

основная активность фермента – окисление ацетальдегида. Известный ингибитор альдегиддегидрогеназы, дисульфирам, вызвал подавление спада разобщающей активности эфиров умбеллиферон-содержащих кислот. Параллельно по данным ТСХ было видно подавление гидролиза этих эфиров. Мы проверили действие еще одного ингибитора митохондриальной альдегиддегидрогеназы дайdzина и пришли к заключению, что исчезновение разобщающей активности эфиров умбеллиферон-содержащих кислот связано с эстеразной активностью ALDH2. В пользу этого заключения говорят и данные статьи [2] о взаимодействии разнообразных производных кумарина с альдегиддегидрогеназой.

Известно, что в печени ALDH2 содержится в избытке по сравнению с другими органами. Поэтому можно было ожидать, что в митохондриях, выделенных из других органов, разобщающая активность эфиров умбеллиферон-содержащих кислот не будет быстро исчезать. Эксперименты на митохондриях сердца и почек подтвердили это предположение. Следовательно, сложные эфиры умбеллиферон-содержащих кислот оказались тканеспецифичными разобщителями. Стабильность разобщающей активности этих эфиров в митохондриях сердца позволила нам сравнить их действие на скорость дыхания. Оказалось, что сложные эфиры 3-карбоновой кислоты проявляют на порядок более высокую разобщающую активность, чем эфиры 4-уксусной кислоты.

Была также исследована зависимость разобщающей активности производных 7-гидроксикумарина от активности переносчика адениновых нуклеотидов ANT1. Оказалось, что снижение мембранного потенциала митохондрий сердца крысы под действием эфиров 3-карбоновой и 4-уксусной кислот частично обращается при добавлении специфического ингибитора ANT1 карбоксиатрактилозида [3,4]. Был сделан вывод о том, что подобно жирным кислотам, производные 7-гидроксикумарина осуществляют разобщающее действие в митохондриях с участием ANT1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 21-14-00062).

1. M.M. Shchepinova et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1837 (2014) 149-158.
2. C.D. Buchman, T.D. Hurley, *J. Med. Chem.* 60 (2017) 2439-2455.
3. V.S. Krasnov et al., *Bioelectrochemistry* 145 (2022) 108081.
4. V.S. Krasnov et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 728 (2022) 109366.

Влияние комплекса мутаций митохондриальной ДНК на содержание и продукцию АТФ в клетках

Казаков М.С.^{1*}, Шитикова Е.Ю.¹, Винокуров А.Ю.¹
¹*Орловский государственный университет им. И.С.Тургенева ;*
kms898@mail.ru

Казаков М.С.(1), Шитикова Е.Ю.(1), Винокуров А.Ю.(1)

(1) Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники ОГУ имени И.С. Тургенева

Число заболеваний, связанных с мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК) сегодня близится к 400 [1]. Возможность проявления патологии зависит от локализации, уровня гетероплазмии и сочетания мутаций. Мутации в мтДНК могут негативно сказаться на синтезе АТФ из-за нарушений в работе электронтранспортной цепи (ЭТЦ), инициируя появление и развитие ряда заболеваний [2]. В связи с этим целью данной работы является исследование влияния сочетаний мутаций мтДНК на содержание и синтез АТФ.

Материалы и методы

Объектами изучения выступали линии цитоплазматических гибридов (цибридов) (TCP, TCN, TCI, HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, MAM1, MAM2, MAM3, 520, 521, 522) на основе клеток ТНР, каждая из которых имеет от 5 до 10 мутаций мтДНК с разным уровнем гетероплазмии, затрагивающих гены первой (m.3336T>C) (в зависимости от линии уровень гетероплазмии меняется от 0% до 37%), второй (m.5178C>A) (от 0% до 22%), пятой (m.13513G>A) (от 10% до 68%), шестой (m.14459G>A) (от 0% до 61%) субъединиц I комплекса, цитохрома b (m.15059G>A) (от 0% до 38%), (m.14846G>A) (от 0% до 55%), 12S рРНК (del652G) (от 0% до 44%), (m.1555A>G) (от 0% до 28%) и тРНКЛей (m.c3256C>T) (от 0% до 50%), (m.12315G>A) (от 0% до 44%). Для анализа физиологического уровня АТФ применяли люциферазный метод с применением набора определения АТФ (LifeTechnologies, США). Контроль уровня люминесценции вели на планшетном флуориметре FLUOstar Omega. Измерение времени истощения запасов клеточного АТФ проводили методом флуоресцентной микроскопии при помощи зонда magFura-2 на длинах волн возбуждения 340 нм (Mg-связанная форма) и 380 нм (свободная форма). Перед исследованием клетки инкубировали в 3 мкМ растворе зонда. Синтез АТФ блокировали добавлением олигомицина А (2 мкг/мл) и йодуксусной кислоты (100 мкМ). Момент резкого увеличения отношения флуоресценции 340 нм/ 380 нм являлся сигналом истощения запаса АТФ. Для оценки сопряженности окислительного фосфорилирования провели исследование дыхания полярографическим методом

с помощью респирометра Oxytherm+R. В качестве среды измерения использовали HBSS с содержанием глюкозы 10 мМ. В ходе изучения выполняли анализ базовой скорости потребления кислорода и после внесения ингибитора АТФ-синтазы олигомицина А (2 мкг/мл).

Результаты и их обсуждение.

Почти во всех линиях цибридов отмечено статистически достоверное снижение содержания АТФ относительно линии ТНР (от 1,9-кратного для ТСН до 19-кратного для LSM1). Такое изменение может быть следствием как нарушений синтеза АТФ, так и повышенного потребления макроэрга.

Для подтверждения теории о повышенном потреблении АТФ были проведены исследования с использованием ратиометрического флуоресцентного зонда magFura-2. Результаты измерений показали, что большая часть исследуемых линий имеет не меньшее время истощения запасов АТФ, чем ТНР (от 3,8 ч. у LSM2 и 4,9 ч. у ТНР). Данный параметр не коррелирует с данными по содержанию АТФ. Одной из причин может быть высокий уровень разобщения в клетках, для оценки которого было проведено исследование скорости дыхания клеток. Все линии цибридов имеют сниженную скорость дыхания в сравнении с ТНР (от 33 нг(O₂)/(мин*10⁶ клеток) у LSM1 до 54 нг(O₂)/(мин*10⁶ клеток) у MAM2 и 64 нг(O₂)/(мин*10⁶ клеток) у ТНР). Статистически значимый ответ на олигомицин А наблюдался для линий ТНР, MAM1 и MAM2 (23%, 15% и 18% соответственно). Таким образом, скорость потребления кислорода, сопряженного с синтезом АТФ, в случае всех клеточных линий относительно невелика (среднее изменение около 14%) из-за возможного разобщения, которое может быть инструментом снижения негативных последствий митохондриальной дисфункции, связанных с мутациями генов рРНК (del652G), тРНК (m.3256C>T, m.12315G>A) и комплексов ЭТЦ (m.15059G>A, m.14846G>A, m.5178C>A) в мтДНК [3]. В тоже время данные линий MAM1 и MAM2 показывают более высокий уровень митохондриальной функции, несмотря на значительную мутационную нагрузку. По нашему мнению, это может быть связано с высоким уровнем гетероплазмии мутаций 5 субъединицы I комплекса (m.13513G>A) и 12S рРНК (m.1555A>G), для которых в ряде работ показана отрицательная корреляция с развитием атеросклероза [4, 5]. Вероятно, это связано с тем, что мутация m.1555A>G препятствует синтезу дефектных белков ЭТЦ из-за нарушения работы рибосом, а мутация m.13513G>A приводит к увеличению функциональности комплекса I.

Таким образом, нарушение метаболизма АТФ, и дальнейшее развитие патологии является результатом не только уровня гетероплазмии отдельных мутаций, но также их взаимным влиянием, которое может иметь как негативный, так и компенсационный характер.

Литература

1. Naviaux R.K. Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease // *Mitochondrion*. - 2004. - V. 4. - P. 351-61.
2. McInnes J. Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress // *Nutr Metab (Lond)*. - 2013. - V. 10(1). - P. 63.
3. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Khasanova Z.B., Postnov A.Y., Yarygina E.I., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Role of Mitochondrial Genome Mutations in Pathogenesis of Carotid Atherosclerosis // *Oxid Med Cell Longev*. - 2017. - P. 6934394.
4. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Barinova V.A., Ryzhkova A.I., Zhelankin A.V., Postnov A.Y., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Mosaicism of mitochondrial genetic variation in atherosclerotic lesions of the human aorta // *Biomed Res Int*. - 2015. - P. 825468.
5. Sazonova M.A., Chicheva M.M., Zhelankin A.V., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Association of mutations in the mitochondrial genome with the subclinical carotid atherosclerosis in women // *Experimental and Molecular Pathology*. - 2015. - V. 99. - P. 25-32.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00317.

Влияние кратковременного белково-углеводного дефицита в питании на показатели памяти

Бахшалиева А.Я.^{1*}

¹*Институт физиологии имени академика Абдуллы Караева Министерства науки и образования Азербайджанской Республики, г.Баку. ;
afetfarm@mail.ru*

Известно, что энергия, необходимая для жизнедеятельности организма, является субстратом процессов распада метаболитов, поступающих в кровь в процессе пищеварения, которое обеспечивает обмен веществ, структурную и функциональную активность клетки. Метаболиты, поступающие в кровь в процессе