной активности АТФазы, а замена остатка аспарагиновой кислоты на остаток аспарагина предотвращает транслокацию  $H^+$  [42]. Второй аминокислотой, связанной с переносом протонов, является аргинин (арг210), входящий в состав субъединицы  $a$ , что было также подтверждено с помощью метода направленного мутагенеза [43]. В настоящее время принята модель так называемого полуканального транспорта протона, где два полуканала образованы трансмембранными  $\alpha$ -спиралями субъединицы  $a$  [41], имеют выходы к противоположным сторонам мембраны и соприкасаются с двумя разными субъединицами  $c$ . Протон входит в полу-канал с внешней стороны (периплазма бактерий или межмембранное пространство митохондрий), где нейтрализует отрицательный заряд карбоксильной группы аминокислот находящейся там субъединицы  $c$ . Нейтральная субъединица  $c$  теряет сродство к расположенному рядом положительно заряженному участку  $\alpha$  спирали субъединицы  $a$  и движется в сторону гидрофобного липидного бислоя, освобождая место во внешнем канале для следующей субъединицы  $c$ , генерируя таким образом вращение всего  $c$ -кольца. Тем временем, протонированная субъединица достигает второго полу-канала, где под влиянием щелочной среды протон высвобождается в матрице митохондрий, или в цитоплазму в случае бактериальной АТФазы [44]. Число протонов, необходимых для поворота  $c$ -кольца на  $360^\circ$ , равно числу субъединиц, входящих в его состав. Это вращение передается на  $\gamma$  субъединицу  $F_1$  сектора АТФазы, нижняя часть которой связана с гидрофильными петлями субъединиц  $c$ ; стабильность этой связи придают субъединицы  $\delta$  и  $\epsilon$  входящие в состав центральной оси ротора [45]. Верхняя часть  $\gamma$  субъединицы располагается в полости, образованной гексамером  $\alpha_3\beta_3$ , и ее вращение внутри этого комплекса приводит к тому, что каждая из трех каталитических  $\beta$ -субъединиц поочередно находится в одном из трех конформационных состояний, различающихся по степени сродства молекул АТФ, АДФ и  $\Phi_n$  к каталитическому центру, что в итоге приводит к синтезу трех молекул АТФ на каждый полный поворот роторной части фермента [45].

Первым шагом в цепи реакций, ведущих к синтезу АТФ является связывание молекул АДФ и  $\Phi_n$  активным центром свободной  $\beta$ -субъединицы, находящейся в состоянии 1. Затем в результате поворота на  $120^\circ$  происходят конформационные изменения в  $F_1$  секторе, в результате которых АДФ и  $\Phi_n$  становятся прочно связанными с каталитическим центром (состояние 2) и становится возможным образование АТФ. Непосредственное превращение АДФ

и неорганического фосфата в АТФ осуществляется спонтанно с очень небольшими затратами энергии. Основной энергопотребляющей стадией синтеза АТФ является освобождение прочно связанной АТФ из каталитического центра. В результате энергозависимого структурного изменения молекулы  $F_1$ , каталитическая субъединица  $\beta$  переходит в состояние 3, в котором связь АТФ с каталитическим центром ослаблена, молекула АТФ освобождается в раствор, а субъединица  $\beta$  возвращается в исходное состояние 1. При каждом повороте на  $120^\circ$  все три центра претерпевают координированные конформационные изменения, и в любой момент времени все они находятся в различных состояниях [46].

Таким образом, АТФ-синтетаза является сложноорганизованной молекулярной машиной, субъединичный состав, строение и пространственная организация которой тесно связаны с процессом синтеза АТФ. Казалось бы, что специализация такой машины должна быть весьма узкой, поскольку обеспечение эукариотических клеток энергией является жизненно важной задачей. Однако накопленные данные о регуляции АТФ-синтетазы все больше и больше свидетельствовали о том, что она принимает участие и в других митохондриальных процессах, в частности, в последние годы активно обсуждается ее роль в формировании мРТР.

### Регуляция АТФ-синтетазы

В настоящее время известно, что многие факторы, влияющие на активность мРТР, участвуют в регуляции активности митохондриальной АТФ-синтетазы. Одно из наиболее известных явлений - ингибирование гидролазной активности АТФазы при неконкурентном связывании АДФ и магния с каталитическими субъединицами  $\beta$   $F_1$ -сектора, которое было показано впервые для АТФазы хлоропластов, а затем бактерий и митохондрий (см. обзор [47]). Такой блок позволяет предохранять клетки от непродуктивного гидролиза АТФ,

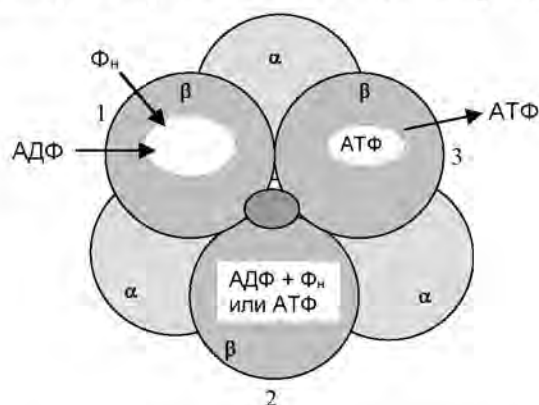
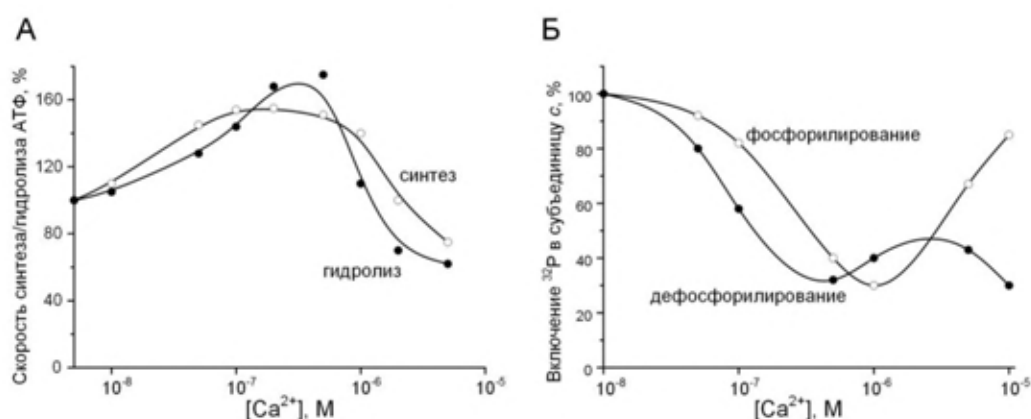


Рисунок 2. Схема основных состояний каталитических центров (адаптировано из [46]).

который стимулируется падением мембранного потенциала. Известно, что АДФ и  $Mg^{2+}$  являются также ингибиторами неселективной поры, в то время как неорганический фосфат, активатор поры, способен снимать  $Mg^{2+}$ -АДФ-блок. Каталитическая активность АТФ-синтетазы регулируется разностью мембранного потенциала на внутренней митохондриальной мембране и рН, от которых также зависит чувствительность мРТР к модуляторам поры [47, 48].

В работах группы Евтодиенко было показано, что АТФ-синтетазная и гидролазная активности регулируются ионами  $\text{Ca}^{2+}$  [49] в диапазоне физиологических концентраций - при увеличении концентрации до  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  происходит активация, а при дальнейшем росте наблюдается ингибирующий эффект  $\text{Ca}^{2+}$  на окислительное фосфорилирование и АТФазную активность митохондрий. Кроме того, авторы исследовали влияние тех же концентраций кальция на фосфорилирование 3.5 кДа митохондриального пептида, идентифицированного позднее как субъединица *c* АТФ-синтетазы митохондрий [50, 51], и обнаружили четкую обратную корреляцию между скоростью окислительного фосфорилирования и уровнем фосфорилирования субъединицы *c*. При очень низких концентрациях свободного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-8} \text{M}$ ) наблюдается высокий уровень фосфорилирования субъединицы *c* и низкий уровень синтеза АТФ, напротив, при высоком уровне  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-7} \text{M}$ - $10^{-6} \text{M}$ ) фосфорилирование пептида было относительно низким, а скорость синтеза АТФ увеличивалась [49] (Рис. 3). Таким образом, было предположено, что  $\text{Ca}^{2+}$  - активатор мРТР - способен модулировать активность АТФ-синтетазы непосредственно путем модуляции фосфорилирования/дефосфорилирования одной из субъединиц комплекса.

Позднее этой же группой было показано, что субъединица *c*, выделенная из митохондрий печени крыс, связывает  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  [26]. Это подтвердило уже имевшиеся косвенные данные о способности ионов кальция регулировать катионную проводимость каналов, образованных субъединицей *c*, изолированной из плазматической мембраны нейронов [52], и перенос протонов АТФазами хлоропластов и бактерий [53]. Кроме того, исследователи предполагают, что свойство связывать  $\text{Ca}^{2+}$  присуще и субъединице *e* FoF<sub>1</sub>-



**Рисунок 3.** Влияние ионов кальция на скорость синтеза/гидролиза АТФ (А) и включение  $^{32}\text{P}$  в субъединицу *c* (Б) (адаптировано из [49]).

АТФазы [54].

Недавно было обнаружено, что регулятор поры - циклофилин Д связывается с периферическим стержнем АТФазы, в частности с относящимися к нему субъединицами *d* и OSCP [55]. При этом снижается как синтетическая, так и гидролитическая активность АТФазы, причем в присутствии неорганического фосфата этот эффект усиливается, а блокатор циклофилина Д – циклоспорин А обладает способностью ее восстанавливать. Кроме того, исследователи группы Бернарди показали, что ассоциация циклофилина Д с

АТФазой ослабляется в присутствии бензодиазепина-423, который блокирует АТФазу при взаимодействии с тем же участком субъединицы OSCP, что и циклофилин D, а также является активатором открытия мПТР [23]. Стоит отметить, что циклоспорин А снижает вероятность открытия мПТР на ту же самую величину, что и ингибирование OSCP с помощью siRNA [23], что говорит о том, что эта субъединица принимает участие в регуляции поры. Об участии АТФазы в регуляции мПТР также свидетельствуют данные о том, что олигомицин, блокирующий ее каталитическую активность при связывании с OSCP, ингибирует пору, индуцированную TNF, BAX и антинеопластическим агентом эруфозином (см обзор [56]).

Также было показано, что другой регулятор мПТР Bcl-x<sub>L</sub> белок, относящийся к семейству анти-апоптотических белков Bcl-2, не только регулирует проницаемость внешней митохондриальной мембраны путем связывания с VDAC, но также напрямую взаимодействует с β-субъединицей АТФазы, увеличивая эффективность продукции АТФ митохондриями, что было продемонстрировано методом patch-clamp на субмитохондриальных частицах, обогащенных АТФ-синтетазой [57].

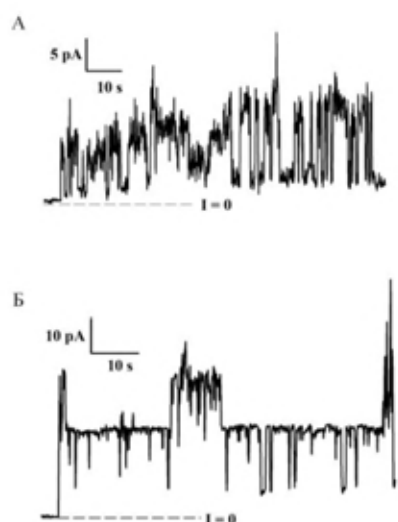
Таким образом, данные приведенных выше исследований позволяют предположить непосредственное участие F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФазы в формировании неселективной поры во внутренней митохондриальной мембране.

#### **Гипотезы об участии F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФ-синтетазы в формировании мПТР**

Несмотря на большой массив накопленных к настоящему времени данных о регуляции АТФазы эффекторами мПТР непосредственный механизм формирования поры АТФ-синтетазой остается предметом научных дискуссий. Работы, появившиеся в большом количестве в последние годы [24-27] рассматривают две основные гипотезы: критическую роль димеров АТФазы (группа Бернарди) и участие субъединицы *c* F<sub>0</sub> сектора АТФазы (группы Пинтона, Джонас и Азарашвили).

Первые предположения о том, что субъединица *c* АТФазы может проявлять свойства каналов появились более 15 лет назад, когда было показано, что субъединица *c*, изолированная из плазматической мембраны, способна формировать в искусственных липидных мембранах каналы с катионной проводимостью, которая регулируется кальцием [58]. Позднее в нашей лаборатории было показано, что индукция мПТР в митохондриях печени и мозга коррелирует с дефосфорилированием субъединицы *c* [50, 51, 59], а также, что изолированная из печени крыс субъединица *c*, будучи встроенной в искусственную мембрану (БЛМ), увеличивает ее проводимость путем формирования одиночных каналов [50]. Кроме того, было обнаружено, что наблюдаемое при открытии поры дефосфорилирование субъединицы *c* ингибируется в присутствии циклоспорина А и антагониста кальмодулина – калмидазолия [60], ингибитор Ca<sup>2+</sup>-унипортера – рутениевый красный, который блокирует вход кальция в митохондрии, также увеличивал уровень фосфорилирования субъединицы *c* митохондрий мозга крыс, инкубировавшихся в присутствии 10<sup>-4</sup>М Ca<sup>2+</sup> [61]. Любопытно, что в присутствии митохондриального разобщителя CCCP также наблюдалось уменьшение включения меченого фосфора в субъединицу *c*, однако эксперименты по

исследованию дефосфорилирования пептида в этих условиях показали, что снижение мембранного потенциала практически не влияет на содержание  $^{32}\text{P}$ , что говорит о том, что мембранный потенциал оказывает влияние только на фосфорилирование полипептида протеинкиназами [62]. В работе 1999 года также было показано, что фосфорилирование субъединицы *c* увеличивалось в присутствии бутирил-цАМР, что позволило предположить участие цАМР-зависимой протеинкиназы в этом процессе. Дальнейшие исследования Азарашвили и др. показали, что фосфорилированная и дефосфорилированная формы изолированной субъединицы *c* обладают разной способностью индуцировать открытие поры при добавлении к митохондриям в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ . Действие дефосфорилированной формы субъединицы *c* было более эффективным [26], что было продемонстрировано при измерении  $\text{Ca}^{2+}$ -емкости и набухания митохондрий. Кроме того, сходным с дефосфорилированной формой субъединицы *c* действием обладала и субъединица *c*, выделенная из особых тел хранения («storage body») печени и мозга овец, больных цероидным липофусцинозом.



**Рисунок 4.** Одиночные каналы, зарегистрированные при добавлении фосфорилированной (А) и дефосфорилированной форм субъединицы *c* (адаптировано из [26]).

стороны бислоя вызывал увеличение проводимости БЛМ на 2-3 порядка. Одиночные ионные каналы регистрировались в области 15-2000 pS, что соответствует данным о проводимости мРТР. Однако при использовании фосфорилированной формы наблюдались каналы с быстрой кинетикой переключения между открытым и закрытым состояниями. В присутствии дефосфорилированной формы возникали более устойчивые каналы с медленной кинетикой, которые практически не переходили в закрытое состояние (Рис. 4) [26].

Таким образом в работах группы Азарашвили было показано, что в формировании мРТР может принимать участие субъединица *c* FoF<sub>1</sub>-АТФазы, а регуляция проницаемости поры может осуществляться

При этом нейродегенеративном заболевании происходит аккумуляция митохондриальной субъединицы *c* в липофусциновых гранулах или так называемых телах хранения, расположенных в цитоплазме. Ранее исследователи предположили, что патогенез цероидного липофусциноза связан с аккумуляцией субъединицы *c* и ее канал-образующими свойствами [52], что подтверждают и данные по инициации мРТР в митохондриях в присутствии субъединицы *c* из липофусциновых гранул. Канал-образующая активность различных форм субъединицы *c* была изучена и на искусственных липидных мембранах. Электрофоретически очищенный препарат обеих форм субъединицы *c* при добавлении с одной

фосфорилированием/дефосфорилированием субъединицы при участии протеинкиназ и протеинфосфатаз.

Другие исследования также свидетельствуют о важной роли субъединицы *c* в формировании митохондриальной поры. Так в работах группы Пинтона было показано, что при блокировании экспрессии всех трех изоформ *c*-субъединицы с помощью siRNA в клетках линии HeLa, наблюдается ингибирование открытия мPTP, индуцированного иономицином, а также деполаризации митохондрий в условиях окислительного стресса [27]. Увеличение экспрессии субъединицы *c* в этих клетках вело к ускорению открытия неселективной митохондриальной поры под действием иономицина. Подобным же образом изменение экспрессии субъединицы *c* действовало и на фрагментацию митохондрий. Поскольку HeLa - опухолевые клетки, синтезирующие АТФ гликолитическим путем, генетическое ингибирование синтеза субъединиц АТФазы не приводило к уменьшению внутриклеточного содержания АТФ. На уровне клеток, уменьшение количества субъединицы *c* вело к ослаблению гибели как опухолевых клеток, так и что приводило к блокированию выхода цитохрома *c* и уменьшению клеточной гибели как гликолитических HeLa клеток, так и культуры кортикальных нейронов, производящих АТФ преимущественно в митохондриях [27].

В то же время было показано, что изолированное и очищенное от примесей кольцо из субъединиц *c* F<sub>0</sub> сектора АТФазы при реконструкции его в липосомы проявляет канальную активность в области 100-2000 pS. Такие каналы обладали катионной селективностью и ингибировались антителами к субъединице *c* и высокими концентрациями АТФ [24]. Добавление к *c*-кольцу очищенного препарата F<sub>1</sub>-сектора АТФазы также приводило к ингибированию проводимости каналов. Авторы провели интересный эксперимент с флуоресцентно-меченой субъединицей *c* и показали на живых клетках, что в ответ на индукцию мPTP ионами кальция и блокирование ее циклоспорином А наблюдается открытие-закрытие *c*-кольца, выразившееся в увеличении просвета канала. В митохондриях, митопластах или субмитохондриальных частицах содержащих интактную АТФазу исследователи наблюдали проводимость, активируемую Ca<sup>2+</sup> и ингибируемую циклоспорином А, АТФ и АДФ [25], что согласуется с данными о присутствии сайтов связывания этих соединений на субъединицах F<sub>1</sub> сектора и бокового стержня. При обработке таких препаратов мочевиной, которая убирала F<sub>1</sub>-сектор и другие периферические белки, регуляция Ca<sup>2+</sup> и циклоспорином снималась, и также снижалась чувствительность к АТФ/АДФ. Данные эксперименты позволили предположить, что мембранное кольцо лишь формирует канал, а его активность регулируется внеклеточными компонентами АТФазы.

Другая модель формирования мPTP была предложена исследователями группы Бернарди, которые также показали, что ключевая роль в образовании мPTP принадлежит АТФазе. Однако они показали, что в каналы в бислойной мембране могут быть сформированы только из димерной формы АТФазы, а мономерная форма не обладает проводимостью [23], что находится в противоречии с данными, полученными в других лабораториях. Более того, противоречат этому и опубликованные ранее этим же коллективом данные о том, что неселективная пора все же открывается в клетках rho<sup>0</sup>, которые лишены митохондриальной ДНК, кодирующей в числе прочего субъединицы *a* и Ab1.

ответственные за димеризацию АТФазы [63]. Также известно, что димеризация

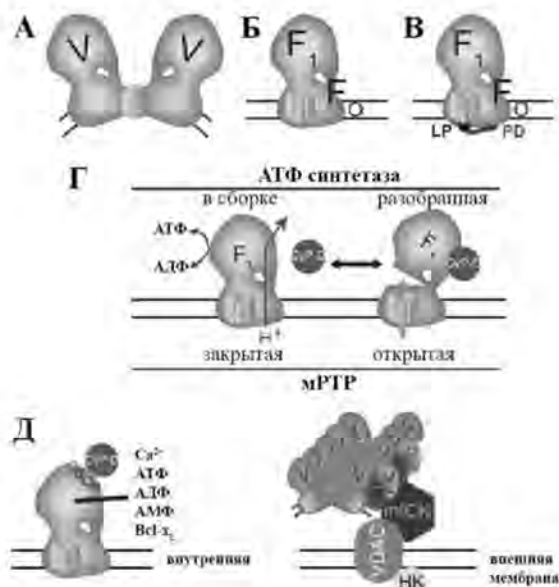


Рисунок 5. Современные представления о строении мРТР (адаптировано из [66]).

АТФазы стабилизируется специальным ингибиторным белком F<sub>1</sub> (IF-1), что приводит к увеличению продукции АТФ и снижает вероятность клеточной гибели при ишемии, и напротив в стареющих клетках степень димеризации АТФазы снижается, а гибель клеток усиливается [64]. Недавно стало известно, что в митохондриях дрожжей димеры АТФазы образуют ряды на конечных участках крист, которые поддерживают структурную организацию внутренней мембраны и, вероятно, обеспечивают более эффективную работу митохондрий [65].

### Заключение

Таким образом, несмотря на то, что до сих пор нет неопровержимых доказательств и конкретного неоспоримого механизма возникновения неселективной поры на основе V комплекса митохондрий, в настоящее время рассматривается несколько вероятных моделей участия АТФазы в формировании мРТР. Это, во-первых, уже упомянутая димеризация АТФазы, предложенная Бернадди с сотрудниками, когда канал, обеспечивающий неселективную проводимость, образуется между двумя мономерами АТФ-синтетазы, а точнее в контактном сайте между их периферическими стержнями (Рис. 5А).

Другие модели основаны на принятии гипотезы о том, что непосредственное участие в образовании канала проводимости принимает субъединица c АТФазы [66]. В частности, рассматривается возможность формирования поры внутри протон-транспортирующего кольца, состоящего из субъединиц c (Рис. 5В). Рентгеноструктурные исследования c-кольца показали, что липиды, в норме заполняющие просвет кольца, могут сдвигаться в сторону противоположную F<sub>1</sub> домену и находящуюся ближе к межмембранному пространству [67], кроме того, диаметр c-кольца может изменяться под влиянием ионов Ca<sup>2+</sup> [24]. В пользу этой гипотезы свидетельствуют и данные о том, что в



клетке существуют аналоги субъединицы *c*, которые способны индуцировать или регулировать мембранную проницаемость. К ним относится 16 кДа протеолипид – гидрофобный ДЦКД-связывающий пептид вакуолярной  $V_0V_1$ -АТФазы (дактин), рассматриваемый как димер митохондриальной субъединицы *c* [68]. Описано, что дактин входит в состав межклеточных контактов (gap junction), и обладает, кроме способности осуществлять транслокацию ионов водорода, свойством формировать мегаканалы в межклеточных контактах [69]. Однако отсутствие сайтов для связывания циклофилина D и других регуляторов поры, ставит под сомнение идентичность отдельно взятого *c*-кольца и мРТР. Как потенциальный сайт формирования поры рассматривалась также поверхность между субъединицами *c* и *a* (Рис. 5С), которая как известно образует канал для транспорта протонов во время синтеза АТФ. С помощью метода криоэлектронной микроскопии было показано, что существует инвагинация мембраны между *c*-кольцом и *a*-субъединицей АТФазы зеленой водоросли *Polytomella*, что могло бы рассматриваться как подтверждение этой идеи, однако тот факт, что в митохондриях клеток, не содержащих митохондриальной ДНК, и соответственно кодируемой в ней субъединицы *a*, мРТР пора формируется, приводит к отрицанию какого-либо непосредственного участия субъединицы *a* в образовании структуры поры.

Принимая во внимание, что просвет *c*-кольца, заполнен липидами, что было показано *in vivo* для АТФазы *Escherichia coli* [67], возникает вопрос, каким образом можно обратимо убирать эту липидную «пробку» и регулировать проводимость канала. Недавно с помощью криоэлектронной микроскопии в бычьей АТФазе была визуализирована некая плотность со стороны *c*-кольца, обращенной к межмембранному пространству, так называемая *p*-плотность (*p*-side density, PD). Было предположено, что эта плотность образована субъединицами DAPI и 6.8 кДа, эти субъединицы легко диссоциируют от комплекса АТФазы во время его выделения из митохондрий и поэтому не были достаточно исследованы. По-видимому, эти субъединицы, находясь в дистальной части трансмембранного домена периферического стержня, связаны с липидами внутри просвета *c*-кольца, и способны при своей диссоциации захватывать эти липиды, освобождая просвет канала [67] (Рис. 5С).

Более убедительной выглядит гипотеза Джонас и др., согласно которой, мРТР пора образуется при участии целого комплекса АТФ-синтетазы. В интактной АТФ-сингетазе происходит транспорт протонов через канал, образованный субъединицами *a* и *c*, и таким образом осуществляется синтез АТФ. При этом неселективная проводимость канала, расположенного в просвете *c*-кольца, заблокирована субъединицами центрального стержня и  $F_1$  сектора. При открытии поры, наблюдается диссоциация  $F_0$  сектора от регуляторного  $F_1$ , что снимает ингибирование проводимости кольца, образованного субъединицами *c* (Рис. 5D). Эта гипотеза основана на экспериментальных данных, где было показано, что кальций способен дестабилизировать комплекс АТФ-синтетазы циклоспорин D-зависимым способом, а при добавлении к встроенному в мембрану *c*-кольцу очищенного комплекса  $F_1$  наблюдалось ингибирование его проводимости [24]. Вполне вероятно, что обнаруженное Азарашвили и др.  $Ca^{2+}$ -индуцируемое дефосфорилирование субъединиц *c* облегчает диссоциацию  $F_1$  фактора от мембранного *c*-кольца, таким образом открывая мРТР. В такой

модели регуляция активности неселективной поры циклофилином. Д. осуществляется путем его связывания с OSCP субъединицей АТФазы, а другие модуляторы поры, такие как  $Ca^{2+}$ , адениновые нуклеотиды, и  $Vcl-x_1$  связываются с другими ее субъединицами (Рис. 5Е).

Известно, что митохондриальная АТФаза находится в тесном контакте с транслоказой адениновых нуклеотидов и фосфатным переносчиком, образуя так называемую АТФ-синтасому [70]. Халестрап предложил гипотезу, согласно которой эти компоненты взаимодействуют между собой, что при соответствующих условиях приводит к появлению мРТР [71]. АТФ-синтасома, располагаясь на внутренней митохондриальной мембране, в свою очередь формирует особые контактные сайты, в состав которых входит митохондриальная креатинкиназа, находящаяся в матриксе, и белки внешней мембраны – VDAC, TSP0, гексокиназа и белки семейства  $Vcl-2$ , и стабилизация этих сайтов приводит к ингибированию открытия неселективной поры [71] (Рис.5Е).

Несмотря на то, что многие детали функционирования неселективной митохондриальной поры объясняются в рамках текущей концепции о критической роли субъединицы  $c$   $F_0F_1$ -АТФ-синтетазы в формировании мРТР, большое количество вопросов остается нерешенными, например, до сих пор неизвестен молекулярный механизм взаимодействия OSCP и  $c$ -кольца ротора АТФазы, не найдены редокс-чувствительные сайты, регулирующие мРТР в зависимости от состояния глутатионового пула, не определен сенсор реагирующий на изменения мембранного потенциала. Модель работы АТФазы как канала для неселективного транспорта ионов остается до сих пор загадкой, в отличие от разобранного до аминокислотного уровня механизма функционирования АТФазы как машины для синтеза АТФ. Все еще не известна пространственная организация АТФазного комплекса в условиях открытой поры со всеми возможными при этом межсубъединичными взаимодействиями, которая позволила бы снять некоторые вопросы структурного характера. Таким образом, несомненно, что исследования структуры и регуляции мРТР должны быть продолжены с использованием новых подходов и методов.

Работа поддержана грантами РФФИ №№14-04-00625 и 16-04-00927 и Правительства РФ №14.Z50.31.0028.

#### Список литературы

1. Hunter FE, Jr., FORD L (1955). *J Biol Chem.* 216,357-369.
2. Lehninger AL (1959). *J Biol Chem.* 234,2465-2471.
3. Hunter DR, Haworth RA, Southard JH (1976). *J Biol Chem.* 251,5069-5077.
4. Crompton M, Costi A (1988). *Eur J Biochem.* 178,489-501.
5. Brockmeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR (1989). *J Biol Chem.* 264,7826-7830.
6. Halestrap AP, Davidson AM (1990). *Biochem J.* 268,153-160.
7. Le QK, Le QD (1988). *Arch Biochem Biophys.* 265,249-257.
8. Szabo I, De P, V, Zoratti M (1993). *FEBS Lett.* 330,206-210.
9. Bentner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D (1998). *Biochim Biophys Acta.* 1368,7-18.
10. Kimbally KW, Zorov DB, Antonenko YN, Snyder SH, McEnery MW, Tedeschi H (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90,1374-1378.
11. Vander Heiden MG, Thompson CB (1999). *Nat Cell Biol.* 1,E209-E216.
12. Marzo I, Bremer C, Zanuzzi N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vicini HL, Prevost MC, Nic Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998). *Science.* 281,2027-2031.
13. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunsell FW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Melkentin JD (2005). *Nature.* 434,658-662.
14. Basso F, Fauc L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005). *J Biol Chem.* 280,18558-18561.

15. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y (2005). *Nature*. 434,652-658.
16. Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkentin JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX, Yan SD (2008). *Nat Med*. 14,1097-1105.
17. Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, Sweeney HL, Robbins J, Molkentin JD (2008). *Nat Med*. 14,442-447.
18. Mukherjee R, Mareninova OA, Odnokova IV, Huang W, Murphy J, Chvanov M, Javed MA, Wen L, Booth DM, Cane MC, Awais M, Gavillet B, Pruss RM, Schaller S, Molkentin JD, Tepikin AV, Petersen OH, Pandolfi SJ, Gukovsky I, Criddle DN, Gukovskaya AS, Sutton R, Unit NPBR (2016). *Gut*. 65,1333-1346.
19. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC (2004). *Nature*. 427,461-465.
20. Baines CP, Kaiser RA, Szeiko T, Craigen WJ, Molkentin JD (2007). *Nat Cell Biol*. 9,550-555.
21. Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP (2008). *J Biol Chem*. 283,26312-26323.
22. Gutierrez-Aguilar M, Douglas DL, Gibson AK, Domeier TL, Molkentin JD, Baines CP (2014). *J Mol Cell Cardiol*. 72,316-325.
23. Giorgio V, von Stockum S, Antonietti M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabo I, Lippe G, Bernardi P (2013). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110,5887-5892.
24. Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznerski P, Li H, Nabili P, Hockensmith K, Graham M, Porter GA, Jr, Jonas EA (2014). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111,10580-10585.
25. Alavian KN, Dworetzky SI, Bonanni L, Zhang P, Sacchetti S, Li H, Signore AP, Smith PJ, Gribkoff VK, Jonas EA (2015). *Mol Pharmacol*. 87,1-8.
26. Azanishvili T, Odnokova I, Bakunts A, Temovsky V, Krestinina O, Tyynela J, Saris NE (2014). *Cell Calcium*. 55,69-77.
27. Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebedzińska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wojtala A, Wiecekowski MR, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P (2013). *Cell Cycle*. 12,674-683.
28. Wittig I, Schagger H (2008). *Biochim Biophys Acta*. 1777,592-598.
29. Abraham JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE (1994). *Nature*. 370,621-628.
30. Gibbons C, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE (2000). *Nat Struct Biol*. 7,1055-1061.
31. Nesci S, Trombetti F, Ventrella V, Pagliarini A (2016). *J Membr Biol*. 249,11-21.
32. Valtysveitil FI, Fillingame RH (1998). *J Biol Chem*. 273,16241-16247.
33. Girvin ME, Rastogi VK, Abildgaard F, Markley JL, Fillingame RH (1998). *Biochemistry*. 37,8817-8824.
34. Fillingame RH, Angevine CM, Dmitriev OY (2003). *FEBS Lett*. 555,29-34.
35. Dmitriev O, Jones PC, Jang W, Fillingame RH (1999). *J Biol Chem*. 274,15598-15604.
36. Collinson IR, Skehel JM, Fearnley IM, Runswick MJ, Walker JE (1996). *Biochemistry*. 35,12640-12646.
37. Devenish RJ, Prescott M, Rodgers AJ (2008). *Int Rev Cell Mol Biol*. 267,1-58.
38. Runswick MJ, Bason JV, Montgomery MG, Robinson GC, Fearnley IM, Walker JE (2013). *Open Biol*. 3,120160.
39. Okino D, Iino R, Noji H (2011). *J Biochem*. 149,655-664.
40. Noji H, Amano T, Yoshida M (1996). *J Bioenerg Biomembr*. 28,451-457.
41. Junge W, Jil H, Engelbrecht S (1997). *Trends Biochem Sci*. 22,420-423.
42. Junge W, Pinke O, Cherepanov DA, Gumbiowski K, Müller M, Engelbrecht S (2001). *FEBS Lett*. 504,152-160.
43. Dinroth P, Matthey U, Kaim G (2000). *Biochim Biophys Acta*. 1459,506-513.
44. Pogoryelov D, Krah A, Langer JD, Yıldız O, Fariello-Gomez JD, Meier T (2010). *Nat Chem Biol*. 6,891-899.
45. von Ballmoos C, Wiedenmann A, Dinroth P (2009). *Annu Rev Biochem*. 78,649-672.
46. Boyer PD (2001). *Biochemistry (Mosc)*. 66,1058-1066.
47. Feniouk BA, Yoshida M (2008). *Results Probl Cell Differ*. 45,279-308.
48. Bernardi P (2013). *Front Physiol*. 4,95.
49. Evtodienko YV, Azanishvili TS, Teplova VV, Odnokova IV, Saris N (2000). *Biochemistry (Mosc)*. 65,1023-1026.
50. Azanishvili TS, Tyynela J, Odnokova IV, Grigorjev PA, Baumann M, Evtodienko YV, Saris NE (2002). *J Bioenerg Biomembr*. 34,279-284.
51. Azanishvili TS, Tyynela J, Baumann M, Evtodienko YV, Saris NE (2000). *Biochem Biophys Res Commun*. 270,741-744.
52. McGeoch JE, Guidotti G (2001). *Eur J Paediatr Neurol*. 5 Suppl A,147-150.
53. Van Walraven HS, Scholts MJ, Zakharov SD, Kraayenhof R, Dilley RA (2002). *J Bioenerg Biomembr*. 34,455-464.
54. Arakaki N, Ueyama Y, Hirose M, Himeda T, Shibata H, Futaki S, Kitagawa K, Higuti T (2001). *Biochim Biophys Acta*. 1504,220-228.
55. Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Ibani-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P, Lippe G (2009). *J Biol Chem*. 284,33982-33988.
56. Bonora M, Wiecekowski MR, Chinopoulos C, Kepp O, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P (2015). *Oncogene*. 34,1475-1486.
57. Alavian KN, Li H, Collis L, Bonanni L, Zeng L, Sacchetti S, Lazrove E, Nabili P, Flaherty B, Graham M, Chen Y, Messerli SM, Moriggio MA, Rahner C, McNay E, Shore GC, Smith PJ, Hardwick JM, Jonas EA (2011). *Nat Cell Biol*. 13,1224-1233.

58. McGeoch JE, Guidotti G (1997). *Brain Res.* 766,188-194.
59. Krestinina OV, Grachev DE, Odinkova IV, Reiser G, Evtodienko YV, Azarashvili TS (2009). *Biochemistry (Mosc.)*. 74,421-429.
60. Azarashvili T, Krestinina O, Odinkova I, Evtodienko Y, Reiser G (2003). *Cell Calcium*. 34,253-259.
61. Azarashvili T, Krestinina O, Yurkov I, Evtodienko Y, Reiser G (2005). *J Neurochem*. 94,1054-1062.
62. Azarashvili TS, Odinkova IV, Evtodienko YV (1999). *Biochemistry (Mosc)*. 64,556-560.
63. Masgras I, Rasola A, Bernardi P (2012). *Biochim Biophys Acta*. 1817,1860-1866.
64. Morciano G, Giorgi C, Bonora M, Punzetti S, Pavasini R, Wieckowski MR, Campo G, Pinton P (2015). *J Mol Cell Cardiol*. 78,142-153.
65. Davies KM, Anselmi C, Wittig I, Faraldo-Gomez JD, Kuhlbrandt W (2012). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109,13602-13607.
66. Beutner G, Kambiz AN, Jonas EA, Porter GA, Jr. (2016). *Handb Exp Pharmacol*.
67. Gerle C (2016). *Biochim Biophys Acta*. 1857,1191-1196.
68. Peters C, Bayer MJ, Buhler S, Andersen JS, Mann M, Mayer A (2001). *Nature*. 409,581-588.
69. Finbow ME, Harrison MA (1997). *Biochem J*. 324 ( Pt 3),697-712.
70. Chen C, Ko Y, Delannoy M, Ludtke SJ, Chiu W, Pedersen PL (2004). *J Biol Chem*. 279,31761-31768.
71. Halestrap AP, Richardson AP (2015). *J Mol Cell Cardiol*. 78,129-141.

## ***Глава 12. ПОВЫШЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТАХ***

Фадеев Р.С.,<sup>1,2</sup> Кобякова М.И.,<sup>1,2</sup> Захаров С.Г.,<sup>3</sup> Фадеева И.С.,<sup>1,2</sup> Сенотов А.С.,<sup>1</sup> Митина Т.А.,<sup>3</sup> Голенков А.К.,<sup>3</sup> Акатов В.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup>Пушинский государственный естественно-научный институт МОН, 142290, Пущино, Россия

<sup>3</sup>Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

### **Аннотация**

Лекарственная устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) к противоопухолевой терапии остается одной из актуальных задач онкологии. Причину лекарственной устойчивости связывают как с активацией переноса токсических веществ из клеток за счет белков-транспортёров семейства ABC, так и с взаимодействием лейкозных клеток с компонентами стромы костного мозга, с межклеточными взаимодействиями. Однако в целом наши представления о механизмах лекарственной устойчивости клеток ОМЛ остаются недостаточными для эффективного решения проблем противоопухолевой терапии. В главе обсуждается новый вид лекарственной устойчивости клеток ОМЛ, возникающей при формировании ими многоклеточных агрегатов. Основываясь на собственных экспериментальных результатах и данных литературы предложена гипотеза о том, что механизм повышения лекарственной устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах основан на изменении взаимодействия провоспалительных сигнальных молекул с пориновыми каналами внешней мембраны митохондрии.

### **Введение**

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественная опухоль миелоидного ростка гемопозитической системы. Для ОМЛ характерна быстрая клональная экспансия и накопление в костном мозге трансформированных клеток с различной степенью зрелости с последующим выходом в кровеносное русло. При накоплении трансформированных клеток-предшественников и более зрелых бластных форм в костном мозге происходит подавление нормального гемопоэза [1]. Эффективность терапии ОМЛ по различным источникам составляет от 20% до 45% [2]. Одну из основных причин недостаточной эффективности терапии ОМЛ связывают с возникновением лекарственной устойчивости лейкозных клеток. Этиология данного феномена представлена, как минимум, двумя основными причинами. Одна из них – приобретение устойчивости к препаратам, которая возникает при длительном их применении в результате появления устойчивых клонов опухолевых клеток. Как правило, данный вид лекарственной устойчивости связывают с активностью белков-транспортёров семейства ABC, выводящих ксенобиотики из клеток, но есть и другие механизмы повышения резистентности клеток, связанные с активацией сигнальных путей выживаемости, репарации ДНК и др. Другая, не менее важная,

причина повышения резистентности клеток может быть связана с изменением их взаимодействия с микроокружением в костном мозге (мезенхимальные стромальные клетки, внеклеточный матрикс), с изменением этого микроокружения, что также может способствовать повышению устойчивости лейкозных клеток к цитотоксическим воздействиям [4]. Клетки, зависимые от адгезии к внеклеточному матриксу (саркомы, карциномы, глиомы, нейробластомы и т.д.), обладают еще одним механизмом повышения лекарственной устойчивости – так называемой многоклеточной лекарственной устойчивостью, которая выявляется в конфлюэнтных (слившихся) культурах, а также при формировании трехмерных сфероидов, состоящих из клеток одного типа. Возникновение такого вида устойчивости связывают как с формированием межклеточных контактов, так и с адгезией клеток к внеклеточному матриксу, но механизмы этого явления остаются неизученными [5]. Нашим коллективом была впервые описана новая форма лекарственной устойчивости клеток ОМЛ возникающая в трехмерных многоклеточных агрегатах, при активации гомотипической межклеточной адгезии. В настоящем главе обсуждаются вопросы о механизмах повышения лекарственной устойчивости клеток ОМЛ в условиях, способствующих межклеточной адгезии, при активации гомотипической межклеточной адгезии в трехмерных многоклеточных агрегатах, состоящих из клеток одного типа, одной клеточной линии.

#### **Острый миелоидный лейкоз. Этиология, патогенез, классификация**

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является результатом ряда соматических мутаций, как правило, хромосомных транслокаций, произошедших в примитивных мультипотентных (стволовых) гемопоэтических клетках или, в некоторых случаях, в более дифференцированных бластных формах. Стволовые клетки ОМЛ имеют специфический иммунофенотип: CD123<sup>+</sup>/CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> и могут быть выявлены с помощью диагностической цитометрии. Причины возникновения разнообразны: воздействие радиации, высоких доз бензола, курение, последствия после курсов химиотерапии и т.д. Результаты данных мутаций представлены в основном мутантными факторами транскрипции или элементами транскрипционного пути, которые изменяет регуляторный каскад, контролирующей скорость роста или выживаемость клеток-предшественников, а также их дифференцировку и созревание [6]. Поэтому мутантные (лейкозные) гемопоэтические клетки более жизнеспособные и более активно пролиферирующие по сравнению с нормальными клетками гемопоэтической паренхимы костного мозга. Примерами часто мутирующих генов является ген основного связывающего фактора, рецептора ретиноевой кислоты, состоящий из двух субъединиц, кодируемых генами CBF и RUNX1. Основным связывающий фактор активирует гены, участвующие в миелоидной и лимфоидной дифференцировке и созревании. Однако, этих мутаций недостаточно для того, чтобы вызвать развитие ОМЛ. Дополнительные мутации, например, генов FLT3 или N-RAS и K-RAS в гемопоэтических клетках, в итоге могут привести уже к развитию заболевания. Наиболее свойственные для ОМЛ цитогенетические изменения представлены транслокацией (8;21), транслокацией (15;17), инверсией 16, трисомией 8 и делецией всей или части 7-й или 5-й хромосомы. Одним из

наиболее распространенных эпигенетических нарушений является гиперметилирование генов, которое наблюдается примерно в 25% случаев первично выявленного ОМЛ [7]. Таким образом, существует достаточно большое количество генетических и эпигенетических изменений, которые в свою очередь приводят к возникновению большого разнообразия фенотипов ОМЛ.

Лейкозные клетки (бласты) способны к несовершенной дифференцировке и созреванию. Злокачественный клоон может содержать клетки, которые имеют морфологические или иммунофенотипические особенности эритробластов, мегакариоцитов, моноцитов, эозинофилов, или, реже, базофилов или тучных клеток, в дополнение к миелобластам или промиелоцитам. Когда одна из описанных линий клеток является доминирующей, то лейкоз определяется как эритроидный, мегакариоцитарный, моноцитарный и т. д.

Характерным признаком патогенеза ОМЛ является клональная экспансия мутантных клеток, при этом происходит подавление нормального гемопоэза, и соответственно, развитие вторичного иммунодефицита и анемии.

Тип ОМЛ может быть идентифицирован с помощью морфологических исследований клеток крови и костного мозга, с использованием гистохимических реакций, иммунофенотипирования на основе кластеров дифференцировки лейкоцитов (CD) или наличия специфических хромосомных транслокаций. Типы ОМЛ могут быть как первично выявленными, так и развиваться из тромбоцитемии, идиопатического миелофиброза, хронического миелоидного лейкоза или других хронических клональных миелоидных расстройств.

В настоящее время выделяют следующие типы ОМЛ по FAB классификации:

- Острый миелобластный лейкоз (M0, M1, M2);
- Острый промиелоцитарный лейкоз (M3, M3V);
- Острый миеломонобластный лейкоз (M4, M4Eo);
- Острый монобластный лейкоз (M5a, M5b);
- Острый эритроидный лейкоз (M6);
- Острый мегакариоцитарный лейкоз (M7);
- Острый эозинофильный лейкоз;
- Острый базофильный лейкоз;
- Острый лейкоз тучных клеток.

Стандартная терапия ОМЛ представлена комбинацией цитарабина с противоопухолевыми антибиотиками семейства антрациклинов доксорубицином, даунорубицином, идарубицином. Исключением из этого подхода является терапия острого промиелоцитарного лейкоза (FAB M3), представленная комплексами транс-ретиноевой кислоты с триоксидом мышьяка и антрациклиновыми антибиотиками. При терапии рецидива заболевания, а также в случаях высокого риска рецидива после химиотерапии, применяются высокие дозы стандартной химиотерапии, а также аутологичные или аллогенные трансплантации стволовых гемопоэтических клеток. Принято считать, что современный комплекс терапевтических подходов способен обеспечить вероятность излечения до 50% у детей, в то время как у пожилых людей вероятность излечения близка к нулю [8].

## Лекарственная устойчивость острого миелоидного лейкоза

Одной из основных причин ограниченной эффективности терапии ОМЛ является устойчивость злокачественно трансформированных миелоидных клеток к индукции клеточной гибели, так называемая лекарственная устойчивость. Данную устойчивость можно условно разделить на два основных типа: приобретенную лекарственную устойчивость и *de novo* (первичную) лекарственную устойчивость.

### *Приобретенная лекарственная устойчивость*

Приобретенная лекарственная устойчивость возникает после проведения курсов химиотерапии. Механизмы, лежащие в основе формирования данного типа резистентности, могут включать в себя активацию системы множественной лекарственной устойчивости семейства ABC, представленную белками-транспортерами, выводящими ксенобиотики различного происхождения из клеток во внеклеточное пространство [9], а также гибель клеток с низкой активностью ABC системы и отбором субпопуляций с высокой активностью ABC-переносчиков, возникающих в результате мутагенеза. Существуют более 40 различных генов ABC человека, которые опосредуют выведение терапевтических препаратов из клеток в межклеточное пространство. MDR1, первый идентифицированный белок семейства ABC, представляет собой связанный с мембраной гликопротеин, который экспрессируется почти во всех тканях на достаточно низком уровне, но встречается в более высоких количествах на эпителии толстого и тонкого кишечника, поджелудочной железы, желчных и почечных канальцев. Избыточная экспрессия MDR1 может рассматриваться как одна из значительных причин слабой эффективности химиотерапии у некоторых типов карцином (почки, толстого кишечника, печени) и у некоторых форм лейкоза и лимфомы. Избыточная экспрессия другого представителя семейства ABC-белка - MRP1 также коррелирует с лекарственной устойчивостью опухолей простаты, легкого и молочной железы. Еще один белок-транспортер из семейства ABC – белок BCRP связан с формированием резистентности к химиотерапевтическим препаратам при карциноме молочной железы, а также при острых формах лейкоза. Такие препараты таргетной терапии как иматиниб, эрлотиниб, сунитиниб и нилотиниб, являются субстратами и модуляторами MDR 1 и BCRP [10]. Известно, что лейкозные клетки, обладающие фенотипом стволовых клеток, также обладают более высоким уровнем выведения лекарственных препаратов [11]. Например, CD44, один из маркеров стволовых клеток лейкоза, участвует в активации белков BCRP [12]. В настоящее время в клинической практике используется как минимум два препарата ингибирующих активность MDR1 - ZOSUQUIDAR™ и TARIQUIDAR™, обладающие высокой активностью и специфичностью. Однако их использование практически не изменяет фенотип лекарственной устойчивости. Это может свидетельствовать о том, что вклад белков семейства ABC в развитие клинической лекарственной устойчивости является не единственным и не определяющим в подавлении эффективности консервативной терапии.



### *De novo (первичная) лекарственная устойчивость*

*De novo* (первичная) лекарственная устойчивость клеток ОМЛ опосредована, прежде всего, эпигенетическими изменениями в трансформированных бластах, возникающими при воздействии условий микроокружения в гемопозитической паренхиме костного мозга [13].

Условия микроокружения могут способствовать возникновению лекарственной устойчивости с помощью различных механизмов. Например, белок BCRP усиливает свою активность в опухолевых клетках в условиях низких концентраций кислорода. Также показано, что повышение уровня экспрессии MDR1 опосредуется активацией транскрипционного фактора HIF-1 [14].

В повышении лекарственной устойчивости клеток ОМЛ определенную роль играют клеточные компоненты стромы костного мозга и молекулы межклеточного матрикса гемопозитической паренхимы. Стромальные клетки костного мозга могут способствовать возникновению устойчивости лейкозных бластов к индукции клеточной гибели и защищать клетки от цитотоксического действия лекарственных препаратов. В качестве примера можно привести роль мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в повышении устойчивости лейкозных клеток к действию аспарагиназы. Аспарагиназа обычно используется при лечении острых форм лейкоза, поскольку экспрессия аспарагинсинтетазы, фермента, синтезирующего аспарагин, у лейкозных клеток сильно снижена и функционирование таких клеток сильно зависит от экзогенного аспарагина. Оказалось, что мезенхимальные стромальные клетки (МСК) могут способствовать повышению синтеза аспарагина лейкозными клетками и, таким образом, повышать устойчивость последних к действию аспарагиназы [15]. Также лейкозные бласты могут экспрессировать лизосомальные цистеиновые протеазы, которые разрушают аспарагиназу, что также приводит к формированию резистентности [16]. В дополнение к сказанному выше, применение аспарагиназы значительно снижает эффективность применения цитарабина [17].

Одним из главных растворимых факторов, секретируемых стромой является хемокин CXCL12 (SDF-1), который вырабатывается остеобластами и служит лигандом для рецептора CXCR4, расположенного на поверхности гемопозитических клеток [18]. Такая активация с помощью CXCL12 также была выявлена для лейкозных бластов. У лейкозных клеток активация CXCR4 индуцирует секрецию лиганда KLF, белка SCF. Данный белок, является одним из основных регуляторов/ингибиторов гемопоэза и увеличение его секреции лейкозными клетками может приводить к подавлению нормального гемопоэза.

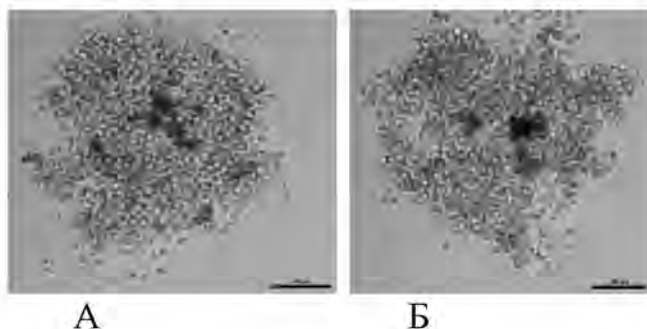
Также немаловажную роль в формировании лекарственной устойчивости клеток ОМЛ играет адгезия последних к молекулам внеклеточного матрикса костного мозга. Показано, что активация CD44 клеток ОМЛ способствует хоумингу данных клеток к эндостальной нише костного мозга, где находится наибольшее содержание гиалуроновой кислоты - основного лиганда для CD44. Нахождение в эндостальной нише значительно повышает лекарственную устойчивость клеток ОМЛ за счет перехода клеток в состояние пролиферативного покоя [19]. Адгезия клеток ОМЛ к молекулам внеклеточного матрикса (ВКМ), таким как фибронектин, ламинин и коллаген, также способствует повышению лекарственной устойчивости за счет активации

сигнального каскада  $ILK/PI3K/Akt/GSK-3\beta$ , основного сигнального пути повышения выживаемости [20].

Результаты по изучению роли микроокружения в костном мозге в формировании фенотипа лекарственной устойчивости клеток ОМЛ легли в основу клинического исследования низкомолекулярных ингибиторов адгезии миелоидных бластов к стромальным элементам костного мозга, например, ингибитора CXCL12-индуцированного хемотаксиса AMD3100 [21].

### ***Лекарственная устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах***

Недавно нами было обнаружен дополнительный вид зависимой от межклеточной адгезии лекарственной устойчивости клеток ОМЛ. Данный вид устойчивости возникает при образовании многоклеточных агрегатов лейкозных клеток, то есть при активации гомотипической межклеточной адгезии. Ранее сходное повышение устойчивости было показано для опухолевых клеток, зависимых от адгезии к внеклеточному матриксу, например, клеток карцином, при образовании клеточных сфероидов, в основном за счет кадгериновых контактов [22]. В отличие от клеток солидных опухолей клетки ОМЛ не способны к формированию высокоплотных клеточных сфероидов, но при определенных условиях могут формировать многоклеточные «рыхлые» агрегаты (Рис.1).



**Рисунок 1.** Многоклеточный агрегат, состоящий из клеток ОМЛ линии ТНР-1 (а) и первичных бластных клеток ОМЛ, выделенных из костного мозга (б) [24, с изменениями].

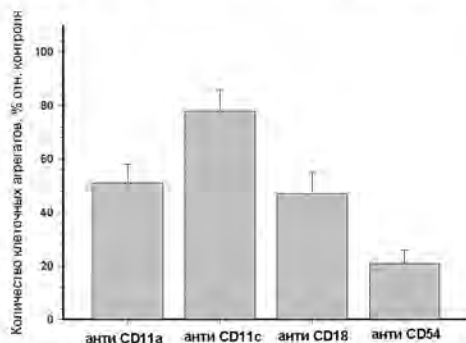
Именно у клеток в составе таких агрегатов и было обнаружено повышение устойчивости как к индукции рецептор-опосредованной, так и к индуцированной химиотерапевтическими препаратами клеточной гибели. Следует отметить, что такие многоклеточные агрегаты достаточно легко могут разрушаться даже при слабых гидродинамических воздействиях. Поэтому существование таких многоклеточных агрегатов возможно только в периваскулярной и эндостальной нишах костного мозга, где нет быстрых потоков жидкостей в отличие от центральных и периферических кровеносных сосудов.

Было показано, что в многоклеточных агрегатах клеток ОМЛ линии ТНР-1 происходило повышение устойчивости к действию ингибитора топоизомеразы 2 - этопозиды, мультикиназного ингибитора - сорафениба, природного противоопухолевого лиганда - белка TRAIL, ингибитора протеасомальной активности - бортезомиба, антрациклинового антибиотика - доксорубицина, антиметаболитов – флударабина и цитарабина и т.д. Интересно, что при разобщении межклеточной адгезии путем культивирования в среде с высокой

вязкостью, содержащей метилцеллюлозу, происходило выраженное подавление устойчивости ко всем вышеперечисленным цитотоксическим веществам [23, 24].

Все это указывает на то, что активация гомотипической межклеточной адгезии может играть значительную роль в приобретении клетками ОМЛ фенотипа лекарственной устойчивости, и изучение механизмов данного феномена позволит лучше понять роль межклеточной коммуникации клеток ОМЛ в реализации лекарственной устойчивости.

Проведенные нашим коллективом исследования показали, что на поверхности клеток ОМЛ линии ТНР-1, способных образовывать многоклеточные агрегаты, экспрессированы такие молекулы межклеточной адгезии как интегрин альфа L (CD11a), интегрин альфа X (CD11c), интегрин бета-2 (CD18) и молекула межклеточной адгезии первого типа (CD54). Присутствие других молекул межклеточной адгезии, таких как интегрин альфа М (CD11b), молекула межклеточной адгезии третьего типа (CD50) и молекула межклеточной адгезии второго типа (CD102) обнаружено не было. С помощью специфических моноклональных антител, было показано, что наибольшее значение для образования многоклеточных агрегатов клеток ОМЛ линии ТНР-1 имеют интегрин альфа L (CD11a), интегрин бета-2 (CD18) и молекула межклеточной адгезии первого типа (CD54). Определяющую роль в образовании агрегатов клетками ОМЛ играет молекула межклеточной адгезии первого типа (CD54), лигирование которой с помощью моноклональных антител практически полностью подавляло способность клеток формировать агрегаты. На рисунке 2 представлены обобщенные результаты данного эксперимента.



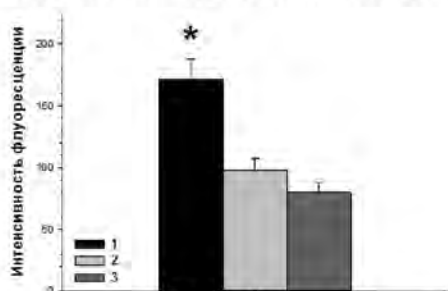
**Рисунок 2.** Влияние ингибирующих антител к молекулам межклеточной адгезии на агрегационную способность клеток ОМЛ линии ТНР-1 (собственные данные авторов).

Еще одним результатом исследования механизмов лекарственной устойчивости было то, что у клеток ОМЛ линии ТНР-1 в составе многоклеточных агрегатов не происходило снижение пролиферативной (ДНК-синтезирующей и митотической) активности. Эти данные интересны прежде всего тем, что пролиферирующие клетки рассматриваются как чувствительные к химиотерапевтическим воздействиям, повышение лекарственной устойчивости лейкозных клеток в большинстве случаев возникает на фоне подавления пролиферативной активности, а в наших экспериментах в многоклеточных агрегатах фенотипом лекарственной устойчивости обладали активно пролиферирующие клетки [24].

Можно предположить, что одним из важнейших механизмов, лежащих в основе повышения лекарственной устойчивости клеток ОМЛ линии ТНР-1 в многоклеточных агрегатах является активация клеточных транспортеров системы множественной лекарственной устойчивости (Р-гликопротеида, MRP и

BCRP). Однако повышение устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах трудно объяснить только активацией клеточных транспортеров системы ABC, так как применение низкомолекулярных ингибиторов этой системы, таких как С4 (ингибитор транспортной активности MDR-1), Reversan (ингибитор транспортной активности MRP белков) и Ko143 (ингибитор транспортной активности BCRP) не вызывало подавления устойчивости (собственные данные авторов). Указанием на активацию других систем (не связанных с активацией белков системы ABC), опосредующих лекарственную устойчивость клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах является то, что при агрегации клетки ТНР-1 приобретают устойчивость к рецептор-опосредованному апоптозу, индуцируемому рекомбинантным белком izTRAIL [23].

Также было показано, что подавление активности транскрипционного фактора NF-κB и белков семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl<sub>xl</sub>, Bcl<sub>w</sub>) с помощью применения специфических ингибиторов может в значительной мере снижать устойчивость клеток ОМЛ линии ТНР-1 в многоклеточных агрегатах как к TRAIL-индуцированному апоптозу, так и к действию этопозида (собственные данные авторов). При дальнейшем исследовании было установлено, что у клеток в составе многоклеточных агрегатов происходит повышение уровня экспрессии основного антиапоптотического белка Bcl-2 [24].



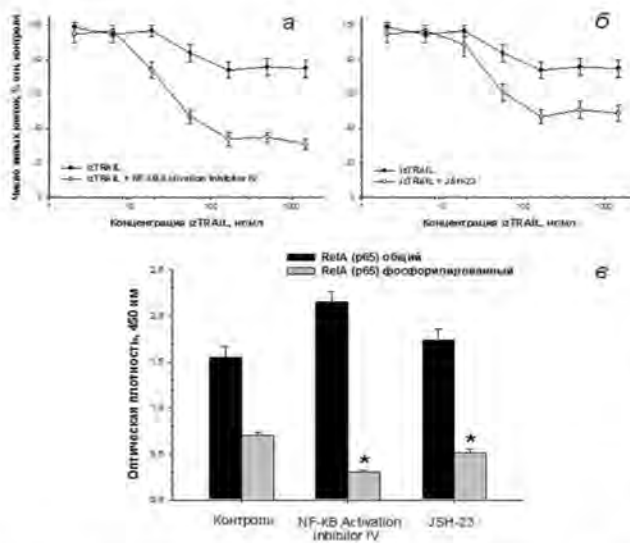
**Рисунок 3.** Интенсивность флуоресценции клеток ОМЛ линии ТНР-1 окрашенных антителами к белку Bcl-2, конъюгированными с изотиоцианатом флуоресцеина (ФИТЦ). Интенсивность флуоресценции ФИТЦ отражает уровень экспрессии белка Bcl-2 в клетках. 1 – Многоклеточные агрегаты, 2 – Контроль (клетки, культивируемые не в агрегатах), 3 – Разобщенные многоклеточные агрегаты [24]. Звездочка указывает на достоверность отличия по отношению к контролю

( $p < 0.05$ ).

Результаты ингибиторного анализа и анализа уровня экспрессии белка Bcl-2 указывают, что в механизме повышения лекарственной устойчивости клеток ОМЛ линии ТНР-1 может принимать участие транскрипционный фактор NF-κB, под транскрипционным контролем которого находятся гены белков семейства Bcl-2 [25]. При расширенном исследовании роли транскрипционного фактора NF-κB было показано, что на фоне снижения уровня фосфорилированного RelA (p65), маркера активации NF-κB, происходит снижение лекарственной устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах. Также, в данном исследовании с использованием соответствующих коммерческих ингибиторов было обнаружено, что не только ингибирование активации NF-κB в цитоплазме клеток, но и блокирование транслокации его в клеточное ядро может привести к снижению лекарственной устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах [26].

Таким образом, представленные результаты указывают на непосредственное участие транскрипционного фактора NF-κB и белков семейства Bcl-2 в формировании лекарственной устойчивости клеток ОМЛ,

опосредованной гомотипической межклеточной адгезией в многоклеточных агрегатах.



**Рисунок 4.** Применение ингибиторов NF-κB - Activation Inhibitor IV (а) и - JSH-23 (б) приводит к снижению лекарственной устойчивости клеток ОМЛ линии ТНР-1 в многоклеточных агрегатах, за счет уменьшения активности транскрипционного фактора NF-κB (в) [26, с изменениями]. Звездочками указана достоверность отличия по отношению к контролю ( $p < 0.05$ ).

В настоящее время все больше появляется публикаций о важной роли потенциал-зависимых каналов внешней мембраны митохондрии (VDAC) в формировании лекарственной устойчивости клеток

опухолевого происхождения [27-29]. В то же время в литературе имеются указания на то, что транскрипционный фактор NF-κB и белки семейства Bcl-2 могут выступать в качестве молекулярных партнеров VDAC каналов [30,31]. Кроме того, в недавнем исследовании было показано, что применение ингибитора VDAC каналов, эрастина, способствовало снижению лекарственной устойчивости клеток ОМЛ [32]. Поэтому можно предположить участие VDAC каналов в повышении лекарственной устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах.

В связи с предложенной гипотезой о связи многоклеточной лекарственной устойчивости с проницаемостью пориновых каналов можно отметить, что ингибирование активности VDAC каналов с помощью специфического низкомолекулярного ингибитора эрастина не подавляло устойчивость как к рецептор-опосредованной, так и к индуцированной химиотерапевтическими препаратами клеточной гибели у клеток ОМЛ линии ТНР-1 в многоклеточных агрегатах. Однако использование низкомолекулярных ингибиторов молекулярных партнеров VDAC белков Bcl-2, Bcl<sub>xl</sub> и Bcl<sub>w</sub>, таких как АВТ263 и АВТ737, приводило к существенному снижению устойчивости как к TRAIL-опосредованной, так и к индуцированной этопозидом клеточной гибели (собственные данные авторов). В то же время, основываясь на работе [30], можно предположить, что прямое ингибирование активности VDAC не приведёт к снижению устойчивости клеток ОМЛ, опосредованной гомотипической адгезией, в многоклеточных агрегатах. В данной работе авторы показывают, что при активации транскрипционного фактора NF-κB, его ингибитор IκBα может аккумулироваться около внешней мембраны митохондрий, стабилизируя при этом комплекс VDAC1/HK2 (гексокиназа 2). Стабилизация комплекса предотвращает образование комплекса VDAC1/Bax и, соответственно, ингибирует выход цитохрома c в цитоплазму. Существует принципиальная возможность того, что в многоклеточных агрегатах происходит активация транскрипционного фактора NF-κB, так как ингибирование данного процесса приводило к снижению устойчивости клеток ОМЛ линии ТНР-1 в многоклеточных агрегатах [26]. Другими словами, в многоклеточных агрегатах

возможен механизм, описанный в работе [30]. Кроме того, в многоклеточных агрегатах клеток ОМЛ линии THP-1 показано повышение экспрессии антиапоптотического белка bcl-2, известного ингибитора одного из индукторов апоптоза белка Araf-1 [24]. Вероятно, такое двухстороннее ингибирование сборки апоптосомы может быть одним из основных механизмов повышения лекарственной устойчивости клеток ОМЛ при активации гомотипической межклеточной адгезии в многоклеточных агрегатах. Предлагаемый механизм повышения устойчивости клеток ОМЛ к клеточной гибели в многоклеточных агрегатах требует дальнейшего исследования и указывает на важную роль провоспалительного сигнального каскада в регуляции проницаемости внешней мембраны митохондрий и лекарственной устойчивости клеток ОМЛ в целом.

### Заключение

Повышение выведения цитотоксических препаратов из клеток за счет активности белков транспортеров семейства ABC и активация антиапоптотических сигнальных каскадов в лейкозных клетках за счет коммуникации с клеточными и внеклеточными стромальными компонентами костного мозга лежат в основе лекарственной устойчивости клеток ОМЛ. Как представлено в настоящей работе, возможно существование нового вида лекарственной устойчивости клеток ОМЛ, возникающего в многоклеточных агрегатах лейкозных клеток. При образовании многоклеточных агрегатов клетками ОМЛ происходит активация провоспалительного сигнального каскада транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и подавление апоптоза. Вероятно, в основе механизма данного явления лежит взаимодействие цитоплазматического компонента молекулярного комплекса NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B $\alpha$  с пориновым каналом внешней митохондриальной мембраны VDAC. Изучение причин, лежащих в основе лекарственной устойчивости клеток ОМЛ, возникающей в многоклеточных агрегатах, может послужить основой не только для понимания механизмов межклеточной коммуникации, но и для повышения эффективности консервативной терапии острых лейкозов.

Работа выполнена в рамках гранта Правительства РФ №14.750.31.0028 и при финансовой поддержке стипендиального гранта Президента РФ (№СП-6867.2013.4).

### Список литературы

1. Schnerch D., Yalcintepe J., Schmidts A., Becker H., Follo M., Engelhardt M., Wäsch R. (2012). *Am. J. Cancer Res.* 2 (5), 508–528.
2. Wiernik P.H., Goldman J.M., Dutcher J., Kyle R.A. (2013). 5th ed. Springer Science + Business Media. 1431.
3. Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D.B., Johnston P.G. (2013). *Nat. Rev. Cancer*. 13 (10), 714–726.
4. Konopleva M., Tabe Y., Zeng Z., Andreeff M. (2009). *Drug Resist. Updat.* 12 (4-5), 103–113.
5. Ma H.L., Jiang Q., Han S., Wu Y., Cui Tomshine J., Wang D., Gan Y., Zou G., Liang X.J. (2012). *Mol. Imaging*. 11 (6), 487–498.
6. Kelly LM, Gilliland DG (2002). *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 3, 179.
7. van Rhenen A, van Dongen GA, et al. (2007). *Blood*. 110, 2659.
8. Williams Hematology, 8e > Chapter 89. Acute Myelogenous Leukemia
9. J.A. Burger. (2011). *ASH Education Program Book*. 1, 96–103.
10. J.J. Fletcher, et al. (2010). *Nat. Rev. Cancer* 10 (2), 147–156.
11. A. Aljedai, et al. (2015). *PLoS ONE* 10 (4), e0123016.
12. A. Sinclair, A.L. Latif, T.L. Holyoake. (2013). *Br. J. Pharmacol.* 169 (8), 1693–1707.
13. M.Y. Konopleva, C.T. Jordan. (2011). *J. Clin. Oncol.* 29 (5), 591–599.
14. A. Persidis. (1999). *Nat. Biotechnol.* 17 (1), 94–95.
15. T. Tsunoo, et al. (2003). *Cancer Sci.* 94 (1), 15–21.

16. N. Patel, et al. (2009). *J. Clin. Invest.* 119 (7), 1964–1973.
17. M. Konopleva, et al. (2002). *Leukemia*, 16 (9), 1713–1724.
18. T. Sugiyama, et al. (2006). *Immunity*, 25 (6), 977–988.
19. Avigdor, A., Goichberg, P., Shvritiel, S., Dar, A., Peled, A., Samira, S., et al. (2004). *Blood*, 103, 2981–2989.
20. Tabe, Y., Jin, L., Tsutsumi-Ishii, Y., Xu, Y., McQueen, T., Priebe, W., Mills, G.B., Ohsaka, A., Nagaoka, I., Andreeff, M., Konopleva, M. (2007). *Cancer Res.* 67, 684–694.
21. M.Y. Konopleva, C.T. Jordan. (2011). *J. Clin. Oncol.* 29 (5), 591–599.
22. Shimazui T., Selhaken J. A., Kawai K., Kawamoto R., van Bockhoven A., Oosterwijk E., Akaza H. (2004). *Oncol Rep.* 11(2), 357-60.
23. Захаров С.Г., Голеньков А.К., Митина Т.А., Луцкая Т.Д., Белоусов К.А., Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Сенотов А.С., Акатов В.С. (2014). Альманах клинической медицины. № 31. С. 11–16.
24. Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Слядовский Д.А., Захаров С.Г., Фадеева И.С., Сенотов А.С., Долгих Н.В., Голеньков А.К., Акатов В.С. (2015). Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. Т. 32, № 2. С. 125–134.
25. Takahashi S., Harigae H., Ishii K.K., Inomata M., Fujiwara T., Yokoyama H., Ishizawa K., Kameoka J., Licht J.D., Sasaki T., Kaku M. (2005). *Leuk Res.* 29(8), 893-899.
26. Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Слядовский Д.А., Захаров С.Г., Фадеева И.С., Сенотов А.С., Голеньков А.К., Акатов В.С. (2015). Биофизика. Т. 60, № 6. С. 1146–1150.
27. Arif T., Vasilkovsky L., Refaely Y., Konson A., Shoshan-Barmatz V. (2014). *Mol Ther Nucleic Acids* 3(4), 159.
28. Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Lakunina V.A., Kirpiy A.A., Kudryavtseva A.V. (2013). *Expert Opin Ther Targets* 17(10), 1221-33.
29. Shoshan-Barmatz V., Golan M. (2012). *Curr Med Chem* 19(5), 714-35.
30. Pazarentzos E., Mahul-Mellier A. L., Dutler C., Chausakert W., Hwang M. S., Kroon J., Qize D., Osborne F., Al-Rubaish A., Al-Ali A., Mazarakis N. D., Aboagye E. O., Grimm S. (2014). *EMBO J.* 33(23), 2814-28.
31. Tsujimoto Y., Shimizu S. (2000). *Cell Death Differ.* 7(12), 1174-81.
32. Yu Y., Xie Y., Cao L., Yang L., Yang M., Lotze M. T., Zeh H. J., Kang R., Tang D. (2015). *Mol Cell Oncol.* 2(4), 1054-59.

### **Глава 13. ВЛИЯНИЕ ВИМЕНТИНА И ДЕСМИНА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА ИОНОВ КАЛИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ**

Хмиль Н.В.<sup>1</sup>, Горбачева О.С.<sup>1</sup>, Белослудцева Н.В.<sup>1</sup>, Валуев Т.<sup>1</sup>, Минина Н.В.<sup>2</sup>, Минин А.А.<sup>2</sup>, Миронова Г.Д.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Белка РАН, Пущино, Россия

#### **Аннотация**

В работе изучено влияние промежуточных филаментов виментина и десмина, играющих важную роль в функционировании и транслокации митохондрий в клетке, на работу митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (митоK<sub>АТФ</sub>), осуществляющего энергозависимый вход калия в митохондриях. Данные, полученные в результате использования двух различных методов определения АТФ-зависимого транспорта калия в митохондриях, показали, что виментин и десмин ингибируют вход калия через mitoK<sub>АТФ</sub> канал. Показано, что как виментин, так и десмин ингибируют АТФ-зависимый вход ионов калия в митохондриях печени крыс, в то время как модифицированный по одной аминокислоте виментин (Y117L, P56R), который неспособен связываться с митохондриями, не оказывает подобного влияния. Обсуждается возможное влияние промежуточных филаментов на регуляцию в митохондриях транспорта калия и объема органелл.

#### **Введение**

В последнее время большое внимание уделяется изучению структуры и функции цитоскелета в эукариотических клетках. Одним из его компонентов являются промежуточные филаменты (ПФ), которые локализируются как в клеточном ядре, так и в цитоплазме и имеют диаметр 10 нм [1]. К цитоплазматическим ПФ, входящим в группу виментин-подобных белков, относятся: виментин, встречающийся во многих клетках мезенхимного происхождения; десмин, экспрессирующийся во всех типах мышечных клеток; периферин, участвующий наряду с нейрофиламентами в сборке ПФ в периферических нейронах, и кислый глиальный белок [2]. Все белки ПФ построены по единой схеме, а именно, центральная часть молекулы представляет собой  $\alpha$ -спираль, разделенную тремя небольшими линкерными участками, и различные по длине N- и C-концевые последовательности, не имеющие определенной вторичной структуры.

Функция ПФ в настоящее время до конца не выяснена. Считается, что они обеспечивают механическую прочность клеток [3], 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 нескольких лабораторий показывают, что ПФ могут играть важную роль в функционировании митохондрий [4, 5]. Было показано, что подвижность митохондрий в культивируемых фибробластах



ингибируется их взаимодействием с виментиновыми ПФ [6]. Другая группа исследователей показала, что белки нейрофиламентов селективно связываются *in vitro* с митохондриями, и это связывание зависит от степени их фосфорилирования и от уровня мембранного потенциала митохондрий [4].

В клетках, лишенных виментина и десмина, обнаружено повышенное содержание активных форм кислорода (АФК) и подавление дыхательной функции митохондрий [7, 8]. В нормальных условиях образование АФК как сигнальных молекул имеет небольшую продолжительность и ограниченные пространственные рамки [9]. Однако при патологических состояниях уровень АФК повышается, что может оказывать повреждающее действие на различные внутриклеточные системы и компоненты. В частности, митохондрии при действии АФК начинают сами продуцировать АФК по механизму положительной обратной связи [10]. В результате этого митохондрии теряют потенциал, набухают и фрагментируются. Окислительный стресс является одним из основных факторов, нарушающих динамическое равновесие в митохондриальном аппарате клеток [11, 12, 13].

Замечено, что митохондрии различных типов клеток часто располагаются около ПФ [14], и это связывают с наличием между ними функциональной связи [15]. Нарушение нормального распределения и транспорта митохондрий может приводить к формированию ряда патологических состояний, в частности, к развитию тканевой дистрофии. Так, одним из наиболее распространенных следствий при повреждении клеток в условиях гипоксии, является увеличение объема митохондрий. К настоящему времени также установлено, что нарушение функционирования десмина приводит к развитию миопатии и кардиомиопатии [14].

Нарушения внутриклеточного распределения митохондрий при тяжелой острой гипоксии различного происхождения приводят к развитию митохондриальной дисфункции: снижается максимальная скорость дыхания, АДФ-стимулируемое потребление кислорода, существенно снижаются активность креатинкиназы и уровень цитохрома *c*. Митохондрии при этом набухают в результате нарушения в них работы калиевых каналов [16], антиапоптотический белок Bcl-2 перемещается с внутренней на наружную мембрану митохондрий, и запускается процесс апоптоза [11, 17, 6].

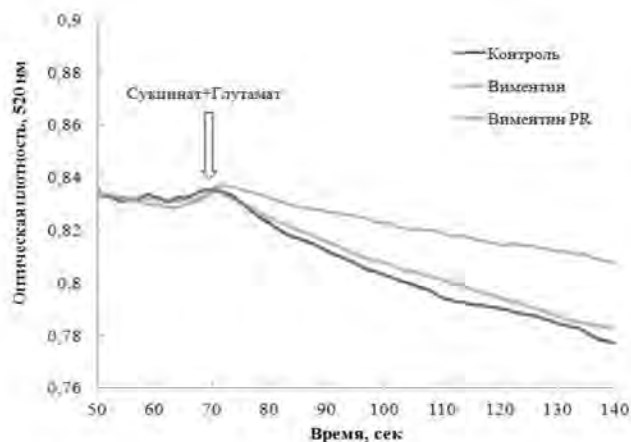
Известно, что при гипоксии, связанной с накоплением АФК, что, как было сказано выше, наблюдается в клетках лишенных виментина и десмина, важная роль отводится АТФ-зависимому транспорту калия в митохондриях, осуществляемому АТФ-чувствительным калиевым каналом (митоK<sub>АТФ</sub>). Было установлено, что mitoK<sub>АТФ</sub> участвует в защите тканей от ишемии, а его модуляторы обладают выраженным кардиопротекторным действием [18–20].

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

### **Влияние виментина и десмина на энергозависимый вход калия в митохондриях**

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 [21]. В качестве отрицательного контроля использовали двойной мутант виментина (Y117L, P56R), не способный связываться с митохондриями [22].

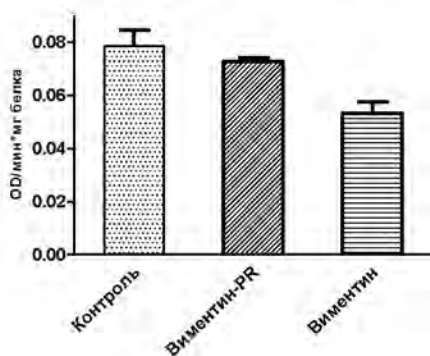


**Рисунок 1.** Влияние виментина (Y117L) и измененного виментина (Y117L, P56R) на изменение оптической плотности суспензии митохондрий печени крысы.

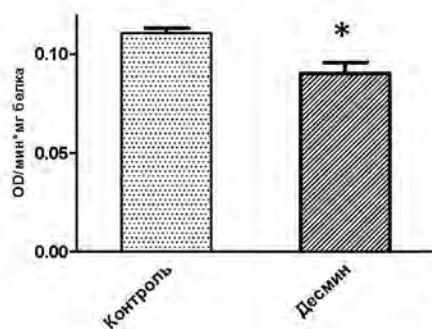
Вход ионов калия определялся по скорости набухания митохондрий в гипотонической среде, содержащей 50 мМ KCl, 5 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 мМ ЭГТА, 5 мкМ цитохром c, 10 мМ HEPES-NaOH (pH 7.4). Кинетику

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°C. Набухание митохондрий инициировали добавлением 5 мМ сукцината в присутствии 2 мкМ ротенона или 5 мМ сукцинатом и 2,5 мМ глутаматом без ротенона.



**Рисунок 2.** Влияние виментина (Y117L) и виментина (Y117L, P56R) на скорость изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени крысы (n=5). Приведены средние значения ± ошибка средней. \*P<<0,05, отличия статистически достоверны по сравнению с контролем.



Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0,2-0,3 мг/мл. Виментин или десмин добавляли в концентрации 30 мкг/мл. Добавка виментина, содержащего сайт связывания митохондрий (VimY117L), приводила к снижению (в среднем на 30-35%) скорости изменения оптической плотности суспензии митохондрий в описанных условиях, т.е. к их набуханию и, следовательно, ингибировала вход ионов калия в митохондрии

(рис. 1, 2).

**Рисунок 3.** Влияние десмина (Y129L) на скорость изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени крысы (n=5). Приведены средние значения ± ошибка средней. \*P<0.05, отличия статистически достоверны по сравнению с контролем

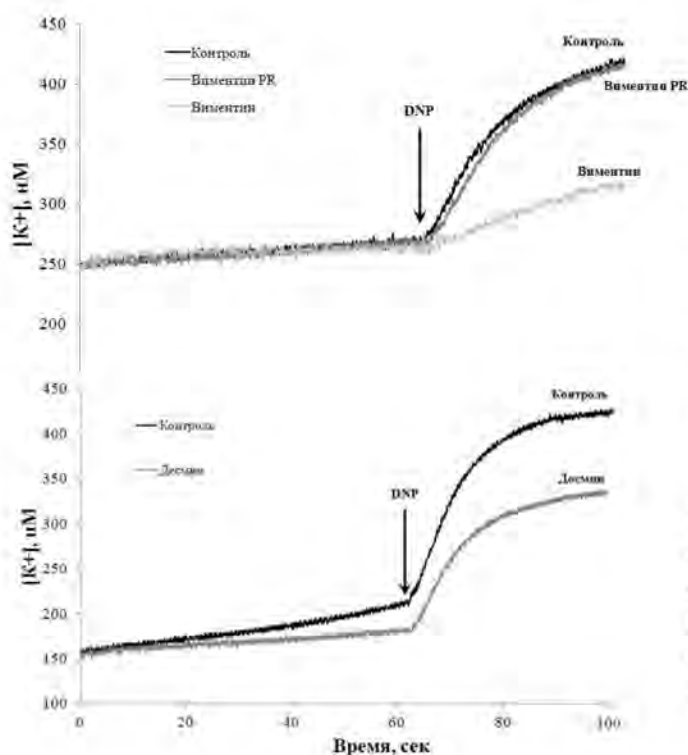
Добавка измененного виментина (Y117L, P56R), в котором замена пролина-56 на аргинин нарушает взаимодействие с митохондриями, практически не оказывала влияния на скорость набухания митохондрий. (Рис. 1 и 2)

Подобно виментину действовал и другой изучаемый нами ПФ - десмин (Y129L), при добавлении которого также замедлялось набухание митохондрий (в среднем на 20-25%, рис. 3).

Следовательно, добавление виментина или десмина приводит к ингибированию АТФ-зависимого набухания митохондрий. Этот эффект не наблюдался при использовании двойного мутанта виментина (Y117L, P56R) который, вследствие замены одной аминокислоты, терял способность взаимодействовать с митохондриями.

### Влияние ПФ на АТФ-зависимый ДНФ-стимулированный транспорт калия в митохондриях печени крыс

Функционирование митоK<sub>АТФ</sub> канала также оценивали по скорости АТФ-зависимого выхода калия из митохондрий, инициированного разобщителем окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом (ДНФ). Данный метод позволяет регистрировать работу митоK<sub>АТФ</sub> канала 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4). Выход K<sup>+</sup> 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°C.



**Рисунок 4.** Влияние виментина (Y117L) и виментина (Y117L, P56R) (концентрация 30 мкг/мл) на скорость ДНФ-индуцированного выхода ионов калия из митохондрий. Типичная кривая изменения проницаемости митохондриальной мембраны для ионов калия после добавления разобщителя окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенола (ДНФ, 50 мкМ). ПФ в концентрации 30 мкг/мл вносились в кювету за 1 мин до начала измерений.

**Рисунок 5.** Влияние десмина (30 мкг/мл) на скорость ДНФ-индуцированного выхода ионов калия из митохондрий. Типичная кривая изменения проницаемости митохондриальной мембраны для ионов калия после добавления разобщителя окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенола (ДНФ, 50 мкМ). Десмин в концентрации 30 мкг/мл вносился в кювету за 1 мин до начала измерений.

Из данных, представленных на рис. 4 и 5, видно, что преинкубация митохондрий в течении 1 минуты с белками ПФ (виментин или десмин) ингибирует ДНФ-индуцированный выход ионов калия. В то же время, добавка измененного виментина (Y117L, P56R), не оказывала влияния на скорость выхода калия из митохондрий. Видно, что добавление обоих белков снижает скорость выхода  $K^+$  из митохондрий в среднем на 20-25% (десмин) и на 50-65% (виментин). Полученный эффект ПФ на митохондрии имел концентрационную зависимость.

Таким образом, при использовании двух различных методов определения АТФ-зависимого транспорта калия, показано, что виментин и десмин ингибируют этот транспорт, осуществляемый посредством работы митоК<sub>АТФ</sub>. Известно, что одной из функций митоК<sub>АТФ</sub> является регуляция объема митохондрий и ингибирование транспорта калия, приводит к сокращению митохондрий [23].

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 [5, 24]. Можно предположить, что оба ПФ, связываясь с митохондриями, ингибируют работу митоК<sub>АТФ</sub> и держат митохондрии в сокращенном 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 связываться с митохондриями [22], не оказывал влияния на транспорт калия в митохондриях, что указывает на специфичность действия этого ПФ.

Полученные результаты позволяют предположить, что эффекты ПФ на митохондрии, наблюдаемые в живых клетках [25] 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 [5, 24]. Насколько справедливо это предположение, покажут дальнейшие исследования.

#### Список литературы

1. Herrmann H, Aebl U (2004). *Annu Rev Biochem.* 73,749–789.
2. Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, Liao J, Omary MB (2005). *Trends Cell Biol.* 15,608–617.
3. Fuchs E, Weber K (1994). *Annu Rev Biochem.* 63,345–382.
4. Wagner OI, Lifshitz J, Janmey PA, Linden M, McIntosh TK, Leterrier JF (2003). *J Neurosci.* 23,9046–9058.
5. Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y (2000). *J Cell Biol* 150,1283–1298.
6. Некрасова ОЕ, Кулик АВ, Минин АА (2007). *Биологические мембраны.* 24,126–132.
7. Tolstonog GV, Belichenko-Weitzmann IV, Lu JP, Hartig R, Shoeman RL, Traub U, Traub P (2005). *DNA Cell Biol.* 24,680–709.
8. Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S (2007). *Exp Cell Res.* 313, 2063–2076.
9. Daiber A (2010). *Biochim Biophys Acta.* 1797, 897–906.
10. Chernyak BV, Izyumov DS, Lyamzaev KG, Pashk ovskaya AA, Pletjushkina OY, Antonenko YN, Sakharov DV, Wirtz KW, Skulachev VP (2006). *Biochim Biophys Acta.* 1757, 525–534.
11. Karbowski M, Youle RJ (2003). *Cell Death and Differentiation.* 10,870–880.
12. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2002). *EMBO J.* 21, 1616–1627.
13. Пшенкина НН (2008). *Вестник Российской Военно-медицинской академии.* 23,219 с.
14. Минин АА, Молдавер МВ (2008). *Успехи биол. химии.* 48,221–252.
15. Schwarz N, Leube RE (2016). *Cells.* 5(3).
16. Garlid K, Dos Santos P, Xie Z, Paucek P (2003). *Biochim Biophys Acta.* 1606(1-3), 1-21.

17. Скулачев ВП (2001). *Российский биомедицинский журнал*. 5, 116–126.
18. Розова ЕВ, Маньковская ИИ, Миронова ГД (2015). *Биохимия*. 80(8), 1186-1194.
19. Krylova IP, Kachaeva EV, Rodionova OM, Negoda AE, Evdokimova NR, Balina MI, Sapronov NS, Mironova GD (2006). *Exp Geront*. 41, 697–703.
20. Mironova GD, Shigaeva MI, Gritsenko EN, Murzaeva SV, Gorbacheva OS, Germanova EL, Lukyanova LD (2010). *J Bioenerg Biomembr*. 42, 473–481.
21. Meier M, Padilla GP, Herrmann H, Wedig T, Hergt M, Patel TR, Stetefeld J, Aeberli U, Burkhard P (2009). *J Mol Biol*. 390, 245-261.
22. Nekrasova OE, Mendez MG, Chernouvanenko IS, Tyurin-Kuzmin PA, Kuczmarski ER., Gelfand VI., Goldman RD, Minin AA (2011). *Mol Biol Cell*. 22(13), 2282-2289.
23. Garlid KD, Paucek P (2003). *Biochim Biophys Acta*. 1606, 23-41.
24. Tang, HL, Lung HL, Wu KC, Le AH, Tang HM, Fung MC (2008). *Biochem J*. 410, 41–146.
25. Chernouvanenko IS, Matveeva EA, Gelfand VI, Goldman RD, Minin AA (2015). *FASEB J*. 29(3), 820-827.

## ***Глава 14. РОЛЬ ПОРИНОВЫХ КАНАЛОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ В РАЗВИТИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ, ИНДУЦИРУЕМОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ***

Теплова В.В.<sup>1</sup>, Мальков А.Е.<sup>1</sup>, Холмухамедов Э.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУИ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

### **Введение**

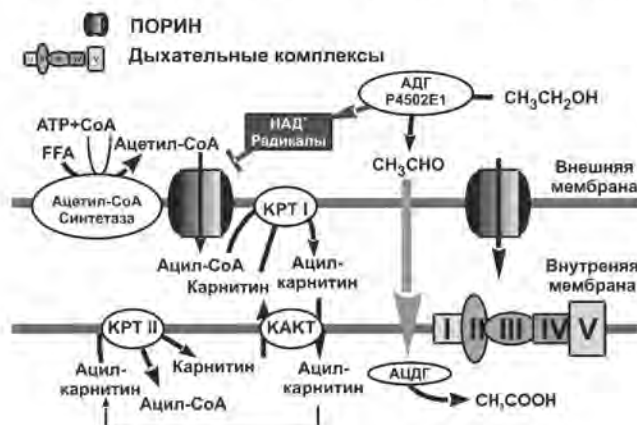
Хронический алкоголизм является одной из важнейших проблем современности. Продолжительное злоупотребление алкоголем провоцирует развитие ряда тяжелейших заболеваний, основными из которых являются алкогольное поражение печени с последующими нарушениями системного метаболизма, и алкогольная печеночная энцефалопатия. Печеночная энцефалопатия – мультифакторный синдром, в котором функция центральной нервной системы нарушена в результате повышенной концентрации аммиака в крови при повреждениях функций печени. Это заболевание приводит к нарушениям сна, резким перепадам настроения, изменениям личностных характеристик, тревожному и депрессивному состоянию, расстройствам когнитивных функций, а в наиболее тяжёлых случаях к коматозному состоянию. Имеющиеся в литературе данные указывают на то, что развитие печеночной энцефалопатии связано с нарушениями метаболизма жизненно важных митохондриальных метаболитов и увеличением уровня окислительного стресса [1, 2]. Установлено, что при алкогольной печеночной энцефалопатии снижается функциональная и детоксицирующая активность клеток печени и увеличивается уровень токсинов, таких как аммиак и марганец, которые могут повреждать клетки мозга [3-5]. Однако причины и механизмы гипераммониемии, обнаруживаемой при алкогольной интоксикации, остаются невыясненными. Причины развития митохондриальных дисфункций и окислительного стресса в патогенезе алкогольной печеночной энцефалопатии в настоящее время также не выявлены. Тогда как для успешного лечения и преодоления последствий этого заболевания и развития новых подходов нейропротекции необходимо выяснить механизмы развития печеночной энцефалопатии.

В настоящее время усиливается понимание того, что возникновение и развитие различных патологий в организме человека связано с нарушением функций митохондрий. Функционирование митохондрий и их роль в жизнедеятельности и гибели клеток связаны с регуляцией каналов и пор в митохондриальных мембранах. Митохондриальный метаболизм требует непрерывного обмена субстратами между цитоплазмой и матриксом митохондрий. Для нормального обмена эти метаболиты должны пересечь две митохондриальные мембраны – внешнюю и внутреннюю. Транспорт метаболитов через внутреннюю мембрану осуществляется множеством специфических транспортных белков и достаточно хорошо изучен [6, 7]. Через внешнюю мембрану водорастворимые метаболиты проникают в межмембранное пространство митохондрий через открытые потенциал-зависимые анионные каналы (VDAC), образованные белками поринами, которые обеспечивают регуляцию обмена метаболитами между митохондриями и цитоплазмой [8].

Любые нарушения этого обмена приведут к существенным нарушениям метаболизма клеток особенно в тех процессах, которые невозможны без участия митохондрий, катализирующих синтез АТФ, мочевины, выработку активных форм кислорода (АФК). В настоящее время внимание многих исследователей направлено на выяснение роли пориновых белков в развитии различных заболеваний, и пориновые белки рассматриваются как перспективные молекулярные мишени для препаратов направленного действия. Однако роль пориновых каналов внешней мембраны митохондрий печени в индукции и развитии алкогольной печеночной энцефалопатии до сих пор остается не выясненной. Выяснению этого вопроса и посвящено настоящее исследование. Представленные в работе данные показывают, что хроническая алкогольная интоксикация приводит к закрыванию пориновых каналов во внешней мембране митохондрий печени, что ограничивает свободную диффузию субстратов окислительного фосфорилирования и цикла мочевины и приводит к нарушению основных функций митохондрий, развитию гипераммониемии, окислительного стресса, нарушению функционирования нервных клеток и алкогольной энцефалопатии.

### Гипотетическая схема окисления этанола в гепатоцитах и транспорта метаболитов через пориновые каналы

Гипотеза, согласно которой алкогольная интоксикация приводит к нарушению основных путей обмена водорастворимых митохондриальных субстратов между матриксом и цитоплазмой, которое вызывает глобальную потерю основных функций митохондрий, заключается в том, что проницаемость внешней митохондриальной мембраны определяется проводимостью пориновых каналов и может меняться при развитии различных патологических состояний.



**Рисунок 1.** Окисление этанола в гепатоцитах и транспорт метаболитов через пориновые каналы. АДГ/P450E1 – алкогольдегидрогеназа и цитохром P450; АЦДГ – митохондриальная ацетальдегиддегидрогеназа; КПТ I и КПТ II – карнитин пальмитоилтрансфераза I и 2; КАКТ – карнитин ацилкарнитинтрансфераза. Показана также дыхательная цепь (комплексы I, II, III, IV) и  $F_0F_1$  АТФ-аза (комплекс V).

На рисунке 1 представлена гипотетическая схема окисления этанола в гепатоцитах и транспорта метаболитов через пориновые каналы, которая показывает, как генерация внутриклеточных сигналов, обусловленных окислением этанола, связана с пориновыми белками и состоянием пориновых каналов во внешней мембране митохондрий, определяющих ее проницаемость. Показано также, к каким изменениям в метаболизме митохондрий приводит закрывание пориновых каналов при алкогольной интоксикации. Этанол ( $CH_3CH_2OH$ ) окисляется в цитоплазме алкогольдегидрогеназой (АДГ) или специальной формой цитохрома P450 (P450E1), которая индуцируется в

эндоплазматическом ретикулуме клеток, но может обнаруживаться и в цитоплазме гепатоцитов.

Продукт первого этапа окисления этанола, ацетальдегид диффундирует в митохондрии, где он окисляется ферментом ацетальдегиддегидрогеназой до ацетата. На всех этапах окисления этанола происходит восстановление пиридиновых нуклеотидов и увеличение редокс-потенциала в цитоплазме и митохондриальном матриксе. Кроме того, окисление этанола цитохромом P4502E1 сопровождается производством кислородных радикалов, которые нейтрализуются совместным действием цитоплазматической и/или митохондриальной супероксиддисмутазы и каталазы. Первый продукт окисления, ацетальдегид, может ковалентно связываться с карбоксильными группами в молекулах белков и образовывать устойчивые соединения. Существенную роль в поддержании нормального обмена метаболитов между цитоплазмой и митохондриями выполняют каналы во внешней мембране митохондрий, образованные пориновыми белками (ПОРИН). Можно предположить, что глобальные нарушения митохондриальных функций при алкогольном отравлении могут быть обусловлены уменьшением потоков метаболитов через внешнюю мембрану митохондрий из-за закрытия пориновых каналов и нарушения нормального обмена метаболитов не только между митохондриями и цитоплазмой, но также и в самих митохондриях. Закрывание пориновых каналов будет приводить к блокированию и других биохимических процессов, протекающих исключительно в митохондриях и нуждающихся в участии ферментных систем, локализованных в матриксе митохондрий, таких как синтез мочевины и производство метильных групп в митохондриях, через трансаметилирование глицина в системе его расщепления.

### **Окисление этанола снижает проницаемость внешней митохондриальной мембраны в гепатоцитах**

При алкогольной печеночной энцефалопатии с увеличением степени разрушения печени снижается функциональная и детоксицирующая активность клеток печени и увеличивается уровень токсинов, которые могут повреждать клетки мозга. Среди нейротоксинов основным является аммиак. Уровень гипераммониемии у 90% больных циррозом печени достоверно коррелирует со степенью тяжести и развитием печеночной энцефалопатии. Основным механизмом для обезвреживания аммиака в организме служит синтез мочевины в печени. При хроническом поражении печени количество нормально функционирующих гепатоцитов уменьшается, что создает предпосылки для гипераммониемии.

Исследования влияния алкоголя на основные функции митохондрий в культивируемых первичных гепатоцитах показали, что окисление этанола в гепатоцитах ингибирует скорость синтеза мочевины, который протекает исключительно в митохондриях, и способность митохондрий связывать аммиак. Для нормального протекания цикла мочевины все необходимые субстраты, в том числе L-орнитин и L-цитруллин, должны транспортироваться матриксом митохондрий через внешнюю митохондриальную мембрану, и закрывание пориновых каналов во внешней мембране митохондрий может ингибировать синтез мочевины в гепатоцитах. Оценка влияния этанола на дыхание



гепатоцитов, которое активируется синтезом мочевины, показала, что синтез мочевины зависит от состояния пориновых каналов внешней мембраны митохондрий, а закрывание этих каналов под действием этанола сопровождается подавлением скорости дыхания клеток стимулированного синтезом мочевины. Концентрации этанола, которые использовались в этих экспериментах, были того же порядка, что обнаруживаются в крови входящей в печеночную ткань алкогольиков из кишечного тракта через портальную вену. Подавление этанолом синтеза мочевины и дыхания в гепатоцитах частично обращалось ингибиторами метаболизма этого спирта: 4-метилпиразолом, специфическим ингибитором алкогольдегидрогеназы, аминокбензотриазолом и цианамидом, ингибиторами ацетальдегиддегидрогеназы и цитохрома P450E1. Наиболее эффективным ингибитором пориновых каналов из продуктов окисления этанола оказался ацетальдегид. Эти агенты восстанавливали скорость дыхания гепатоцитов, стимулированную активацией синтеза мочевины, приблизительно в одинаковой степени. Так как ни один из исследованных ингибиторов не влиял на скорость разобшенного дыхания в присутствии 2,4-ДНФ, можно сделать вывод о том, что подавление уреагенного дыхания обусловлено закрыванием пориновых каналов и ограничением переноса АТФ/АДФ и субстратов. Эти наблюдения находятся в хорошем соответствии с гипотезой о том, что окисление этанола сопровождается закрыванием пориновых каналов внешней митохондриальной мембраны, уменьшая, таким образом, скорость переноса и подачу субстратов синтеза мочевины в межмембранное пространство митохондрий, что приводит к снижению производства АТФ и подавлению активации дыхания, индуцированного субстратами синтеза мочевины [9-11]. Кроме того, окисление этанола в культуре выделенных гепатоцитов несмотря на избыток кислорода и субстратов окисления вызывало замедление скорости синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата без заметного подавления активности дыхательной цепи или митохондриальной АТФ-синтетазы этанолом. Наблюдаемое ингибирование дыхания снималось дигитонином, пермеабилizующим внешнюю митохондриальную мембрану [11]. В прямых экспериментах с водорастворимым флуоресцентным декстраном с молекулярным весом 3,000 Да было продемонстрировано, что инкубация клеток печени с этанолом снижает накопление молекул флуоресцирующего декстрана в областях, занятых митохондриями, указывая на то, что обработка гепатоцитов этанолом приводит к закрыванию пориновых каналов во внешней мембране митохондрий [12]. Полученные доказательства о закрывании пориновых каналов внешней мембраны митохондрий при метаболическом окислении этанола гепатоцитами являются основой принципиально нового механизма развития алкогольной энцефалопатии, обусловленного нарушением обменных процессов в митохондриях. Все эти процессы могут вызывать нарушение межклеточной, внутриклеточной сигнализации, синаптической пластичности и приводить к снижению когнитивных функций.

## **Влияние алкогольной интоксикации экспериментальных животных на основные функции изолированных митохондрий**

Кроме моделей интактных и пермеабилizованных гепатоцитов для выяснения влияния этанола и продуктов его окисления на состояние пориновых каналов внешней мембраны митохондрий могут быть использованы митохондрии, изолированные из печени контрольных животных и животных с острой и хронической алкогольной интоксикацией. Изолированные митохондрии являются хорошей моделью для исследования влияния алкогольной интоксикации на основные системы и параметры митохондрий печени (митохондриальный мембранный потенциал, окислительное фосфорилирование, синтез АТФ, ионный транспорт и производство реактивных форм кислорода). Исследования влияния длительного хронического употребления 20% этанола крысами *Wistar* на ряд митохондриальных функций показали, что длительное (в течение 7 месяцев) хроническое употребление этанола крысами значительно снижало скорости дыхания, синтеза АТФ и дыхательный контроль. Это ингибирование не зависело от субстрата, который окисляют митохондрии, и проявлялось как при окислении субстратов первого комплекса дыхательной цепи, так и при окислении сукцината, субстрата третьего комплекса дыхательной цепи. Таким образом, аналогично тому, как окисление экзогенного этанола в гепатоцитах подавляет скорости окислительного фосфорилирования и разобщенного дыхания, моделирование хронической алкоголизации на крысах показывает изменение этих параметров в изолированных митохондриях печени. Наблюдаемое в митохондриях печени крыс хронических алкоголиков ингибирование окислительного фосфорилирования действительно определяется снижением доступа субстратов дыхания и окислительного фосфорилирования из-за закрывания пориновых каналов во внешней мембране митохондрий, так как эксперименты с закрыванием пориновых каналов в контрольных митохондриях с помощью известных ингибиторов VDAC моделировали состояние митохондрий, наблюдаемое у крыс хронических алкоголиков. Инкубация контрольных митохондрий с эрастином значительно увеличивала время окислительного фосфорилирования, которое увеличивалось с возрастанием концентрации эрастина. Подавление скорости синтеза АТФ не обусловлено высоким отношением НАДН/НАД, так как наблюдается и при использовании НАД-независимых субстратов дыхания, а связано именно с закрытием пориновых каналов, о чем свидетельствуют наши данные о влиянии эрастина, известного ингибитора VDAC, на функции митохондрий. Таким образом, закрытие пориновых каналов во внешней мембране митохондрий приводит к энергетической дисфункции митохондрий, что в дальнейшем может приводить к окислительному стрессу, нарушению функции гепатоцитов и развитию печеночной алкогольной энцефалопатии.

Кроме подавления транспорта метаболитов закрывание пориновых каналов во внешней мембране митохондрий может препятствовать свободному выходу супероксид радикалов, которые образуются на внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны при работе дыхательной цепи и освобождаются в межмембранное пространство, вероятно через открытые пориновые каналы. Исследование влияния известного ингибитора пориновых

каналов G3139 на развитие в изолированных митохондриях «внутреннего» окислительного стресса показало, что закрывание пориновых каналов увеличивает уровень флуоресценции дигидрооксиэтидина, флуоресцентного зонда содержания супероксид-радикалов в митохондриях, что соответствует возрастанию уровня супероксид-радикалов в митохондриях. Обработка митохондрий дигитонином, образующим поры во внешней мембране митохондрий и облегчающим диффузию супероксид-анионов из межмембранного пространства митохондрий в среду инкубации, уменьшила интенсивность флуоресценции дигидрооксиэтидина и, соответственно, степень окислительного стресса. Кроме того, закрывание пориновых каналов под действием известных VDAC блокаторов эрастина и G3139, ускоряло открытие в митохондриях  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемой неспецифической поры (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) и снижало кальциевую ёмкость митохондрий с  $138,2 \pm 8,7$  до  $51,8 \pm 4,3$  и  $54,9 \pm 3,5$  нмоля  $\text{Ca}^{2+}$ /мг белка соответственно [13, 14]. Алкогольная интоксикация, которая по нашей гипотезе приводит к снижению проницаемости внешней мембраны митохондрий, также вызывала значительное снижение кальциевой ёмкости, необходимой для открытия mPTP. Таким образом, закрывание пориновых каналов во внешней мембране митохондрий при активной дыхательной цепи способствует избыточному накоплению кислородных радикалов в матриксе митохондрий, что приводит к развитию «внутреннего» окислительного стресса, повышению чувствительности митохондрий к кальциевой нагрузке и активации открытия mPTP.

### **Развитие системного окислительного стресса при алкогольной интоксикации**

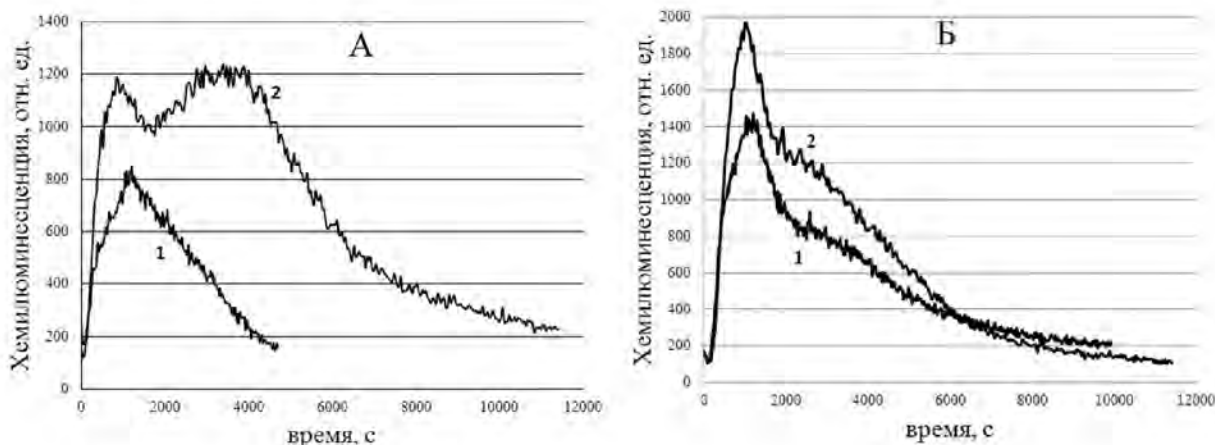
В последние годы высказано предположение о том, что окислительный стресс является частью патофизиологического каскада алкогольной печеночной энцефалопатии. Развитие в митохондриях «внутреннего» окислительного стресса и повышение их чувствительности к кальциевой нагрузке, вызывающей открытие  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемой mPTP, приводит к нарушению всего клеточного метаболизма и развитию системного окислительного стресса, в том числе при алкогольной печеночной энцефалопатии.

Получены новые данные, демонстрирующие роль окислительного стресса в патогенезе алкогольной энцефалопатии. Наши исследования показали, что развитие хронической алкогольной интоксикации, индуцирующее печеночную энцефалопатию, сопровождается увеличением содержания алкоголя в крови, меньшим приростом массы тела и большим весом печени опытных животных. При этом в крови животных хронических алкоголиков снижается уровень мочевины на 60-70%, увеличивается уровень аммиака на 70-80% и уровень триглицеридов. Проведенная количественная оценка биомаркеров окислительного стресса, таких как малоновый диальдегид (MDA) и содержание SH-групп в плазме крови и тканях печени и мозга, данные которой представлены в таблице 1, свидетельствует об увеличении окислительного стресса, снижении в организме хронических алкоголиков уровня восстановленного глутатиона и повышении интенсивности перекисных процессов.

**Таблица 1.** Содержание SH-групп и образование MDA в плазме крови и тканях контрольных крыс и крыс с хроническим алкоголизмом

Группа животных	Концентрация свободных SH-групп, мкМ	Содержание SH-групп, мкмол/гр ткани		Концентрация MDA, мкМ	Скорость образования MDA, нмол/гр ткани за час	
		плазма крови	мозг		печень	плазма крови
Контрольная	51,73±7,89	1,52±0,09	8,34±0,35	5,49±1,06	212,3±11,1	603,7±12,5
Хронические алкоголики	28,81±3,18	0,87±0,08	5,42±0,24	10,73 ±1,21	314,0±21,0	705,8±14,1

В условиях длительной алкогольной интоксикации, достаточной для развития печеночной энцефалопатии, концентрация свободных SH-групп в плазме крови животных снижается почти в 2 раза, а уровень малонового диальдегида и концентрация активных продуктов тиобарбитуровой кислоты повышаются в 2 и 4 раза соответственно. Скорость образования MDA в тканях печени и мозга алкоголиков увеличилась на 15%, а концентрация свободных SH-групп сократилось на 35%. Существенные различия были получены и при сравнении генерации активных форм кислорода (АФК), индуцируемой РМА, в нейтрофилах и моноцитах крови контрольных крыс и крыс хронических алкоголиков (Рис. 2).



**Рисунок 2.** Продукция АФК, индуцируемая РМА, в нейтрофилах (А) и моноцитах (Б) крови контрольных крыс (1) и крыс хронических алкоголиков (2).

В крови алкоголиков наблюдалось увеличение фракции клеток моноцитарного ряда. Выделенные моноциты, как и нейтрофилы, продуцировали большее количество АФК в ответ на РМА по сравнению с контролем. Впервые обнаружено, что на фоне повышенной продукции АФК в нейтрофилах крыс хронических алкоголиков наблюдается появление второго пика хемилюминесценции, что может быть связано с высвобождением активированной миелопероксидазы и говорит о праймированном состоянии клеток. Таким образом, окисление этанола, вызывающее увеличение уровня аммиака, снижает уровень восстановленного глутатиона и повышает

интенсивность пероксидных процессов, приводя к усилению окислительного стресса. Это может привести к повреждению мозговой деятельности подопытных животных и развитию печеночной энцефалопатии. Представленные данные согласуются с данными литературы о повышении интенсивности пероксидных процессов и снижении в организме хронических алкоголиков активности различных антиоксидантных ферментов и витаминов, что приводит к снижению общей антиоксидантной активности. Одним из объяснений наблюдаемого низкого уровня общей антиоксидантной активности у крыс алкоголиков может быть увеличенное использование антиоксидантов в уборке свободных радикалов. Окислительный стресс, сопровождающий развитие алкогольной энцефалопатии, наряду с увеличением внутреннего окислительного стресса митохондрий может индуцировать нарушение межклеточной и внутриклеточной сигнализации и синаптической пластичности и приводить к развитию алкогольного поражения печени и мозга и как следствие к алкогольной энцефалопатии.

### **Повреждение мозговой деятельности подопытных животных при развитии алкогольной энцефалопатии**

Основным фактором, ответственным за нейрологические повреждения при энцефалопатии принято считать гипераммониемию [15]. Уровень гипераммониемии у 90% больных циррозом печени достоверно коррелирует со степенью тяжести и развитием печеночной энцефалопатии. Наши исследования также показали, что при развитии хронической алкогольной интоксикации уровень мочевины в крови опытных животных снижается на 60-70%, а уровень аммиака увеличивается на 70-80%. Существуют данные о том, что гипераммониемия нарушает долговременную потенциацию в гиппокампе - структуре мозга, ответственной за формирование памяти [16]. Ослабление долговременной потенциации в гиппокампе может быть связано с нарушением передачи импульсов между нейронами, а также с изменением возбудимости структуры в целом. Современные работы, в которых исследовалось воздействие употребления алкоголя на когнитивную деятельность человека и экспериментальных животных выявили нарушение пространственной памяти и внимания при развитии печеночной энцефалопатии [17]. Однако механизмы повреждения гиппокампа остаются неизвестными. Полученные доказательства о закрывании пориновых каналов внешней мембраны митохондрий при метаболическом окислении этанола являются основой принципиально нового механизма развития алкогольной энцефалопатии, обусловленного нарушением обменных процессов в митохондриях. Все эти процессы могут вызывать нарушение межклеточной, внутриклеточной сигнализации, синаптической пластичности и приводить к повреждению мозговой деятельности и снижению когнитивных функций.

В наших исследованиях параметры повреждения мозговой деятельности крыс при развитии печеночной энцефалопатии оценивались *in vivo* - по изменениям активности гиппокампальных нейронов и *in vitro* - по изменениям возбудимости нейронов срезов головного мозга в условиях острой и хронической алкогольной интоксикации. Модель хронической алкогольной

интоксикации позволила получить характерные патологические изменения, сравнимые с таковыми у человека при длительном злоупотреблении алкоголем.

### Активность гиппокампальных нейронов *in vivo*

Для оценки изменений активности гиппокампальных нейронов исследовали фоновую популяционную активность нейронов гиппокампа в поле СА1 *in vivo*, состоящую преимущественно из тета- и дельта- волн, а также ответы на электрическую стимуляцию неокортикального входа - перфорирующего пути, которая вызывала в гиппокампе нарастающие ответы, представляющие собой высокоамплитудные (до 2 мВ) разряды, следующие с частотой 2-6 Гц, с накладывающимися на них бета- и гамма- осцилляциями с частотой 20-40 Гц, и на сенсорные (фото) стимулы, подаваемые с частотой 8 Гц. Для регистрации электроэнцефалограмм *in vivo* проводили стереотаксические операции по имплантированию регистрирующего и индифферентного электродов в мозг крыс – контрольных, с острой и хронической алкогольной интоксикацией. Для регистрации вызванных полевых потенциалов в область перфорирующего пути вживлялся стимулирующий электрод.

Активность гиппокампальных нейронов *in vivo* в условиях острой алкогольной интоксикации представлена на рис. 3. Локальные полевые потенциалы поля СА1 гиппокампа, зарегистрированные в контрольных животных, были характерны для здоровых животных в свободном поведении. Активность гиппокампа состояла преимущественно из тета- и дельта- волн. Средняя частота ритма в тета- диапазоне составляла  $5.1 \pm 0.4$  Гц, частота дельта ритма была  $2.9 \pm 0.6$  Гц. При острой алкогольной интоксикации характер электроэнцефалограммы изменялся после каждого нового введения алкоголя.

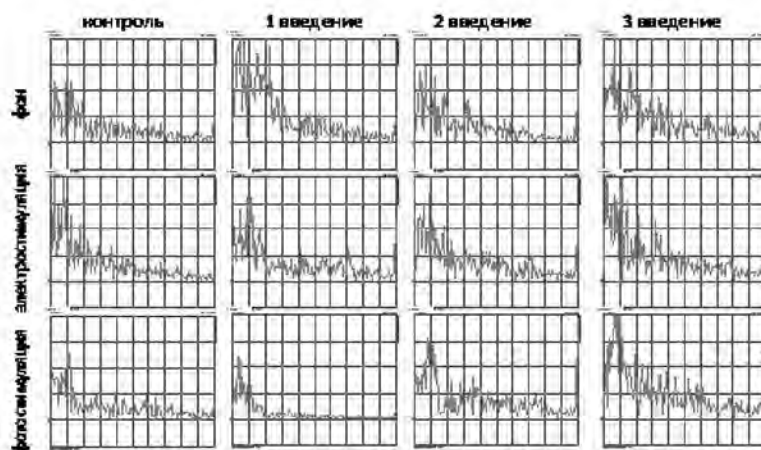


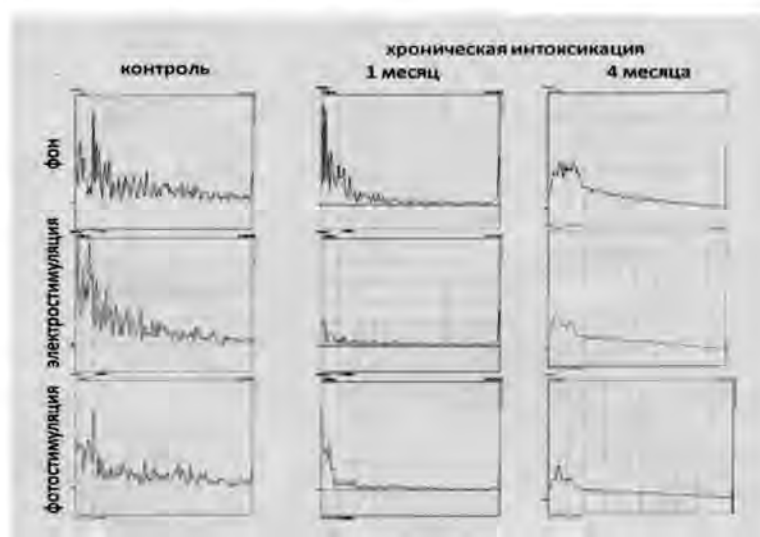
Рисунок 3. Активность гиппокампальных нейронов *in vivo* в условиях острой алкогольной интоксикации

После первого введения этанола наблюдалось резкое увеличение ритмических процессов в гиппокампе. На электроэнцефалограмме преобладали низкочастотные дельта-волны регистрируемые в диапазоне 0.5 – 4 Гц. Мощность ритма в тета-диапазоне увеличивалась в среднем на 50%. Однако через неделю после второго введения этанола эти изменения активности гиппокампа становились менее выраженными (увеличение мощности тета-ритма не превышало 20%) и практически исчезали после третьего введения. Аналогично

ослаблялась способность гиппокампа подстраиваться по частоте к сенсорным стимулам. После серии электрических импульсов клеточные ритмы гиппокампа подстраивались к частоте электрической стимуляции. Если в ответ на электрическую стимуляцию в гиппокампе здоровых крыс возникали стабильные, не меняющие паттерн, популяционные ответы со средней амплитудой первого пика  $0,49 \pm 0,16$  мВ и латентным периодом  $32 \pm 9,5$  мс, то с каждым введением алкоголя наблюдалось постепенное увеличение как амплитуды популяционного ответа нейронов CA1, так и латентного периода. После первого и второго введения алкоголя исчезал пик “подстройки” гиппокампальных осцилляций к режиму электрической стимуляции. Мощность ритма в тета-диапазоне не изменялась даже после третьего введения алкоголя. При оценке способности гиппокампа реагировать на сенсорные фото стимулы, контрольные животные продемонстрировали ориентировочные реакции, выражающиеся увеличением мощности тета-ритма в среднем на 35%. При острой алкогольной интоксикации после первого введения алкоголя наблюдалось снижение активности гиппокампа в ответ на фотостимуляцию. Мощность тета-ритма снижалась примерно на 30%. Однако уже после второго введения алкоголя мощность тета-ритма соответствовала контрольным значениям, а после третьего введения незначительно возрастала.

Таким образом, при острой алкогольной интоксикации происходит резкое увеличение ритмических процессов в гиппокампе, свидетельствующее о нарушении обработки стимулов от сенсорных и неокортикальных входов гиппокампа. Следовательно, в условиях острой алкогольной интоксикации и последующей гипераммонемии структура теряет способность адекватно обрабатывать информацию. Эти нарушения наиболее заметны при первоначальном токсическом воздействии. При повторных введениях, очевидно, происходит адаптация организма, и негативные последствия употребления алкоголя нивелируются.

Активность гиппокампальных нейронов *in vivo* в условиях хронической алкогольной интоксикации представлена на рис. 4.



**Рисунок 4.** Активность гиппокампальных нейронов *in vivo* при хронической алкогольной интоксикации

Анализ полевой активности гиппокампа показал, что у крыс с хронической моделью алкогольной энцефалопатии уже через месяц употребления алкоголя

наблюдалось значительное снижение мощности гиппокампальных осцилляций (до 40% от контрольных значений). После 4-х месяцев употребления алкоголя изменения в электроэнцефалограмме сохранились, уровень гиппокампальных осцилляций так же оставался сниженным. Так же, как и в случаях энцефалопатии у человека наблюдалось драматическое падение мощности ритма в тета-диапазоне. За время регистрации не удалось выявить ни одного стабильного эпизода генерации тета-ритма, что свидетельствует о нарушении когнитивной функции гиппокампа. В противоположность контрольным крысам и крысам с острой алкогольной интоксикацией электрическая и сенсорная стимуляция вызывали депрессию активности гиппокампа как после 1 месяца, так и после 4-х месяцев интоксикации. У животных с хронической моделью алкогольной энцефалопатии как после 1 месяца, так и после 4-х месяцев алкогольной интоксикации гиппокамп не отвечал популяционными разрядами на электрические стимулы принятой амплитуды. После предъявления серии стимулов наблюдалась депрессия активности (на  $85 \pm 5\%$  по сравнению с фоновой активностью) на всех частотах в диапазоне от 0 до 50 Гц. Также как в случае с электрической стимуляцией, серия световых стимулов вызывала резкое падение мощности гиппокампальных осцилляций. После предъявления световых стимулов у животных с развитым хроническим алкоголизмом наблюдалась депрессия активности, мощность ритма падала в среднем на 60-70%. Ориентировочные реакции в электроэнцефалограмме гиппокампа крыс хронических алкоголиков отсутствовали.

Можно сделать вывод о том, что модель с хроническим употреблением алкоголя более точно воспроизводит когнитивные нарушения при развитии печеночной энцефалопатии. Характерные для этого синдрома ослабление пространственной памяти и внимания, нарушение трансмиссии выражаются в неспособности гиппокампа активироваться при увеличении информационного потока. Одним из возможных факторов, обуславливающим снижение гиппокампальной функции, может быть нарушение метаболизма нейронов и глии.

### **Активность гиппокампальных нейронов *in vitro***

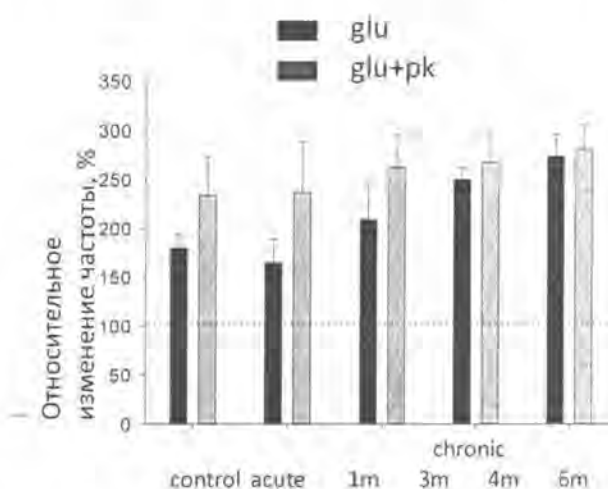
Исследования активности гиппокампальных нейронов *in vitro* проводились на переживающих срезах мозга контрольных крыс и крыс, подвергнутых острой и хронической алкогольной интоксикации. В этих условиях была проведена оценка изменений активности пирамидных нейронов гиппокампа поля СА1 как фоновой, так и вызванной электрической стимуляцией, а также оценена степень изменений порогов возбудимости при аппликации фармакологических модуляторов - глутамата и блокатора ГАМК-эргических рецепторов пикротоксина.

В фоновой активности нейронов гиппокампа при острой алкогольной интоксикации, а также в реакциях на аппликацию фармакологических модуляторов даже после 3-х кратного введения алкоголя не наблюдалось значимых отличий от контрольных значений. У нейронов гиппокампа крыс с хронической моделью алкогольной энцефалопатии наблюдалось достоверное снижение спонтанной активности. Частоты залповых разрядов нейронов падала до  $1,89 \pm 0,17$  Гц через один месяц приема алкоголя;  $1,67 \pm 0,12$  Гц через 4 месяца



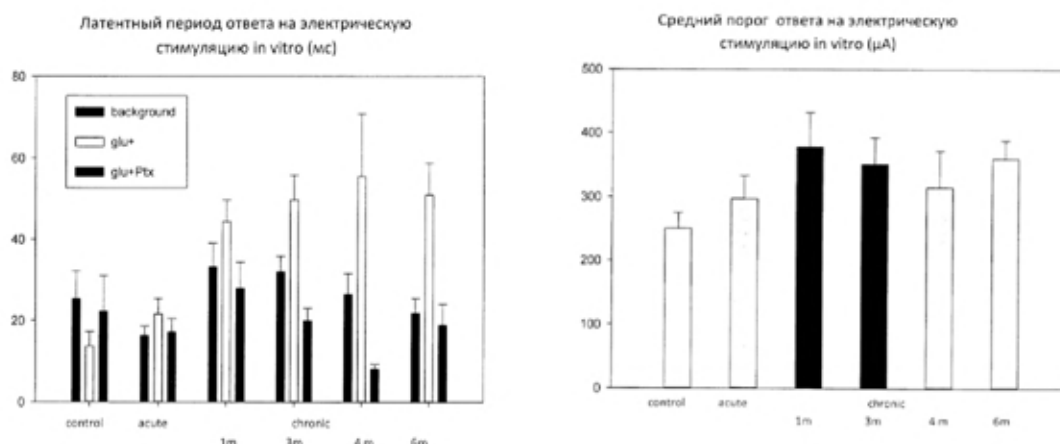
и  $1,26 \pm 0,14$  Гц через 6 месяцев алкогольной интоксикации по сравнению с  $2,5 \pm 0,28$  Гц в контроле.

На рисунке 5 представлены данные по активности гиппокампальных нейронов при воздействии глутамата и пикротоксина. В норме аппликация глутамата приводила к обратимому изменению средней частоты разрядов всех зарегистрированных нейронов гиппокампа. На подавляющее большинство нейронов, глутамат оказывал активирующее действие. Частота разрядов повышалась в среднем на 80%, частота ритмических залпов также возрастала. Аппликация глутамата на фоне пикротоксина также приводила к повышению частоты разрядов. По сравнению с контрольными значениями частота разрядов возрастала на 130%. Частота залпов также возрастала.



**Рисунок 5.** Активность гиппокампальных нейронов при воздействии глутамата и пикротоксина. Активирующее воздействие как глутамата, так и пикротоксина наблюдалось и у животных с острой и хронической алкогольной энцефалопатией. Причем с увеличением срока хронического приема алкоголя частота разрядов повышалась в среднем со 110% (1 месяц) до 150% (3 месяца) и 180% (6 месяцев). Аппликация глутамата на фоне пикротоксина приводила к более выраженному повышению частоты разрядов.

Все зарегистрированные гиппокампальные нейроны отвечали на электрическую стимуляцию залпом импульсов после начального торможения. На рисунке 6 показаны изменения латентного периода и среднего порога ответа на электрическую стимуляцию пирамидных нейронов гиппокампа поля СА1. Во всех моделях алкогольной печеночной энцефалопатии глутамат вызывал увеличение латентного периода, что может быть связано с преимущественной активацией тормозных ГАМК-эргических нейронов. Латентный период в группе острой алкогольной интоксикации был ниже по сравнению с контролем, но после аппликации глутамата происходило увеличение латентного периода. При хроническом употреблении алкоголя нейроны гиппокампа достоверно медленнее реагировали на электрические импульсы, а аппликация глутамата вызывала более выраженное по сравнению с острой алкогольной интоксикацией увеличение латентного периода. После блокады ГАМК-эргических рецепторов пикротоксином аппликация глутамата не изменяла длительности латентного периода ни в контроле, ни в группе острой алкогольной интоксикации, ни при хроническом употреблении алкоголя в течение 1 месяца.



**Рисунок 6.** Изменения латентного периода и среднего порога ответа на электрическую стимуляцию пирамидных нейронов гиппокампа поля CA1

Однако при более длительной хронической алкоголизации (3-6 месяцев) латентный период после аппликации глутамата на фоне пикротоксина сокращался. Помимо этого, показано достоверное увеличение порога активации гиппокампальных нейронов при развитии хронической алкогольной энцефалопатии. Порог реакции нейронов на электрическую стимуляцию в контроле составил  $250 \pm 25$  мкА. В группе с острой алкогольной интоксикацией порог реакции составил  $297 \pm 36$  мкА; при этом латентный период ответа был ниже по сравнению с контролем. Порог реакции нейронов из группы хронической алкогольной энцефалопатии уже спустя один месяц составил  $378 \pm 54$  мкА. Нейроны гиппокампа достоверно медленнее реагировали на электрические импульсы.

Таким образом, при развитии алкогольной интоксикации наблюдается существенное снижение мощности гиппокампальных осцилляций, свидетельствующее о нарушении когнитивной функции гиппокампа. Электрическая и сенсорная стимуляция мозга крыс хронических алкоголиков вызывали депрессию активности гиппокампа. Полученные нами данные демонстрируют, что в гиппокампе крыс с хронической моделью алкогольной энцефалопатии достоверно снижается частота залповых разрядов нейронов и увеличивается порог активации гиппокампальных нейронов. При этом, по сравнению с контролем нейроны мозга алкогольных крыс сильнее активируются при воздействии глутамата. У крыс, подвергавшихся гипераммониемии, было обнаружено снижение сайтов связывания глутамата без потери аффинности [18]. С другой стороны, во внеклеточном пространстве может происходить чрезмерное накопление глутамата, вследствие снижения функции астроцитов и глутаминситаза [19]. На астроциты может оказывать влияние и увеличение объема жидкости в межклеточном пространстве мозга. При этом возрастает активность протеинкиназ, поднимается внутриклеточная концентрация кальция, увеличивается экспрессия рецепторов ГАМК и нарушается транспорт аминокислот [20]. Все эти факторы нарушают нейротрансмиссию и смещают баланс межнейронных связей от возбуждения в сторону торможения, что может объяснить обнаруженное в наших экспериментах увеличение порогов активации и снижение уровня нейронных осцилляций (залпов) гиппокама. Обнаруженное нами увеличение латентного периода ответов на электрическую стимуляцию и

увеличение латентного периода при аппликации глутамата может быть связано с преимущественной активацией тормозных ГАМК-нейронов. Помимо усиления тормозных процессов в гиппокампе аммоний может затруднять прохождение сигнала как в тормозных, так и в возбуждающих синаптических контактах и обуславливать более длительную задержку при формировании ответа на стимул. Наши данные показали, что только в случае длительной хронической алкогольной интоксикации латентный период ответа значительно сокращается после блокады ГАМК-рецепторов, что говорит о том, что у этой группы животных тормозная трансмиссия вносит большой вклад в увеличение латентного периода. Полученные данные свидетельствуют о значительных морфофункциональных изменениях в гиппокампе при развитии хронической алкогольной энцефалопатии, приводящих к снижению возбудимости этой структуры и нарушению способности адекватно реагировать на внешние стимулы. Электроэнцефалографические исследования с использованием метода вызванных потенциалов показали, что алкоголики испытывают трудности в дифференцировке стимулов [21]. У больных алкоголизмом также имеет место запаздывание появления волны P300 на зрительные стимулы по сравнению со здоровыми добровольцами, что свидетельствует о нарушении переработки информации в мозге [22].

### **Заключение**

На основании представленных данных можно сделать вывод о том, что развитие алкогольной интоксикации приводит к нарушению обменных процессов в митохондриях печени, вследствие этанол-индуцируемого закрытия пориновых каналов во внешней мембране митохондрий и ограничения свободного обмена субстратами окислительного фосфорилирования и субстратов цикла мочевины, что приводит к окислительному стрессу, снижению эффективности связывания аммиака, гипераммониемии и нарушениям функционирования нервных клеток, характерных для алкогольной печеночной энцефалопатии. Все эти процессы могут вызывать нарушение межклеточной, внутриклеточной сигнализации, синаптической пластичности и приводить к снижению когнитивных функций. Таким образом, установлена взаимосвязь между метаболическим окислением этанола, изменением проницаемости внешней митохондриальной мембраны печени, окислительным стрессом и степенью повреждений мозговой деятельности подопытных животных при развитии алкогольной энцефалопатии. Полученные доказательства являются основой принципиально нового механизма развития алкогольной энцефалопатии, обусловленного нарушением обменных процессов в митохондриях. Эти данные могут быть использованы для разработки новых лекарственных препаратов и новых подходов лечения алкогольной печеночной энцефалопатии, направленных на селективное фармакологическое управление проницаемостью пориновых каналов внешней митохондриальной мембраны. Основное внимание необходимо уделить потенциальными агентам, восстанавливающим проницаемость внешней мембраны митохондрий и снижающим или устраняющим алкоголь-индуцированную митохондриальную недостаточность.

### Список литературы

1. Rao VL (2002). *Neurochem. Int.* 41, 161–170;
2. Desjardines, P.; Butterworth, R.F. (2005). *Molecular neurobiology* 31(1-3), 17-25;
3. Rodrigo R, Cauli O, Boix J, El Mili N, Agusti A, Felipo V. (2009). *Neurochem. Int.* 55, 113–118;
4. Kareyeva AV, Grivennikova VG, Cecchini G, Vinogradov AD (2011) *FEBS Lett* 585(2), 385-389;
5. Grivennikova VG, Kareyeva AV, Vinogradov AD. (2010). *Biochim Biophys Acta*.1797(6-7), 939-944;
6. Duchon MR. (2004). *Mol. Aspects. Med.* 25, 365-451;
7. Rasola A. and Bernardi P. (2007). *Apoptosis*. 12, 815-833;
8. Shoshan-Barmatz V. and Ben-Hail D. (2012). *Mitochondrion*. 12(1), 24-34;
9. Холмухамедов ЭЛ, Черны С, Лемастерс JJ, Бессон КС, Бейкер ТТ, Джонсон КБ, Педиадитакис JJ, Теплова ВВ, Тикунов А, Макдоналд Д, Лемастерс Дж (2010). *Биофизика*. 55(5), 822-823;
10. Holmuhamedov EL, Czerny C, Beeson CC, Lemasters JJ. (2012). *J Biol Chem*. 287(10), 7692-7700;
11. Lemasters JJ, Holmuhamedov EL, Cherny C, Zhong Z, Maldonado EN (2012). *Biochim Biophys. Acta*. 1818, 1536-1544;
12. Holmuhamedov EL, Lemasters JJ. (2009). *Arch Biochem Biophys*. 481, 226-233;
13. Tikonov A, Johnson CB, Pediaditakis P, Markevich N, Macdonald JM, Lemasters JJ, Holmuhamedov EL. (2010). *Arch Biochem Biophys* 495, 174-181.
14. Azatashvili T, Odinkova I, Krestinina O, Baburina Yu, Teplova V, Jahangir A, Holmuhamedov E. (2013). *Innovative Journal of Medical and Health Science*. 3, 163-170.
15. Monfort P, Cauli O, Montolin C, Felipo V. (2009). *Neurochemistry International*. 55(1-3), 106-112;
16. Monfort P, Muñoz D. and Felipo V. (2004). *G. Neurobiol. Dis.*15, 1–10;
17. Mendes DD, Mello MF, Ventura P, Passarela Cde M, Mari Jde J. (2008). *Int J Psychiatry Med*. 38(3), 241-259;
18. Lisý V, Stustný F (2002). *Physiol Res*. 51(3), 299-307;
19. Jalan R, Shewcross DL, Davies N. (2003). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35(8), 1175-1181.
20. Jalan R, Balata S, Olde Damink SWM, Ferguson K, Marshall J, Kapoor D, Hayes PC, Deutz NEP, Williams R, Wardlaw J. (2001) *Hepatology* 35, 67;
21. Begleiter H. and Porjesz B. (2006). *International Journal of Psychophysiology*. 60, 162–171;
22. Шабазов, П. Д. Основы наркологии. Практическое руководство. 2002. Издательство Лань [СПб]. 555 с ISBN 5-8114-0412-3;

## **ГЛАВА 15. РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В ИНИЦИИ КАЛЬЦИНОЗА ИМПЛАНТИРОВАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ**

Фадеева И.С.<sup>1,2</sup>, Фесенко Н.И.<sup>1,2</sup>, Соловьев В.В.<sup>1</sup>, Фадеев Р.С.<sup>1,2</sup>, Сенотов А.С.<sup>1</sup>, Кузьмин М.В.<sup>1,2</sup>, Сенотова О.В.<sup>1</sup>, Бригигов Д.В.<sup>3</sup>, Сачков А.С.<sup>3</sup>, Соркомов М.Н.<sup>3</sup>, Муратов Р.М.<sup>3</sup>, Акатов В.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

<sup>2</sup>Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия;

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева» Минздрава РФ.

### **Аннотация**

В работе обсуждены возможные механизмы эктопической (гетеротопической, дисфункциональной или аберрантной) минерализации мягких тканей, представлены сведения о возможных внутри- и внеклеточных источниках кальция и фосфатов, а также выделена роль митохондрий клеток донора и реципиента, которые при ряде патологических состояний могут инициировать запуск процессов асептического кальциноза переживающих и девитализированных тканей, имплантируемых человеку для возмещения утраченных функций органов или тканей в реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии.

### **Введение**

В мировой научной литературе споры об этиологии эктопической (гетеротопической, дисфункциональной или аберрантной [1]) минерализации мягких тканей продолжаются с 1904 г., когда в журнале «Архив патологической анатомии» Mönckeberg описал два случая стеноза устья аорты со значительным обызвествлением клапанов [2]. Немногим позже сообщения Mönckeberg была предложена гипотеза апатитовой биоминерализации, которая на многие годы стала догмой среди ученых и действие которой распространялось практически на все формы жизни [3]: в 1914 г. Mummery предположил, что кальцификация тканей зуба млекопитающих одинакова в каждой точке с теми же процессами, протекающими в низших организмах, и осуществляются они по пассивному физико-химическому механизму из  $Ca^{2+}$  и  $P_i$ , заканчивающемся образованием апатитовых кальцесферитов (calcospherites) [4]. Суть данной гипотезы сводилась к тому, что процесс образования минералов апатита в организмах биоминерализация – осуществляется в условиях пересыщенного водного раствора при участии (посредничестве) органической, секретируемой клетками, матрицы [5]. При этом данная органическая матрица, или иначе «центр нуклеации кальциноза», характеризуется своего рода афинностью к соединениям кальция, которую в 1965 г. Selye назвал понятием «кальцифилаксии» [6].

### **Источники кальция и фосфатов для биоминерализации**

Исходя из выявленного состава бактериальных, большинства физиологических и ряда эктопических кальцификатов, рядом авторов было предложено обозначать процесс биоминерализации не кальцификацией, а фосфатизацией [4-7], как наиболее отражающей суть физико-химического процесса осаждения минерала для данных живых систем.

Оправданием долгожительству гипотезы апатитовой биоминерализации послужило несколько фактов, базирующихся прежде всего на принципиальном сходстве состава образованных бактериями и найденных в организме кальцификатов, а также за счет сходства некоторых функций древних прокариот и митохондрий эукариот [8-11], обеспечивающих по мнению авторов накопление  $\text{Ca}^{2+}$  и фосфатов до предельных концентраций [12-13], при которых осуществляется формирование аморфных фосфатов кальция (ассоциатов) – предшественников кальцификатов.

Спорная, но популярная эндосимбиотическая гипотеза постулирует, что современная митохондрия возникла из похожих на одну из ныне живущих бактерий (*Paracoccus*) [14], а также делает упор на тот факт, что многофакторная роль полифосфатов в различных физиологических функциях организма млекопитающих является возможным наследием слияния хозяйской клетки и древних прокариот [15-16]. Конечно рассмотрение правдоподобности данной гипотезы не является предметом данной работы, ориентированной лишь на рассмотрение участия митохондрий в развитии асептического кальциноза переживающих и девитализированных тканей.

Известно, что минеральная часть скелета позвоночных, представляет собой апатит ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{OH}, \text{Cl})$ ), состоящий преимущественно из фосфата и кальция [17]. Известно также, что внеклеточная концентрация ионизированного кальция в плазме крови варьирует от 1,03 до 1,37 мМ, а общего от 1,9 до 2,6-2,75 мМ. Внутриклеточный же уровень ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) составляет примерно 100 нМ, что обеспечивает создание химического градиента 15.000-40.000:1 [18].

При этом, исходя из известного состава найденных в организме физиологических и патологических кальцификатов, для начала необходимо отдельно рассмотреть возможные источники фосфатов, обеспечивающие локальное повышение их концентрации до пределов, обеспечивающих зарождение и рост потенциальных кристаллических форм фосфатов кальция уже вне клетки.

Известно, что неорганические полифосфаты (полиФ) или конденсированные фосфаты представляют собой полианионные полимеры, состоящие из нескольких десятков или даже сотен молекул ортофосфата, соединенных между собой, по аналогии с АТФ, фосфоангидридными связями. Было высказано предположение, что у млекопитающих (и, как правило, иных высших эукариот) полиФ является универсальной и полифункциональной макромолекулой, участвующей в таких физиологических процессах как хранение фосфата, улавливание поливалентных катионов [1], апоптоз, повышение митогенной активности фактора роста фибробластов (FGF) [19], минерализация костей [17,20], свертываемость крови [21], воспаление [22-23], биоэнергетика клетки [24], функции ионного канала [25] и ядерная транскрипция [26]. Помимо этого, недавно было показано, что ряд ферментов высших эукариот

обладают полифосфат-гидролизующей активностью (например, регулирующие метаствозирование белки H-prune [27], полиФ-гидролаза [27], длинноцепочечная эндополифосфатаза [28], 5'-nucleotidase и циклическая фосфодиэстераза [29], полиФ-ассоциированная активация протеинкиназы MTOR [30]), и идентифицированы ферменты, участвующие в деградации полифосфатов (преимущественно щелочные фосфатазы – кишечная [31] и TNAP [32]), которые расщепляют полиФ до Pi при нейтральных и основных условиях pH [33-34]. В то же время пути синтеза полиФ в клетках млекопитающих до сих пор неизвестны [35].

Таким образом, три важных качества полифосфатов – высокая степень сродства с кальцием (1), способность к секвестрации локальных высоких концентраций ортофосфатов с целью сохранения их низкой активности (2), способность синтезироваться и деградировать гидролитически или под воздействием ферментов (3) [36] – наделяет их статусом потенциальной причины создания локальной гиперфосфатемии, инициирующей образование Ca-P-ассоциатов в нетипичных для процесса минерализации тканях.

Одновременно с этим все больше накапливается данных, что основным источником полифосфатов в клетке являются митохондрии, хроматин и «электроно-плотные гранулы», образующиеся в норме или при патологии в широком спектре клеток как постоянный или промежуточный источник ионизованного кальция [37]. В этих образованиях отрицательно заряженные полиФ находятся в тесной ассоциации с неорганическими ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) и органическими (основные аминокислоты, полиамины) катионами [35]. Так, например, было обнаружено, что в организме млекопитающих полиФ хранятся в плотных гранулах тромбоцитов человека и в гранулах (acidocalcisomes) тучных клеток, высвобождающихся при их активации [38-39]. Несмотря на то, что первоначально волкютин-подобные ацидокальцисомы были найдены в трипаносомах, апикомплексах водорослей, миксомицетах, грибах и т.д., их обнаружение именно в тучных клетках млекопитающих показало, что эти органеллы выступают в качестве сильно обогащенных полифосфатами кислотных компартментов клетки для хранения высоких концентраций кальция [40]. В дальнейшем было показано, что ацидокальцисомы некоторых организмов обладают рядом насосов ( $\text{H}^+$ -вакuoloлярная пирофосфатаза,  $\text{H}^+$ -вакuoloлярная АТФаза,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза), обменников ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ;  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ), каналов (аквапорин,  $\text{InsP}_3\text{R}$ ) и транспортеров, необходимых для накопления и выпуска катионов и воды, а также ферментов, участвующие в синтезе и деградации пирофосфата и полиФ [35,41], что можно гипотетически транслировать и на неизвестные пока аналогичные механизмы в клетках млекопитающих.

Также в научной литературе можно найти ряд работ, свидетельствующих о том, что полиФ участвуют в образовании ионных каналов вида полиФ/ $\text{Ca}^{2+}$ /полигидроксibuтират (ПГБ) – при этом канал данного типа был найден и в *E.coli* [42] и в митохондриях высших эукариот (например, как тип VDAC) [43-44], как структурная часть мРTP, а также в плазматической мембране, как часть калиевого канала и кальциевого насоса [35,45-46]. В свою очередь, подтверждением предположения о том, что полиФ в интактных митохондриях эукариотических клеток является необходимым условием для регуляции мРTP является ряд экспериментов, показавших, что при

культивировании в условиях пониженного содержания полиФ, митохондрии клеток становятся более устойчивыми к открытию мРГР и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной гибели клеток [47], а также показавших, что полиФ является непосредственным мощным активатором  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного открытия мРГР в клетках сердца [48], а также выступает в роли глиотрансмиттера в астроцитах [49]. Кроме вышесказанного обнаружено, что в митохондриях млекопитающих ассоциированный с полиФ ПГБ играет роль эндогенного ионофора, который может быть вовлечен в транспорт кальция [50-51]. Помимо этого, участие полиФ подтверждено для TRPM8 канала митохондрий человека [52].

Одновременно с вышесказанным известно, что в организме свободные полифосфаты предотвращают зарождение (и по некоторым данным направление) роста кристаллов гидроксиапатита (ГАп) [53-54], т.е. именно их полимерная (инертная) форма является естественным ингибитором эктопической кальцификации. В тоже время известно, что разрушение полифосфатов при различных патологических состояниях или вследствие вторичной дисфункции митохондрий [55-60] приводит к высвобождению из полифосфатов неорганического фосфата (спонтанный гидролиз, действие щелочных фосфатаз), провоцируя локальное увеличение концентрации свободного фосфата (гиперфосфатемия), и инициируя таким образом трансдифференцировку клеток в остеобластоподобный тип [61-63], а также пассивное зарождение различных форм фосфатов кальция во внеклеточном матриксе в условиях повышенной концентрации внеклеточного кальция при гибели клеток.

На сегодняшний день известно, что минерал зарождается из раствора, если состояние минерального насыщения выше равновесного (насыщенного) значения. Таким образом, если ионная активность продукта [IAP] больше произведения растворимости, то раствор является «перенасыщенным» в отношении этого минерала. Степень пересыщения обеспечивает возможность роста кристаллов (при низком пересыщении), гетерогенной нуклеации (при промежуточном пересыщении) или гомогенной нуклеации (при высоком пересыщении) [64-65]. Рядом авторов было отмечено, что внеклеточная жидкость является пересыщенной относительно костного минерала, и что концентрации кальция,  $\text{P}_i$  и гидроксильных ионов достаточно высока, чтобы поддерживать рост кости минеральных кристаллов, как только сформировались начальные кристаллы [66]. При этом, несмотря на создание условий для роста минерала при низком состоянии пересыщения, обеспечить спонтанное образование кристаллических форм ГАп данные концентрации кальция,  $\text{P}_i$  и ионов не могут. Как указывалось выше, самопроизвольное осаждение кристаллических форм называют «гомогенным зародышеобразованием», требующим наибольших значений пересыщения. В данном случае нуклеация на какой-либо другой твердой фазе требует более низкого значения пересыщения и основной белок внеклеточного матрикса – коллаген – может выступать в качестве данной твердой фазы для нуклеации костного минерала и, таким образом, обеспечить условия гетерогенного зародышеобразования ГАп на внеклеточном матриксе [67].

В то же время физиологические концентрации кальция и фосфатов недостаточно высоки, чтобы вызвать гетерогенное осаждение ГАп на коллагене,



таким образом можно предположить, что лишь локальное увеличение кальция и  $P_i$  (гиперкальци- и -фосфатемия) может обеспечить необходимые условия для апатитовой биоминерализации, что предположительно и происходит при гибели клеток – лавинообразное высвобождение  $P_i$  из полиФ при разрушении ацидокальцисом или Са-Р гранул митохондрий, «включение» щелочных фосфатаз и их смещение с поступлением внеклеточного кальция в высоких концентрациях (~2мМ).

### **Возможная роль митохондрий в процессе физиологической биоминерализации**

Еще в 1963 г. Lehninger предложил гипотезу о том, что митохондрии играют определенную роль в биоминерализации тканей: он предположил, что митохондрии при нарушении кальциевого гомеостаза клетки, как активные SOS-кальциевые органеллы, начинают активно депонировать  $Ca^{2+}$  при его концентрациях свыше 0,5-1 мкМ. При достижении предельных концентраций кальция уже внутри митохондрий (в среднем до 0.5М), сама митохондрия погибает с образованием первичных кристаллов ГАп, что может быть причиной как физиологической, так и патологической минерализации тканей [68-70]. Рядом научных групп Са-Р-содержащие гранулы были идентифицированы в митохондриях остеокластов, хондроцитов, остеобластов, остеоцитов, а также в обызвествляющемся хряще и минерализующейся кости [71-82]. Вонсеи, определив несвязанные с коллагеном докусы кальцификации в хряще предположил, что фибриллы коллагена не являются центрами инициации кальцификации хряща, и что необходимые для минерализации ионы могут накапливаться в митохондриях [83]. В дальнейшем Mahamid и др. выявили непосредственную роль связанных с митохондриальной мембраной внутриклеточных Са-Р-глобул размером 80 нм, состоящих из более мелких 10-нм сфер, в процессе минерализации (эмбриональный и постнатальный период) костей мыши. Однако только в 2012 году, электронно-плотные, некристаллические, обогащенные аморфными фосфатами кальция гранулы были выделены из митохондрий остеобластов *in vitro* [1]. В работе Boonrungsiman и соавт. сочетанным методом high-pressure freezing (HPF) и freeze substitution (FS), исключаящим получение артефактов при проведении электронно-микроскопических исследований, были идентифицированы митохондриальные гранулы диаметром 47,6-16,8 нм, которые были дополнительно охарактеризованы по кальций-фосфатному содержанию. Также в данной работе были идентифицированы области внутри митохондрий, которые были лишены таких электронно-плотных гранул, но содержали значительные запасы ионного кальция в дополнение к гранулам. Далее авторы выявили связь между митохондриальными гранулами и цитозольными Са-Р-везикулами, подтвердив, что источником кальция и фосфатов для цитозольных везикул являются непосредственно митохондрии, идентифицировав таким образом центральное недостающее звено, связывающее внеклеточные матриксные везикулы, напрямую участвующие в минерализации внеклеточного матрикса и внутриклеточные «электронно-плотные гранулы» и выявив путь, с помощью которого внутривакуолярный аморфный фосфат кальция транспортируется из внутриклеточного во внеклеточное пространство [1].

На основании полученных данных была предложена модель минерализации костной ткани, предполагающая участие митохондриальных гранул, Са-Р-содержащих цитозольных везикул и внеклеточных матричных везикул, обеспечивающих преципитацию минерала на внеклеточном матриксе [1,84].

### **Гипотеза о роли митохондрий в инициации кальциноза имплантированных биологических тканей**

Таким образом, нахождение недостающего звена Са-Р-гранул митохондрий – обеспечило первичное понимание процессов физиологической минерализации костной ткани, но не смогло пролить свет на участие митохондрий в развитии патологического асептического кальциноза мягких тканей в целом, и непосредственно переживающих или девитализированных биологических тканей, имплантируемых человеку для возмещения утраченных функций органов или тканей в реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии (ССХ).

Предполагается множество теорий, в частности, рассматриваются предположения о связи инициации кальциноза фиксированной сосудистой ткани с компонентами погибших клеток [85-88], апоптотическими тельцами [89], компонентами тканевого матрикса: коллагеном I типа, фибронектином [90-91], эластином [85,92-96], кальций-связывающими белками (Gla-протейны, остеокальцин, остеопонтин, остеоонектин, фетуин-А) и фосфопротеинами [81,97-98], щелочной фосфатазой [99-100], липидами [101-105] и т.д.

Однако, несмотря на интенсивные исследования, четкого представления о механизмах асептического кальциноза трансплантатов клапанов сердца или девитализированных биоматериалов в настоящее время просто нет. Авторами данной работы выполнено исследование участия митохондрий в процессе асептического кальциноза переживающих и девитализированных биоматериалов, используемых для хирургической замены поврежденных клапанов сердца и сосудов.

Основываясь на предположении о том, что основной причиной асептического кальциноза биоматериалов являются клетки донора, в последние двадцать лет активно разрабатываются способы предварительного обесклеточивания (децеллюляризации) матрикса графтов, либо принудительной, контролируемой гибели в них клеток донора до имплантации (девитализация ткани). Предполагается, что в результате лизиса или гибели клеток донора до имплантации будет снижена иммуногенность и элиминированы центры нуклеации кальциноза, однако по данным литературы и нашим собственным экспериментальным данным большинство предлагаемых способов предварительной децеллюляризации/девитализации не только не снижают способность тканей к кальцинозу, но и значительно ее усиливают [106-107].

Отсутствие ясного представления о механизме инициации кальциноза в переживающих или девитализированных биоматериалах для ССХ затрудняет разработку эффективных методов его предотвращения. Поэтому авторами данной работы была предложена наиболее очевидная и вероятная (по мнению авторов) гипотеза о том, что важная роль в процессе инициации кальцификации трансплантатов клапанов сердца и сосудов или на соответствующих биопротезах

может быть отведена митохондриям клеток донора или контактирующим с имплантом клеткам реципиента.

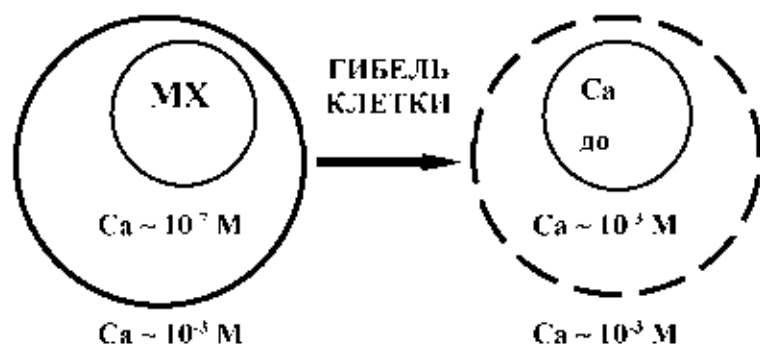


Рисунок 1 – Схема механизма зарождения центров кальцификации в клетках трансплантатов клапанов сердца.

*МХ митохондрии*

Предложенная гипотеза основывалась на изложенных выше фактах, согласно которым непосредственно в митохондриях имеются относительно высокие концентрации полиФ, а также на том, что митохондрии могут активно аккумулировать кальций при концентрациях выше 0.5-1 мкМ синпортно с фосфатами. В результате аккумуляции концентрация фосфатов кальция в нативных митохондриях может достигать значений 0.2-0.5 М [108] и выше (по некоторым данным до 0.8 М [109]) после чего открывается мРТР и митохондрии погибают [102]. Даже учитывая тот факт, что полифосфаты и кальций в митохондриях находятся преимущественно в ионизированной форме, при нейтральных или основных значениях рН деполимеризация полиФ одновременно приводит к снятию ингибирования процесса минерализации апатита и увеличивает химический потенциал для нуклеации апатита из раствора [79]. При таких концентрациях следовало бы ожидать образование кластеров фосфатов кальция (аморфная форма) с последующим формированием кристаллов ГАп [110], например, на коллагене ВКМ, при условии недостаточных концентраций (отсутствия) природных ингибиторов минерализации, например пирофосфата (ПФ) или тканеспецифичного матричного Gla протеина (MGP) [111-112], возникающих при гибели клеток в достаточно большом объеме ткани.

Исходя из этих данных, можно ожидать, что при гибели клеток в тканях переживающего трансплантата до его забора, например в результате ишемии, в матриксе могут образовываться первичные центры кристаллизации ГАп непосредственно при задействовании митохондрий погибающих клеток донора. Учитывая тот факт, что гибель клеток донора в тканях трансплантата до его забора является патологическим процессом, происходящим в условиях гипоксии, недостатка энергетических субстратов, нефизиологических концентраций продуктов метаболизма, можно предполагать некротическую форму гибели клеток, при которой митохондрии могут оставаться интактными в течение некоторого времени после нарушения проницаемости плазматической мембраны [102] и способны активно накапливать поступающий внескелеточный  $Ca^{2+}$  и фосфаты, вследствие их гидролитического или ферментативного (возможно лизосомального) расщепления из полиФ до Pi. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что аккумуляция фосфатов

кальция митохондриями с последующим образованием отложений ГАп характерна для необратимой стадии гибели многих клеток [113-115].

В случае же использования фиксированного ГА биопротеза, как известно обладающего слабой токсичностью, можно ожидать гибели клеток реципиента, погибающих вследствие контакта с поверхностью биопротеза, либо вследствие иммунной или неспецифичной реакции на биоматериал. Предполагается, что может происходить активный выброс  $Ca^{2+}$  и полиФ из гранул погибающих на трансплантате тромбоцитов и активированных тучных клеток, последующая деградация полиФ до Pi при активации TNAP или при выбросе щелочных фосфатаз из иных компартментов погибающих клеток и, как следствие, инициация компенсаторной активной аккумуляции фосфатов и кальция митохондриями погибающих клеток реципиента.

Подтверждением высказанного предположения могут служить данные по наличию ацидокальцисом в тромбоцитах и тучных клетках млекопитающих [37,38], а также ряд ультраструктурных исследований кальцифицировавшихся тромбов в свинных биопротезах клапанов сердца, показавших, что сайтами инициации кальцификации на фиксированных ГА, являлись митохондрии тромбоцитов и лейкоцитов реципиента [116].

Некоторые авторы считают, что кальцификация митохондрий представляет собой основной механизм инициации внутриклеточной кальцификации, приводящий к кальцификации всей клетки. В то же время предполагается, что этот механизм неприемлем для биопротезов, поскольку аккумуляция кальция в митохондриях, по крайней мере на начальных стадиях, является активным процессом, встречающимся в клетках, которые могут быть повреждены, но еще остаются живыми, а при фиксации биопротезов ГА клетки донора уже являются погибшими [102]. Однако, на наш взгляд, и в этом случае можно ожидать инициации кальциноза по механизму возникновения сайтов кальцификации в митохондриях клеток реципиента, поскольку при гибели тромбоцитов и тучных клеток реципиента, привлеченных к месту имплантации под воздействием ГА какое-то время митохондрии также будут оставаться живыми и аккумулировать обильно высвобождающийся кальций и фосфаты. Дополнительным фактором провокации процесса асептического кальциноза выступает отсутствие в матриксе девитализированного биопротеза естественных ингибиторов минерализации, таких как матриксный Gla-протеид (MGP) и собственно полиФ, а также фактор повреждения нативной архитектоники внеклеточного матрикса, дополнительно стимулирующий осаждение кристаллической формы ГАп на «оголенных» участках коллагенового матрикса.

Для изучения роли органоидов клетки и компонентов тканевого матрикса в инициации кальцификации трансплантатов клапанов сердца и сосудов нами было проведено электронно-микроскопическое исследование локализации центров нуклеации отложений кальция. В исследованиях, учитывая отсутствие кальциноза в створках трансплантатов клапанов сердца, использовались только стенки аорты человека: нативные, взятые в ходе операции по замене клапана, и стенки, полученные при аутопсии, через 15-18 часов после гибели донора (стандартные условия для забора трансплантатов клапанов сердца человека). По данным люминесцентной микроскопии, нативные стенки содержали живые гладкомышечные и эндотелиальные клетки, а в стенках аорты, полученных при

аутопсии, живых клеток не наблюдалось. Фрагменты аортальных стенок с погибшими клетками имплантировали подкожно крысам линии Wistar (♂, 180-200 гр, в полном соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009) на 1, 3 и 5 суток.

Было установлено, что во фрагментах нативных стенок аорты до имплантации отложения кальция ни в клетках, ни в тканевом матриксе не обнаруживались. Во фрагментах стенок аорты после аутопсии электронно-микроскопический анализ не выявил достоверного накопления кальция в митохондриях, ЭПР, в других частях клетки, также как и в тканевом матриксе. Электронно-плотные участки в ядре и в цитоплазме не устранились обработкой ЭГТА, что свидетельствует о том, что они не являлись отложениями кальция (Рис.2).

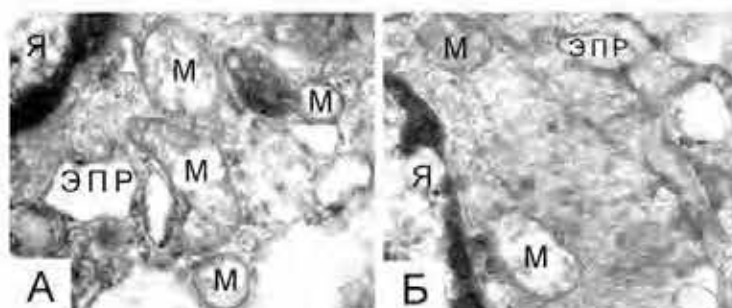


Рисунок 2 – Отсутствие локализации кальция в митохондриях погибших гладкомышечных клеток фрагмента стенки аорты человека до подкожной имплантации крысам

А – до обработки срезов раствором ЭГТА. Б – после обработки срезов раствором 20 mM ЭГТА. М – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Я – ядро. Увеличение: – 20000.

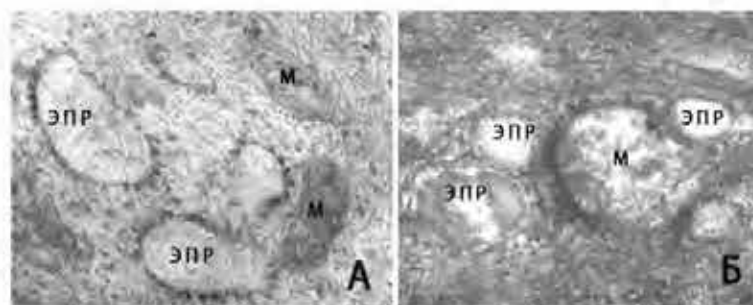


Рисунок 3 – Отсутствие локализации кальция в митохондриях погибших гладкомышечных клеток фрагмента стенки аорты человека после 1 сут. подкожной имплантации крысам А – до обработки срезов раствором ЭГТА. Б – после обработки срезов раствором 20 mM ЭГТА. М – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум. Увеличение: – 20000.

Через 1 сут. после подкожной имплантации крысам отложения кальция в стенках аорты не выявлялись. Ультраструктура клеток была повреждена: митохондрии выглядели набухшими с частично фрагментированными кристами, цистерны ЭПР были значительно увеличены (Рис.3).

Через 3 и 5 суток после имплантации в 30-40% клеток стенок аорты большая часть митохондрий была заполнена электронно-плотным осадком (Рис.4С). Обработка срезов раствором специфического хелатора ионов кальция ЭГТА полностью удаляла электронно-плотный осадок из митохондрий, указывая на то, что они содержали именно кальций (Рис.4D). Наблюдалось дальнейшее гигантское расширение цистерн эндоплазматического ретикулума и деструктивные изменения мембран митохондрий, свидетельствующие о

происходящих в клетке процессах лизиса. В разрушающихся митохондриях отложения кальция сохранялись. Ядра в клетках также содержали электронно-плотные участки, но обработка раствором ЭГТА не удаляла их.

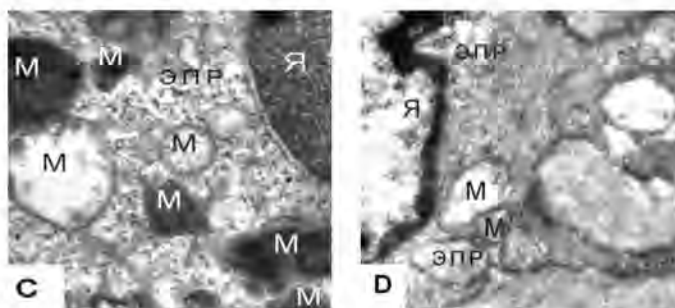


Рисунок 4 – Выявление локализации кальция в митохондриях погибших гладкомышечных клеток фрагмента стенки аорты человека через 3 суток после ее имплантации под кожу крысам.

С – электронно-плотные участки отложений кальция в митохондриях (М). D - кальций в срезах удален из митохондрий обработкой 20 мМ ЭГТА. Увеличение: –20000.

С целью отделения минерализующего вклада клеток реципиента была выполнена имплантация экспериментальных образцов в диффузионных лавсановых камерах с размерами пор 0,2 мкм, обеспечивающих полное ограничение доступа клеток реципиента к фрагменты стенки аорты. Эта модель исключает прямой контакт клеток окружающих тканей с поверхностью исследуемого образца, и позволяет провести сравнительный анализ вклада клеточных и гуморальных факторов в механизм кальцификации. С целью выявления минерализованных участков в матриксе экспериментальных образцов проводили гистохимическое окрашивание криосрезов фрагментов стенки аорты свиньи по методу Даля/Мак Ги–Рассела [117]. Через 6 недель подкожной имплантации крысам фрагментов переживающих стенок аорты, выполненной с применением модели ограничения доступа клеток было отмечено, что ядра клеток донора полностью исчезали (литическая децеллюляризация), а отложения кальцификатов в матриксе трансплантатов наблюдались преимущественно в виде мелких и разрозненных очагов между ламеллярными компонентами матрикса (Рис.5), что подтверждает вклад внутриклеточных компартментов клетки в процесс асептического кальциноза переживающих стенок аорты.

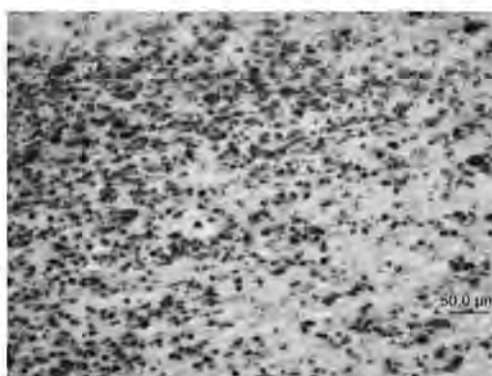


Рисунок 5 – Микрофотографии криосрезов нативных стенок аорты после 6 недель подкожной имплантации крысам

Световая микроскопия, окраска по методу Даля/Мак Ги–Рассела; кальцификаты – ярко-красные (здесь темные пятна), компоненты ВКМ – бежево-голубые (здесь светлый фон).

## Заключение

Суммируя вышесказанное можно заключить, что суть гипотезы в целом состоит в том, что в погибающих клетках в первое время после нарушения проницаемости плазматической мембраны митохондрии, содержащие высокие концентрации полиФ могут оставаться живыми и, попадая в условия высокой концентрации околоклеточного кальция (1-2мМ), активно аккумулируют кальций до столь высоких концентраций, при которых осуществляется формирование аморфных фосфатов кальция (ассоциатов), с последующим образованием кристаллов ГАп, предположительно на коллагеновом матриксе. Именно эти небольшие кристаллы ГАп могут быть матрицами для последующей сорбции на них ионов фосфата и кальция, то есть для роста больших кристаллов ГАп в физиологической среде, что подтверждает увеличение степени кальцификации образцов стенки аорты с увеличением времени имплантации.

Таким образом, появление отложений кальция в митохондриях и отсутствие связанного кальция в других частях погибших клеток донора и в тканевом матриксе стенки аорты после имплантации указывает на то, что инициация асептического кальциноза в трансплантатах и на биопротезах клапанов сердца и сосудов осуществляется с прямым задействованием митохондрий.

Полученные результаты позволили рассматривать митохондрии погибших клеток как центры нуклеации кальциноза трансплантатов клапанов сердца и сосудов. На основании данной гипотезы в лаборатории Тканевой инженерии ИТЭБ РАН был разработан эффективный способ антикальцинозной девитализации [118], который в настоящее время внедрен и активно применяется в клинической практике НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН для предимплантационной подготовки аллотрансплантатов клапанов сердца и сосудов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства РФ (14.Z50.31.0028), Программы Президиума РАН «ФИМТ» (№ФИМТ-2014-136), ГЗ ВУЗу (Проект №768).

## Список литературы

1. Booningsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, et al. (2012) *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:14170–14175.
2. Агеев Ф.Т., Барникова И.В., Середеннича Е.М. и др. (2006) *Кардиологический вестник*. № 2:57–63.
3. Omelon S, Ariganello M, Bonicci E, et al. (2013) *Calcif Tissue Int*, 93(4):382-96.
4. Thompson DW (1945) *On growth and form*. MacMillan, New York
5. Гилинская Л.Г., Григорьева Т.Н., Окунева Г.Н., Власов Ю.А. (2003) *Журнал структурной химии*, 44(4):678-689.
6. Selye H., Gabbiani G. (1965) *Electrolytes and Cardiovascular Diseases*. New York, Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 135-160.
7. Gilinskaya L.G., Okuneva G.N., Vlasov Y.A. (2003) *Ж. структ. химии*, 44(5):869-874
8. Smithen, M., Flustondo, P.A., Winkfein, R. et al. (2013) *Cell Calcium*, 54, 86–94
9. Flustondo, P.A., Angeleva, P.R., Kawalec, M. et al. (2013). *PLoS One* 8, e75812
10. Kane, D.A. and Pavlov, E.V. (2013) *Channels* 7, 426–431
11. Seidlnayer I.K, Blatter I.A, Pavlov E, Dedkova EN (2012) *Channels (Austin)*, 6(6):463-7.
12. Seidlnayer I.K, Gomez-Garcia MR, Blatter I.A, et al. (2012) *J Gen Physiol*, 139(5):321-31
13. Akatov VS, Ryndina NI, Muratov RM, et al. (2006) *Dokl Biol Sci*, 406:112-4.
14. Guerrero R, Margulis L, Berlanga M. (2013) *Int Microbiol*, 16(3):133-43
15. Kulnev IS, Vagabov VM, Kulakovskaya TV et al. (2000) *Biochemistry (Mosc)* 65(3):271-8
16. Кулев И.С. (1996) *Соросов.образ.журнал*, 2, 28–35.
17. Lowenstam, H. A., and Weiner, S. (1989) *On Biomineralization*, Oxford University Press, Inc.: New York.
18. Egelmann D.M., Montagne P.R. (1999) *Biophys J*, 76(4):1856–1867.
19. Kulakovskaya TV, Vagabov VM, Kulnev IS (2012) *Process Biochem* 47: 1–10.
20. Omelon S, Georgiou J, Henneman ZJ, et al. (2009) *PLoS One*, 4:e5634.
21. Smith SA, Mutch NJ, Baskir D, et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(4):903-8.
22. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al. (2009) *Cell*, 139(6):1143-56.
23. Morrissey JH, Choi SH, Smith SA. (2012) *Blood*, 119:5972-9.
24. Pavlov E, Asehar-Sobhi R, Campanella M, et al. (2010) *J Biol Chem*, 285:9420–8.
25. Zakharin E, Thyagarajan B, French RJ, et al. (2009) *PLoS One*, 4:e5404.
26. Jimenez-Nunez MD, Moreno-Sanchez D, Hernandez-Ruiz L, et al. (2012) *Haematologica*, 97:1264–71.

27. Tammenkoski M, Koivula K, Cusanelli E, et al. (2008) *Biochemistry*, 47(36):9707-13.
28. Kumble KD, Kornberg A. (1996) *J Biol Chem*, 271(43):27146-51.
29. Hirschler A., Hubert L.J., Claude J. (1990) *FEMS Microbiology Ecology*, 73(3), 211-20
30. Wang L, Fraley CD, Faridi J, et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20):11249-54.
31. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:903-908.
32. Omelon S, Georgiou J, Henneman ZJ, et al. (2009) *PLoS ONE* 4:e5634
33. Fortuna R, Anderson HC, Carty R, Sajdera S (1980) *Calcif Tissue Int* 30:217-225.
34. Dylirman ST, Jenkins BD, Ryncarson TA, et al. (2012) *PLoS ONE* 7:e33768.
35. Moreno SN, Docampo R. (2013) *PLoS Pathog.* 9(5):e1003230.
36. Omelon Sidney J. and Grynpras Marc D. (2008) *Chem. Rev.*, 108(11):4694-4715
37. Ryall R.L. (2008) *Urol Res*, 36(2):77-97.
38. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 903-908.
39. Moreno-Sanchez D, Hernandez-Ruiz L, Ruiz FA, Docampo R (2012) *J Biol Chem* 287: 28435-28444.
40. Docampo R, de Souza W, Miranda K, et al. (2005) *Nat Rev Microbiol* 3: 251-261.
41. Docampo R, Moreno S.N. (2011) *Cell Calcium*, 50(2):113-9.
42. Reusch RN, Sadoff HL (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(12):4176-80.
43. Pavlov E, Zakharian E, Bladen C, et al. (2005) *Biophys J*, 88(4):2614-25.
44. Reusch RN. (1989) *Proc Soc Exp Biol Med*, 191(4):377-81.
45. Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A (2009) *Annu Rev Biochem*, 78():605-47.
46. Reusch RN. (2012) *Chem Biodivers*, Nov; 9(11):2343-66.
47. Abramov AY, Fraley C, Diao CT, et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(46):18091-6.
48. Seidlmayer I.K, Gomez-Garcia MR, Blatter L.A, et al. (2012) *J Gen Physiol*, May; 139(5):321-31
49. Angelova PR, Baev AY, Bereznov AV, Abramov AY. (2016) *Biochem Soc Trans*, Feb;44(1):40-5
50. Smithen, M., Elustondo, P.A., Winkfein, R, et al. (2013) *Cell Calcium* 54, 86-94.
51. Elustondo, P.A., Angelova, P.R., Kawalec, M, et al. (2013) *PLoS One* 8, e75812
52. Reusch, R.N. and Sadoff, H.L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 4176-4180.
53. Fleisch H, Neuman WF (1961) *Am J Physiol* 200:1296-1300.
54. Francis M (1969) *Calcif Tissue Res* 3:151-162.
55. Ando Y, Ichihara N, Takeshita S, et al. (2004) *Exp Anim*, 53(2):81-8.
56. Blanco FJ, López-Arnada MJ, Manciro E. (2004) *Mitochondrion*, 4(5-6):715-28
57. Yu E, Mercier J, Bennett M. (2012) *Cardiovasc Res.*, 95:173-182.
58. Yu E, Calvert PA, Mercier JR, et al. (2013) *Circulation*, 128:702-712.
59. Botto N, Berti S, Manfredi S, et al. (2005) *Mutat Res.*, 570:81-88.
60. Pugliese G, Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, Menitti S. (2015) *Atherosclerosis*, 238:220-230.
61. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. (2000) *Circ Res.*, 87:1055-1062.
62. Son BK, Kozaki K, Iijima K, et al. (2007) *Eur J Pharmacol.*, 556:1-8.
63. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, et al. (2004) *J Am Soc Nephrol.*, 15:2857-2867.
64. Kashcheyev D, van Rosmalen GM (2003) *Cryst Res Technol* 38:555-574
65. Larsen MJ (1986) *Arch Oral Biol* 31:757-761
66. Fleisch H, Neuman WF (1961) *Am J Physiol* 200:1296-1300.
67. Glimcher MJ, Hodge AJ, Schmitt FO (1957) *Proc Natl Acad Sci USA* 43:860.
68. Lehninger A.L., Rossi C.S., Greenawalt J.W. (1963) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10, 444.
69. Левинджер А. (1966) Митохондрия. Молекулярные основы структуры и функции. М., Мир.
70. Shapiro I, Greenspan J (1969) *Calcif Tissue Res* 3:100-102.
71. Gonzales F, Karnovsky MJ (1961) *J Biophys Biochem Cytol* 9:299-316.
72. Suttin LV, Holtrop ME, Ogilvie RE (1971) *Science* 174:947-949.
73. Martin JH, Matthews JL (1969) *Calcif Tissue Res* 3:184-193.
74. Landis WJ, Paine MC, Glimcher MJ (1980) *J Ultrastruct Res* 70:171-180.
75. Matthews JL (1970) *Am J Anat* 129:450-457.
76. Matthews JL, Martin JH, Simpson HW, et al. (1970) *Calcif Tissue Res* 5:91-99.
77. Martin JHPD, Matthews JLPD (1970) *Clin Orthop Relat Res* 68:273-278.
78. Landis WJ, Hauselka BT, Rogerson CA, Glimcher MJ (1977) *J Ultrastruct Res* 59:185-206.
79. Landis WJ, Glimcher MJ (1978) *J Ultrastruct Res* 63:188-223.
80. Kashiwa HK, Komoroski J (1971) *Anat Rec* 170:119-127.
81. Landis WJ, Glimcher MJ (1982) *J Ultrastruct Res* 78:227-268.
82. Gay C, Schriber H (1975) *Calcif Tissue Res* 19:39-49.
83. Bonucci E. (1971) *Clin Orthop Relat Res*, 78:108-39.
84. Omelon S, Ariganello M, Bonucci E, et al. (2013) *Calcif Tissue Int*, 93(4):382-96.
85. Ghadially F. (2001) *Ultrastruct Pathol*, 25, 243-267.
86. Jahnke-Dechent W., Heiss A., Schäfer C., Ketteler M. (2011) *Circ Res.*, 108(12):1494-509.
87. Tudorache J., Calistru A., Baraki H, et al. (2013) *Tissue Eng Part A*, 19(15-16):1686-1694.
88. Valente M., Bortolotti U., Thiene G. (1985) *Am J Pathol*, 119, 12-21.
89. Brylka L, Jahnke-Dechent W. (2013) *Calcif Tissue Int*, 93(4):355-64.
90. Price P.A., Chan W.S., Jolson D.M., Williamson M.K. (2006) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(5):1079-1085.
91. Tudorache J., Cebotari S., Sturz G, et al. (2007) *J Heart Valve Dis*, 16(5):567-573.



92. Bailey M., Pillarisetti S., Jones P. et al. (2004) Cardiovasc Pathol. 13. 146–155.
93. Bailey M.T., Pillarisetti S., Xiao H., Vyavahare N.R. (2003) J Biomed Mater Res A. 66(1):93–102.
94. Hosaka N., Mizobuchi M., Ogata H. et al. (2009) Calcif Tissue Int. 85(6):523–529.
95. Lee J.S., Basalyga D.M., Simionescu A. et al. (2006) Am J Pathol. 168(2):490–8.
96. Ronchetti L., Borsaldi F., Annovi G. et al. (2013) Front Genet. 4. A. 22.
97. Santin M., Rhyss-Williams W., O'Reilly J. et al. (2006) J R Soc Interface. 3(7):277–281.
98. Proudfoot D., Davies J.D., Skepper J.N. et al. (2002) Circulation. 106:3044–3050.
99. Hui M., Tenenbaum H.C. (1998) Anat Rec (New Anat). 253. 91–94.
100. Price P.A., Toroian D., Chan W.S. (2009) J Biol Chem. 284(7):4594–604.
101. Baba H.A., Deiwick M., Breukelmann D. et al. (1998) Pathologe. 19(6):420–424.
102. Demer L.L. (1997) Circulation. 95(2):297–298.
103. Jorge-Herrero E., Fernandez P., Gutierrez M., Castillo-Olivares J.L. (1991) Biomaterials. 12. 683–689.
104. Jorge-Herrero E., Fernández P., de la Torre N. et al. (1994) Biomaterials. 15(10):815–20.
105. Shetty R., Pibarot P., Audet A. et al. (2009) Eur J Clin Invest. 39(6):471–480.
106. Фесенко (Рындина) Н.И. Исследование механизма развития кальциноза трансплантатов клапанов сердца и разработка способов его предотвращения: Дис. ... канд. биол. наук / Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Пущино. 2006.
107. Фадеева И.С. Роль клеток реципиента и нарушения структуры тканевого матрикса в механизме кальцификации трансплантатов сосудов и клапанов сердца: Дис. ... канд. биол. наук : 03.03.01 / Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук. Пущино. 2013.
108. Lehninger A.L., Rossi C.S., Greenwalt J.W. (1963) Biochem Biophys Res Commun. 10:444–448.
109. Lehninger A.L. (1970) Biochem J. 119:129–138.
110. Fanes E.D. and Termine J.D. (1983) Calcium in mineralized tissues. Metal ions in biology. Edited by Spiro T.G. Vol.6. Calcium in biology. N York "A Wiley-Interscience publication":201-233.
111. Ho A.M., Johnson M.D., Kingsley D.M. (2000) Science. 289. 265–270.
112. Mursheed M., McKee M.D. (2010) Curr Opin Nephrol Hypertens. 19(4):359–65.
113. Crescenzo D.G., Hilbert S.L., Messier R.H. et al. (1993) Ann Thorac Surg. 55:25-31.
114. Hanzlikova V. and Schiaffino S. (1977) J. Ultrastruct. Res. 60:121-133.
115. Trump B.F. and Benzelsky L.K. (1995) FASEB J. 9:219-228.
116. Ferrans V.J., Boyce S.W., Billingham M.E. et al. (1980) Am J. Cardiol. 46 (5):721- 734.
117. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника. М.: Медицина. 1996. 544 с.
118. Ахатов В.С., Муратов Р.М., Рындина Н.И. и др. Способ обработки трансплантатов для сердечно-сосудистой хирургии / Патент РФ № 2291675. 2007. Бюл. №2.

## СПИСОК АВТОРОВ

Азарашвили Т.С.	Куприянова Е.С.	Сачков А.С.
Акатов В.С.	Лемастерс Дж.Дж.	Селина Е.Н.
Бабурин Ю.Л.	Лукин С.М.	Сенотов А.С.
Белослудцев К.Н.	Мальков А.Ф.	Сенотова О.В.
Белослудцева Н.В.	Маркович П.И.	Соловьев В.В.
Бритиков Д.В.	Минин А.А.	Соловьева М.Е.
Бульон В.В.	Минина Н.В.	Соркомов М.Н.
Булл Л.Е.	Миронова Г.Д.	Сурин Н.М.
Валуев Т.	Митина Т.А.	Таланов Е.Ю.
Венедиктова Н.И.	Муратов Р.М.	Теплова В.В.
Глушкова О.В.	Мурзаева С.В.	Фадеев Р.С.
Голеников А.К.	Нисминен А.-Л.	Фадеева И.С.
Горбачева О.С.	Никифорова А.Б.	Федотова И.Б.
Захаров С.Г.	Новоселова Ж.А.	Фесенко Н.И.
Кобякова М.И.	Новоселова Т.В.	Хмель Н.В.
Комте-Уолтерс С.Л.	Одинокова И.В.	Хоек Я.Б.
Крестинина О.В.	Парфенюк С.Б.	Холмухамедов Э.Л.
Круглов А.Г.	Полтаева И.И.	Хренов М.О.
Крылова И.Б.	Родионова О.М.	Хунг И.Х.
Кройген У.Дж.	Сапронов Н.С.	Чеканов А.В.
Кузьмин М.В.	Сарис Н.-Э.	Шейко Т.



Митохондрии являются не только энергетическими станциями эукариотических клеток, но и выполняют множество других функций. В частности, они играют важную роль в регуляции апоптотической гибели клеток, связанной с выходом из митохондрий проапоптотических белков (цитохром с, AIF, EndoG, Smac). Выход этих белков и низкомолекулярных соединений, ионов осуществляется через митохондриальные поры и каналы. Это определяет возможность сдерживать инициацию апоптотической клеточной гибели при стрессовых воздействиях, модулируя проницаемость пор и каналов митохондрий, что очень важно для разработки новых эффективных кардиопротекторов, гепатопротекторов и т.д.

С другой стороны, усиливая выход проапоптотических белков из митохондрий можно повысить эффективность действия новых противоопухолевых препаратов. Такие исследования были поддержаны мегагрантом правительства РФ и выполняются с 2014 г. научным коллективом Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН под руководством ведущего ученого из США профессора Дж. Дж. Лемастерса (проект № 14.Z50.31.028). В монографии представлены главы по различным темам этого направления.

