

На правах рукописи



ВЕДЕРНИКОВ АЛЕКСАНДР АНДРЕЕВИЧ

**Сравнительное исследование механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации  
внутренней мембраны митохондрий печени некоторых видов  
млекопитающих и птиц**

03.01.04 – биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пушино – 2016

Работа выполнена на кафедре биологии, кафедре фундаментальной медицины и в лаборатории молекулярной биоэнергетики ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет» (г. Йошкар-Ола).

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Самарцев Виктор Николаевич**

**Официальные оппоненты:** **Миронова Галина Дмитриевна,**  
доктор биологических наук, профессор,  
заслуженный деятель науки РФ,  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт теоретической и  
экспериментальной биофизики Российской  
академии наук, заведующая лабораторией  
митохондриального транспорта

**Амерханов Зариф Гарриевич,**  
кандидат биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биофизики клетки  
Российской академии наук, старший научный  
сотрудник лаборатории механизмов природных  
гипометаболических состояний

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования Московский  
государственный университет им.  
М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский  
институт физико-химической биологии имени  
А.Н. Белозерского

Защита состоится «\_\_\_» ноября 2016 г. в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 002.066.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН) по адресу: 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИФПБ РАН (<http://www.ibbp.psn.ru/>)

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» сентября 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
к.б.н.



Назарова Галина Николаевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Митохондрии в энергизованном состоянии обладают способностью аккумулировать и удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе (Rasola and Bernardi, 2011; Zorov et al., 2014). Максимальный выход  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса этих органелл наблюдается при условии индукции неспецифической проницаемости или, говоря по-другому, пермеабиллизации внутренней мембраны для ионов и растворимых в воде веществ с молекулярной массой до 1500 Да по их градиенту концентрации (открытие митохондриальной поры) (Rasola and Bernardi, 2011; Zorov et al., 2014). Это приводит к нарушению энергетических функций митохондрий, прежде всего синтеза АТФ, а также может вызвать набухание матрикса митохондрий, разрыв внешней мембраны и, как следствие, выход находящихся в межмембранном пространстве цитохрома *c* и других, так называемых, апоптогенных белков. В связи с этим индукция поры во внутренней мембране митохондрий рассматривается как один из факторов гибели клеток при различных патологических состояниях (Скулачев и др., 2010; Zorov et al., 2014).

Согласно «классической» гипотезе формирования митохондриальной поры, АДФ/АТФ-антипортер (другое название адениннуклеотидтранслоказа) в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  связывается с белком матрикса циклофилином D. Циклоспорин А (ЦсА), специфический блокатор поры, нарушает его взаимодействие с АДФ/АТФ-антипортером и, тем самым, препятствует открытию поры (Rasola and Bernardi, 2011; Zorov et al., 2014). Было также предположено, что в формировании порового комплекса с циклофилином D принимают участие переносчик фосфата (Leung et al., 2008) и  $F_0F_1$ -АТФ-синтаза (Bonora et al., 2013; Giorgio et al., 2013). Эффективным природным индуктором  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры во внутренней мембране митохондрий печени является неорганический фосфат ( $\text{P}_n$ ) (Varanyuwatana and Halestrap, 2012). Индукция ЦсА-чувствительной поры значительно усиливается при окислительном стрессе (Скулачев и др., 2010; Zorov et al., 2014). 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; Ronchi et al., 2011). Длинноцепочечные  $\alpha,\omega$ -дикарбоновые кислоты, среди них наиболее эффективна  $\alpha,\omega$ -гексадекандикарбоновая кислота (ГДК), способны индуцировать  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую пермеабиллизацию митохондрий печени по механизму, нечувствительному к ЦсА (Дубинин и др., 2013; Dubinin et al., 2014).

Изложенные выше механизмы и пути регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости изучены главным образом на митохондриях печени и сердца лабораторных крыс и мышей, которые характеризуются относительно короткой продолжительностью жизни (Barja, 2002). Необходимо выяснить, каковы особенности индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях животных с большей продолжительностью жизни, чем продолжительность жизни крыс и мышей. Птицы по сравнению с млекопитающими одинаковой массы тела характеризуются более интенсивным метаболизмом, более высокой температурой тела и большей потенциальной максимальной продолжительностью жизни (ПМПЖ) (Hulbert et al., 2007; Furness and Speakman, 2008). Так, например, ПМПЖ голубей составляет 35 лет, что в 8 раз больше ПМПЖ крыс (Montgomery et al., 2011). Однако до сих пор отсутствуют данные о механизме и пути регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации в митохондриях жизненно важных органов птиц. Наряду с голубями наше внимание привлекли птицы отряда курообразных (Galliformes) цесарки (*Numida meleagris*). Цесарки серо-крапчатой популяции (СКП) разводятся в племенных хозяйствах в качестве резервного генофонда. Цесарки загорской белогрудой породы (ЗБП), отличаются от этой популяции генетически и характеризуются более высокими продуктивными качествами (Забиякин, 2005).

**Цель работы:** сравнительное исследование механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации митохондрий печени разных видов млекопитающих (мыши, крысы и кролики) и птиц (голуби, цесарки СКП и цесарки ЗБП).

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**.

1. Определить, каковы особенности окислительного синтеза АТФ и свободного окисления в митохондриях печени указанных млекопитающих и птиц.

2. Выяснить, имеется ли в митохондриях печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей ЦсА-чувствительный механизм индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры, как в митохондриях печени млекопитающих.

3. Оценить кинетику транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями печени указанных животных при индукции ЦсА-чувствительной поры. Определить связано ли различие в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры с особенностями функционирования системы окислительного синтеза АТФ в митохондриях печени животных разных видов.

4. Выяснить, как влияет окисляющий агент ТБГ на индукцию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени указанных животных.

5. Исследовать действие ГДК как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий печени указанных млекопитающих и птиц. Определить связано ли различие в резистентности к действию ГДК с особенностями функционирования системы окислительного синтеза АТФ в митохондриях печени животных разных видов.

**Научная новизна работы.** Впервые установлено, что в митохондриях печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей имеется ЦсА-чувствительный механизм индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры, как в митохондриях печени млекопитающих – крыс, мышей и кроликов. При этом митохондрии печени указанных птиц по сравнению с митохондриями печени млекопитающих обладают большей резистентностью к действию  $\text{Ca}^{2+}$  и окисляющего агента ТБГ как к индукторам ЦсА-чувствительной поры. Показано, что митохондрии печени голубей, в отличие от митохондрий печени млекопитающих и цесарок, не способны эффективно поглощать и удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе. Установлена специфика в эффективности действия  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии  $\Phi_{\text{H}}$  как индуктора ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени животных разных видов (мышь, крыса, кролики и цесарки), в том числе в условиях действия окисляющего агента ТБГ. Впервые дана оценка индукции ГДК  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий печени мышей, кроликов, голубей, цесарок СКП и цесарок ЗБП. Показано, что в митохондриях печени животных указанных видов различия в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры и к ГДК как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации не связано с особенностями функционирования системы окислительного синтеза АТФ.

**Научно-практическое значение работы.** Работа имеет, прежде всего, значение для фундаментальной науки в области эволюционной биохимии и биоэнергетики. Результаты исследований используются в учебном процессе в Марийском государственном университете. Новые знания, полученные при выполнении диссертации, позволят лучше понять связанные с функционированием митохондрий механизмы, определяющие различие в видовой продолжительности жизни гомойотермных животных. Знание таких механизмов, в свою очередь, будет способствовать разработке новых подходов к лечению связанных с нарушением функционирования митохондрий возрастных патологий у пожилых людей, а также патологий, возникающих при воздействии на организм экстремальных факторов окружающей среды.

## **Основные научные положения, выносимые на защиту.**

1. Митохондрии печени птиц: голубей, цесарок СКП и цесарок ЗБП по сравнению с митохондриями печени млекопитающих: крыс, мышей и кроликов обладают большей резистентностью к действию  $\text{Ca}^{2+}$  и окисляющего агента ТБГ как к индукторам ЦсА-чувствительной поры.

2. Митохондрии печени голубей, в отличие от митохондрий печени указанных млекопитающих и цесарок, не способны эффективно поглощать и удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе и обладают наибольшей резистентностью к индукторам ЦсА-чувствительной поры и к ГДК как к индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации внутренней мембраны.

3. В митохондриях печени животных указанных видов различия в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры и к ГДК как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации не связаны с особенностями функционирования системы окислительного синтеза АТФ.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были доложены на 38-м и 39-м Конгрессах федерации европейских биохимических обществ (Санкт-Петербург, 2013 г.; Париж, 2014 г.); на международных конференциях «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2013 г. и 2015 г.); на международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2014 г.); на 17-ой, 18-ой и 19-ой международных Пушинских школах-конференциях молодых ученых (Пушино, 2013 г., 2014 г. и 2015 г.); V международной научной конференции «Принципы и способы сохранения биоразнообразия» (Йошкар-Ола, 2013 г.); 69-ой школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2016г.)

**Финансовая поддержка работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение 14.В37.21.0191), грантов РФФИ (№ 14-04-00688-а и № 16-34-00435 мол\_а), государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации (проекты № 4.8257.2013 и № 1365).

**Публикации.** По теме диссертации опубликованы 4 статьи в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, и 12 статей, тезисов докладов региональных, всероссийских и международных научных конференций, также получено авторское свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ.

**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 106 страницах, включая список литературы, иллюстрационный материал включает 36 рисунков и 7 таблиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Экспериментальные животные.** В работе были использованы млекопитающие зрелого возраста (самцы): белые лабораторные мыши (масса тела 25–28 г), белые лабораторные крысы (масса тела 210–240 г) и домашние кролики породы серый великан (масса тела 3500–3700 г). Птицы зрелого возраста (самцы): сизые голуби (*Columba livia*) (масса тела 420–460 г), цесарки (*Numida meleagris*) СКП и ЗБП (масса тела 1570–2100 г). Содержание, кормление и забой животных соответствует необходимым требованиям, изложенным в соответствующих руководствах (Западнюк и др., 1983; Лукьянов, 2008), а также международным правилам «Guide for the Care and Use of Animals» и правилам, утвержденным в системе Министерства высшего и среднего образования СССР (Приказ № 742 от 13 ноября 1984 г.).

**Выделение митохондрий.** Митохондрии выделяли из печени животных общепринятым методом дифференциального центрифугирования (Маркова и др., 1999). Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ ЭГТА и 5 мМ МОПС-Трис, pH 7,4. Суспензию митохондрий (60 – 70 мг белка в 1 мл) хранили на льду. Белок определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали БСА.

**Регистрация параметров дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий.** Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при температуре 25°C (и 39°C при исследовании параметров свободного окисления в митохондриях печени цесарок) с помощью кислородного электрода типа Кларка при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Концентрация кислорода в среде инкубации при 25°C – 240 мкМ (Chance and Williams, 1955). Концентрация белка митохондрий в кислородной ячейке составляла ~1,1 – 1,2 мг/мл. Применяли следующие показатели дыхания и окислительного фосфорилирования:  $J_2$  – скорость дыхания митохондрий в присутствии  $\Phi_n$  до добавления АДФ (состояние 2 по Чансу);  $J_3$  – скорость дыхания митохондрий в присутствии  $\Phi_n$  и АДФ (состояние 3 по Чансу);  $J_4$  – скорость дыхания митохондрий в присутствии  $\Phi_n$  после того, как весь добавленный АДФ был израсходован в процессе синтеза АТФ (состояние 4 по Чансу);  $J_u$  – скорость дыхания митохондрий в присутствии протонофорного разобщителя 2,4-динитрофенола в концентрации, вызывающей максимальную стимуляцию дыхания;  $J_p$  – скорость синтеза АТФ;  $R_C$  – отношение величин  $J_3$  и  $J_4$

(дыхательный контроль по Чансу);  $P_C$  – отношение величин  $J_p$  и  $J_4$ ;  $АДФ/О$  – стехиометрический коэффициент, показывающий эффективность окислительного фосфорилирования. Значение коэффициента  $АДФ/О$  определяли пульсовым методом (Hinkle and Yu, 1979). Значение величины  $J_p$  – как удвоенное произведение величин  $J_3$  и  $АДФ/О$ . Размерность величин  $J_2$ ,  $J_3$ ,  $J_4$  и  $J_u$  – нмоль  $O_2$ / мин на 1 мг белка; размерность величины  $J_p$  – нмоль АДФ / мин на 1 мг белка; размерность величин  $R_C$ ,  $P_C$  и  $АДФ/О$  – относительные единицы.

**Оценка набухания митохондрий.** Набухание митохондрий регистрировали по изменению оптической плотности суспензии митохондрий (А) при длине волны 540 нм на спектрометре «КФК- 3-01» («ЗОМЗ», Россия) в кювете объемом 4 мл и при температуре 25°C. Для регистрации и первичной обработки данных применяли специально разработанную нами программу (свидетельство о регистрации № 2015619788). Концентрация митохондриального белка в кювете 0,8 – 1,0 мг/мл. Скорость набухания митохондрий ( $\Delta A_{540}$ /мин на 1 мг белка) определяли как изменение оптической плотности суспензии митохондрий в течение первой минуты набухания. Амплитуду набухания ( $\Delta A_{540}$  на 1 мг белка) определяли как изменение оптической плотности суспензии митохондрий за 10 минут.

**Оценка проницаемости внутренней мембраны митохондрий для  $Ca^{2+}$ .** Проницаемость внутренней мембраны митохондрий для  $Ca^{2+}$  оценивали по изменению концентрации этих ионов в среде инкубации с помощью  $Ca^{2+}$ -селективного электрода и универсального иономера И-500 («Аквилон», Россия) в ячейке объемом 10 мл и при температуре 25°C. Концентрация митохондриального белка в кювете была ~ 1,5 мг/мл.

**Измерение разности электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий ( $\Delta\Psi$ ).**  $\Delta\Psi$  оценивали по распределению предварительно добавленного в среду инкубации катиона тетрафенилфосфония ( $TФФ^+$ ) через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали  $TФФ^+$ -чувствительным электродом (Kato et al., 1979) при 25°C и постоянном перемешивании в открытой ячейке объемом 2 мл с помощью оригинальной многоканальной электрометрической системы Record 4usb. В этих экспериментах среда инкубации содержала 1,6 мкМ  $TФФ^+$ . Концентрация митохондриального белка в кювете была ~ 1,5 мг/мл.

**Состав среды инкубации митохондрий.** В большинстве экспериментов среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ КСl, 5 мМ янтарную кислоту, 1 мМ  $KH_2PO_4$ , 20 мкМ ЭГТА, 10 мМ МОПС-Трис, рН 7,4. При изучении дыхания и окислительного фосфорилирования среда инкубации дополнительно содержала 2 мМ

MgCl<sub>2</sub> и БСА (0,2-0,4 мг/мл), а концентрации ЭГТА и КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> были увеличены до 0,5 и 5 мМ соответственно.

**Статистическая обработка результатов исследований.** Анализ гомогенности дисперсий был выполнен с применением критериев Бартлетта, Кохрена, Хартли. Для анализа данных применяли метод однофакторного дисперсионного анализа или t-критерий Стьюдента. Результаты представлены в виде средних значений ± средняя квадратичная ошибка среднего значения. Статистическая обработка данных проводилась с использованием лицензионных программ STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel 2010.

**Реактивы.** В работе использовалась 3-[N-Морфолино]пропансульфоновая кислота (МОПС), α,ω-гексадекандикарбоновая кислота (ГДК), рутениевый красный (РК), олигомицин, янтарная кислота, циклоспорин А (ЦсА), очищенный от жирных кислот бычий сывороточный альбумин (БСА) фракции V, трис(гидроксиметил)аминометан, хлорид тетрафенилфосфония, ("Sigma", США), ротенон, ЭГТА ("Serva", Германия), сахароза, АДФ, 2,4-динитрофенол, КСl ("Fluka" Швейцария), КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, СаСl<sub>2</sub>, MgСl<sub>2</sub> ("Merck", Германия). Использовались растворы олигомицина (2 мг/мл), ротенона (2 мМ), ГДК (20 мМ), ЦсА (1 мМ) в дважды перегнанном этаноле; АДФ (100 мМ) и 2,4-динитрофенола (5 мМ) – в бидистиллированной воде. 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.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Характеристика дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени млекопитающих и птиц разных видов.

Как видно из таблиц 1 и 2, митохондрии печени крыс, голубей и цесарок СКП не отличаются по показателям дыхания и окислительного синтеза АТФ, за исключением скорости разобщенного 2,4-динитрофенолом дыхания. Митохондрии печени мышей отличаются от митохондрий этих животных более высокой скоростью дыхания в отсутствие синтеза АТФ (свободное окисление) и вследствие этого меньшей степенью сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования. В отличие от этого митохондрии печени кроликов характеризуются как меньшей скоростью дыхания в различных состояниях, так и большей степенью сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования. Митохондрии печени цесарок ЗБП

характеризуются более низкой скоростью дыхания в состоянии 2 и более высокой в состоянии 4, меньшей скоростью окислительного синтеза АТФ, а также наиболее слабым сопряжением дыхания и окислительного синтеза АТФ.

**Таблица 1.** Сравнение показателей дыхания митохондрий печени исследуемых животных.

Животные	$J_2$	$J_3$	$J_4$	$J_u$
	нмоль $O_2$ / мин на 1 мг белка			
Крысы ( $n=8$ )	$10,9 \pm 0,4$	$43,7 \pm 1,8$	$10,6 \pm 0,4$	$65,8 \pm 1,7$
Мыши ( $n=5$ )	$14,3 \pm 1,1^*$	$44,2 \pm 3,3$	$14,7 \pm 1,4^*$	$56,3 \pm 4,4$
Кролики ( $n=7$ )	$5,8 \pm 0,4^*$	$27,3 \pm 0,8^*$	$5,7 \pm 0,2^*$	$33,2 \pm 3,0^*$
Голуби ( $n=7$ )	$9,8 \pm 0,7$	$38,3 \pm 2,8$	$10,1 \pm 0,7$	$46,1 \pm 3,0^*$
Цесарки СКП ( $n=8$ )	$10,2 \pm 0,5$	$44,2 \pm 2,6$	$11,2 \pm 0,6$	$51,8 \pm 3,1$
Цесарки ЗБП ( $n=6$ )	$7,0 \pm 0,6^*$	$31,4 \pm 3,1^*$	$18,3 \pm 2,5^*$	$40,7 \pm 4,2^*$

*Примечание.* Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* Различия между показателями митохондрий контрольной группы животных (крысы) и показателями митохондрий указанных групп животных статистически значимы,  $p < 0,05$ .

**Таблица 2.** Сравнение скорости синтеза АТФ и степени сопряжения дыхания и окислительного синтеза АТФ митохондрий печени исследуемых животных.

Животные	$R_c$	АДФ/О	$P_c$	$J_p$
	относительные единицы			нмоль ADP / мин на 1 мг белка
Крысы ( $n=8$ )	$4,11 \pm 0,07$	$1,73 \pm 0,03$	$7,01 \pm 0,18$	$150,9 \pm 7,8$
Мыши ( $n=5$ )	$3,01 \pm 0,08^*$	$1,46 \pm 0,03^*$	$4,43 \pm 0,20^*$	$129,7 \pm 8,0$
Кролики ( $n=7$ )	$4,82 \pm 0,20^*$	$1,81 \pm 0,03$	$8,51 \pm 0,21^*$	$96,0 \pm 4,7^*$
Голуби ( $n=7$ )	$3,80 \pm 0,14$	$1,65 \pm 0,07$	$6,25 \pm 0,37$	$125,1 \pm 7,4$
Цесарки СКП ( $n=8$ )	$3,97 \pm 0,08$	$1,75 \pm 0,03$	$6,80 \pm 0,20$	$152,6 \pm 9,4$
Цесарки ЗБП ( $n=6$ )	$1,79 \pm 0,12^*$	$1,06 \pm 0,06^*$	$1,76 \pm 0,11^*$	$67,4 \pm 6,0^*$

*Примечание.* Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* Различия между показателями митохондрий контрольной группы животных (крысы) и показателями митохондрий указанных групп животных статистически значимы,  $p < 0,05$ .

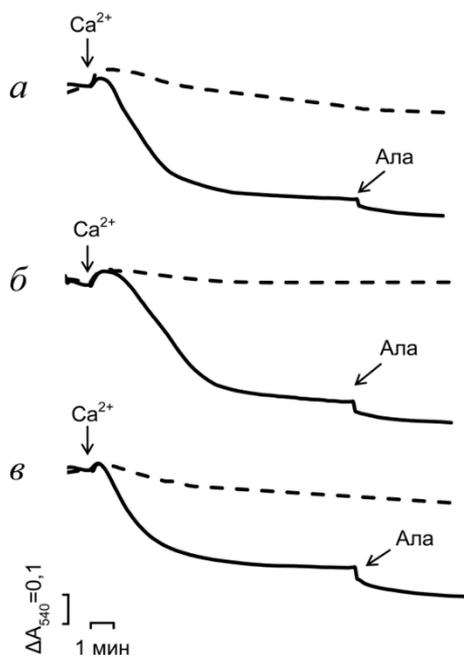
Установлено, что в митохондриях печени указанных животных скорость свободного окисления как составная часть скорости дыхания в состоянии 3 равна скорости дыхания в состоянии 4. Это свидетельствует о том, что окислительный синтез АТФ не оказывает ингибирующего действия на свободное окисление в состоянии 3. В качестве коэффициента, характеризующего способность митохондрий эффективно синтезировать АТФ, предложено использовать отношение скорости окислительного синтеза АТФ и скорости дыхания в состоянии 4 – коэффициент  $P_c$ .

### 3.2. Сравнительное исследование индукции $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени млекопитающих и птиц разных видов.

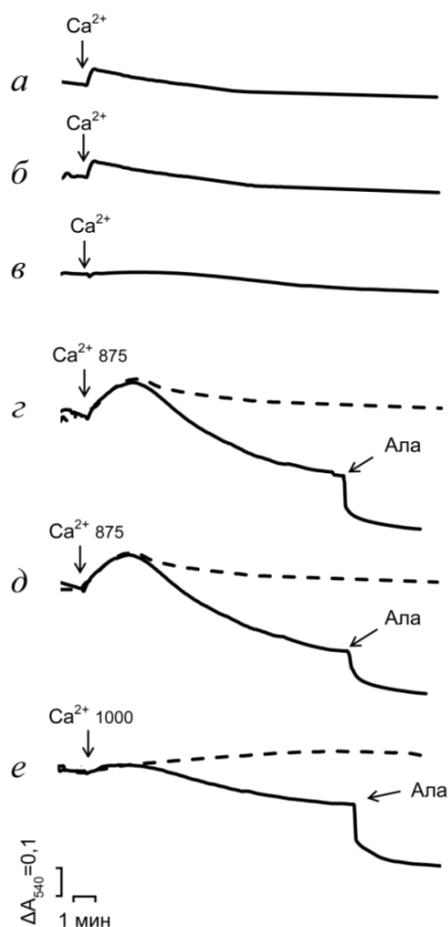
Добавление  $\text{CaCl}_2$  к митохондриям печени крыс, инкубируемых в сахарозной среде в присутствии  $\Phi_n$  и энергизованных путем окисления сукцината, приводит к существенному снижению оптической плотности суспензии (рис. 1, *a*). Аналогичные результаты получены при добавлении  $\text{CaCl}_2$  в том же количестве и к митохондриям печени мышей (рис. 1, *б*) и кроликов (рис. 1, *в*). В присутствии ЦсА эффективное набухание митохондрий печени этих животных наблюдается только при добавлении  $\text{CaCl}_2$  в количестве порядка 1000 нмоль на 1 мг белка. Полученные данные согласуются с литературными источниками, свидетельствующими о формировании в присутствии  $\Phi_n$   $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры во внутренней мембране митохондрий печени млекопитающих (Petronilli et al., 1993; Leung et al., 2008; Varanyuwatana, Halestrap et al., 2012).

Митохондрии печени кроликов отличаются от митохондрий печени крыс и мышей по амплитуде набухания (рис. 1, табл. 3). Добавление к митохондриям печени этих животных известного каналобразующего агента аламетицина (Brustovetsky et al., 2002; Gostimskaya et al., 2003), вызывает дальнейшее изменение оптической плотности не более чем на 20% (рис. 1). Это свидетельствует о том, что лишь малая часть популяции митохондрий является резистентной по отношению к действию применяемых нами индукторов поры.

Митохондрии печени цесарок СКП (рис. 2, *a*) и ЗБП (рис. 2, *б*), также как митохондрии печени голубей (рис. 2, *в*) не набухают при добавлении  $\text{CaCl}_2$  в количестве 250 нмоль на 1 мг белка. В этом случае количество добавляемого  $\text{CaCl}_2$  должно быть повышено как минимум до 875 нмоль на 1 мг белка для митохондрий цесарок СКП (рис. 2, *г*) и цесарок ЗБП (рис. 2, *д*) и до 1000 нмоль на 1 мг белка для митохондрий печени голубей (рис. 2, *е*). В отличие от митохондрий печени крыс, добавление аламетицина к митохондриям печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей приводит к дальнейшему существенному усилению их набухания (рис. 2). Следовательно, имеется существенная доля митохондрий резистентная к действию  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\Phi_n$  как к индукторам поры. Скорости и амплитуды набухания митохондрий этих животных приведены в табл. 3. Митохондрии печени голубей обладают наименьшей скоростью и амплитудой набухания этих органелл.



**Рисунок 1.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени крыс (а), мышей (б), кроликов (в), инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\Phi_n$ , при добавлении 250 нмоль на 1 мг белка  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) в отсутствии (сплошная линия) и присутствии (пунктирная линия) 1 мкМ ЦсА. Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Другие добавки: 5 мкг/мл аламетицин (Ала). Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл.



**Рисунок 2.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени СК (а, г) и ЗБ (б, д) цесарок и голубей (в, е) и инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\Phi_n$ , при добавлении 250 нмоль на 1 мг белка  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ), 875 нмоль на 1 мг белка  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$  875) и 1000 нмоль на 1 мг белка  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$  1000) в отсутствии (сплошная линия) и присутствии (пунктирная линия) 1 мкМ ЦсА. Другие добавки: 5 мкг/мл аламетицин (Ала). Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы» и на подписи к рис. 1. Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл.

**Таблица 3.** Сравнение скорости и амплитуды набухания митохондрий печени крыс, мышей и кроликов в условиях индукции  $\text{Ca}^{2+}/\Phi_{\text{H}}$  -индуцируемой неспецифической проницаемости внутренней мембраны.

Животные	Скорость Набухания	Амплитуда набухания	Амплитуда набухания в присутствии аламетицина
Крысы	$0,134 \pm 0,009$	$0,542 \pm 0,006$	$0,619 \pm 0,002$
Мыши	$0,126 \pm 0,002$	$0,527 \pm 0,008$	$0,663 \pm 0,010^*$
Кролики	$0,177 \pm 0,004^*$	$0,480 \pm 0,005^{**}$	$0,605 \pm 0,003^*$
Цесарки СКП	$0,042 \pm 0,008^{**}$	$0,358 \pm 0,016^{**}$	$0,684 \pm 0,016^{**}$
Цесарки ЗБП	$0,056 \pm 0,007^{**}$	$0,419 \pm 0,016^{**}$	$0,692 \pm 0,024^{**}$
Голуби	$0,012 \pm 0,001^{**}$	$0,179 \pm 0,005^{**}$	$0,409 \pm 0,016^{**}$

*Примечание.* Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Количество добавляемого  $\text{CaCl}_2$  к суспензии митохондрий печени указанных животных как в подписях к рис. 1 и 2. Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл. Добавки, как в подписи к рис.1 и 2. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 4$ ). Различия между показателями митохондрий контрольной группы животных (крысы) и показателями митохондрий указанных групп животных статистически значимы, \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ .

Для митохондрий печени крыс показано, что импульсное добавление к суспензии 160 нмоль на 1 мг белка  $\text{CaCl}_2$  в отсутствие ЦсА вызывает необратимое снижение  $\Delta\psi$ . Для митохондрий печени мышей и кроликов аналогичные концентрации  $\text{CaCl}_2$  составляют в среднем 100 нмоль и 40 нмоль соответственно. В присутствии ЦсА концентрация  $\text{CaCl}_2$ , необходимая для индукции необратимого падения  $\Delta\psi$  возрастает в 6-8 раз.

Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , вызывающая полное падение мембранного потенциала в митохондриях печени птиц, существенно выше аналогичной концентрации для митохондрий печени исследуемых нами млекопитающих и составляет в среднем 930 нмоль  $\text{CaCl}_2$  на 1 мг белка. ЦсА повышает концентрацию  $\text{CaCl}_2$  необходимую для необратимого снижения  $\Delta\psi$  до 1330 нмоль  $\text{CaCl}_2$  на 1 мг белка. Митохондрии печени голубей практически нечувствительны к добавкам ионов кальция – даже при добавлении значительного количества  $\text{CaCl}_2$  не происходит видимого изменения  $\Delta\psi$ .

### **3.3. Изучение кинетики поглощения $\text{Ca}^{2+}$ митохондриями печени млекопитающих и птиц разных видов при индукции ЦсА-чувствительной поры. Кальциевая емкость митохондрий.**

В отсутствие ЦсА митохондрии печени крыс способны полностью поглощать  $\text{Ca}^{2+}$  при условии пятикратного добавления  $\text{CaCl}_2$  по 13,3 нмоль на 1 мг белка и удерживать его в матриксе как минимум 10 мин (рис.3, а). В этом случае только после

шестой добавки  $\text{CaCl}_2$  наблюдается выход  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий. Выход  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий печени мышей и кроликов наблюдается соответственно после пятой и третьей добавок  $\text{CaCl}_2$  в том же количестве (рис.3, б, в). В отличие от митохондрий печени млекопитающих, митохондрии печени цесарок СКП, также инкубируемые в сахарозной среде с  $\Phi_n$ , способны даже в отсутствие ЦсА поглощать и удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  при условии шестикратного добавления  $\text{CaCl}_2$  по 133 нмоль на 1 мг белка. Аналогичные свойства были обнаружены и у митохондрий печени цесарок ЗБП. Для митохондрий печени голубей было отмечено, что они практически не способны поглощать и удерживать даже относительно небольшие добавки  $\text{CaCl}_2$  (рис.3, г-е).

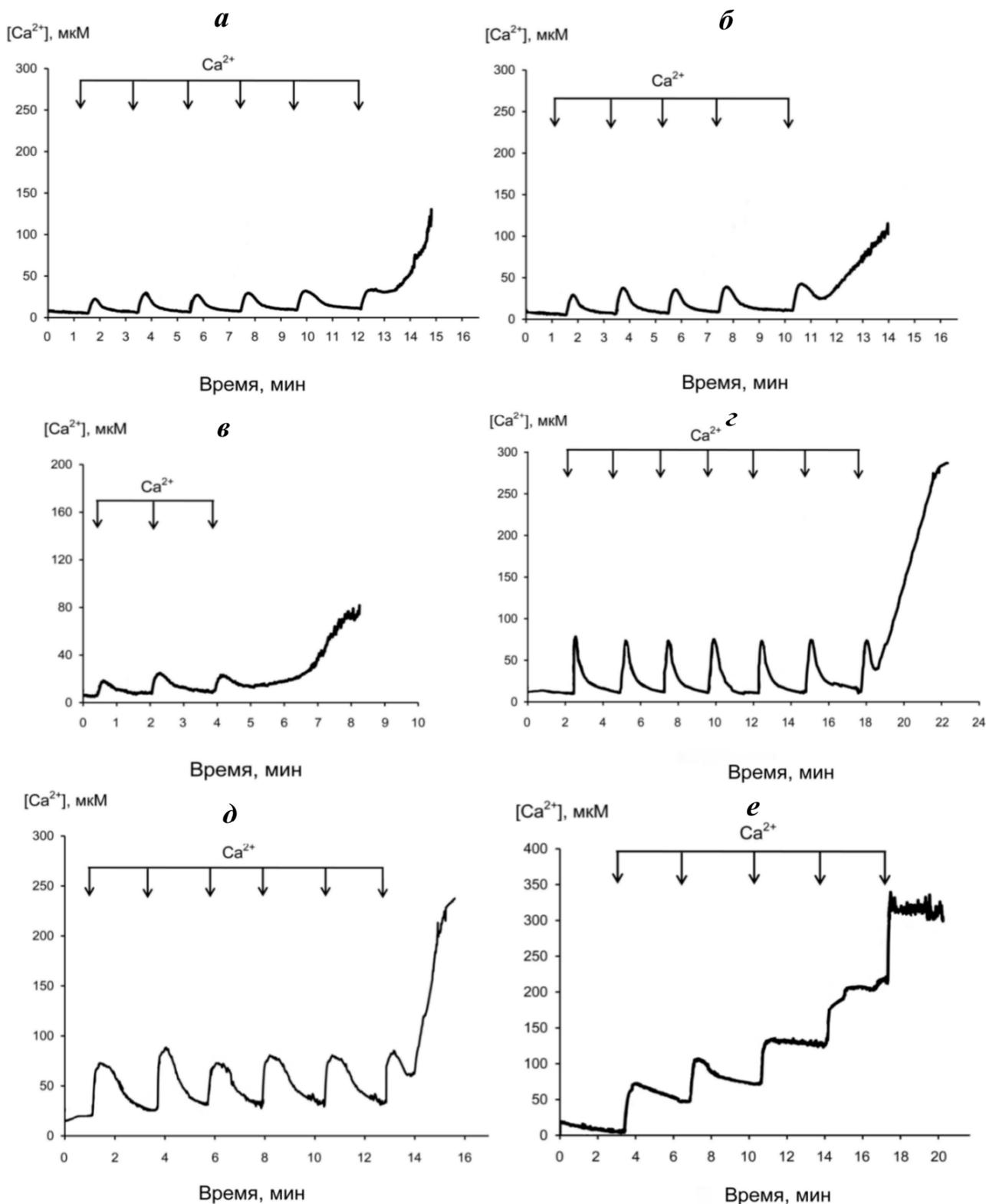
Способность  $\text{Ca}^{2+}$  индуцировать открытие поры в митохондриях можно выразить количественно как кальциевая емкость (КЕ) митохондрий, другими словами, то максимальное количество  $\text{Ca}^{2+}$ , которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры (Basso et al., 2008; Varanyuwatana, Halestrap, 2012; Giorgio et al., 2013). Исходя из кинетики поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями исследуемых животных были получены значения их КЕ, представленные в сводной таблице 4. Исключение составляют голуби, митохондрии которых, как упоминалось выше, практически не поглощают ионы кальция.

**Таблица 4.** Сравнение кальциевой емкости (нмоль  $\text{CaCl}_2$  на 1 мг белка) митохондрий печени различных животных в отсутствии и присутствии добавок.

Животные	Без добавок	ЦсА 1 мкМ	ТБГ 200 мкМ
Крысы ( $n = 9$ )	$70 \pm 5$	$933 \pm 51$	$30 \pm 3$
Мыши ( $n = 9$ )	$57 \pm 7$	$734 \pm 33$	$25 \pm 2$
Кролики ( $n = 6$ )	$38 \pm 5^*$	$789 \pm 52$	$8.9 \pm 0.2^*$
Цесарки СКП ( $n = 6$ )	$844 \pm 46^*$	$1400 \pm 67^*$	$545 \pm 48^*$
Цесарки ЗБП ( $n = 6$ )	$793 \pm 35^*$	$1289 \pm 77^*$	$491 \pm 33^*$

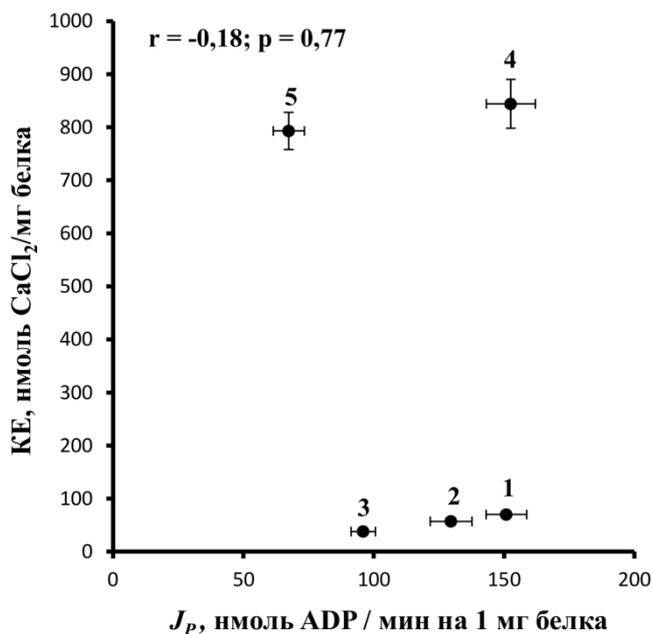
*Примечание.* Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия между опытом (присутствие ТБГ или ЦсА) и контролем (их отсутствие) статистически значимы,  $p < 0,01$ . \*Выявлены статистически значимые различия между показателями митохондрий указанных животных и аналогичными показателями митохондрий крыс и мышей,  $p < 0,05$ .

Полученные данные свидетельствуют о том, что митохондрии печени цесарок и голубей по сравнению с митохондриями печени указанных млекопитающих в присутствии  $\Phi_n$  обладают значительно более высокой резистентностью по отношению к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как к индуктору ЦсА-чувствительной поры. Более высокая резистентность к индукторам ЦсА-чувствительной поры митохондрий печени голубей может быть обусловлена их неспособностью захватывать и удерживать в матриксе  $\text{Ca}^{2+}$  в необходимом для индукции поры количестве.



**Рисунок 3.** Транспорт  $Ca^{2+}$  в митохондриях печени крыс (а), мышей (б), кроликов (в), цесарок СКП (г) и ЗБП (д), голубей (е), инкубируемых в присутствии 1 мМ  $P_i$ . Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки: **а-в:**  $CaCl_2$  по 13,3 нмоль на 1 мг белка ( $Ca^{2+}$ ); **г-д:**  $CaCl_2$  по 133 нмоль на 1 мг белка ( $Ca^{2+}$ ); **е:**  $CaCl_2$  по 66 нмоль на 1 мг белка ( $Ca^{2+}$ ).

Для выяснения взаимосвязи между резистентностью митохондрий печени указанных животных к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры и эффективностью окислительного синтеза АТФ применяли такие величины, как КЕ митохондрий, скорость окислительного синтеза АТФ ( $J_p$ ) и коэффициент  $P_c$ , представляющий собой отношение  $J_p$  и  $J_4$ .



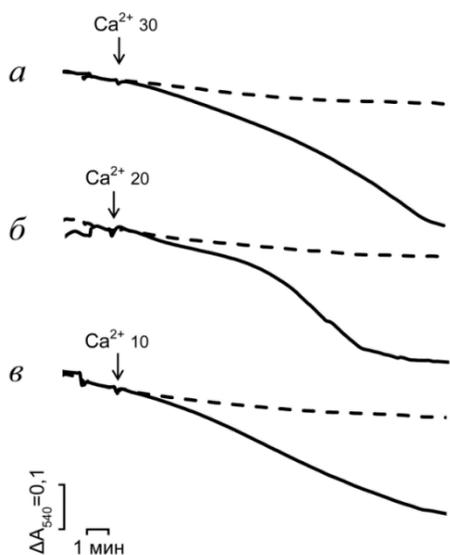
**Рисунок 4.** Отсутствие зависимости величины кальциевой емкости (КЕ) от скорости синтеза АТФ ( $J_p$ ) митохондрий печени животных разных видов. Каждая точка на графике – средние значения величин КЕ и  $J_p$  митохондрий печени одного вида животных  $\pm$  стандартная ошибка среднего. На графике цифрами обозначены митохондрии печени: крыс (1), мышей (2), кроликов (3), цесарок СКП (4), цесарок ЗБП (5).

Проведенные исследования не выявили связи между КЕ и скоростью синтеза АТФ ( $J_p$ ) для митохондрий печени крыс, мышей, кроликов, цесарок СКП и цесарок ЗБП в отсутствии (рис. 4) и в присутствии ЦсА ( $r=-0,04$ ;  $p=0,95$ ). Также было показано отсутствие корреляции между КЕ и коэффициентом  $P_c$  для митохондрий печени указанных животных как в отсутствии ЦсА ( $r=-0,47$ ;  $p=0,43$ ), так и в присутствии его ( $r=-0,33$ ;  $p=0,59$ ). Таким образом, в митохондриях печени животных разных видов различие в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры не связано с особенностями окислительного синтеза АТФ.

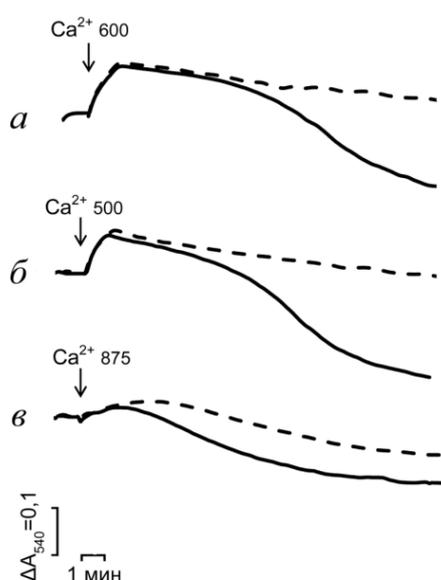
### 3.4. Влияние окисляющего агента ТБГ на индукцию $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях животных разных видов.

Как показано на рис. 5, при снижении количества добавляемого к митохондриям печени крыс, мышей и кроликов  $\text{CaCl}_2$  до 30, 20 и 10 нмоль на 1 мг белка соответственно не наблюдается набухания данных органелл. При тех же условиях предварительная инкубация митохондрий этих животных в присутствии окисляющего агента ТБГ и в отсутствии ЦсА приводит к их высокоамплитудному набуханию. Аналогичное влияние ТБГ оказывает и на митохондрии печени птиц. Показано, что инкубация митохондрий печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей с

ТБГ в отсутствие ЦсА также приводит к их высокоамплитудному набуханию при меньших количествах  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с контролем (рис. 6).



**Рисунок 5.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени крыс (а), мышей (б), кроликов (в), инкубируемых в присутствии (сплошная линия) и отсутствии 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка (пунктирная линия), при добавлении  $\text{CaCl}_2$ . Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Количество добавляемого  $\text{CaCl}_2$  (в нмоль на 1 мг белка) указано на рисунке. Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл.



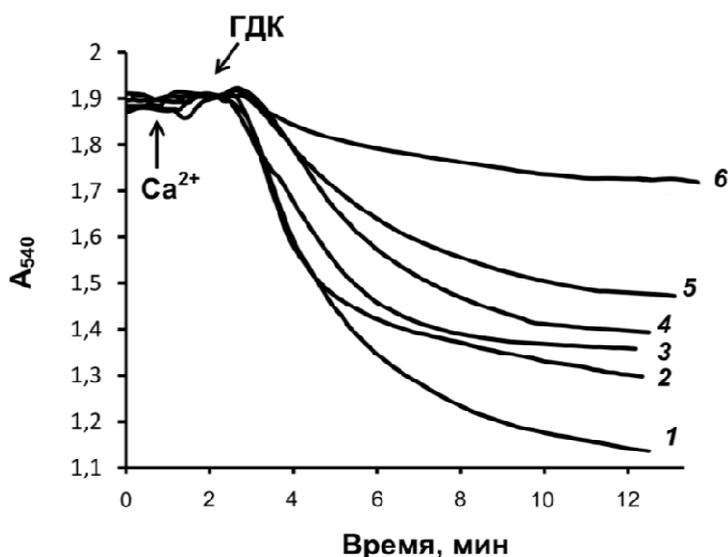
**Рисунок 6.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени цесарок СКП (а), цесарок ЗБП (б) и голубей (в), инкубируемых в присутствии (сплошная линия) и отсутствии 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка (пунктирная линия), при добавлении  $\text{CaCl}_2$ . Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Количество добавляемого  $\text{CaCl}_2$  (нмоль на 1 мг белка) указано на рисунке. Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл.

В условиях индуцированного ТБГ окислительного стресса наблюдается снижение КЕ митохондрий печени животных (табл. 4). Наибольший эффект ТБГ наблюдается в митохондриях печени кролика (снижение КЕ на 77%), в меньшей степени – в митохондриях печени мышей и крыс (снижение КЕ на 56 и 57% соответственно). В то время как в митохондриях печени цесарок СКП и ЗБП ТБГ менее эффективен (снижение КЕ на 35 и 38% соответственно). Эти и приведенные выше данные свидетельствуют о том, что по сравнению с митохондриями печени крыс и мышей митохондрии печени кроликов являются менее резистентными к действию изучаемых нами индукторов поры, в то время как, митохондрии печени

цесарок существенно более устойчивы к действию окисляющего агента ТБГ как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры. Как уже отмечалось выше, определить КЕ для митохондрий печени голубей не представляется возможным. Однако, исходя из данных по набуханию митохондрий печени этих птиц (рис. 6) можно также говорить об их высокой устойчивости к действию окисляющего агента ТБГ как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры.

### 3.5. Действие ГДК как индуктора $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени указанных млекопитающих и птиц.

Как показано на рис. 7, внесение к митохондриям печени крыс, мышей и кроликов последовательно  $\text{CaCl}_2$  (200 нмоль на 1 мг белка) и ГДК (20 нмоль на 1 мг белка) в присутствии ЦсА приводит к снижению оптической плотности суспензии, что свидетельствует о высокоамплитудном набухании этих органелл при формировании ЦсА-нечувствительной пермеабилзации (Дубинин и др., 2013; Dubinin et al., 2014). При аналогичных экспериментальных условиях внесение к митохондриям печени цесарок и голубей последовательно  $\text{CaCl}_2$  и ГДК также приводит к снижению оптической плотности суспензии (рис. 6). В контрольных экспериментах изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени изученных животных не наблюдается при добавлении только  $\text{CaCl}_2$  или только ГДК в указанных выше концентрациях. Митохондрии печени птиц характеризуются меньшей скоростью и амплитудой набухания, по сравнению с митохондриями печени млекопитающих (табл. 5).



**Рисунок 7.** Сравнение кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени кроликов (1), крыс (2), мышей (3), цесарок СКП (4) и ЗБП (5), голубей (6). Добавки: 200 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ ; 20 мкМ ГДК. Условия эксперимента и состав среды инкубации (без  $\text{F}_n$ ) приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл.

**Таблица 5.** Сравнение скорости и амплитуды набухания митохондрий печени исследуемых животных в условиях индукции  $\text{Ca}^{2+}$ /ГДК-индуцируемой неспецифической проницаемости внутренней мембраны.

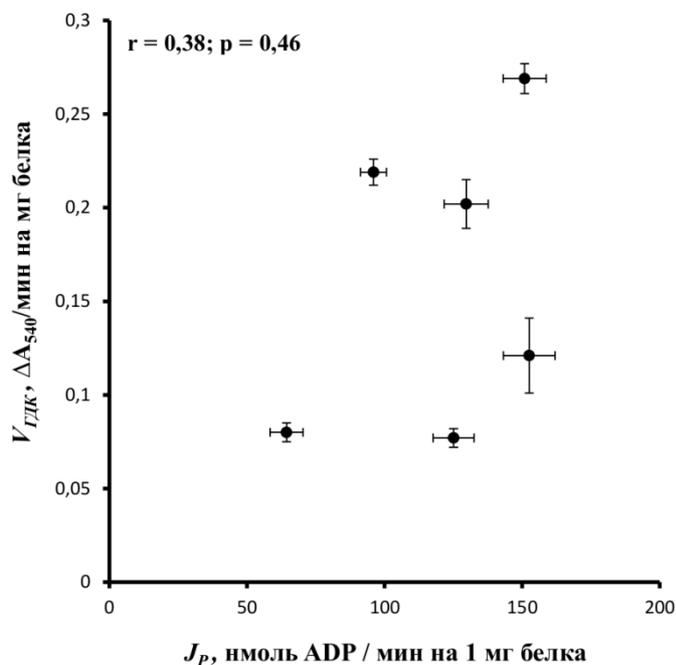
Животные	Скорость Набухания	Амплитуда набухания
Крысы (n = 9)	0,269±0,008	0,828±0,022
Мыши (n = 9)	0,202±0,013*	0,808±0,013
Кролики (n = 6)	0,219±0,007*	1,097±0,015*
Цесарки СКП (n = 6)	0,121±0,020*	0,528±0,053*
Цесарки ЗБП (n = 6)	0,080±0,005*	0,405±0,017*
Голуби (n = 4)	0,077±0,005*	0,192±0,011*

*Примечание.* Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл. Добавки, как в подписи к рис. 7. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. \*Выявлены статистически значимые различия между показателями митохондрий указанных животных и аналогичными показателями митохондрий крыс,  $p < 0,001$ .

Добавление ГДК к суспензии митохондрий печени указанных животных, предварительно нагруженных  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии ЦсА, во всех случаях приводит к быстрому увеличению концентрации этих ионов, что свидетельствует о выходе их из матрикса в среду инкубации. При этих условиях добавление ГДК после внесения  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к быстрому и полному падению  $\Delta\psi$  митохондрий печени всех животных. Полученные данные свидетельствуют о том, что в митохондриях печени птиц ГДК так же, как в митохондриях печени млекопитающих индуцирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую ЦсА-нечувствительную пермеабиллизацию внутренней мембраны, однако, с меньшей эффективностью.

Проведенные исследования не выявили связи между скоростью (рис. 8) и амплитудой ( $r=0,06$ ;  $p=0,90$ ) ГДК/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной проницаемости внутренней мембраны и скоростью синтеза АТФ ( $J_p$ ) для митохондрий печени крыс, мышей, кроликов, цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей. Кроме того было показано отсутствие связи ( $r=0,51$ ;  $p=0,3$ ) между скоростью набухания и коэффициентом  $P_c$  для митохондрий указанных животных. Также установлено отсутствие связи ( $r=0,48$ ;  $p=0,34$ ) между амплитудой набухания и коэффициентом  $P_c$  для митохондрий печени этих животных.

Следовательно, в митохондриях печени животных указанных видов различие в резистентности к действию ГДК как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной пермеабиллизации внутренней мембраны не связано с особенностями окислительного синтеза АТФ.



**Рисунок 8.** Отсутствие зависимости скорости ( $V_{ГДК}$ ) набухания митохондрий в присутствии 200 мкМ  $Ca^{2+}$  и 20 мкМ ГДК от величины скорости синтеза АТФ ( $J_p$ ) митохондрий печени животных разных видов. Каждая точка на графике – средние значения величин  $V_{ГДК}$  и  $J_p$  митохондрий печени одного вида животных  $\pm$  стандартная ошибка среднего. На графике цифрами обозначены митохондрии печени: крыс (1), мышей (2), кроликов (3), цесарок СК (4), цесарок ЗБ (5), голубей (6).

## ВЫВОДЫ

1. Митохондрии печени крыс, голубей и цесарок СКП не отличаются по показателям дыхания и окислительного синтеза АТФ. Митохондрии печени мышей и цесарок ЗБП отличаются от митохондрий этих животных более высокой скоростью дыхания в состоянии 4 и меньшей степенью сопряжения дыхания и окислительного синтеза АТФ, а митохондрии печени кроликов – меньшими скоростями дыхания, но большей степенью сопряжения дыхания и окислительного синтеза АТФ.

2. Для митохондрий печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей характерен ЦсА-чувствительный механизм индукции  $Ca^{2+}$ -зависимой поры, как в митохондриях печени млекопитающих. Для индукции такой поры в митохондриях печени этих птиц необходимы более высокие концентрации  $Ca^{2+}$ , чем в митохондриях печени млекопитающих.

3. Митохондрии печени млекопитающих и цесарок, но не голубей, в присутствии  $\Phi_n$  способны эффективно поглощать и удерживать  $Ca^{2+}$  в матриксе. КЕ митохондрий цесарок существенно больше, чем митохондрий млекопитающих. Различие в резистентности к действию  $Ca^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры митохондрий печени указанных животных не связано с особенностями окислительного синтеза АТФ.

4. В присутствии ТБГ индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени указанных животных наблюдается при добавлении  $\text{CaCl}_2$  в существенно меньших количествах, чем в отсутствие этого окисляющего агента. Наибольший эффект ТБГ наблюдается в митохондриях печени кролика, в то время как в митохондриях печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей этот окисляющий агент наименее эффективен.

5. В митохондриях печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей ГДК индуцирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую ЦсА-нечувствительную пермеабиллизацию внутренней мембраны, но с меньшей эффективностью чем в митохондриях печени млекопитающих. Различие в резистентности к действию ГДК митохондрий печени указанных животных не связано с особенностями окислительного синтеза АТФ.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:**

1. Дубинин М.В., **Ведерников А.А.**, Хорошавина Е.И., Самарцев В.Н. Индукция  $\alpha, \omega$ -гексадекандиоловой кислотой кальций-зависимой циклоспорин А-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени и освобождения цитохрома С в средах различной ионной силы // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – Вып. 6. – С. 726-733.

2. Самарцев В.Н., **Ведерников А.А.**, Дубинин М.В., Забиякин В.А. Сравнительное исследование свободного окисления в митохондриях печени «дикой» серо-крапчатой популяции и продуктивных домашних пород цесарки *Numida meleagris* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2014. – Т. 50. – № 2. – С. 160–162.

3. **Vedernikov A.A.**, Dubinin M.V., Zabiakin V.A., Samartsev V.N.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent nonspecific permeability of the inner membrane of liver mitochondria in the guinea fowl (*Numida meleagris*) // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 2015. – V. 47. – №. 3. –P. 235–242.

4. Дубинин М.В., **Ведерников А.А.**, Хорошавина Е.И., Адакеева С.И., Самарцев В.Н. Индукция кальций-зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны в митохондриях печени млекопитающих и птиц: сравнительное исследование // Биологические мембраны. – 2015. – Т. 32. – № 5–6. – С. 328–337.

## **Свидетельства о государственной регистрации программ для электронных вычислительных машин**

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2015619788. Приложение для обработки данных, передаваемых фотометром КФК-3-ЗОМЗ / Юсупов Н.В., Бакланова Н.Б., Виноградов В.О., **Ведерников А.А.**, Дубинин М.В., Самарцев В.Н.; заявитель и правообладатель ФГБОУ ВПО «Марийский государственный университет». – Заявка № 2015616662 от 20.07.2015; Зарегистр. в реестре программ для ЭВМ 15.09.2015.

## **Статьи, тезисы докладов региональных, всероссийских и международных конференций**

1. **Ведерников А.А.**, Дубинин М.В., Самарцев В.Н., Хорошавина Е.И., Трубянов А.Б. Сравнение функционального состояния митохондрий печени различных популяций цесарки *Numida meleagris* L. по признаку свободного окисления // Принципы и способы сохранения биоразнообразия: материалы V Международной научной конференции в 2 ч. – Мар. гос. ун-т. – Йошкар-Ола, 2013. – Часть II. – с. 18–22.

2. **Ведерников А.А.**, Волкова В.В., Дубинин М.В., Хорошавина Е.И., Самарцев В.Н., Трубянов А.Б. Особенности свободного окисления в митохондриях печени и скелетных мышц различных популяций цесарки // Биология – наука XXI века. 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 21 – 26 апреля 2013 г.). Сборник тезисов. – Пущино, 2013. – С. 403.

3. Дубинин М.В., **Ведерников А.А.**, Адакеева С.И., Хорошавина Е.И., Самарцев В.Н. Физиологические модуляторы циклоспорин А-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени индуцированной ионами кальция и  $\alpha,\omega$ -гексадекандиолевой кислотой // Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 27 – 30 мая 2013 г.). Сборник статей. – Пущино, 2013. – С. 666–670.

4. Dubinin M., Khoroshavina E., **Vedernikov A.**, Adakeeva S., Samartsev V. Induction of non-selective permeability of the inner membrane of rat liver mitochondria by  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic acids // FEBS J. – 2013. – V. 280. – Supplement 1. – P. 252-253.

5. Dubinin M., **Vedernikov A.**, Khoroshavina E., Adakeeva S., Samartsev V. The effect of ionic strength of incubation medium on the cytochrome c release from liver mitochondria under conditions of the pore opening by  $\alpha,\omega$ -hexadecanedioic acids // FEBS J. – 2013. – V. 280. – Supplement 1. – P. 255.

6. Самарцев В.Н., Дубинин М.В., **Ведерников А.А.**, Адакеева С.И., Хорошавина Е.И. Взаимодействие свободных жирных кислот с митохондриями печени животных: механизмы и физиологическое значение // Принципы и способы сохранения биоразнообразия: материалы V Международной научной конференции в 2 ч. – Мар. гос. ун-т. – Йошкар-Ола, 2013. – Часть II. – с. 47–52.

7. **Vedernikov A.A.**, Dubinin M.V., Zabiyaikin V.A., Adakeeva S.I., Samartsev V.N. The study of calcium capacity and induction of  $Ca^{2+}$ -dependent nonspecific permeability of the inner membrane in the liver mitochondria of guinea fowl // FEBS J. – 2014. – V. 281 (Suppl. 1). – P. 367.

8. Дубинин М.В., Хорошавина Е.И., **Ведерников А.А.**, Адакеева С.И., Юсупов Н.В., Самарцев В.Н. Влияние малоната и неорганического фосфата на циклоспорин А-нечувствительную  $Ca^{2+}$ -зависимую неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени, индуцированную  $\alpha,\omega$ -диоловыми кислотами // Международная конференция молодых ученых. 27-29 октября 2014 г. Экспериментальная и теоретическая биофизика `14. Сборник тезисов. – 2014. – С. 154.

9. **Ведерников А.А.**, Дубинин М.В., Адакеева С.И., Самарцев В.Н. Особенности индукции  $Ca^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени цесарок *Numida meleagris* L. // Биология – наука XXI века. 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 21 – 25 апреля 2014 г.). Сборник тезисов. – Пущино, 2014. – С. 85.

10. Дубинин М.В., Хорошавина Е.И., **Ведерников А.А.**, Белослудцев К.Н., Самарцев В.Н. Пальмитиновая кислота и продукты её  $\omega$ -окисления как индукторы  $Ca^{2+}$ -зависимой неспецифической пермеабилитации митохондрий и липосом // Биология – наука XXI века. 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20 – 24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. Пущино, 2015. – С. 91–92.

11. Дубинин М.В., **Ведерников А.А.**, Хорошавина Е.И., Адакеева С.И., Самарцев В.Н. Индукция кальций-зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны в митохондриях печени млекопитающих и птиц: сравнительное исследование // Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 25 – 28 мая 2015 г. Сборник статей. Том. 2. Пущино, 2015. – С. 451–455.

12. **Ведерников А.А., Дубинин М.В., Самарцев В.Н.**  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени птиц // Биосистемы: организация, поведение и управление: Тезисы докладов 69-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 27–29 апреля 2016 г.). Н. Новгород, Университет Лобачевского. – 2016. – С. 26.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозин-5'-дифосфат;

АТФ – аденозин-5'-трифосфат;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ГДК -  $\alpha,\omega$ - гексадекандикарбоновая кислота;

ДНФ – 2,4-динитрофенол;

МОПС - 3-[N-Морфолино]пропансульфоная кислота, буфер;

ПМПЖ – потенциальная максимальная продолжительность жизни;

РК – рутениевый красный

ТБГ – *трет*-бутилгидропероксид;

Трис-ОН – трис-(гидроксиметил)аминометан;

ТФФ<sup>+</sup> – катион тетрафенилфосфония;

Ф<sub>н</sub> – фосфат неорганический;

ЦсА – циклоспорин А.

ЭГТА – этиленгликоль - бис - (2-аминоэтиловый эфир) - N, N, N', N' - тетрауксусная кислота;

$\Delta\Psi$  – разность электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий.