ЛИТЕРАТУРА

1. *Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H.* // Mol. Cell Proteomics. 2005. 4: 1122-33.
2. *Тодоров И.Н.* // Рос. хим. Журнал. 2007. 51: 93-106
3. *Gladden J.D., Ahmed M.I., Litovsky S.H. et al.* // Am. J. Med. Sci. 2011. 342: 114-9.
4. *Иванов В.Г., Горленко В.А.* Антиоксиданты. М.: Академия. 2009. 320 с.
5. *Кемелева Е.А., Васшнина Е.А., Синицина О.И. и др.* // Биоорганическая химия. 2008. 34(4): 558-69.
6. *Бурлакова Е.Б.* // Наука и жизнь. 2006. 2: 18-20.
7. *Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V.* // BBA. 1977. 501: 415-23.
8. *Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L.* // Anal. Biochem. 1973. 52: 1-9.
9. *Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M. et al.* // Circ. Res. 2004. 94: 53-9.
10. *Никонов В.В., Павленко А.Ю.* // Медицина неотложных состояний. 2009. 3-4: 22-3.
11. *Лукьянова Л.Д.* Сигнальные механизмы гипоксии. Москва: РАН. 2019. 201 с.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА МЕТАБОЛИЗМ АТФ В ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

Казаков М.С., Шитикова Е.Ю., Попов Д.Ю., Погонялова М.Ю., Кузнецова Е.А., Винокуров А.Ю.

Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники ОГУ имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

Введение. Клетки млекопитающих реализуют два основных пути производства АТФ – гликолиз и окислительное фосфорилирование (OXPHOS). Ввиду существенное более высокого выхода АТФ последний процесс, протекающий в митохондриях, рассматривается в качестве основного. Однако реализация конкретного метаболического пути зависит от типа клеток и конкретных условий, в связи с чем многие ряд типов клеток, включая клетки многих злокачественных новообразований, характеризуется преимущественно гликолитическим путем синтеза АТФ [1,2].

Очевидно, что митохондриальная дисфункция, ассоциированная с мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК), может оказывать существенное влияние на биоэнергетику клеток, в которых OXPHOS обеспечивает синтез основной части АТФ [3]. Однако ввиду связи гликолиза с протекающими в митохондриях процессами, опосредованной малатным и глицерофосфатным челночными механизмами, повреждения мтДНК могут оказывать существенное влияние и на синтез АТФ в цитозоле [4]. Однако данный аспект является малоизученным ввиду ряда особенностей митохондриального генома – возможностью наличия в мтДНК одновременно нескольких мутаций генов белков

электронтранспортной цепи (ЭТЦ) и/или системы синтеза белков в матриксе митохондрий, а также присутствием в клетке как мутантных молекул мтДНК, так и молекул дикого типа. В связи с этим целью данной работы является исследование влияния комплекса мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) на продукцию АТФ в преимущественно гликолитических клетках.

Материалы и методы. Объектами изучения выступали линии цитоплазматических гибридов (цибридов) (TCP, TCN, TCI, HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, MAM1, MAM2, MAM3, 520), которые были получены на основе клеток THP-1, характеризующихся преимущественно гликолитическим путем синтеза АТФ [5]. Каждая из линий имеет от 5 до 10 мутаций мтДНК с разным уровнем гетероплазмии, затрагивающих гены MT-ND1 (m.3336T>C), MT-ND2 (m.5178C>A), MT-ND5 (m.13513G>A), MT-ND6 (m.14459G>A), MT-CYTB (m.15059G>A и m.14846G>A), MT-RNR1 (del652G и m.1555A>G), MT-TL2 (m.3256C>T и m.12315G>A).

Для анализа физиологического уровня АТФ применяли люциферазный метод с применением набора определения АТФ (LifeTechnologies, США). Оценку времени истощения запасов АТФ при блокировании синтеза макроэрга использовали флуоресцентный зонд Mag-Fura-2 AM (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США). После инкубирования в растворе зонда клетки отмывали и проводили оценку изменения соотношения интенсивности флуоресценции связанной и свободной форм Mag-Fura-2 в присутствии олигомицина А (Sigma-Aldrich, США) и йодуксусной кислоты (Acros Organics, Индия) для блокирования гликолиза и окислительного фосфорилирования соответственно. Исследование митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi m$) проводили с применением флуоресцентного зонд TMRM (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 25 нМ. Величину $\Delta\Psi m$ рассчитывали на основании величины изменения интенсивности флуоресценции TMRM после разобщения с помощью 2 мкМ FCCP (Sigma-Aldrich, США). Оценку $\Delta\Psi m$ и времени расходования запасов АТФ проводили с использованием метода широкопольной флуоресцентной микроскопии. Для исследования скорости дыхания клеток использовали респирометр Oxytherm+R (Hansatech Instruments, Великобритания). В качестве среды для измерения использовали HBSS с содержанием глюкозы 10 мМ. В ходе изучения выполняли анализ базовой скорости потребления кислорода, а также скорости после внесения ингибитора АТФ-синтазы олигомицина А (2 мкг/мл).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программе Origin 2019 (Microcal Software Inc., США). Полученные числовые данные по тексту представлены в виде «медиана (квартиль 1 (Q1); квартиль 3 (Q3))». На рисунках, отражающих значения проанализированных параметров для разных клеточных линий, результаты приведены в виде гистограмм, высота столбцов которых

соответствует медиане, а внутренние ограничители – квартилям 1 и 3 (если не указано иное). Статистическую значимость различий между результатами для клеточной линии THP и линиями цибридов оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни при различных уровнях значимости (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001).

Результаты и обсуждение. Исследование содержания количества АТФ в клетках показало, что практически все линии статистически достоверно имеют сниженное содержание макроэрга в сравнении с THP (от 1,9-кратного для TCN до 19-кратного для LSM1), кроме линии TCN (рис. 1).

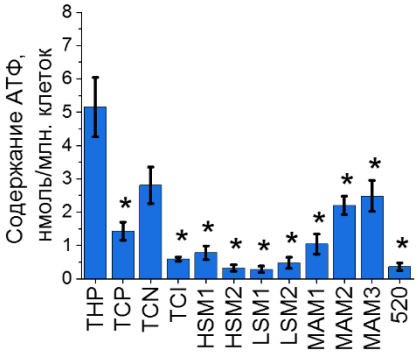

Рис. 1. Содержание АТФ в исследуемых клеточных линиях.

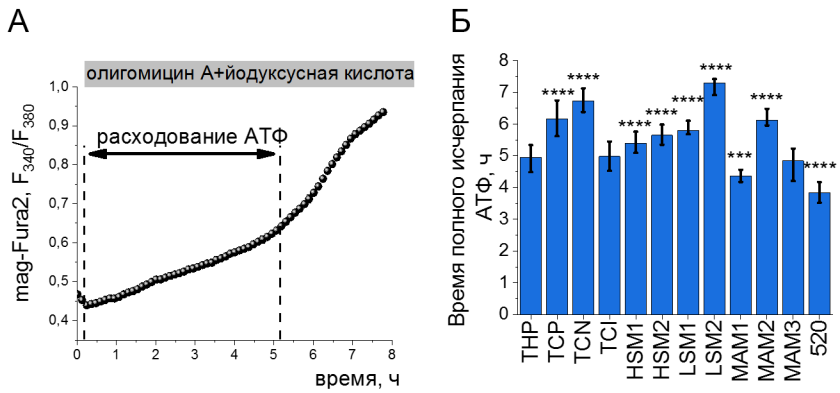

Рис. 2. Время исчерпания АТФ в исследуемых линиях. А. Пример экспериментальной кривой изменения соотношения интенсивностей флуоресценции связанной и свободной форм зонда; Б. Результаты статистического анализа времени потери способности клеток к поддержанию градиента концентрации ионов кальция относительно цитоплазматической мембраны.

Такое различие в содержании АТФ может быть следствием как нарушения работы комплексов ЭТЦ, так и повышенного потребления АТФ [6]. Для проверки роли изменений в протекании энергопотребляющих процессов были проведены ратиометрические исследования с применением зонда mag-Fura-2 (рис. 2).

Исследуемые цибриды характеризуются различным распределением относительно THP показателя времени полного исчерпания АТФ при блокировании его синтеза. В случае линий MAM1 и 520 наблюдается снижение показателя (4.36 и 3.84 соответственно), в то время как для линий TCP, TCN, HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, MAM2 – увеличение (6.16, 6.73, 5.4, 5.65, 5.8, 7.3 и 6.12 ч соответственно), которое, однако, не может объяснить приведенные на рисунке 1 различия. Таким образом различия уровня АТФ в клетках большей степени определяются изменениями скорости продукции макроэрга.

Для оценки вклада окислительного фосфорилирования в продукцию АТФ были проведены респирометрические исследования, результаты которых приведены на рис. 3.

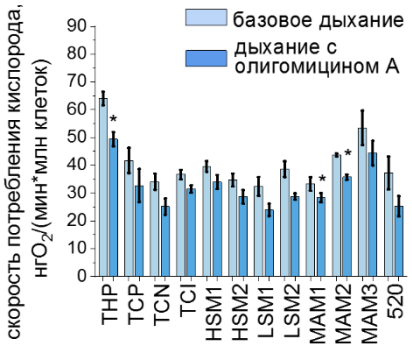

Рис. 3. Скорости базового и сопряженного с синтезом АТФ дыхания.

Как видно из представленных на рис. 3 данных, весьма малая часть дыхания связана с синтезом АТФ (для линий THP, TCP, TCN, TCI, HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, MAM1, MAM2 и MAM3 снижение относительно базового уровня скорости дыхания после внесения олигомицина А составило 22.88%, 21.55%, 26.25%, 14.2%, 14.13%, 17.37%, 26.02%, 25.45%, 14.79%, 18.28%, 16.92% и 32% соответственно. Кроме того, корреляционный анализ показывает высокий уровень связи между содержанием в клетках АТФ и скоростями базового (коэффициент Спирмена составил 0.58 при $p = 0.04$) и разобщенного (0.58 при $p = 0.04$), но не сопряженного с синтезом АТФ дыхания (0.19 при $p = 0.57$). Приведенные результаты позволяют говорить о том, что в клетках как линии THP, так и созданных на ее основе цитоплазматических гибридов

потребности в АТФ обеспечиваются преимущественно за счет гликолиза, а роль митохондрий может быть в большей степени связана с утилизацией образующегося в ходе его реализации пирувата, а также окислением цитозольного НАДН с регенерацией НАД. Вероятно, именно с изменениями в скорости последних двух процессов вследствие нарушений функции ЭТЦ, связанной с мутациями мтДНК, и связаны различия в биоэнергетических параметрах исследуемых клеток с идентичной ядерной ДНК.

С учетом различий по набору мутаций и уровням их гетероплазмии, механизмы развития митохондриальной дисфункции в разных линиях цибридов должны иметь свои особенности, которые характеризуются как увеличением, так и снижением ΔΨm (рис. 4).

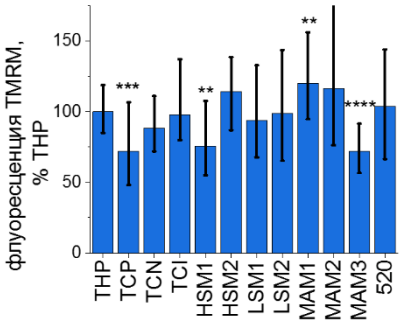

Рис. 4. Сравнение величины ΔΨm в клетках цитоплазматических гибридов и линии THP.

Из исследуемых мутаций изменения генов, кодирующих I и III комплексы ЭТЦ, являются наиболее значимыми в работе ЭТЦ: мутации I (m.5178C>A, m.13513G>A, m.14459G>A) и III комплекса (m.14846G>A, m.15059G>A), нарушают структуру белков и оказывают влияние на их биологические функции [7-10]. Помимо мутаций самих комплексов, на функционирование ЭТЦ, а следовательно и на развитие гликолиза, могут оказывать влияние некоторые мутации рРНК (m.1555A>G) и тРНК (m.3256C>T), нарушающие процесс синтеза белка [11,12].

Таким образом, несмотря на невысокий вклад OXPHOS на общую продукцию АТФ в исследуемых клетках, нарушение функционирования ЭТЦ под влиянием мутаций мтДНК оказывает существенное влияние на внутриклеточный энергетический баланс.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00317).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wilson D.F.* // J. Physiol. 2017. 595(23): 7023-38.
2. *Medeiros H.C.D., Lunt S.Y.* // Mol. Cell. 2022. 82(17): 3119-21.
3. *Khotina V.A. et al.* // Biomedicines. 2023. 11(2): 532.
4. *Novikov V. et al.* // Rev. Clin. Pharmacol. Drug Ther. 2020. 17: 31-42.
5. *Mehrotra P. et al.* // PLoS Pathog. 2014. 10: e1004265.
6. *Khan N. et al.* // Indian J. Med. Res. 2015. 141: 13-26.
7. *Ronchi D. et al.* // BMC Neurol. 2011. 11: 85.
8. *Andreu A.L. et al.* // N. Engl. J. Med. 1999. 341(14): 1037-44.
9. *Sazonova M. et al.* // Atherosclerosis. 2021. 331: e99.
10. *Sun C. et al.* // Front. Neurol. 2021. 12: 601307.
11. *Wu C.-C. et al.* // Ear Hear. 2007. 28(3): 332-42.
12. *Ryzhkova A. et al.* // Atherosclerosis. 2018. 275: e254.

ВЛИЯНИЕ АСТАКСАНТИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИНАМИКИ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ИЗОПРОТЕРИНОЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Крестинин Р.Р., Бабурина Ю.Л., Одинокова И.В., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук, Пущино, Россия

Введение. Сердечная недостаточность представляет собой совокупность расстройств, которые обусловлены в основном низкой сократительной способностью сердечной мышцы – миокарда. Это такое состояние сердца и сосудистой системы, при котором невозможно полноценно обеспечивать организм кислородом и питательными веществами в соответствии с потребностями метаболизма, или же это обеспечение достигается усиленным напряжением компенсаторных сил организма. В результате нарушения питания, гипоксемии и гипоксии развиваются необратимые нарушения и изменения во внутренних органах. Заболевания сердца являются одной из причин, из-за которой возникает нарушение мозгового кровообращения, в результате чего нарушается кровоток в артериях и уменьшается кровоснабжение мозга. Митохондрии принимают участие в заболеваниях различной этиологии. Поддержание структурной и функциональной целостности митохондрий – важнейшая предпосылка для нормальной функции клетки. Митохондриальная дисфункция приводит к развитию различных патологий, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые, сахарный диабет,