

*На правах рукописи*

**ФРОЛОВА МАРИЯ СЕРГЕЕВНА**

**ДЕФЛАВИНИЗАЦИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В  
ДЕГРАДИРУЮЩИХ МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ**

**Специальность 03.01.02 – Биофизика**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук**

**Пушино – 2020**

Работа выполнена в Лаборатории внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки РАН – обособленного подразделения ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, в.н.с.  
**Векшин Николай Лазаревич**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Кратасюк Валентина Александровна**  
(Институт фундаментальной биологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Сибирский федеральный университет», заведующая кафедрой биофизики, г. Красноярск)

кандидат биологических наук, доцент  
**Фенюк Борис Александрович**  
(ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет бионженерии и биоинформатики, г. Москва)

**Ведущая организация:** ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_\_ часов на заседании совета Д 002.093.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пушкино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пушкино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://iteb.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат физ.-мат. наук

Ланина Н.Ф.

## Общая характеристика работы

### Актуальность работы

Окислительное повреждение митохондрий является причиной развития многих заболеваний и преждевременного старения (Castelli et al., 2019).

Практически все митохондриальные источники супероксида, кроме комплекса III, являются флавинозависимыми ферментами (Sies et al., 2017). Флавины играют ключевую роль в переходе от двухэлектронного окисления большинства органических субстратов к одноэлектронному переносу в дыхательной цепи. В большинстве флавопротеидов флавины связаны с белками нековалентно с помощью различных флавиносвязывающих складок (Lienhart et al., 2013). В митохондриях лишь один фермент, сукцинатдегидрогеназа связывает флавин ковалентной связью (Lienhart et al., 2013). Считается, что флавины участвуют в окислительном стрессе через их способность продуцировать супероксид (Palmer, Rade, 2019). Известно, что флавопротеиды могут обратимо распадаться на составляющие: апопротеин и простетическую группу (Massey et al., 2000). Дефлавинизацию (диссоциация флавинового кофермента от апопротеина) в модельных экспериментальных условиях проводят при: понижении pH, изменении концентрации солей и повышении температуры (Nefti et al., 2003), а также с помощью детергентов (Errink et al., 2008). Есть данные, что основной причиной снижения активности комплекса I после ишемии является потеря FMN, которая ведет к образованию супероксида в комплексе I (Kahl et al., 2018). Значительное снижение уровней FAD и FMN наблюдается при дегенерации сетчатки, которое приводит к гибели клеток фоторецепторов (Kelley et al., 2017). Отмечалось заметное уменьшение соотношения концентраций FAD/рибофлавинов, которое коррелирует с увеличением содержания маркеров окислительного стресса, в плазме крови пациентов в отделениях реанимации по сравнению со здоровыми людьми (Vasilaki et al., 2010). Данный фактор может служить мерой оценки критического состояния пациента (Vasilaki et al., 2010).

В данной работе описывается изменение соотношения флавиновых кофакторов (FAD, FMN, рибофлавин) при инкубации в гипотонических условиях выделенных митохондрий печени крысы, устанавливается взаимосвязь дефлавинизации с развитием окислительного стресса в митохондриях.

Используемая нами модель длительной инкубации выделенных митохондрий печени крысы (в течении 2 часов при 37 °С в гипотоническом буфере) характеризуется как искусственное «состаривание» митохондрий и сопровождается постепенной потерей энергетических функций (Özelkök et al., 1974). Такая модель использовалась ранее для изучения действия протекторов, способствующих сохранению функций митохондрий (Mergner et al., 1990). Процесс длительной инкубации митохондрий в умеренно гипотонических условиях приводит, прежде всего, к митохондриальному «набуханию». Это же состояние характерно для

митохондрий при цитотоксическом отеке клетки в результате ишемии, воспалении, диабете, нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваниях (Javadov et al., 2018; Solenski et al., 2002). При продолжительной инкубации выделенных митохондрий печени крысы в гипотоническом буфере наблюдается дефламинизация митохондриальных ферментов (Соколова, Векшин, 2008). В результате, по нашим данным, в суспензии митохондрий уменьшается количество FAD и FMN, возрастает количество рибофлавина, что коррелирует с увеличением содержания супероксида и липофусцина в суспензии.

Ранее в нашей лаборатории была описана способность NAD стабилизировать митохондриальную флавиновую флуоресценцию (Соколова, Векшин, 2008). Использовать протекторные свойства NAD сложно, так как он плохо проникает в клетку и митохондрии, а также ингибирует окисление NADH. Мы протестировали ряд аналогов NAD с целью определить их способность останавливать процесс дефламинизации, а также образования избыточного количества супероксида и липофусцина.

Окислительное повреждение мембран митохондрий способствует образованию «пигмента старения» липофусцина (Murphy, 2009). Наиболее склонными к накоплению липофусцина являются долгоживущие неделяющиеся специализированные клетки: нейроны, кардиомиоциты, клетки пигментного эпителия сетчатки и другие (Terman, Brunk, 1998). Поврежденные митохондрии в клетке преобразуются в липофусциновые гранулы (Brunk, Terman, 2002). Это связано, с тем, что митохондрии являются основным источником супероксида, который инициирует перекисное окисление липидов и белков (Indo et al., 2015). Ранее считалось, что образование и накопление липофусцина происходит только в лизосомах и является результатом митофагии поврежденных и стареющих митохондрий (Terman, Brunk, 1998). В последующие годы появились работы, свидетельствующие о том, что процесс образования липофусцина может идти без участия лизосом (Fishkin et al., 2005; Tsai et al., 1998; Nöhn et al., 2012). В ходе нашей работы была разработана модель получения термо-липофусцина в суспензии выделенных митохондрий без участия лизосом и других дополнительных факторов. С помощью данной модели можно проверить, будет ли вещество в определенной концентрации проявлять себя как антиоксидант или как прооксидант. Используя эту модель, мы определили, что дефламинизация флавопротеидов влияет на процесс образования липофусцина, а также научились его замедлять.

#### **Цель работы:**

Изучить роль дефламинизации митохондрий в образовании супероксида и липофусцина в условиях развития митохондриального набухания при инкубации в умеренно гипотонической среде. Предложить новый способ уменьшения продукции супероксида и липофусцина с

помощью предохранения митохондриальных ферментов от дефламиниации в модельных условиях на суспензии выделенных митохондриях печени крысы.

#### **Задачи исследования:**

1) Оценить вклад процесса дефламиниации и гидролиза флавинов в производство супероксида и липофусцина в выделенных митохондриях печени крысы.

2) Определить способность аналогов NAD останавливать процесс дефламиниации и гидролиза флавинов.

3) Разработать метод образования модельного липофусцина, как одного из маркеров окислительного стресса, в суспензии выделенных митохондрий и изучить его спектральные характеристики.

4) Оценить способность аналогов NAD уменьшать количество супероксида и липофусцина при инкубации суспензии выделенных митохондрий печени крысы.

#### **Научная новизна работы:**

1) Впервые показано, что основным процессом, отвечающим за изменение флуоресценции в суспензии выделенных митохондрий печени крысы при инкубации в течение 2 часов при 37 °С в гипотоническом буфере, является дефламиниация митохондриальных ферментов сопровождающаяся гидролизом FAD и FMN с образованием рибофлавина.

2) Показано, что дефламиниация флавопротеидов может приводить к образованию супероксида как минимум в двух процессах. Первый из них протекает в комплексе I в результате спонтанного выхода FMN из активного центра. Этот процесс подавляется AMP, GMP и NAD. Второй процесс связан с гидролизом FAD до рибофлавина; и дальнейшим неферментативным окислением NADH с помощью рибофлавина и FMN с образованием супероксида. Процесс гидролиза FAD блокируется EDTA, AMP, никотинамидом и NAD.

3) Разработана модель получения термо-липофусцина, которая была использована для тестирования антиоксидантов и восстановителей. Показано, что в выделенных митохондриях печени крысы спонтанно, без дополнительных факторов (насыщение кислородом, прооксиданты, нагревание) образуется липофусцин. Процесс образования липофусцина ускоряется при нагревании суспензии митохондрий до 49 °С в течение 3 часов. При этом образуется термолипофусцин, который был охарактеризован как липофусцин по своим флуоресцентным свойствам.

4) Аденозинфосфаты и гуанозинфосфаты за счет замедления дефламиниации митохондриальных ферментов уменьшают образование супероксида и, как следствие, уменьшают уровень перекисного окисления липидов и образование липофусцина в суспензии выделенных митохондрий.

### **Практическая значимость работы:**

Предложена новая причина развития окислительного стресса в митохондриях. Избыточное образование супероксида может возникать благодаря дефлавинизации митохондриальных флавоферментов. Образование свободных радикалов и липофусцина возможно предотвратить с помощью стабилизации флавинов в флавоферментах аналогами NAD.

В ходе работы разработана модель ускоренного образования липофусцина *in vitro* в выделенных митохондриях печени крысы при облучении и при длительном нагревании. С помощью этих модельных опытов можно опосредованно судить об уровне окислительного стресса в митохондриях. Полученные данные позволяют лучше понять механизмы, связанные с повреждением митохондрий и помогут при скрининге перспективных фармакологических средств.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1) Основным процессом, отвечающим за увеличение флавиновой флуоресценции в суспензии выделенных митохондрий печени крысы при инкубации в течение 2 часов при 37°C, является дефлавинизация митохондриальных ферментов с последующим гидролизом FAD и FMN с образованием рибофлавина.

2) Дефлавинизация митохондриальных флавопротеидов при инкубации в течение 2 часов при 37°C, приводит к образованию супероксида в суспензии выделенных митохондрий печени крысы.

3) Разработана модель образования митохондриального термолипофусцина, которую можно использовать для тестирования веществ на их антиоксидантную и прооксидантную способность. При нагревании суспензии выделенных митохондрий печени крысы образуется термо-липофусцин, обладающий характерным липофусциновым спектром флуоресценции. Основной вклад в образование митохондриального термолипофусцина вносит окисление денатурированных белков.

4) Аденозинфосфаты и гуанозинфосфаты уменьшают дефлавинизацию митохондриальных флавопротеидов и гидролиз флавиновых коферментов (FAD и FMN) и, как следствие, уменьшают образование супероксида и липофусцина в суспензии выделенных митохондрий.

### **Апробация работы:**

Результаты работы были представлены в виде устных сообщений и тезисов конференций: Рецепторы и Внутриклеточная Сигнализация: Международная конференция (Пушино, 2019), V Съезд Биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), Экспериментальная и теоретическая биофизика (Пушино, 2015), Mitochondrial pores and channels as pharmacological

targets – 2014 (Pushchino, 2014), Конференции Биология – Наука XXI Века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 2013 г.), Нейроинформатика (Москва, 2013).

Личный вклад соискателя. Исследования по теме диссертации проводились соискателем лично. Эксперименты по измерению флавинового профиля митохондрий с помощью HPLC хроматографии проводились совместно с Марченковым В.В.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 7 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, 4 главы в 2-х монографиях, 8 тезисов в материалах конференций. Все статьи переведены на английский язык.

Финансовая поддержка. Работа выполнена при поддержке фирмы BRL, Тайвань, стипендии Президента РФ для молодых ученых и аспирантов от МинОбрНауки СП-2027.2015.4, грантов РФФИ 14-34-50310, 16-34-00159

Структура и объем диссертации Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 211 источников. Работа изложена на 116 страницах, содержит 40 рисунков и 8 таблиц.

## **Основное содержание работы**

### **1. Обзор литературы**

В обзоре литературы изложены основные современные сведения о флавоферментах, их функции, а также о возможном вкладе в развитие окислительного стресса и различных заболеваний. Приведена информация об образовании липофусцина как конечного продукта окислительного стресса.

### **2. Материалы и методы**

#### **2.1 Выделение изолированных митохондрий из печени крыс**

Митохондрии выделяли из печени самцов крыс Wistar (220-250 гр.) как описано в работе (Sharova et al., 2004) с некоторыми модификациями. Буфер выделения содержал 20 мМ Трис – (оксиметил)-аминометан, 250 мМ сахароза, 1 мМ EGTA, pH 7.7. Все митохондриальные фракции уравнивали до одинаковой концентрации белка 0,3 мг / мл с использованием инкубационного буфера (100 мМ сахароза и 10 мМ Трис –(оксиметил)-аминометан фосфат, pH 7,0). Концентрацию митохондриального белка определяли УФ-экспресс-методом с помощью спектрофотометра. Для проведения длительных экспериментов сахарозу, присутствующую в инкубационном буфере, заменяли на 100 мМ хлорида натрия (NaCl) и добавляли 1 мМ актиномицина D, с целью предотвратить зарастание митохондриальной суспензии.

#### **2.2 Измерение уровня супероксида с помощью хемилюминесценции MCLA**

Измерения проводились на микропланшетном ридере INFINITE 200 PRO, (Австрия) и

на хемиллюминометре Lum-100 (ДИСофт, Россия). MCLA (2-метил-6- (4-метоксифенил) -3,7-дигидроимидазо [1,2-а] пиазин-3 (7Н) -он) (1  $\mu\text{M}$ ) добавляли к суспензии изолированных митохондрий печени крысы (0,3 мг / мл, рН 7,0) после инкубации. Кинетика хемиллюминесценции измерялась после часовой инкубации суспензии выделенных митохондрий в течение 30 минут при 21°C; для анализа брались показатели интегральной хемиллюминесценции.

В качестве контроля специфичности сигнала вещество добавлялось после инкубации суспензии митохондрий. В контрольных опытах мы убедились, что ни одно из указанных веществ не влияет напрямую на хемиллюминесценцию MCLA ни в водных растворах, ни в суспензии митохондрий.

### **2.3 Определение уровня NADH-зависимой редуктазной активности митохондрий.**

Для определения ингибирующего действия аналогов NAD на скорость ферментативного окисления NADH измерялась скорость восстановления NADH-дегидрогеназами искусственного акцептора паранитротетразолия фиолетового (p-NTV). Уровень NADH-зависимой редуктазной активности митохондрий определялся по ферментативной реакции окисления NADH с помощью p-NTV и детектировался по появлению окраски формазана. Кинетику изменения оптической плотности формазана измеряли на 540 нм в течение 15 минут на спектрофотометре «ПромЭкоЛаб-5400УФ» (Россия).

### **2.4 Определение скорости потребления кислорода суспензией выделенных митохондрий печени крысы**

Состояние митохондрий оценивалось с помощью скорости потребления кислорода суспензией в закрытой ячейке. Также по скорости потребления кислорода детектировалось образование супероксида в неферментативных реакциях. Потребление кислорода измеряли при 21 °С с использованием оптического кислородного датчика VISIFERM DO 120, HAMILTON (Швейцария). Измерения проводили в среде, содержащей 100 мМ сахарозы (или 100 мМ NaCl при длительной инкубации митохондрий) и 10 мМ Трис-фосфат, рН 7,0 в закрытой ячейке при перемешивании 150 об/мин. Скорость потребления кислорода выражалась в  $\mu\text{M}$  кислорода / мин / мг белка.

### **2.5 Определение общей флуоресценции флавинов и липофусцина в суспензии выделенных митохондрий печени крысы.**

Содержание липофусцина и суммарного уровня флавинов в митохондриальной суспензии определяли с использованием флуоресцентного спектрофотометра Perkin-Elmer MPF-44B и Carry ECLIPSE (США) при  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  нм и  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 525$  нм соответственно. Перед измерением флуоресценции в суспензию добавляли 0,05% SDS для устранения мутности.



## **2.6 Определение степени поляризации флавинов и липофусцина.**

Для определения локализации флавинов и липофусцина измерялась степень поляризации флуоресценции. С помощью призм Глана-Томпсона на спектрофлуориметре SLM-4800 (SLM, Inc., США) измерялась интенсивность флуоресценции в четырех положениях (сочетание попарно перпендикулярного и параллельного положений) в максимумах возбуждения и эмиссии, после чего рассчитывались максимальная и минимальная компонента линейного плоско-поляризованного света.

## **2.7 Определение содержания FAD, FMN и рибофлавина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).**

Все флавины имеют одинаковые спектры поглощения и эмиссии и по общей флуоресценции нельзя судить об их составе, поэтому было проведено их хроматографическое разделение. Определение флавинов проводили с помощью обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на колонке Jupiter C18 (Phenomenex, США), подключенной к жидкостному хроматографу ProStar (Varian, США) на основе метода Акимото и коллег с некоторыми модификациями (Akimoto et al. 2006). Поскольку FAD, FMN и рибофлавин чувствительны к свету, приготовление экстрактов образцов проводилось при слабом освещении. 200 мкл митохондриальной суспензии в буфере выделения смешивали с 500 мкл буфера для инкубации, после чего добавляли 1 мл смеси охлажденный метанол: 10 мМ дигидроортофосфат калия, рН 5,0 в соотношении 1:1. Эту смесь центрифугировали в течение 4 минут при 25000 об / мин для отделения белков. Супернатант отбирали и использовали 20 мкл для проведения HPLC анализа. Смесь элюентов содержала 10 мМ дигидроортофосфата калия, рН 5,0; метанол в соотношении 3:1.

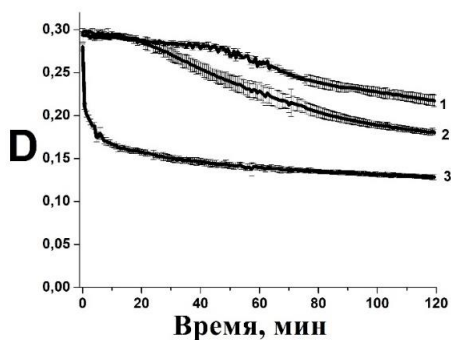
## **3. Результаты и обсуждения**

### **3.1 Основные условия инкубации суспензии выделенных митохондрий печени крысы.**

Длительная инкубация суспензии выделенных митохондрий в течение 2 часов при 37 °С в гипотоническом буфере (100 мМ сахараза, 10 мМ Tris-фосфат) без субстратов является моделью «митохондриального отека». Показано, что в ходе инкубации митохондрии медленно набухают (Рис. 1). При этом уже после 1 часа инкубации митохондрий разобщается система окислительного фосфорилирования (не происходит стимуляция дыхания при добавке ADP и разобщителей), сохраняется скорость дыхания на сукцинате, а также митохондрии начинают окислять NADH, что говорит о потере целостности внутренней мембраны.

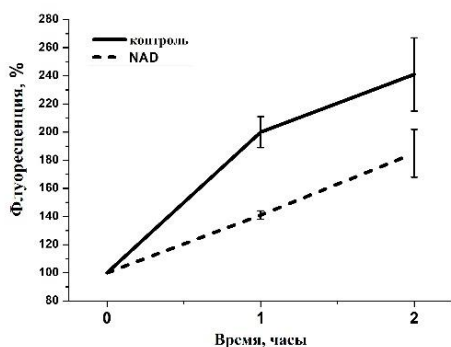
Ранее в нашей лаборатории было показано, что в ходе длительной инкубации суспензии выделенных митохондрий печени крысы в гипотоническом буфере наблюдается увеличение флавиновой флуоресценции, которое ускоряется с помощью нагревания при физиологической

температуре (Соколова и Векшин, 2008). В ходе инкубации выделенных митохондрий печени крысы в течение 2 часов при 37 °С в гипотоническом буфере (100 мМ сахараза, 10 мМ Tris-фосфат) флавиновая флуоресценция увеличивается в 2,5 раза (Рис. 2).



**Рис. 1** Снижение оптической плотности суспензии митохондрий в гипотоническом буфере (100 мМ сахараза, 10 мМ Tris- фосфат, рН 7.0) при 550 нм. Добавление 100 мкМ CaCl<sub>2</sub> (3) уменьшало оптическую плотность в конечной точке инкубации (через 2 часа) на 20% по сравнению с контролем (2), в то время как добавление 1 мМ EDTA (1) увеличивало на 11% (n=3).

Нужно особо отметить, что инкубация митохондрий проводилась в отсутствии субстратов дыхания, так как при этом мы бы наблюдали изменения флавиновой флуоресценции, связанные с редокс процессами (восстановленные формы флавинов не флуоресцируют). Восстановленную часть флавинов, находящихся в митохондриях было бы невозможно детектировать флуоресцентными методами.



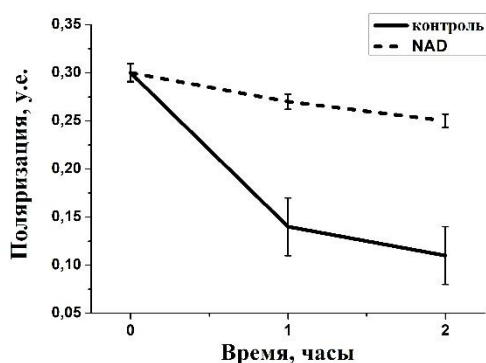
**Рис. 2** Тотальная флавиновая флуоресценция в суспензии выделенных митохондрий крысы (возбуждение 450 нм, эмиссия 525 нм). Сплошная линия – инкубация суспензии митохондрий в течение 2х часов при 37 °С, пунктирная линия – инкубация с 1 мМ NAD в течение 2-х часов при 37 °С.

Несмотря на то, что в ходе инкубации суспензии выделенных митохондрий в течение 2 часов при 37 °С происходит падение оптической плотности на 550 нм до 66 % ( $\pm 1,2$ ) от первоначального значения (Рис.1), что может говорить об открытии РТР (permeability transition pore) поры (Elustondo et al., 2016) и о возможном разрыве наружной мембраны митохондрий, в процессе инкубации не происходит изменения триптофановой флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 286$  нм,  $\lambda_{\text{эмисс}} = 340$  нм) и флуоресценции 7-амино-актиномицина (7AMD) ( $\lambda_{\text{возб}} = 530$  нм,  $\lambda_{\text{эмисс}} = 620$  нм) в фильтрате (через 0,2  $\mu\text{м}$  фильтры) (данные не приводятся). Ранее в нашей лаборатории было показано, что 7AMD встраивается в расплетенные участки ДНК и может быть использован для детекции выхода митохондриальной ДНК (Векшин, 2008). Таким образом, при инкубации не происходит выхода белков и ДНК из митохондрий в среду инкубации.

Помимо увеличения интенсивности флавиновой флуоресценции, в процессе инкубации митохондрий происходит уменьшение степени поляризации. Уменьшение поляризации флавина

говорит о том, что флавиновый флуорофор свободно вращается, а значит частица вышла в раствор. В наших опытах после 2-х часовой инкубации при 37°C степень поляризации уменьшалась в 1,5-2 раза (Рис. 3).

Для определения местоположения флавина, выходит ли он среду инкубации или остается в митохондриальном матриксе, измерялась интенсивность и степень поляризации флуоресценции в профильтрованной через 0,2-мкм миллиметровые фильтры суспензии митохондрий (перед и после 2-х часовой инкубации). Интенсивность флуоресценции в фильтрате после инкубации увеличивалась в 4,3 ( $\pm 0,5$ ) раза. При этом степень поляризации фильтрата снижалась до 0,06 ( $\pm 0,03$ ), что говорит о свободном вращении флавина в водной фазе. Полученные данные говорят о том, что практически весь флавин оказывается во внешнем растворе в свободном виде.



**Рис. 3** Изменение степени поляризации флавиновой флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 450$  нм,  $\lambda_{em} = 525$  нм) при инкубации суспензии митохондрий (0,3 мг/мл) в течение 2 часов при 37°C: сплошная линия - контроль, пунктирная линия – инкубация в присутствии 300  $\mu$ M NAD. Поляризация измерена при 20°C, n = 3.

### 3.2 Влияние аналогов NAD на изменение общей флавиновой флуоресценции

Ранее в нашей лаборатории была описана способность NAD предотвращать возрастание флавиновой флуоресценции при инкубации (Соколова и др., 2008). В данной работе мы протестировали ряд веществ с частично похожей на NAD химической формулой: аденин, аденозин фосфаты (ATP, ADP, AMP), аденозин, гуанозин фосфаты (GTP, GDP, GMP), никотиновая кислота, никотинамид и другие на их способность влиять на флавиновую флуоресценцию. Лучше всего общую флавиновую флуоресценцию стабилизируют аденозинфосфаты (ATP, ADP, AMP) и гуанозинфосфаты (GMP, GDP, GTP), практически с одинаковой эффективностью. Об этом свидетельствуют данные изменения тотального флуоресцентного флавинового сигнала и степени поляризации (Таблица 1); в присутствии изучаемых веществ флавиновые кофакторы в основном остаются связанными с флавоферментами.

Аналоги NAD, не содержащие фосфатных групп, такие как аденин, аденозин, гуанозин, инозин, кофеин, а также cAMP, cGMP, пиримидиновые основания (уридиндифосфат (UDP), цитидиндифосфат (CDP)) в концентрации 300  $\mu$ M не влияют на интенсивность и поляризацию

флавиновой флуоресценции суспензии печеночных митохондрий после инкубации (данные не приводятся).

**Таблица 1** Влияние NADH и его аналогов (300  $\mu$ M) на интенсивность и степень поляризации флавиновой флуоресценции суспензии выделенных митохондрий после 2 часовой инкубации при 37  $^{\circ}$ C. Начальная интенсивность флуоресценции была принята за 100%, начальная степень поляризации была 0,32. (n=3 в группе, p <0.01; ANOVA).

Вещество	Интенсивность, %	Степень поляризации
Контроль	241 ( $\pm$ 26)	0,11 ( $\pm$ 0,03)
Аденин	307 ( $\pm$ 28)	0,18 ( $\pm$ 0,008)
Аденозин	256 ( $\pm$ 17)	0,2 ( $\pm$ 0,02)
AMP	142 ( $\pm$ 18)	0,2 ( $\pm$ 0,02)
ADP	122 ( $\pm$ 21)	0,21 ( $\pm$ 0,01)
ATP	133 ( $\pm$ 7)	0,22 ( $\pm$ 0,01)
NAD	185 ( $\pm$ 17)	0,25 ( $\pm$ 0,007)
Никотинамид	336 ( $\pm$ 41)	0,15 ( $\pm$ 0,02)
Гуанин	194 ( $\pm$ 20)	0,12 ( $\pm$ 0,02)
GMP	120 ( $\pm$ 15)	0,19 ( $\pm$ 0,006)
GDP	117 ( $\pm$ 8)	0,17 ( $\pm$ 0,008)
GTP	120 ( $\pm$ 10)	0,19 ( $\pm$ 0,01)

Известно, что адениновые и пиридиновые нуклеотиды являются мощными физиологическими ингибиторами митохондриальной РТР поры (Bernardi et al., 2013, Kharechkina et al., 2019). Поэтому существует возможность подавления выхода флавинов в результате воздействия нуклеотидов на интактность митохондриальной мембраны. Считается, что чрезмерное митохондриальное набухание происходит в основном из-за открытия РТР – пор (Javadov et al., 2018). Мы показали, что исследуемые вещества, стабилизирующие флавиновую флуоресценцию, в данных условиях не уменьшают скорость набухания митохондриальной суспензии (Таблица 2). Вероятно, что механизм действия аденозин- и гуанозин-фосфатов как протекторов дефламинизации не связан с состоянием РТР-пор.

**Таблица 2** Влияние различных веществ (1 мМ) на изменение оптической плотности суспензии выделенных митохондрий (0,75 мг/мл) на 550 нм после 2 часовой инкубации при 37  $^{\circ}$ C. Начальная оптическая плотность была принята за 100% (n=4, p<0.01; ANOVA).

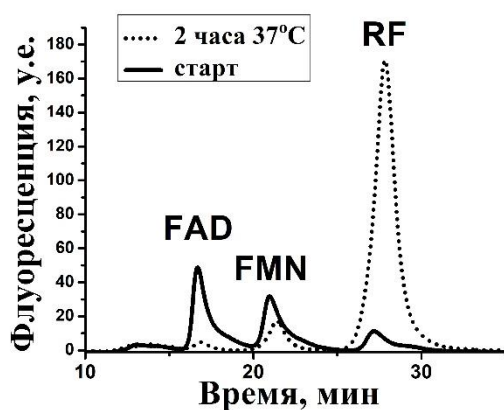
Вещество	Контроль	AMP	GMP	NA*	Аденин	EGTA	EDTA	CaCl <sub>2</sub> **
%	66 $\pm$ 1,2	66 $\pm$ 0,8	51 $\pm$ 1,4	60 $\pm$ 2	49 $\pm$ 1,8	82 $\pm$ 1,7	77 $\pm$ 1,5	46 $\pm$ 1,3

\*NA- никотинамид, \*\*концентрация хлорида кальция 100  $\mu$ M

Первоначально мы интерпретировали результат увеличения флавиновой флуоресценции как выход нековалентно связанного флавиного кофактора комплекса I, FMN, из активного центра. В ряде работ (Vinogradov, 1998; Grivennikova et al, 2006; Albracht et al., 1997) говорится о возможности существования двух центров связывания NADH в комплексе I. Предполагается, что в первом центре идет окисление NADH, а во втором – реакция восстановления NAD до NADH. Возможно, что аденозиновые и гуанозиновые нуклеотиды, также, как и NAD, могут связываться со вторым центром, при этом флавофермент становится более стабильным, что препятствует процессу дефлавинизации и механически не дает молекуле FMN выйти из активного центра. При этом из-за меньшего размера молекул они не конкурируют за центр связывания с NADH и не ингибируют NADH-тетразолий-редуктазную реакцию.

### 3.3 Влияние аналогов NAD на соотношение FAD, FMN и рибофлавина в суспензии выделенных митохондрий печени крысы.

Помимо комплекса I, митохондрии включают в себя FAD - содержащие флавопротеиды, в которых молекулы FAD также, как и FMN связаны нековалентно (Piano et al., 2017). Так как квантовый выход FMN 0,26, а квантовый выход у FAD 0,03 (Weber, 1950), мы пренебрегали его слабым флуоресцентным сигналом и интерпретировали результат увеличения тотального флавинового сигнала как выход FMN из комплекса I. Однако оказалось, что основным процессом, отвечающим за изменение интенсивности флавиновой флуоресценции, является потеря флавоферментами нековалентно-связанного FAD, с его последующим гидролизом до рибофлавина (Рис.4). Возможно, что в некоторых ферментах, из-за непосредственной близости железосерных кластеров, гидролиз FAD идет в самом ферменте.

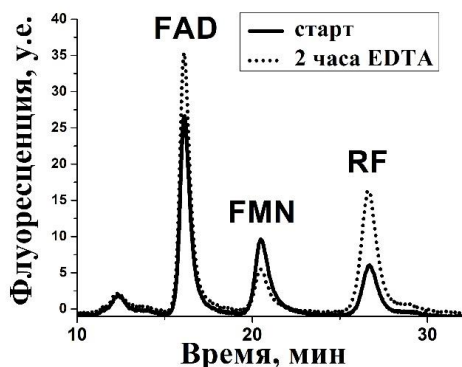


**Рис.4** Профили HPLC элюирования FAD, FMN и рибофлавина (RF) после метанольной экстракции из суспензии выделенных митохондрий: сплошная линия – до инкубации, пунктирная линия – после инкубации суспензии митохондрий в течение 2х часов при 37 °С.

За два часа при 37°C гидролизуется 84 % ( $\pm 4\%$ ) FAD (Рис. 4). Также идет процесс гидролиза FMN 59% ( $\pm 7\%$ ) до рибофлавина, но так как квантовый выход флуоресценции FMN и рибофлавина близки, это не дает ощутимого вклада в изменение флавинового сигнала в суспензии митохондрий. Флуоресценция рибофлавина в ходе инкубации митохондрий усиливается в 4 раза (Рис. 4). Результаты исследования Василяки и со-авторов также показали

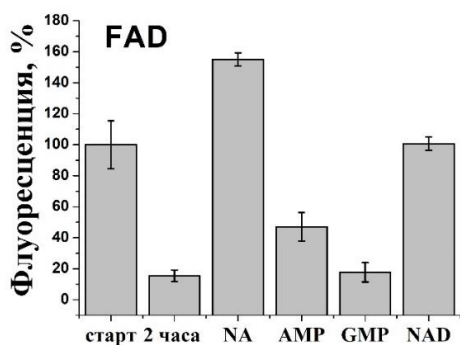
3-кратное увеличение концентрации рибофлавина и уменьшение концентрации FAD в плазме у пациентов в критическом состоянии (Vasilaki et al. 2010).

Результаты HPLC – хроматографии показали, что 1 мМ EDTA полностью останавливает гидролиз FAD. За 2 часа уровень FAD не падает, а даже увеличивается на 17 % ( $\pm 9$  %) (Рис. 5). Возможно, увеличение количества FAD за это время, происходит за счет работы митохондриальной FAD синтетазы (Giancaspero et al., 2013). Количество FMN снижается на 63% ( $\pm 6$  %) по сравнению со стартовым уровнем (выход FMN при этом не подавляется), а количество рибофлавина возрастает в 1,9 раза (Рис. 5).



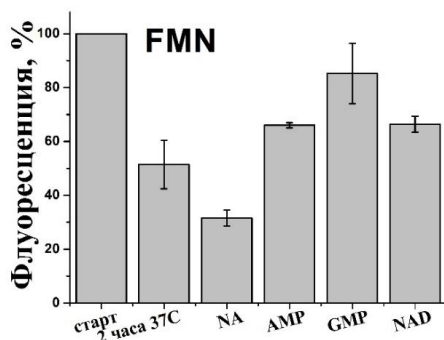
**Рис.5** Профили HPLC элюирования FAD, FMN и рибофлавина (RF) после метанольной экстракции из суспензии выделенных митохондрий: сплошная линия – до инкубации, пунктирная линия – после инкубации суспензии митохондрий с 1мМ EDTA в течение 2х часов при 37 °С.

Аналоги NAD, такие как AMP, GMP, и NAD останавливают рост флуоресценции в суспензии митохондрий (Таблица 1). Ранее мы интерпретировали это как влияние данных веществ на способность стабилизировать молекулу FMN в комплексе I. Но позже, с появлением данных HPLC - хроматографии стало очевидно, что помимо выхода FMN из комплекса I происходит выход и гидролиз FAD из других флавобелков (Рис. 6,7).



**Рис. 6** Показаны уровни FAD (% -е соотношение от базового уровня) после метанольной экстракции суспензии выделенных митохондрий после инкубации в течение 2-х часов при 37 °С и в присутствии 1 мМ AMP, GMP, NAD (n=3, p<0.01; ANOVA).

Никотинамид в концентрации 1 мМ полностью останавливает гидролиз FAD, приводя к его накоплению за счет процессов катализа: концентрация FAD увеличивается на 55% ( $\pm 4$ ). Уровень FAD при инкубации с 1 мМ NAD не меняется, с 1 мМ AMP – уменьшается до 47% ( $\pm 9$ ), с 1 мМ GMP -уменьшается до 17% ( $\pm 6$ ).



**Рис. 7** Показаны уровни FMN, (% -е соотношение от базового уровня) после метанольной экстракции суспензии выделенных митохондрий после инкубации в течение 2-х часов при 37 °C и в присутствии 1 мМ AMP, GMP, NAD (n=3, p<0.01; ANOVA).

Известно, что реакции гидролиза FAD и FMN в плазме крови млекопитающих могут быть ускорены ферментативно с помощью FAD пирофосфатаз и FMN фосфатаз, которые катализируют превращение FAD в FMN и преобразование FMN в рибофлавин, соответственно (Varile et al. 1997). EDTA ингибирует гидролиз FAD и FMN в плазме при 4 °C (Akimoto et al. 2006). Интересно, что оба фермента, FAD пирофосфатаза и FMN фосфатаза в растворе, также ингибировались EDTA (Daniel et al., 1983). Исследования с AMP (1 мМ), известным ингибитором митохондриальной FAD пирофосфатазы, дали аналогичный результат (Varile et al. 1997).

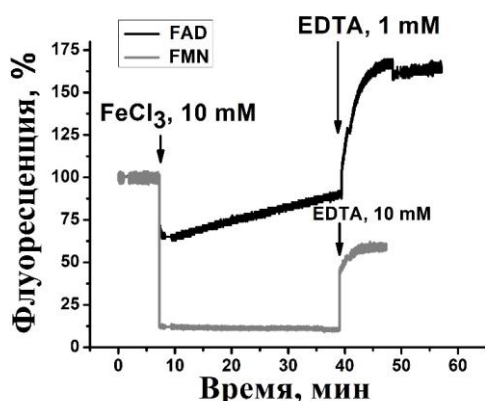
Возможно другое объяснение влияния EDTA и AMP на гидролиз флавинов: EDTA является сильным хелатором ионов железа (Aboulroos et al., 1983), которые возможно катализируют гидролиз FAD (Lomtev et al., 2004). Добавление AMP приводит к частичному замедлению гидролиза FAD. Возможно, что в данном случае AMP с помощью своей фосфатной группы также выступают в роли хелаторов железа.

Таким образом, аналоги NAD по-разному влияют на дефлавинизацию и гидролиз флавинов: AMP и NAD предотвращают гидролиз FAD и FMN; GMP предотвращает гидролиз FMN, FAD в меньшей степени; никотинамид предохраняет от гидролиза только FAD.

### **3.4 Неферментативный гидролиз FAD ионами железа**

Мы провели эксперимент с хлоридом железа, моделирующий неферментативный гидролиз FAD в растворе (Рис. 8). Сразу при добавлении 10 мМ хлорида железа к 100 мМ водному раствору FAD мы наблюдаем небольшое снижение флуоресценции и затем медленный рост, который в итоге превосходит исходный уровень флавинового сигнала. Снижение флуоресценции объясняется тушением, которое вызывают парамагнитные ионы железа. Последующий рост флавиновой флуоресценции происходит благодаря распаду FAD до FMN и рибофлавина, которые имеют больший квантовый выход и, вследствие этого, более интенсивный флуоресцентный сигнал. Рост флавиновой флуоресценции останавливается с помощью 1 мМ EDTA, который хелатирует ионы железа, резко повышая общий уровень сигнала, так как пропадает эффект тушения. При добавлении 10 мМ хлорида железа к 100 мМ

водного раствора FMN наблюдается только тушение флуоресценции с выходом на плато (Рис. 8).



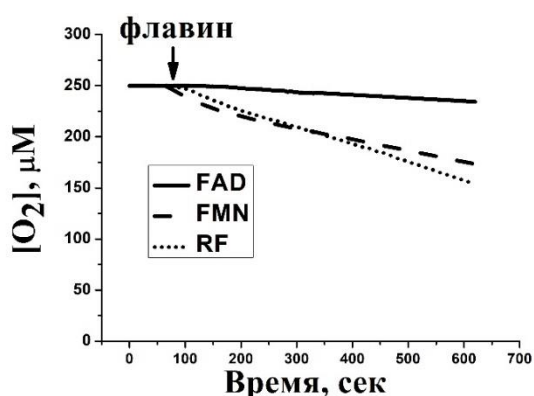
**Рис. 8** Неферментативный гидролиз FAD ионами железа: черная линия 100  $\mu$ M водный раствор FAD, серая линия – контроль - 100  $\mu$ M водный раствор FMN, результаты нормированы на стартовый уровень флуоресценции.

Таким образом, свободный FAD в митохондриях может гидролизоваться ионами железа; хелаторы железа будут останавливать данный процесс.

### 3.5 Образование супероксида при дефламинизации в суспензии выделенных митохондрий

#### 3.5.1 Неферментативное образование супероксида с помощью флавинов и NADH

Ранее было показано, что свободный рибофлавин, так же, как и FMN, в отличие от FAD, способен неферментативно (даже в темновых условиях) катализировать окисление NADH с образованием супероксида (Massey, 1994). В наших модельных экспериментах по измерению кислорода в закрытой ячейке наблюдалось неферментативное потребление кислорода в смеси 1 mM NADH : 100 мкM FMN или 1 mM NADH: 100 мкM рибофлавин в Tris-фосфатном буфере (pH 7.0) (Рис. 8). Скорости потребления кислорода в реакции рибофлавин-NADH выше, чем FMN – NADH и составляют 11  $\mu$ M/мин ( $\pm 0,9$ ) и 8  $\mu$ M/мин ( $\pm 2$ ) соответственно (Рис. 9). В ходе данной реакции образуется супероксид, который затем преобразуется в перекись водорода.



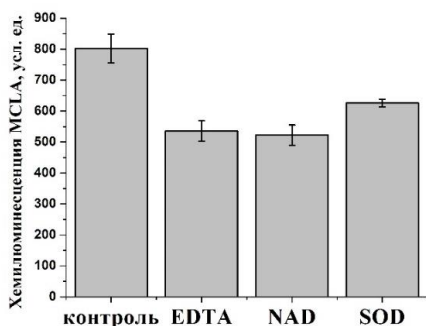
**Рис. 9** Неферментативное поглощение кислорода в 1 mM растворе NADH в 10 mM Tris-фосфатном буфере (pH 7.0): пунктирная линия – при добавлении 100  $\mu$ M RF, штрих-линия – 100  $\mu$ M FMN, сплошная – контроль – 100  $\mu$ M FAD, идет небольшое потребление кислорода из-за следов FMN и RF в препарате FAD. Скорость составила 11  $\mu$ M/мин ( $\pm 0.9$ ) для рибофлавина и 8  $\mu$ M/мин ( $\pm 2$ ) для FMN.

#### 3.5.2 Влияние EDTA на гидролиз FAD и образование супероксида

Инкубация митохондрий в течение 1 часа в присутствии 1 mM EDTA уменьшает образование супероксида (Рис.10). Инкубация суспензии с 1mM EDTA полностью



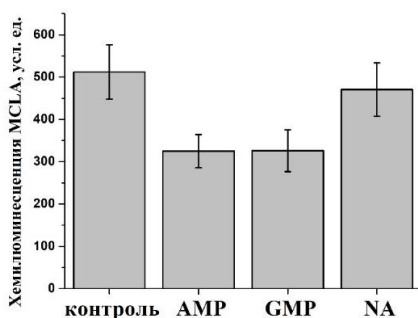
останавливает гидролиз FAD, не влияет на скорость выхода FMN. Однако известно, что EDTA образует комплексы с металлами Cu (II), Mn (II) и Fe (III), которые обладают супероксиддисмутазной и каталазной активностью (Fisher et al., 2004). Сложно интерпретировать что именно повлияло на снижение образования супероксида в суспензии – сохранение FAD или супероксиддисмутазная активность образовавшихся комплексов металлов с EDTA.



**Рис. 10** Интегральная хемилюминесценция MCLA в течение 30 мин после инкубации суспензии выделенных митохондрий в течение 1 часа при 37 °С; контроль – без добавок, с 1 mM EDTA, NAD и 100 ед.акт./мл супероксиддисмутазой (SOD) (n=3, ANOVA, p<0,01).

### 3.5.3 Влияние аналогов NAD на гидролиз FAD и FMN, и образование супероксида.

Инкубация выделенных митохондрий крысы в течение 1 часа при 37 °С с 300 мкМ AMP и GMP уменьшает интегральный хемилюминесцентный сигнал MCLA в среднем на 40% (Рис. 11). Интересно, что гидрофобный аденин, не имеющий фосфатной группы, не оказывает влияния на изменение количества супероксида. Как показано выше (Рис. 6,7) данные вещества в разной степени влияют на гидролиз FAD и FMN.



**Рис. 11** Интегральная хемилюминесценция MCLA в течение 30 мин после инкубации суспензии выделенных митохондрий в течение 1 часа при 37 °С (вычтен сигнал с супероксиддисмутазой); контроль – без добавок, с 300 мкМ AMP, GMP, никотинамидом (NA) (n=3, ANOVA, p<0,01).

NAD полностью останавливает гидролиз FAD и на 66%(±3) гидролиз FMN, при этом понижает образование супероксида практически на 100% (интегральный сигнал MCLA после инкубации с 1 mM NAD меньше чем сигнал после инкубации с супероксиддисмутазой). AMP замедляет гидролиз FAD до 47%(±9), а гидролиз FMN до 66%(±7), при этом количество супероксида меньше на 40%. GMP сохраняет FAD лишь на 18%(±6), количество супероксида меньше на 41%. Никотинамид сохраняет 100% FAD, но не сохраняет FMN, количество супероксида при этом достоверно не отличается от контроля. Таким образом, сохранение FAD (никотинамид сохраняет, GMP нет) не вносит ощутимого вклада в образование супероксида.

Все вещества (NAD, AMP, GMP) сохраняющие FMN уменьшают количество супероксида, образующегося при инкубации суспензии выделенных митохондрий. Гидролиз FMN до рибофлавина вносит небольшой вклад в изменение флавиновой флуоресценции, так как FMN имеет близкий к рибофлавиону, квантовый выход. Кроме того, FMN сам способен к неферментативной реакции образования супероксида при окислении NADH (Рис. 8), поэтому его гидролиз до рибофлавина не приведет к заметному вкладу неферментативного образования супероксида.

Полученные данные поддерживают нашу гипотезу о том, что вещества, содержащие аденозинфосфатную (ATP, ADP, AMP, NAD и NADH) и гуанозинфосфатную часть (GMP, GDP, GMP) предотвращают потерю FMN активным центром комплекса I, уменьшая тем самым образование супероксида. Предполагается, что основной причиной образования избыточного количества супероксида после ишемии является потеря FMN комплексом I (Kahl et al., 2018). Аденозиновые и гуанозинового нуклеотиды являются достаточно большими молекулами, чтобы препятствовать доступу кислорода к восстановленному флавиону в активном центре; поскольку они присутствуют в митохондриальном матриксе в высоких локальных концентрациях (концентрация общего аденозинового нуклеотидного пула оценивается в 10 мМ (Schild et al., 1999)), они конкурируют с NADH за сайт связывания с флавином комплекса I и могут способствовать регуляции скорости образования супероксида (Birrell et al., 2013). Возможно, что после выделения митохондрий происходит уменьшение концентрации аденозинового пула, что ведет к дефлавинизации митохондрий.

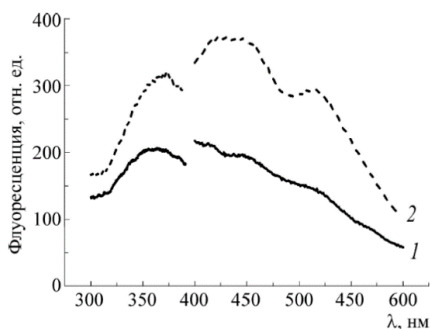
Таким образом, мы наблюдаем как минимум три процесса, связанные с дефлавинизацией флавопротеидов и образованием супероксида в митохондриях: первый из них в комплексе I на внутренней мембране за счет выхода FMN из активного центра, в результате чего происходит еще большая утечка электронов на кислород. Этот процесс способны блокировать аденозин- и гуанозин-фосфаты, а также NAD. Второй процесс связан с ферментативным гидролизом FAD и FMN в матриксе митохондрий; он блокируется EDTA, AMP, NA, NAD. Третий процесс связан с неферментативным гидролизом FAD с помощью атомов железа; он блокируется EDTA и AMP. Все три процесса связаны с образованием активных форм кислорода.

### **3.6 Образование липофусцина в выделенных митохондриях печени крысы.**

Избыток супероксида, образовавшегося в процессе дефлавинизации митохондрий, приводит к перекисному окислению липидов, которое является основой для образования липофусцина. Одним из важных свойств липофусцина, удобных для его изучения, является его интенсивная автофлуоресценция при возбуждении в ближней ультрафиолетовой области (Höhn et al., 2013; Terman et al., 1999). Известно, что даже незначительные колебания температуры

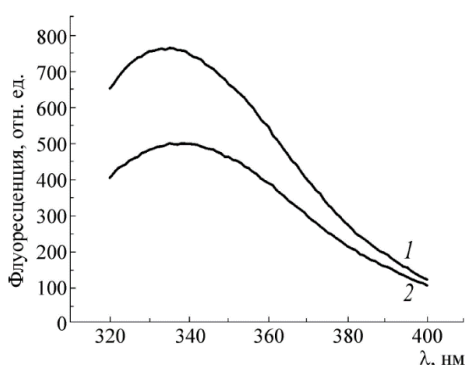
могут оказывать глубокое воздействие на организмы, и по мере ускорения метаболизма при более высоких температурах возрастают и скорости старения (Keil et al., 2015). Мы нагревали суспензию митохондрий до 49°C в течение 3 часов, что фактически являлось ускорением «состаривания» препаратов митохондрий. При этом наблюдалось возникновение характерной интенсивной липофусциновой флуоресценции ( $\lambda_{em} = 360$  нм,  $\lambda_{ex} = 460$  нм) (Рис. 12).

В наблюдаемых условиях, изменения появляются вследствие начала денатурации белков, которые становятся основой для появления сшивок и агрегации белковой полипептидной цепи.



**Рис. 12** Спектры возбуждения ( $\lambda_{em} = 460$  нм) и излучения ( $\lambda_{ex} = 360$  нм) суспензии выделенных митохондрий печени крысы (0,3 мг/мл): 1 - до инкубации, 2 - после инкубации в течение 3 ч при 49°C. Пик на 525 нм принадлежит флуоресценции флавинов.

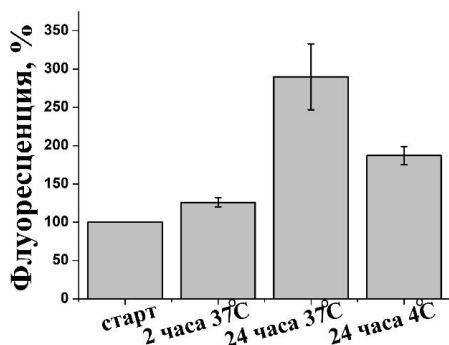
Температура инкубации (49 °C) может показаться весьма экстремальной, но по недавним исследованиям, температура митохондрии в активном состоянии в клетке достигает 50 °C, это подтверждается максимумами активности ферментов дыхательной цепи, а также флуоресцентным анализом с помощью флуоресцентного термического зонда (Chretien et al., 2018).



**Рис. 13** Спектры триптофановой флуоресценции митохондрий ( $\lambda_{ex} = 286$  нм): 1 - до инкубации, 2 – после 3-х часовой инкубации при 49°C.

Для определения происхождения липофусцина измерялась триптофановая флуоресценция до и после нагревания суспензии митохондрий при 49°C в течении 3-х часов (Рис. 13). После нагревания происходит длинноволновой сдвиг максимума спектра триптофановой флуоресценции белков (от 335 нм до 338 нм), а также его уширение (от 60 до 64 нм) и снижение интенсивности сигнала 65% от первоначальной величины. Отсюда следует, что в процессе термической инкубации происходят конформационные изменения структуры белков, вызвавшие выход триптофановых остатков белков ближе к поверхности водной фазы.

Процесс возникновения липофусцина в выделенных митохондриях зависит от температуры. При инкубации митохондрий в течении 24 часов при 37° С образуется больше липофусцина, чем в течении такого же времени при 4°С (Рис. 14) Из такой зависимости от температуры следует, что суммарная скорость процесса лимитируется не перекисным окислением липидов (свободно-радикальные реакции окисления не зависят от температуры), а более медленной стадией. Возможно, что это – денатурация белков или увеличение тепловых колебаний за счет уменьшения вязкости мембраны.

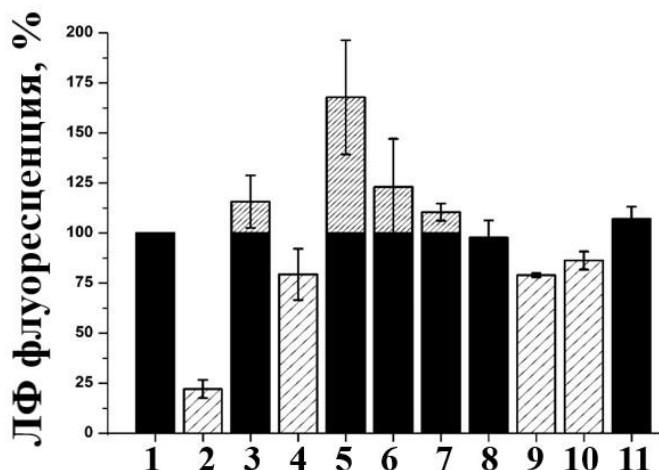


**Рис. 14** Образование термо - липофусцина (в % от начального уровня) в процессе инкубации суспензии выделенных митохондрий печени крысы при разных температурах. Инкубация проводилась в стерильном NaCl – буфере, pH 7.0

Помимо измерения интенсивности флуоресценции, мы определили степень поляризации липофусциновой флуоресценции, по величине которой можно определить, в каком состоянии липофусциновый комплекс – связанном с мембраной или свободном. У молекул липофусцина, связанных с митохондриальной мембраной степень поляризации высокая (из-за низкой вращательной подвижности). В наших экспериментах после инкубации при 49°С в течение 3 часов степень поляризации липофусциновой флуоресценции не изменялась. Это говорит о том, что липофусцин остается в связанном с мембраной состоянии.

### **3.7 Влияние некоторых антиоксидантов и восстановителей в модели образования термо-липофусцина в суспензии выделенных митохондрий.**

С помощью предложенного нами способа получения липофусцина в суспензии митохондрий путём длительного можно изучать способность антиоксидантов и восстановителей предотвращать образование липофусцина. При этом метод позволяет найти действующую антиоксидантную концентрацию в условиях эксперимента (Рис. 15). Также появилась возможность исследовать влияние различных веществ на процесс прямого (неферментативного) расщепления липофусцина активными веществами *in vitro*.



**Рис. 15** Образование

термолипофусцина (в%) в суспензии изолированных митохондрий (1 мг / мл) во время инкубации в течение 3 часов при 49 °С. Без добавок (1), Инкубация с: 100 μМ дигидрокверцетином (2), 100 μМ ионолом (3), 100 μМ восстановленного глутатионом (4), 1 мМ цистеином (5), 1 мМ имидазолом (6), 1 мМ гистидином (7), 100 μМ NAD (8), 100 μМ сукцинатом (9), при pH 6 (10), при pH 8 (11).

Из полученных данных (Рис. 15) видно, что в некоторых случаях антиоксиданты и восстановители становятся прооксидантами (ионол, цистеин, имидазол) и увеличивают образование липофусцина.

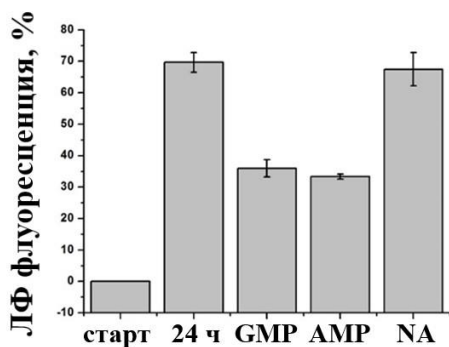
### 3.8 Влияние аденинозин- и гуанозин-фосфатов на скорость образования липофусцина в суспензии выделенных митохондрий.

В процессе дефламинизации митохондриальных белков ускоряет образование супероксида, что ведет к перекисному окислению липидов и образованию липофусцина. Очевидно, что, если замедлить дефламинизацию и, как следствие, образование супероксида с помощью аденозин- и гуанозин-фосфатов, замедлится и образование липофусцина. При ускорении образования липофусцина с помощью инкубации суспензии митохондрий при 49 °С в течении 3 часов аденозин и гуанозин-фосфаты не влияют на образование липофусцина. Видимо, из-за высокой скорости колебаний боковых групп аминокислот при нагреве, аденозин- и гуанозин фосфаты не способны встраиваться в активные центры ферментов и препятствовать дефламинизации и уменьшать тем самым образование липофусцина (данные не приводятся).

При комнатной температуре также идет процесс образования митохондриального липофусцина, только с более медленной скоростью: за 24 часа при температуре 21 °С образуется на 85% (± 9) больше по сравнению с содержанием липофусцина в интактных митохондриях. АМР и GMP встраиваются в активный центр фермента и в концентрации 1 мМ и замедляют процесс образования липофусцина на 45 % (± 1) и на 42% (± 4) соответственно (Рис. 16). Никотинамид в концентрации 1 мМ не оказывает никакого влияния (Рис. 16).

За сутки инкубации при температуре 21 °С уровень флавиновой флуоресценции возрастает на 239 % (± 63). При этом АМР и GMP в концентрации 1 мМ снижали этот эффект до 87% (± 6) и 89% (± 8), а никотинамид не оказал достоверно значимого эффекта (Рис. 16).

Расчеты производились в процентах от начального уровня флуоресценции за вычетом сигнала буфера.



**Рис. 16** Влияние 1мМ никотинамида (NA), 1 мМ GMP и 1 мМ AMP на скорость образования липофусцина при 21 °С за 24 часа.

Таким образом, аденозинфосфаты и гуанозинфосфаты за счет замедления дефламинизации митохондриальных субстратов, уменьшают образование супероксида и, как следствие, уменьшают уровень перекисного окисления липидов и образование липофусцина в суспензии выделенных митохондрий.

### Заключение

В процессе инкубации митохондрий в течение 2 часов при 37 °С при отсутствии субстратов в гипотоническом буфере, моделируется цитотоксический отек, характерный для многих заболеваний, связанных с окислительным стрессом. При этом, в условиях митохондриального набухания наблюдается увеличение сигнала флуоресценции суспензии. Основным процессом, отвечающим за изменение интенсивности флуоресценции, является потеря флавоферментами нековалентно-связанного FAD, с его последующим гидролизом до рибофлавина. Возможно, что в некоторых ферментах, из-за непосредственной близости железосерных кластеров, гидролиз FAD идет в самом ферменте. Одновременно идет процесс выхода FMN из комплекса I, который также заканчивается гидролизом FMN до рибофлавина.

С помощью некоторых аналогов NAD (аденозинфосфаты и гуанозинфосфаты, никотинамид), а также EDTA мы научились управлять процессом дефламинизации. EDTA полностью останавливает гидролиз FAD, возможно за счет хелатирования железа (ионы железа катализируют неферментативный гидролиз FAD), или за счет ингибирования митохондриальной FAD пиррофосфатазы, которая осуществляет ферментативный гидролиз FAD.

Свободные рибофлавин и FMN участвуют в неферментативном образовании супероксида с помощью окисления NADH в фосфатном буфере, поэтому замедляя гидролиз FAD мы уменьшаем вклад в неферментативное образование супероксида. Тем не менее, было показано, что наибольший вклад в образование супероксида вносит потеря FMN комплексом I. Аденозинфосфаты, гуанозинфосфаты и NAD, стабилизирующие FMN в активном центре

NADH- дегидрогеназы способствовали уменьшению образования супероксида. Никотинамид, который предохраняет FAD от гидролиза, но не влияет на выход и гидролиз FMN не способствует уменьшению продукции супероксида.

Избыток супероксида, образовавшегося в процессе дефламинизации митохондрий, приводит к перекисному окислению липидов, которое является основой для образования липофусцина. С помощью предложенного нами способа получения липофусцина в суспензии митохондрий путём длительной инкубации можно изучать способность антиоксидантов и восстановителей предотвращать образование липофусцина и возможность его расщепления.

Аденозинфосфаты и гуанозинфосфаты за счет замедления дефламинизации митохондриальных субстратов, уменьшают образование супероксида и, как следствие, уменьшают уровень перекисного окисления липидов и образование липофусцина в суспензии выделенных митохондрий.

### **Выводы**

1) Основным процессом, отвечающим за изменение флавиновой флуоресценции при длительной инкубации суспензии выделенных митохондрий печени крысы в гипотонической среде, является дефламинизация митохондриальных ферментов с последующим гидролизом FAD и FMN с образованием рибофлавина.

2) Дефламинизация флавопротеидов может приводить к образованию супероксида как минимум в двух процессах. Первый из них протекает в комплексе I в результате спонтанного выхода FMN из активного центра. Этот процесс подавляется AMP, GMP и NAD. Второй процесс связан с гидролизом FAD до рибофлавина; и дальнейшим неферментативным окислением NADH с помощью рибофлавина и FMN с образованием супероксида. Процесс гидролиза FAD блокируется EDTA, AMP, никотинамидом и NAD.

3) Разработана модель получения митохондриального термолипофусцина, которую можно использовать для тестирования веществ на их антиоксидантную и прооксидантную способность. При нагревании суспензии выделенных митохондрий печени крысы образуется термо-липофусцин, обладающий характерным липофусциновым спектром флуоресценции.

4) Аденозинфосфаты и гуанозинфосфаты уменьшают образование супероксида и, как следствие, уменьшают уровень перекисного окисления липидов и образование липофусцина в суспензии выделенных митохондрий.

## Список публикаций по теме диссертации

### Статьи в реферируемых журналах, рекомендованный ВАК:

- 1) Frolova M.S., Marchenkov V.V., Vekshin N.L. Disruption of flavin homeostasis in isolated rat liver mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. Vol. 516, № 4. P. 1211–1215.
- 2) Фролова М.С., Сурин А.М., Браславский А.В., Векшин Н.Л. Деградация митохондрий в липофусцин при освещении и нагреве // Биофизика, 2015 том 60(5), с. 1125–1131.
- 3) Векшин Н.Л., Фролова М.С., Ковалев В.И., Бегунова Е.А. Тиндалевский гипохромизм в суспензиях // Биофизика, 2015, 60(1):129-35.
- 4) Frolova M.S., Vekshin N.L. Stabilization of NADH-dehydrogenase in mitochondria by guanosine phosphates // Journal of Fluorescence, 2014 Jul; 24(4):1061-6
- 5) Фролова М.С., Векшин Н.Л. Стабилизация NADH-дегидрогеназы в митохондриях аденозинфосфатами // Биологические мембраны, 2014, том 31, №2, с. 88-94
- 6) Векшин Н.Л., Фролова М.С. Многопараметрическая формула расчета продолжительности жизни животных // Биофизика, 2019, том 64(1), с. 162–168.
- 7) A.V. Berezhnov, M.P.M. Soutar, E. I. Fedotova, M.S. Frolova, H. Plun-Favreau, V.P. Zinchenko, A. Y. Abramov Intracellular pH modulates autophagy and mitophagy // J Biol Chem, 2016, 291(16):8701-8.

### Публикации в сборниках материалов конференций:

- 1) Фролова М.С., Марченков В.В., Чаплыгина А.В., Дойникова А.Н., Векшин Н.Л. Флавиновый гомеостаз митохондрий // Рецепторы и Внутриклеточная Сигнализация: 10-я Международная конференция (20-24 мая 2019 г. Пущино) Сборник статей, стр 673-676
- 2) Векшин Н.Л., Фролова М.С., Бегунова Е.А., Ковалев В.И., Браславский А.В. Анти-старин V Съезд Биофизиков России (4-10 октября 2015 г. Ростов-на-Дону), том 2, стр 215.
- 3) Фролова М.С., Векшин Н.Л. Предотвращение образования липофусцина в митохондриях in vitro // Экспериментальная и теоретическая биофизика (2-3 ноября 2015 г. Пущино), сборник тезисов.
- 4) Frolova M.S., Surin A.M., Braslavski A.V., Vekshin N.L. Formation of lipofuscin from mitochondria during heating and lighting // Mitochondrial pores and channels as pharmacological targets – 2014 (Pushchino, 29-30 October).
- 5) Чачина Н.А., Кирток А.Н., Фролова М.С., Векшин Н.Л. Митохондрии – силовые электростанции нейронных сетей // Нейроинформатика- 2013, Москва Сборник статей: Часть 1, стр. 219-229
- 6) Фролова М.С., Чачина Н.А., Кирток А.Н., Векшин Н.Л. Стабилизация NADH-дегидрогеназы с помощью аналогов NAD для лечения митохондриальных заболеваний // Рецепторы и



Внутриклеточная Сигнализация: Международная конференция (27-30 мая 2013 г. Пущино)  
Сборник статей, Том 2, стр.735-739

- 7) Бережнов А.В., Фролова М.С., Зинченко В.П., Абрамов А.Ю. Уровень цитозольного рН как возможный регулятор митофагии. Связь с болезнью Паркинсона // Рецепторы и Внутриклеточная Сигнализация: Международная конференция (27-30 мая 2013 г.Пущино) Сборник статей, Том 1, стр.17-20
- 8) Фролова М.С., Чачина Н.А., Кирток А.Н., Векшин Н.Л. Влияние аналогов NADH на ферментативную активность NADH-дегидрогеназы // Биология – Наука XXI Века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (21 – 26 апреля 2013 г.Пущино). Сборник тезисов, стр. 160.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

FAD - флаavin-адениндинуклеотид

FMN – флаavinмононуклеотид

RF - рибофлаavin

AMP – аденозинмонофосфат

ADP – аденозиндифосфат

ATP – аденозинтрифосфат

NADH – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид

УФ – ультрафиолет

EDTA – этилендиаминтетраацетат

MCLA - 2-метил-6-(4-метилфенил)-3,7-дигидроимидазол[1,2-а] пиазин-3(7H)-1

GMP - гуанозинмонофосфат

GDP – гуанозиндифосфат

GTP - гуанозинтрифосфат

ВЭЖХ (HPLC) – высокоэффективная жидкостная хроматография

7AMD – 7-актиномицин D

UDP – уридиндифосфат

CDP – цитидиндифосфат

cAMP – циклический аденозинмонофосфат

cGMP – циклический гуанозинмонофосфат

NA - никотинамид

MX - митохондрии

SOD - супероксиддисмутаза