



На правах рукописи

Степанова Анастасия Евгеньевна

**Ca²⁺-зависимая агрегация и пермеабилзация биологических и искусственных мембран
продуктами ω-окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии
клетки**

1.5.2 Биофизика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2022

Работа выполнена на кафедре биохимии, клеточной биологии и микробиологии и в научно-исследовательской лаборатории молекулярной биоэнергетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Марийский государственный университет».

Научный руководитель:

Дубинин Михаил Васильевич

кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»

Официальные оппоненты:

Литвинова Лариса Сергеевна

доктор медицинских наук, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, профессор кафедры фундаментальной медицины медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Бережнов Алексей Валерьевич

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «23» июня 2022 г. в 11:00 ч. на заседании диссертационного совета 24.1.225.02 на базе ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу: г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке КазНЦ РАН и на официальном сайте КИББ ФИЦ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>.

Автореферат разослан « » мая 2022 г.

Почтовый адрес: 420111, Казань, а/я 261, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН учёному секретарю диссертационного совета (e-mail: dissovet@kibb.knc.ru)

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пономарева Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Длинноцепочечные жирные кислоты играют важную структурную и функциональную роль в эукариотических клетках. В этерифицированной форме они являются основными компонентами фосфолипидов и используются для формирования запасных триглицеридов. В неэтерифицированной форме они образуют комплексы с белками, связывающими жирные кислоты (англ. fatty-acid-binding proteins, FABP). Жирные кислоты входят в состав липидов мембран клеток и органелл, а также представлены свободными жирными кислотами (СЖК). Показано, что в зависимости от концентрации и структуры молекулы СЖК могут оказывать протонофорное и детергеноподобное действие, а также влиять на упаковку фосфолипидов мембран (Divakaruni *et al.*, 2012; Iburguren *et al.*, 2014; Самарцев и Дубинин, 2016; Demine *et al.*, 2019). Они способны изменять проницаемость клеточных мембран, что приводит к их лизису (Белослудцев и др., 2019; Mironova and Pavlov, 2021). Подробно изучено влияние СЖК на мембраны митохондрий, где они могут значительно влиять на генерацию энергии в виде трансмембранного потенциала протонов и АТФ. С одной стороны, СЖК являются субстратом дыхания в большинстве типов клеток и благодаря процессу β -окисления, происходящем в матриксе митохондрий, поставляют электроны в дыхательную цепь этих органелл. С другой стороны, жирные кислоты оказывают существенное влияние на состояние внутренней мембраны митохондрий, увеличивая их протонную проводимость и вызывая рассеивание электрохимического протонного градиента в условиях *in vitro* (Самарцев и Дубинин, 2016; Demine *et al.*, 2019), что, как предполагается, играет важную роль в процессе продукции тепла в клетках млекопитающих (Самарцев и Дубинин, 2016; Rajagopal *et al.*, 2019; Ardalan *et al.*, 2022). Кроме того, известно, что СЖК способны, по крайней мере, в условиях *in vitro*, оказывать деспорягающее действие на комплексы дыхательной цепи митохондрий, индуцируя феномен внутреннего разобщения и, таким образом, снижая эффективность транспорта электронов и синтеза АТФ в органеллах (Samartsev *et al.*, 2020; Semenova *et al.*, 2021).

Большое внимание уделяется способности СЖК разной структуры индуцировать неспецифическую проницаемость липидного бислоя биологических и искусственных (бислойных липидных мембран (БЛМ) и липосом) мембран в присутствии ионов двухвалентных металлов и, прежде всего, кальция. При этом предполагается, что структура СЖК оказывает решающее влияние на механизм Ca^{2+} -зависимого взаимодействия жирной кислоты с липидным бислоем мембран. В лаборатории проф. Г.Д. Мироновой (ИТЭБ РАН, г. Пущино) наиболее детально изучено действие монокарбонных жирных кислот, прежде всего наиболее распространённой пальмитиновой кислоты, на этот процесс. Установлено, что пальмитиновая кислота способна формировать комплексы с Ca^{2+} в липидном бислое мембран, что приводит к их сегрегации в отдельные твердокристаллические домены и формированию липидных пор (Mironova and Pavlov, 2021). Этот механизм детально описан на искусственных липидных мембранах (БЛМ и липосомы), мембранах эукариотических (эритроциты) и прокариотических (*E. coli*) клеток, а также митохондриях различных органов млекопитающих (Mironova and Pavlov, 2021). Кроме того, показано, что конечные продукты ω -окисления насыщенных монокарбонных жирных кислот - α,ω -дикарбонные жирные кислоты также способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую пермеабиллизацию мембран митохондрий печени и искусственной мембраны липосом, в основе которой лежат полиморфные фазовые переходы (Дубинин и др., 2013; Dubinin *et al.*, 2014). При этом стоит

отметить, что молекулярный механизм индукции Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации липидных мембран продуктами ω -окисления жирных кислот далек от понимания. Нет данных о тканевой специфичности их эффектов и зависимости их действия от возраста животных. Неизвестно также, способны ли такие жирные кислоты оказывать влияние на цитоплазматическую мембрану клеток. Более того, в настоящее время отсутствуют сведения о влиянии промежуточных продуктов ω -окисления (ω -гидроксикарбоновых кислот) на Ca^{2+} -зависимую проницаемость липидных мембран. Учитывая все вышеуказанное, а также известные данные о накоплении продуктов ω -окисления жирных кислот при нарушениях липидного обмена, например, при ожирении, голодании, сахарном диабете и т.д. (Mortensen, 1992; Reddy, 2001; Reddy and Rao, 2006, Madec *et al.*, 2011; Wanders *et al.*, 2011), представляется актуальным глубокое исследование механизмов взаимодействия этих кислот с липидными мембранами.

Цель работы: выяснение механизмов Ca^{2+} -зависимого воздействия продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты – ω -гидроксипальмитиновой (ГПК) и ω -гексадекандикарбоновой (ГДК) кислот, на биологические и искусственные мембраны.

Для достижения этой цели необходимо решить следующие **задачи:**

1. Оценить влияние ГПК и ГДК на поведение эритроцитов в суспензии и состояние мембран клеток в присутствии ионов кальция, а также в условиях их инкубации в сыворотке.
2. Рассмотреть эффекты ГПК и ГДК как модуляторов проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени в присутствии ионов кальция. Выяснить возможность выхода цитохрома *c* из органелл в результате такого взаимодействия.
3. Определить основные условия, необходимые для проявления Ca^{2+} -зависимых эффектов ГПК и ГДК на митохондриях клеток печени.
4. Сравнить особенности Ca^{2+} -зависимого действия ГДК на мембраны митохондрий печени, почек и сердца. Исследовать зависимость Ca^{2+} -зависимых эффектов ГДК на митохондриях печени от возраста животных.
5. Оценить влияние ГПК и ГДК на размер и проницаемость липосом для флуоресцентного зонда сульфородамина Б.

Научная новизна работы. Впервые показано, что продукты ω -окисления пальмитиновой кислоты (ω -гидроксипальмитиновая (ГПК) и α,ω -гексадекандиовая кислоты (ГДК)) способны индуцировать массивную кальций-зависимую агрегацию эритроцитов лабораторных крыс в суспензии, которая сопровождается нарушением проницаемости клеточных мембран и выбросом содержимого клеток. Установлено, что ГПК и ГДК также способны индуцировать циклоспорин А (ЦсА)-нечувствительную агрегацию митохондрий печени крыс в присутствии ионов Ca^{2+} , а также Sr^{2+} , которая сопровождается пермеабиллизацией мембран органелл. Выявлены условия необходимые для проявления эффекта продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты как индукторов такой агрегации и пермеабилзации. Показано, что в ходе этих процессов происходит выход из митохондрий печени крыс проапоптотического белка цитохрома *c*. Установлено, что митохондрии сердца лабораторных крыс также подвержены ЦсА-нечувствительной пермеабилзации в присутствии ГДК и ионов кальция, однако она менее выражена по сравнению с органеллами, полученными из печени или почек. Показано, что чувствительность митохондрий печени крысы к индукции ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации усиливается с возрастом животного. Установлено, что ГПК и ГДК в присутствии ионов кальция вызывают агрегацию

и последующий выход флуоресцентного красителя сульфородамина Б из лецитиновых липосом.

Научно-практическое значение работы. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, имеют, прежде всего, фундаментальное значение для биологической науки. Они совершенствуют наше представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе регуляции функционирования и проницаемости мембран митохондрий различных органов с помощью органических метаболитов и неорганических соединений. Результаты работы в перспективе могут найти применение в фундаментальных исследованиях в области биофизики липидных мембран, физиологии и патологии клетки. Действительно, в настоящее время общепризнано, что пермеабиллизация мембран клеток и органелл и, в частности, митохондрий, играет ключевую роль в развитии патофизиологических явлений, таких как ишемия, нейродегенеративные и нейромышечные заболевания, сахарный диабет и другие. Наряду с этим известно, что содержание метаболитов ω -окисления жирных кислот в гепатоцитах значительно увеличивается при ожирении, голодании и различных формах сахарного диабета. Следует подчеркнуть и прикладное значение работы – выяснение механизмов пермеабиллизации липидных мембран при участии жирных кислот может быть использовано для их направленной модификации с целью регуляции транспортных процессов в клетках и тканях и доставки целевых соединений, обладающих, в том числе, терапевтическим потенциалом.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование.

Работа проводилась с 2015 по 2022 г. по тематике работы лаборатории молекулярной биоэнергетики Марийского государственного университета. Исследование по теме диссертации выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке молодых российских ученых-кандидатов наук (МК-61.2019.4, руководитель – к.б.н. М.В. Дубинин).

Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора и на данных, полученных при его непосредственном участии. Эксперименты по конфокальной микроскопии митохондрий проведены совместно с к.б.н. В.А. Яшиным (ИБК РАН, Пущино). Исследования с применением липосом проведены в лаборатории митохондриального транспорта ИТЭБ РАН совместно с д.б.н. К.Н. Белослудцевым. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и руководителем диссертационной работы.

Основные научные положения, выносимые на защиту.

1. Продукты ω -окисления пальмитиновой кислоты (ГПК и ГДК) способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую агрегацию эритроцитов, митохондрий печени, а также лецитиновых липосом, которая приводит к неспецифической пермеабиллизации мембран.

2. Механизм действия ГДК как индуктора агрегации и неспецифической пермеабиллизации митохондрий является циклоспорин А-нечувствительным и проявляется также в митохондриях сердца и почек.

3. Накопление продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты (ГПК и ГДК) в кровяном русле и клетках печени может быть одним из факторов гибели клеток крови и гепатоцитов при патологических состояниях, связанных с нарушением метаболизма липидов.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены на 5-ой и 8-ой международных конференциях «Современные проблемы медицины и естественных наук» (Йошкар-Ола, 2016, 2019 г.); XI международном симпозиуме «Биологическая подвижность» (Пушино, 2016 г.); 69-ой и 72-ой Всероссийских школах-конференциях молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2016, 2019); VI съезде биофизиков России (Сочи, 2019).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 4 статьи в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, и 7 тезисов докладов всероссийских и международных научных конференций, и симпозиумов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 107 страницах, включая список литературы, иллюстрационный материал включает 22 рисунка и 5 таблиц. Библиография содержит 212 наименований статей российских и зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Компоненты сред выделения и инкубации, все неорганические химические вещества, а также органические соединения, включая жирные кислоты (пальмитиновая, ГПК и ГДК), сульфородамин Б, хлорид тетрафенилфосфония, циклоспорин А, фосфатидилхолин, были приобретены в Sigma-Aldrich (США). В экспериментах использовались 30 мМ растворы изучаемых жирных кислот в дважды перегнанном этаноле. При проведении экспериментов в контрольных пробах к митохондриям добавлялись растворители в том же объеме, как и в опытах с исследуемыми веществами. Во всех случаях растворители не изменяли исследуемые параметры митохондрий.

Выделение и подсчет эритроцитов. Использовалась цельная кровь половозрелых крыс-самцов линии Вистар весом 210–250 г. Кровь собирали в пробирку, содержащую 3 мл 3,5% цитрата натрия и 1 мг/мл ЭДТА сразу после декапитации. Пробирку центрифугировали 10 мин при 500 g и 4°C. Плазму и лейкоциты отделяли, а эритроциты промывали три раза в пяти объемах фосфатного буфера (138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄ и 5 мМ глюкозы, pH 7,4) при 500 g в течение 10 минут при 4°C. каждый раз с удалением лейкоцитарного слоя. Полученную суспензию эритроцитов разбавляли фосфатным буфером, так что конечная концентрация клеток составляла ~5-9 x 10⁹ клеток/мл. Подсчет эритроцитов проводили в двухсеточной камере Горяева.

Оптическая микроскопия эритроцитов. Эритроциты (8-10 x 10⁶ клеток/мл) инкубировали в фосфатном буфере в присутствии различных добавок (100 мкМ Ca²⁺ + 30 мкМ ПК, ГПК или ГДК). После инкубации в течение 10 мин с исследуемыми агентами 10 мкл суспензии эритроцитов помещали на предметное стекло и накрывали покровным стеклом для получения изображений с помощью компьютеризированной камеры CAM V500 и бинокулярного микроскопа Meiji MT4000 (Meiji Techno).

Оценка проницаемости эритроцитарной мембраны. Проницаемость мембраны эритроцитов оценивали по выходу K⁺ с помощью K⁺-селективного электрода и многоканальной электрометрической системы Record 4usb в ячейке объемом 1,2 мл при постоянном перемешивании и температуре 25°C. В этом случае среда инкубации содержала 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), концентрация эритроцитов 8-10 x 10⁶ клеток/мл.

Выделение митохондрий. Митохондрии из печени, почек и сердец крыс-самцов линии Вистар выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования с последующим удалением эндогенных жирных кислот с помощью БСА (Dubinin et al., 2014). Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ ЭГТА и 5 мМ МОПС-Трис (рН 7,4). Концентрацию белка митохондрий определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали БСА.

Оценка функциональных параметров митохондрий. Набухание митохондрий регистрировали по изменению оптической плотности суспензии митохондрий (А) при длине волны 540 нм в кювете с перемешиванием при комнатной температуре (~22°C) с использованием волоконно-оптической системы Ocean Optics FLAME-T-UV-VIS (Ocean Optics, США). Концентрацию ионов Ca^{2+} в инкубационной среде определяли с помощью Ca^{2+} -селективного электрода. Трансмембранный электрический потенциал ($\Delta\psi$) оценивали путем регистрации распределения катиона тетрафенилфосфония (TFF^+) по митохондриальной мембране. Изменения концентраций TFF^+ и Ca^{2+} регистрировали одновременно в кювете объемом 1,2 мл при постоянном перемешивании и температуре (25°C) с использованием многоканальной электрометрической системы Record-4usb. Инкубационная среда содержала 200 мМ сахарозы, 20 мМ КСl, 10 мкМ ЭГТА, 5 мМ янтарной кислоты, 2 мкМ ротенона, 1 мкМ ЦсА и 10 мМ буфера Мопс-трис, рН 7,4. В ячейку сразу после митохондрий (0,4 – 1,0 мг/мл) добавляли ротенон (2 мкМ) и, если это необходимо, 1 мкМ циклоспорин А.

Конфокальная микроскопия митохондрий. Митохондрии (0,4 мг белка/мл) инкубировали в течение 10 минут в инкубационной среде с добавлением 0,5 мкМ Mitotracker red в присутствии различных добавок (50 мкМ Ca^{2+} , 30 мкМ ГПК, 50 мкМ Ca^{2+} + 30 мкМ ГПК). Образцы (10 мкМ суспензии митохондрий) помещали на предметные стекла и проверяли с помощью сканирующего конфокального микроскопа Leica TSC SP5 (Германия) с объективом PL APO 63×/1,40 Oil λ bl (лямбда-синий). Флуоресценция возбуждалась лазером с $\lambda=543$ нм и регистрировалась в канале спектрального диапазона 591–716 нм.

Электронная микроскопия митохондрий. Для исследования с помощью электронной микроскопии образцы митохондрий фиксировали в течение 2 часов в 2,5% глутаральдегиде, растворенном в среде, содержащей 200 мМ сахарозы, 20 мМ КСl, 20 мкМ ЭГТА, 5 мМ янтарной кислоты, 2 мкМ ротенона, 1 мкМ ЦсА и 10 мМ буфера Мопс-трис (рН 7,4). После фиксации в 1% тетроксиде осмия (OsO_4) образцы заливали в эпоксидную смолу Эпон 812. Микроскопические срезы были нарезаны на ультрамикротоме LKB-III и окрашены цитратом свинца и уранилацетатом. Электронную микроскопию проводили на микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония).

Определение вышедшего из митохондрий цитохрома c. Содержание вышедшего из митохондрий цитохрома c (нмоль/мг митохондриального белка) определяли спектрометрически при длине волны 414 нм как показано в работе (Arraix et al., 2000). Максимальное высвобождение цитохрома c из митохондрий было индуцировано добавлением 1% SDS. Концентрацию цитохрома c рассчитывали, используя предварительно полученную калибровочную кривую, в качестве стандарта использовали раствор цитохрома c в среде инкубации.

Формирование и измерение проницаемости больших однослойных липосом, загруженных сульфородамино Б. Однослойные липосомы, загруженные сульфородамино Б, получали общепринятым методом экстракции (Agafonov et al., 2003).

Измерение неспецифической проницаемости липосомальной мембраны оценивалось по выходу красителя из липосом методом флуориметрии на спектрофлуориметре «Ocean Optics USB 2000». Состав буфера: 10 мМ Трис-НСl (рН 8.5), 50 мкМ ЭГТА, и 40 мМ КСl.

Измерение размера липосом. Измерение размеров наночастиц (липосом), основанное на определении коэффициента диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света, производилось методом динамического рассеяния света (ДРС) с помощью лазерного анализатора Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments», Великобритания). Результаты ДРС были также выражены в виде значений z-среднее. Этот параметр был рассчитан на основе совокупного анализа корреляционной функции (с использованием стандартного программного пакета «Zetasizer nano»); характеризует средний эффективный гидродинамический диаметр частиц.

Статистическая обработка результатов исследований. Данные были проанализированы с использованием программ Microsoft Office Excel и Graph Pad Prizm 5. Каждый эксперимент проводили минимум в трех повторах и добивались совпадения результатов, по крайней мере, в трех независимых параллельных экспериментах на разных животных. Находили среднее, ошибку среднего, стандартное отклонение, 95% доверительный интервал. Множественные сравнения проводили с помощью критерия Краскелла-Уоллиса. Дальнейшие попарные сравнения (post-hoc) проводили с помощью критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение Ca^{2+} -зависимых эффектов пальмитиновой кислоты и продуктов ее ω -окисления (ГПК и ГДК) на эритроцитах крыс

Внесение пальмитиновой кислоты (ПК) к суспензии эритроцитов в присутствии Ca^{2+} вызывает значительное уменьшение количества клеток в суспензии (рис. 1Б). Такое уменьшение количества клеток сопровождается значительным увеличением концентрации K^+ в инкубационной среде (рис. 2). Все это говорит о том, что происходит гемолиз эритроцитов. В основе гемолиза лежит, как показано ранее, образование липидных пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированных пор в плазматической мембране эритроцитов (Belosludtsev *et al.*, 2010).

Как видно из рис. 1 (В и Г), продукты ω -окисления ПК – ГПК и ГДК в присутствии Ca^{2+} иначе взаимодействуют с эритроцитами. Внесение этих кислот вызывает массивную Ca^{2+} -зависимую агрегацию эритроцитов в суспензии. Такая агрегация сопровождается уменьшением количества одиночных клеток. С другой стороны, мы полагаем, что небольшое снижение количества клеток может происходить и вследствие гемолиза эритроцитов. Как видно из рис. 2, добавление ГДК (ГПК) и Ca^{2+} к суспензии эритроцитов, как и в случае с ПК, также приводит к выходу ионов K^+ из клеток. Однако, ГДК и ГПК существенно уступают ПК по способности индуцировать Ca^{2+} -зависимую проницаемость эритроцитов (рис. 2).

Мы полагаем, что в основе ГДК(ГПК)/ Ca^{2+} -индуцированного выброса K^+ из клеток (и, соответственно их лизиса) могут лежать несколько процессов. Во время агрегации эритроцитов плазматические мембраны соседних клеток будут взаимодействовать друг с другом, что может приводить к их слиянию. Процесс слияния сопровождается массивными перестройками мембран, появлением небислойных фаз, что будет приводить к появлению

различных мембранных дефектов и ее пермеабиллизации для различных соединений и ионов (в том числе и K^+) (Chernomordik and Kozlov, 2008). В результате такого типа пермеабиллизации может происходить и лизис части эритроцитов.

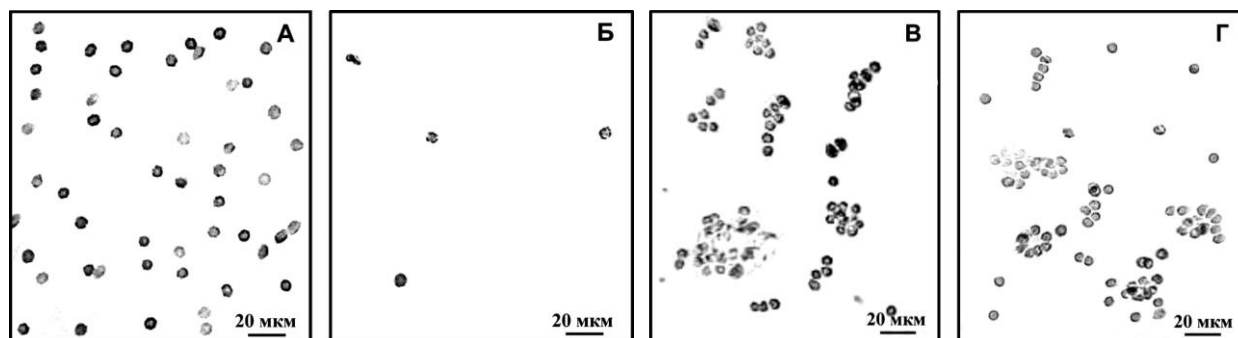


Рис. 1. Эритроциты крысы в отсутствие добавок (А), в присутствии ПК и Ca^{2+} (Б), ГДК и Ca^{2+} (В), ГПК и Ca^{2+} (Г). Состав среды инкубации указан в разделе «Материалы и методы исследования». Добавки: эритроциты ($8-10 \times 10^6$ клеток/мл); по 30 мкМ ПК, ГДК и ГПК; 100 мкМ $CaCl_2$ (Ca^{2+}). Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате эритроцитов. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

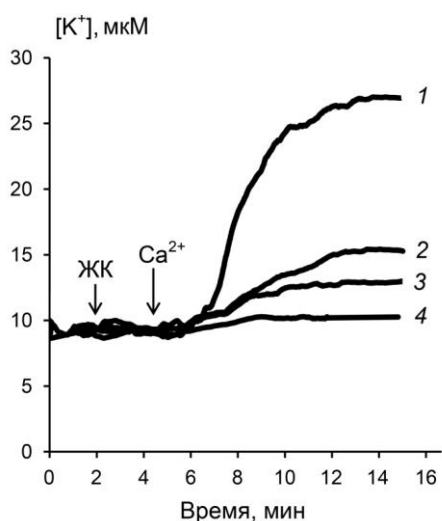


Рис. 2. Выход K^+ из эритроцитов, индуцированный жирными кислотами (ЖК) и Ca^{2+} . Состав среды инкубации указан в разделе «Материалы и методы исследования». Добавки: эритроциты ($8-10 \times 10^6$ клеток/мл). 1, 30 мкМ ПК+ 100 мкМ $CaCl_2$. 2, 30 мкМ ГДК + 100 мкМ $CaCl_2$. 3, 30 мкМ ГПК + 100 мкМ $CaCl_2$. 4, 100 мкМ $CaCl_2$. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате эритроцитов. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

2. Влияние ГПК и ГДК на митохондрии печени крыс в присутствии ионов двухвалентных металлов

2.1. Влияние ГПК и ГДК в присутствии ЦсА на состояние суспензии митохондрий печени, нагруженных ионами кальция

Нами предположено, что ГПК и ГДК в присутствии Ca^{2+} могут индуцировать агрегацию и других мембранных структур, в частности, митохондрий. Для изучения процессов, происходящих непосредственно в суспензии митохондрий, мы использовали метод конфокальной микроскопии. Установлено, что добавление ГПК или ГДК к нагруженным Ca^{2+} митохондриям печени крыс приводит к образованию массивных агрегатов органелл (рис. 3Б и В). Стоит отметить, что добавление только ионов Ca^{2+} к митохондриям не оказывает влияния на поведение митохондрий, в то время как при добавлении только ГПК или ГДК митохондрии уже обнаруживали тенденцию к агрегации.

При этом присутствовавший в среде инкубации ЦсА не оказывал влияния на агрегацию органелл. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГПК и ГДК способны индуцировать ЦсА-нечувствительную Ca^{2+} -зависимую агрегацию митохондрий печени.

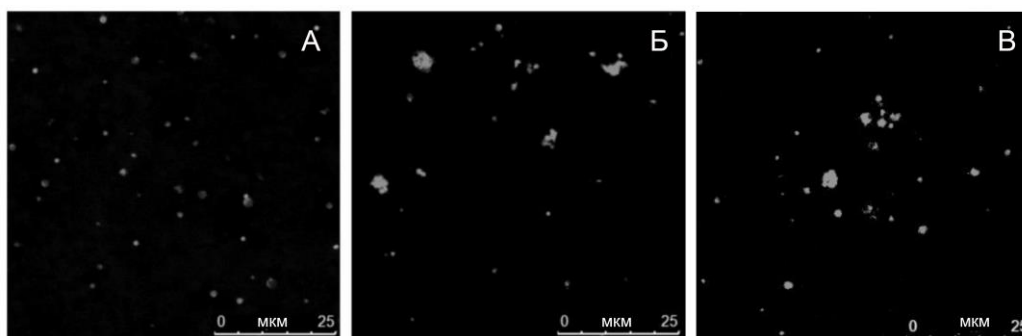


Рис. 3. Конфокальное микроскопическое исследование суспензии митохондрий в отсутствие (А) и присутствии Ca^{2+} и ГПК (Б), Ca^{2+} и ГДК (В) с использованием MitoTracker™ Red. Состав среды инкубации указан в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

2.2. Влияние ГПК (ГДК)/ Ca^{2+} -индуцированной пермеабиллизации митохондрий печени на выход цитохрома *c* из органелл

Ранее было показано, что продукты ω -окисления пальмитиновой кислоты способны вызывать апоптоз в культуре клеток меланомы, проявляя, таким образом, цитотоксичность (Abe *et al.*, 2002, 2005). Стоит отметить, что апоптоз, индуцируемый ГПК был каспаз-зависимым, что предполагает участие цитохрома *c* в запуске этого процесса (Abe *et al.*, 2002). Представляет интерес выяснить, может ли индуцированная ГПК или ГДК Ca^{2+} -зависимая ЦсА-нечувствительная агрегация митохондрий печени сопровождаться нарушением проницаемости внешней мембраны органелл и выходом этого белка в цитоплазму.

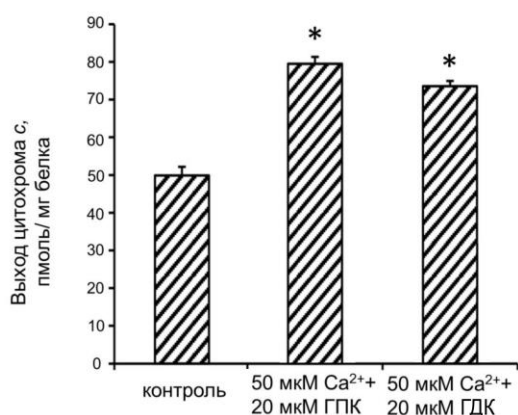


Рис. 4. Сравнение количества вышедшего из митохондрий печени цитохрома *c* при условии их инкубации в отсутствии (контроль) и в присутствии: 50 мкМ хлорида кальция (Ca^{2+}) и 20 мкМ ГПК, 50 мкМ Ca^{2+} и 20 мкМ ГДК. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 9$). *- различия между опытом (Ca^{2+} +ГПК; Ca^{2+} +ГДК) и контролем статистически значимы, $p < 0,01$

Действительно, как видно из данных рис. 4, ГПК и ГДК в присутствии Ca^{2+} приводит к выходу цитохрома *c* из органелл. При этом добавление только Ca^{2+} , только ГПК или только ГДК существенно не влияют на количество вышедшего из митохондрий цитохрома *c*. Таким

образом, индуцированная ГПК или ГДК Ca^{2+} -зависимая агрегация митохондрий печени сопровождается выходом цитохрома *c*, что может быть вызвано пермеабиллизацией внешней мембраны.

Исходя из того, что при индукции Ca^{2+} -зависимой агрегации митохондрий ГПК или ГДК наблюдается выход цитохрома *c*, накопление продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты в клетках печени может рассматриваться как один из факторов их гибели при различных патологических состояниях, связанных с нарушением метаболизма липидов.

2.3. Влияние ГПК и ГДК в присутствии ЦсА на Ca^{2+} -зависимую проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени

Как было показано выше (рис. 3 и 4), ГПК или ГДК, будучи добавленные к нагруженным Ca^{2+} митохондриям печени, индуцируют агрегацию органелл и выход цитохрома *c*, по-видимому, вследствие повреждения внешней мембраны. В то же время длительная инкубация органелл в этих условиях приводила к их лизису, что предполагает также разрушение внутренней мембраны. В этом случае в условиях инкубации нагруженных Ca^{2+} митохондрий с ГПК или ГДК следует ожидать пермеабиллизации и внутренней мембраны как начального этапа разрушения органелл. Подобные процессы показаны нами и на эритроцитах – добавление ГПК или ГДК в присутствии Ca^{2+} к этим клеткам приводило не только к их агрегации клеток, но и к пермеабиллизации их мембран.

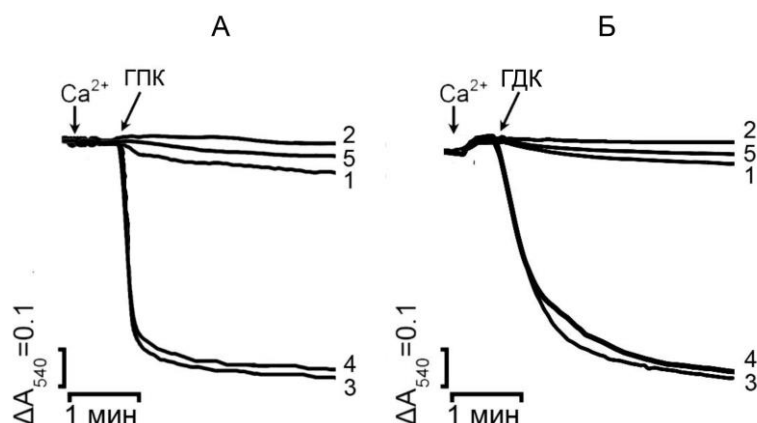


Рис. 5. Эффекты ГПК (А) и ГДК (Б) на оптическую плотность суспензии митохондрий печени при различных экспериментальных условиях. Последовательность добавок: (1) ГПК или ГДК; (2) Ca^{2+} ; (3) Ca^{2+} и ГПК (или ГДК); (4) ЦсА, Ca^{2+} и ГПК (или ГДК); (5) рутений красный, ЦсА, Ca^{2+} и ГПК (или ГДК). Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Добавки: 50 мкМ CaCl_2 ; 20 мкМ ГПК; 20 мкМ ГДК, 1 мкМ ЦсА, 0,5 мкМ рутений красный. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

Известно, что пермеабиллизация внутренней мембраны митохондрий приводит к высокоамплитудному набуханию органелл (Belosludtsev *et al.*, 2014). Набухание митохондрий, в свою очередь, приводит к уменьшению рассеивания проходящего через суспензию света, и это может быть зарегистрировано как снижение оптической плотности суспензии митохондрий (Belosludtsev *et al.*, 2014). В настоящей работе установлено, что внесение к энергизованным сукцинатом митохондриям печени, инкубируемым в сахарозной среде, последовательно 50 мкМ хлорида кальция и 20 мкМ ГПК приводит к значительному

снижению оптической плотности суспензии (рис. 5А, кривая 3). При добавлении только хлорида кальция изменения оптической плотности суспензии митохондрий не происходит (рис. 5А, кривая 2). Внесение только ГПК приводит к незначительному снижению оптической плотности (рис. 5А, кривая 1). Аналогичные результаты получены и при в случае применения ГДК как индуктора Ca^{2+} -зависимой агрегации органелл. Как показано на рис. 5А,Б (кривые 4), циклоспорин А не оказывал влияния на снижение оптической плотности суспензии органелл, индуцированное Ca^{2+} и ГПК или ГДК, что исключает участие «классической» МРТ поры в этом процессе. Показано, что ингибитор митохондриального кальциевого унипортера рутений красный существенно подавляет эффекты ГПК и ГДК (рис. 5А,Б, кривые 5), что свидетельствует о необходимости присутствия Ca^{2+} в матриксе органелл для индукции их агрегации и пермеабилзации.

На рис. 6 показаны типичные электронные микрофотографии нормальных митохондрий с плотным матриксом и видимыми кристами по сравнению с органеллами, обработанными 50 мкМ Ca^{2+} и 20 мкМ ГПК в присутствии ЦсА. В последнем случае (после 5 мин инкубации) видна типичная картина митохондриального набухания: плотность митохондриального матрикса снижается, а часть органелл теряет свою внешнюю мембрану. Следует отметить, что в некоторых митохондриях кристы исчезли, а в других органеллах видна внутренняя мембрана, что свидетельствует о сохранении внешней мембраны.

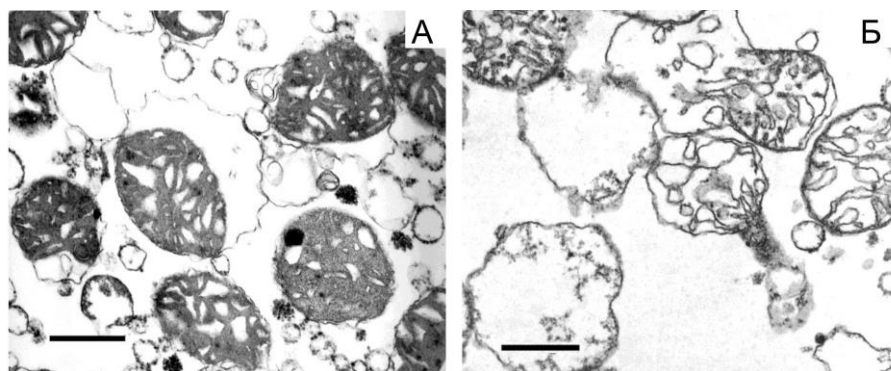


Рис. 6. Электронно-микроскопическое изображение митохондрий печени крысы до (А) и после (Б) обработки 50 мкМ CaCl_2 и 20 мкМ ГПК в присутствии 1 мкМ ЦсА. Масштабная линейка - 1 мкм. Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

Необходимо также отметить, что описанное снижение оптической плотности митохондрий печени в ответ на добавку Ca^{2+} и ГПК или ГДК может быть вызвано как набуханием, так и агрегацией органелл. Это не позволяет, основываясь только на этом методе дать однозначную оценку индукции ГПК или ГДК Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации митохондрий. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования Ca^{2+} -зависимого действия ГПК на митохондрии с применением альтернативных методов оценки пермеабилзации органелл, например, оценка окисления пула НАД(Ф)Н.

Как видно на рис. 7 последовательное добавление Ca^{2+} и ГПК или ГДК к суспензии митохондрий печени приводит к резкому уменьшению флуоресценции НАД(Ф)Н. При этом последующее добавление 5 мкМ FCCP не приводит к дальнейшему снижению активности

флуоресценции, что свидетельствует о полном окислении НАД(Ф)Н, индуцированном ГПК или ГДК и Ca^{2+} .

Следовательно, ГПК или ГДК в присутствии Ca^{2+} в матриксе митохондрий индуцирует пермеабиллизацию внутренней мембраны, которая сопровождается снижением оптической плотности суспензии митохондрий, вследствие их набухания, а также выходом Ca^{2+} из матрикса, падением мембранного потенциала и окислением пула НАД(Ф)Н.

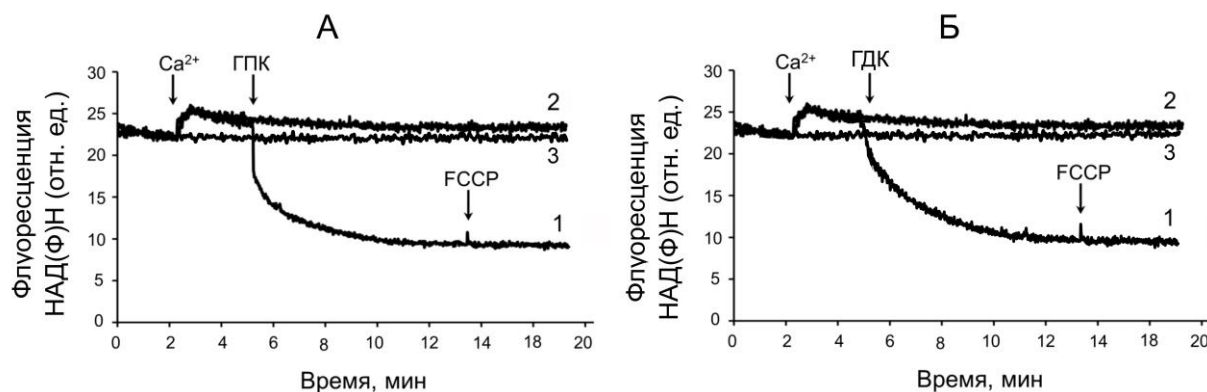


Рис. 7. Влияние ГПК (А) и ГДК (Б) на автофлуоресценцию НАД(Ф)Н в присутствии Ca^{2+} (1). Кривая (2) – Ca^{2+} был добавлен без ГПК или ГДК, кривая (3) – ГПК или ГДК добавлены в отсутствие Ca^{2+} . Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы исследования». FCCP (5 мкМ) был добавлен в конце эксперимента для индукции полного окисления НАДФ(Н). Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

3. Возрастная и тканевая особенности ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации митохондрий крыс

3.1. Тканеспецифичность ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации митохондрий крыс

Известно, что липидный и белковый состав митохондриальных мембран, а, следовательно, и их физические свойства, зависят от типа ткани и возраста животного (Daum, 1985). Предполагается, что это может оказывать существенное влияние на пермеабиллизацию мембран. Также известно, что пермеабиллизация мембран в митохондриях печени крысы существенно облегчается с увеличением возраста животного (Belosludtsev *et al.*, 2009).

Как видно из рис. 8, добавление 20 мкМ ГДК к митохондриям печени половозрелых крыс-самцов, инкубируемых в сахарозной среде, в присутствии 50 мкМ Ca^{2+} и 1 мкМ ЦсА приводит к высокоамплитудному набуханию органелл при формировании неспецифической ЦсА-нечувствительной проницаемости внутренней мембраны. Подобная картина наблюдается и в случае добавления хлорида кальция и ГДК к митохондриям, выделенным из почек и сердца (рис. 8). Как видно на рисунке, скорость набухания митохондрий сердца ниже, по сравнению с таковой митохондрий почек и печени крыс.

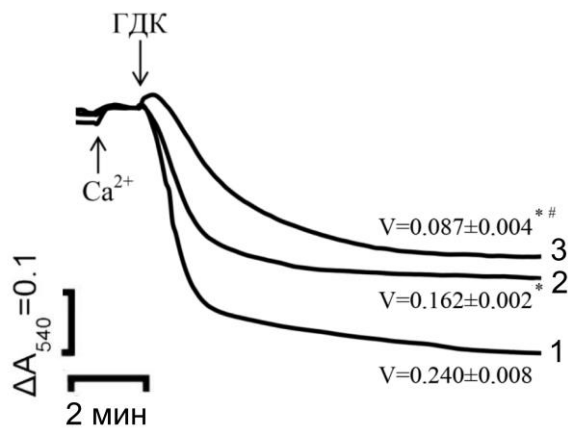


Рис. 8. Влияние Ca^{2+} и ГДК на кинетику ЦсА-нечувствительного изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени (1), почек (2) и сердца (3) крыс. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы исследования». V – скорость ГДК/ Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий ($\Delta A/\text{мин}$ на 1 мг белка), приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 12$). Добавки: 50 мкМ хлорида кальция (Ca^{2+}), 20 мкМ ГДК. * - статистически значимые различия между скоростями ГДК/ Ca^{2+} - индуцированного набухания митохондрий почек, сердца и аналогичным показателем митохондрий печени крыс, $p < 0,05$; # - статистически значимые различия между скоростями ГДК/ Ca^{2+} - индуцированного набухания митохондрий почек и сердца крыс, $p < 0,05$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что митохондрии сердца проявляют большую резистентность к ГДК как индуктору Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации, чем митохондрии печени и почек крыс. Это может быть обусловлено разным как липидным, так и белковым составом митохондриальных мембран этих тканей. В частности, в митохондриях печени и почек крыс, по сравнению с митохондриями сердца, увеличено соотношение кардиолипина к общим фосфолипидам (Daum, 1985), который, как известно, способствует образованию подобного типа липидных пор в мембране (Belosludtsev *et al.*, 2009). Кроме того, различия в амплитуде набухания митохондрий сердца, почек и печени, по литературным данным, могут быть обусловлены существенно большим содержанием АТФ: креатин- N -фосфотрансферазы – белка, участвующего в формировании контактных сайтов между митохондриальными мембранами, в митохондриях сердца и почек, по сравнению с митохондриями печени.

3.2. Зависимость ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации митохондрий печени крыс от возраста животных

Нами также были изучены параметры индукции ГДК/ Ca^{2+} -активируемой пермеабилзации внутренней мембраны в митохондриях, выделенных из печени крыс 4-х возрастных групп: 1, 4, 8 и 18 месяцев. Известно, что с возрастом в митохондриях снижается мембранный потенциал, активность электрон-транспортной цепи в целом и ее отдельных комплексов, меняются состав и свойства митохондриальных мембран (Daum, 1985; Hagen *et al.*, 1997).

Таблица 1. Сравнение скоростей ЦсА-нечувствительного набухания митохондрий (МХ) печени крыс в возрасте 1, 4, 8 и 18 месяцев, индуцированного 50 мкМ Ca^{2+} и различными концентрациями ГДК. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 12$)

	Скорость набухания митохондрий ($\Delta A/\text{мин}$ на 1 мг белка)			
	5 мкМ ГДК	10 мкМ ГДК	20 мкМ ГДК	40 мкМ ГДК
МХ печени крысы 1 мес.	0.099 \pm 0.001*	0.185 \pm 0.001	0.238 \pm 0.001*	0.282 \pm 0.006*
МХ печени крысы 4 мес.	0.139 \pm 0.005*	0.194 \pm 0.003	0.263 \pm 0.001	0.307 \pm 0.001*
МХ печени крысы 8 мес.	0.169 \pm 0.004	0.181 \pm 0.024	0.281 \pm 0.016	0.417 \pm 0.003
МХ печени крысы 18 мес.	0.171 \pm 0.006	0.237 \pm 0.020*	0.373 \pm 0.015*	0.482 \pm 0.021*

Примечание. * Выявлены статистически значимые различия между скоростями ГДК/ Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий печени половозрелых крыс возрастом 8 месяцев и указанных групп животных, $p < 0,05$

В таблице 1 приведены значения скоростей ЦсА-нечувствительного Ca^{2+} -зависимого набухания митохондрий печени крыс разного возраста, индуцированного ГДК в концентрации 5, 10, 20 и 40 мкМ. Видно, что митохондрии печени молодых неполовозрелых крыс в возрасте 1 и 4 месяцев проявляют значительно большую резистентность к ГДК как индуктору Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации, по сравнению с митохондриями печени половозрелых особей возрастом 8 месяцев и старых крыс возрастом 18 месяцев. В то же время для индукции пермеабилзации в митохондриях печени старых крыс необходима меньшая концентрация ГДК. Полученные данные указывают на существенное снижение резистентности митохондрий к действию ГДК как к индуктору такой пермеабилзации с возрастом.

Таблица 2. Влияние ТБГ на скорость набухания митохондрий печени, индуцированного 50 мкМ Ca^{2+} и 5 мкМ ГДК. Приведены средние значения \pm ошибка средней ($n = 9$)

	Скорость набухания митохондрий ($\Delta A/\text{мин}$ на 1 мг белка)
контроль	0,092 \pm 0,006
+ 200 мкМ ТБГ	0,131 \pm 0,004*

Примечание. * Выявлены статистически значимые различия между скоростями ГДК/ Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий печени 4-месячных крыс в отсутствие (контроль) и в присутствии 200 мкМ ТБГ, $p < 0,05$

Можно предположить, что это может быть связано со структурно-функциональными изменениями, облегчающими пермеабилзацию мембран, в частности, с развитием окислительного стресса. Одним из путей моделирования *in vitro* окислительного стресса в изолированных митохондриях является их инкубация с различными окисляющими агентами, в частности, с *трет*-бутилгидропероксидом (ТБГ) (Кожина и Самарцев, 2010). Как известно, инкубация митохондрий с ТБГ приводит к окислению пиридиновых нуклеотидов и

глутатиона и сопровождается образованием метильного и других свободных радикалов, а также повышением уровня продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов (Кожина и Самарцев, 2010). В настоящей работе мы применяли ТБГ в концентрации 200 мкМ, известно, что в этой концентрации этот агент не оказывает влияния на дыхание и окислительный синтез АТФ (Кожина и Самарцев, 2010).

Установлено, что предварительная инкубация митохондрий печени крыс возрастом 4 месяца с 200 мкМ ТБГ приводит к увеличению скорости набухания митохондрий (Табл. 2). Таким образом, окислительный стресс, индуцированный ТБГ, оказывает слабое влияние на индукцию митохондриальной ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации. Можно предположить, что снижение резистентности митохондрий к действию ГДК как индуктору Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации с возрастом обусловлено и другими факторами, в частности, с увеличением содержания холестерина и свободных жирных кислот в митохондриальных мембранах с возрастом (Daum, 1985), которые, как считается, облегчают индукцию липидных пор (Belosludtsev *et al.*, 2009).

4. Индукция ГПК и ГДК Ca^{2+} -зависимой агрегации и пермеабиллизации липосом

Для проверки нашего предположения о механизме действия ГПК и ГДК как индукторов Ca^{2+} -зависимой агрегации мембран нами проведены эксперименты на липосомах с использованием метода динамического рассеяния света. Как видно на рис. 9, средний гидродинамический диаметр однослойных лецитиновых липосом при данных условиях составляет порядка 140 нм (рис. 9, кривая 1). При внесении ГПК или ГДК наблюдаются процессы, схожие с теми, которые мы наблюдали на эритроцитах и митохондриях. В отсутствие Ca^{2+} эти кислоты не влияли на размер липосом (не показано). Однако добавление Ca^{2+} к липосомам, содержащим эти кислоты, приводит к существенному (до 520 нм в случае ГДК и до 1990 нм в случае ГПК) увеличению гидродинамического диаметра липосом (рис. 9, кривые 3 и 4). Это говорит о том, что в присутствии ГПК (ГДК) и Ca^{2+} происходят динамические процессы, в результате которых изменяется размер липосом, что может быть обусловлено, в том числе, и агрегацией везикул. Необходимо отметить, что Ca^{2+} в использованной нами концентрации 1 мМ, добавленный к липосомам без жирных кислот, не индуцировал изменение их размера (рис. 9, кривая 2), что соответствует литературным данным по влиянию Ca^{2+} на слияние и агрегацию липидных везикул (Parahadjopoulos *et al.*, 1990). На рис. 9Б приведены данные изменения параметра z-average от времени экспозиции липосом, которые наглядно демонстрируют тенденцию к укрупнению частиц образца со временем после добавления ГПК и Ca^{2+} . Таким образом ГПК в присутствии Ca^{2+} индуцирует процессы агрегации и (или) слияния липосом, которые развиваются во времени.

Известно, что перестройка мембраны липосом, сопровождающая процессы агрегации и (или) слияния может приводить к выходу содержимого липосом (Parahadjopoulos *et al.*, 1990). В нашем случае также наблюдаются подобные процессы – добавление Ca^{2+} к липосомам, содержащим ГПК или ГДК, помимо агрегации и/или слияния везикул, также сопровождается пермеабиллизацией липосомальной мембраны и выходом флуоресцентного зонда СрБ, предварительно загруженного в липосомы (рис. 10). При этом Ca^{2+} и ГПК (или ГДК) добавленные по отдельности, не индуцировали выход СрБ из везикул (данные не приведены). Необходимо отметить, что ГПК как индуктор проницаемости мембраны липосом гораздо менее эффективна, чем ее аналоги – пальмитиновая кислота и ГДК (рис.

10). Стоит отметить кинетику выхода СрБ индуцированного ГПК и ГДК – по аналогии с агрегацией везикул этот процесс развивается во времени.

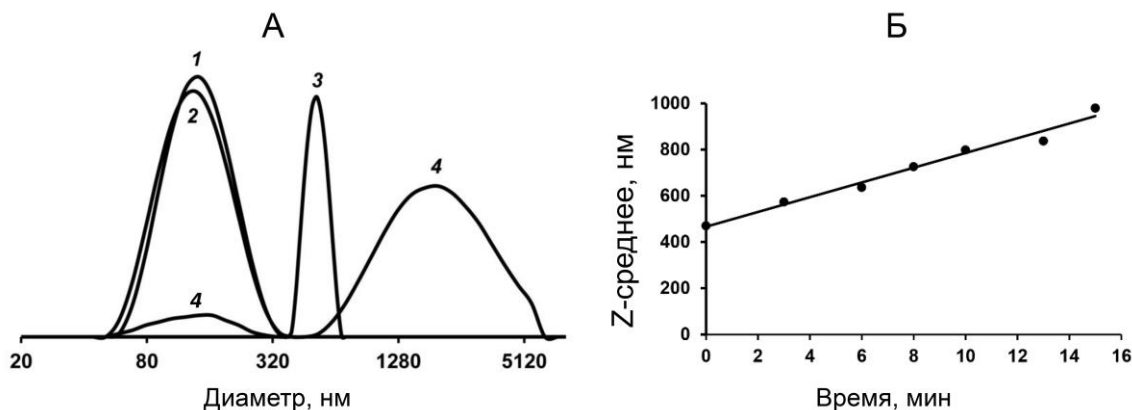


Рис. 9. Изменение размера лецитиновых липосом при добавлении к ним жирных кислот и Ca²⁺ (А). 1, липосомы (50 мкМ лецитина). 2, липосомы (50 мкМ лецитина) + 1 мМ Ca²⁺. 3, липосомы (50 мкМ лецитина) +75 мкМ ГДК+1 мМ Ca²⁺. 4, липосомы (50 мкМ лецитина) +100 мкМ ГПК+1 мМ Ca²⁺. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате липосом. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах. (Б) Зависимость параметра z-среднее липосом от времени их инкубации в присутствии 50 мкМ ГПК и 1 мМ Ca²⁺. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы исследования».

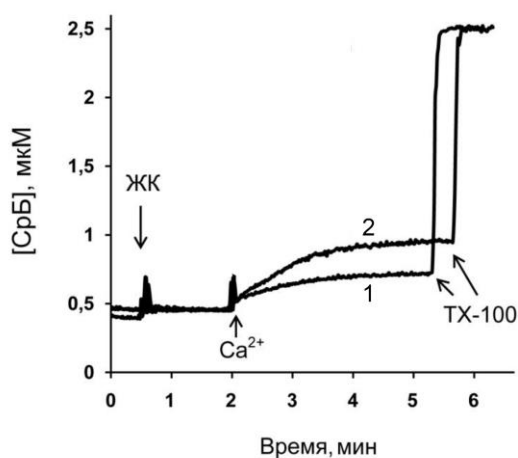


Рис. 10. Выход сульфородамина Б (СрБ) из однослойных липосом индуцированный Ca²⁺ и ГПК (1), Ca²⁺ и ГДК (2). Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Добавки: 50 мкМ ГПК; 50 мкМ ГДК; 1 мМ хлорида кальция (Ca²⁺); 0.1% ТХ-100. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате липосом. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что продукты ω-окисления пальмитиновой кислоты ГПК и ГДК способны индуцировать Ca²⁺-зависимую агрегацию эритроцитов, а также митохондрий, с последующей их пермеабиллизацией. По-видимому, этот процесс инициируется агрегацией внешних мембран контактирующих клеток или органелл, что сопровождается нарушением их целостности. В случае эритроцитов это приводит к нарушению ионного гомеостаза и лизису части клеток. В случае митохондрий, агрегация и пермеабиллизация митохондрий приводит к выходу цитохрома c, локализованного в межмембранном пространстве. Дальнейшие деструктивные процессы

затрагивают внутреннюю мембрану митохондрий, приводят к ее пермеабиллизации, падению $\Delta\psi$, выходу Ca^{2+} , набуханию матрикса и окислению пула НАД(Ф)Н и в конечном итоге к лизису органелл.

Кроме того, нами выявлена ткань-специфичность действия продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты, в частности, ГДК, как индукторов ЦсА-нечувствительной Ca^{2+} -зависимой агрегации и пермеабиллизации митохондрий. Установлено, что ГДК также способна индуцировать эти процессы в митохондриях почек и сердца крысы. Однако по сравнению с митохондриями печени, а также почек, в митохондриях сердца набухание, индуцированное этими агентами, имеет меньшую амплитуду и скорость. Кроме того, нами показано, что чувствительность митохондрий печени крысы к индукции ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации усиливается с возрастом, что, как предполагается, связано с изменением белкового и липидного состава мембран органелл с возрастом.

В опытах на модельных мембранных системах – лецитиновых липосомах установлено, что ГПК и ГДК способны индуцировать агрегацию везикул и выход из них флуоресцентного зонда СрБ, что свидетельствует об их пермеабиллизации.

Учитывая схожесть эффектов ГПК и ГДК на эритроцитах, митохондриях и липосомах нами предположено наличие универсального механизма, лежащего в основе Ca^{2+} -зависимых эффектов продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты, который заключается в агрегации липидных мембран, сопровождающейся их пермеабиллизацией. Мы предполагаем, что описанные эффекты могут лежать в основе токсического действия этих соединений, наблюдаемого при патологиях липидного обмена.

ВЫВОДЫ

1. ГПК и ГДК индуцируют Ca^{2+} -зависимую агрегацию эритроцитов в суспензии, которая сопровождается нарушением проницаемости мембран клеток и их лизисом.

2. ГПК и ГДК вызывают циклоспорин А (ЦсА)-нечувствительную Ca^{2+} -зависимую агрегацию и пермеабиллизацию митохондрий печени, которая приводит к нарушению гомеостаза Ca^{2+} , коллапсу мембранного потенциала, окислению пула НАД(Ф)Н органелл и выходу цитохрома *c*.

3. Наличие Ca^{2+} в матриксе митохондрий является основным условием индукции ГПК (ГДК)/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации внутренней мембраны митохондрий печени. При этом Ca^{2+} может быть замещен ионами Sr^{2+} , но не Mg^{2+} и Ba^{2+} .

4. ЦсА-нечувствительная ГДК/ Ca^{2+} -индуцируемая пермеабиллизация митохондрий характеризуется ткань-специфичностью. Митохондрии сердца крыс более устойчивы к индукции этого процесса, чем митохондрии печени и почек.

5. Эффективность ГДК/ Ca^{2+} -индуцируемой пермеабиллизации митохондрий печени крыс увеличивается с возрастом животных, что может быть обусловлено дополнительным вкладом окислительного стресса в устойчивость органелл к этому процессу.

6. ГПК и ГДК способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую агрегацию липосом, с последующей пермеабиллизацией их мембран и выходу флуоресцентного зонда сульфородамина В из везикул.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Дубинин М.В. Индукция Ca^{2+} -зависимой агрегации и пермеабилзации эритроцитов ω -гидроксипальмитиновой и α,ω -гексадекандиовой кислотами. [Текст] / Дубинин М.В., **Степанова А.Е.**, Щербаков К.А., Самарцев В.Н., Белослудцев К.Н. // Биофизика. – 2016. – Т. 61. – Вып. 5. – С. 916 - 921.
2. Dubinin M.V. Membranotropic effects of ω -hydroxypalmitic acid and Ca^{2+} on rat liver mitochondria and lecithin liposomes. Aggregation and membrane permeabilization. [Текст] / Dubinin M.V., Samartsev V.N., **Stepanova A.E.**, Khoroshavina E.I., Penkov N.V., Yashin V.A., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 2018. – V. 50. – P. 391-401.
3. Дубинин М.В. Возрастная и тканевая особенности индукции α,ω -гексадекандикарбоновой кислотой кальций-зависимой пермеабилзации митохондрий крыс. [Текст] / Дубинин М.В., Теньков К.С., Старинец В.С., **Степанова А.Е.**, Белослудцев К.Н., Самарцев В.Н. // Журнал Эволюционной биохимии и физиологии. – 2019. – Т. 55. – №1. – С. 73-75.
4. Дубинин М.В. Сравнительное исследование эффектов пальмитиновой и ω -гидроксипальмитиновой кислот как индукторов Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации митохондрий печени и лецитиновых липосом. [Текст] / Дубинин М.В., Самарцев В.Н., **Степанова А.Е.**, Семенова А.А., Хорошавина Е.И., Белослудцев К.Н. // Биофизика. – 2019. – том 64. – № 6. – С. 1115–1123.

Тезисы:

1. **Степанова А.Е.** Влияние сфингозина на стимуляцию дыхания митохондрий печени продуктами ω -окисления жирных кислот. [Текст] / **Степанова А.Е.**, Дубинин М.В., Самарцев В.Н. // 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». / Межфакультетский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова в г. Пушино.– Пушино, 2016. – С.188-189.
2. Дубинин М.В. Пермеабилзация биологических мембран продуктами ω -окисления жирных кислот. Роль в патологии. [Текст] / Дубинин М.В., **Степанова А.Е.**, Хорошавина Е.И., Самарцев В.Н. // Современные проблемы медицины и естественных наук. Сборник статей Международной научной конференции. – Йошкар-Ола, 2016. – Выпуск 5: Мар. гос. ун-т - Йошкар-Ола, 2016. – С. 85-88.
3. Dubinin M.V. Products of fatty acids ω -oxidation as inducers of Ca^{2+} -dependent aggregation and permeabilization of red blood cells. [Текст] / Dubinin M.V., Scherbakov K.A., **Stepanova A.E.**, Belosludtsev K.N., Kondratyev M.S., Samartsev V.N. // Biological Motility. – Pushchino: SYNCHROBOOK – 2016. – P. 54-57.
4. Дубинин М.В. Влияние продуктов ω -окисления жирных кислот на Ca^{2+} -зависимую проницаемость мембраны эритроцитов. [Текст] / Дубинин М.В., **Степанова А.Е.**, Рыбакова А.Н., Самарцев В.Н. // «Биосистемы: организация, поведение, управление». Тезисы докладов 69-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых. – Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского Институт биологии и биомедицины. – Нижний Новгород, 2016. – С. 47.

5. **Степанова А.Е.** Влияние продуктов омега-окисления жирных кислот на проницаемость биологических и искусственных липидных мембран. [Текст] / **Степанова А.Е.**, Самарцев В.Н., Дубинин М.В. // «Биосистемы: организация, поведение, управление». / Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. – Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского Институт биологии и биомедицины. – Нижний Новгород, 2019. – С. 214.
6. **Степанова А.Е.** Изучение влияния продуктов омега-окисления пальмитиновой кислоты на проницаемость биологических и искусственных липидных мембран. [Текст] / **Степанова А.Е.**, Самарцев В.Н., Белослудцев К.Н., Дубинин М.В. // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России: в 2 томах, том 1 – Краснодар, 2019. – С. 192-193.
7. **Степанова А.Е.** Изучение влияния ω -гидроксипальмитиновой кислоты на проницаемость биологических и искусственных мембран. [Текст] / **Степанова А.Е.**, Белослудцев К.Н., Дубинин М.В. // Современные проблемы медицины и естественных наук. Сборник статей Международной научной конференции. – Йошкар-Ола, 2019. – Выпуск8: Мар. гос. ун-т - Йошкар-Ола, 2019. – С. 164-166.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность и благодарность научному руководителю кандидату биологических наук, доценту Михаилу Васильевичу Дубинину за ценные замечания и важнейшие советы, помощь и поддержку на всех этапах выполнения диссертации. Также автор искренне благодарен за помощь в выполнении экспериментальной работы К.Н. Белослудцеву, В.А. Яшину и Н.В. Пенькову.

Автор глубоко признателен всем сотрудникам кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии и научно-исследовательской лаборатории молекулярной биоэнергетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Марийский государственный университет» а также коллективу лаборатории митохондриального транспорта ИТЭБ РАН за помощь в проведении совместных исследований.