

## СИГНАЛ ГИПОКСИИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНДУКТОР ОБРАЗОВАНИЯ СУПЕРКОМПЛЕКСА СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА

© 2018 г. И.М. Бывшев\*, Т.Н. Муругова\* \*\*, А.И. Иванов\* \*\* \*\*\*,  
А.И. Куклин\* \*\*, И.М. Вангели\*\*\*\*, В.В. Теплова\*\*\*\*\*, В.И. Попов\*\*\*\*\*,  
С.В. Нестеров\* \*\*\*\*\*, Л.С. Ягужинский\* \*\*\*\* \*\*\*\*\*

\*Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний Московского физико-технического института, 141701, Москва, Долгопрудный, Институтский пер., 9

\*\*Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка Объединенного института ядерных исследований, 141980, Дубна Московской области, ул. Жолио-Кюри, 6

\*\*\*Институт проблем безопасности атомных энергетических станций Национальной академии наук Украины, 03028, Киев, ул. Лысогорская, 12, Украина

\*\*\*\*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1/40

\*\*\*\*\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пуцзино Московской области, ул. Институтская, 3

\*\*\*\*\*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пуцзино Московской области, ул. Институтская, 3

\*\*\*\*\*Научно-исследовательский институт цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, Москва, ул. 6-я Радиальная, 24/14

E-mail: yag@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 22.05.18 г.

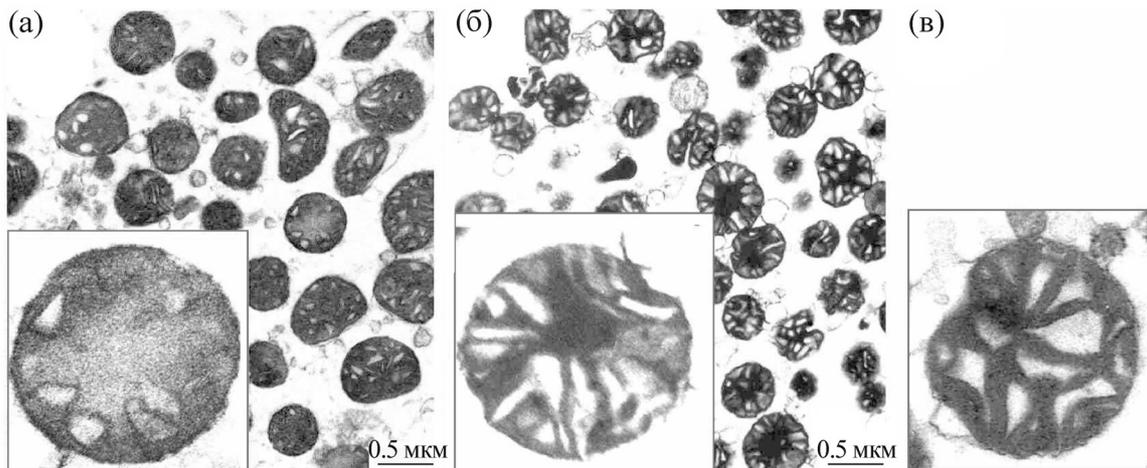
Впервые установлена корреляционная связь между переходом системы окислительного фосфорилирования в режим суперкомплекса и изменением функционального состояния энергетики митохондрий при переходе от аэробного дыхания к режиму гипоксии. Эффект наблюдался двумя разными способами на митохондриях печени и сердца. Обнаружено в условиях перехода окислительного фосфорилирования в режим суперкомплекса методами малоуглового рассеяния нейтронов и электронной микроскопии присутствие высокоупорядоченных структур в мембранах митохондрий сердца в условиях гипоксии. Проведено сопоставление структурных параметров крист, рассчитанных из данных малоуглового рассеяния нейтронов и электронной микроскопии. Результаты измерений двумя методами совпадают. Путем последовательного воздействия сигналов гипоксии и слабого осмотического стресса доказано качественное различие этих сигналов. Показано, что последовательное воздействие двух сигналов – вначале гипоксии, затем слабого осмотического стресса – приводит к нарушению интактности структуры митохондрий. Эффект регистрируется методами малоуглового рассеяния нейтронов и электронной микроскопии. Тем самым было показано существование двух качественно различных сигналов (гипоксии и осмотического стресса), которые изменяют систему окислительного фосфорилирования, переводя ее в режим суперкомплекса.

*Ключевые слова:* митохондрия, система окислительного фосфорилирования, суперкомплекс, система объемной регуляции, гипоксия, ультраструктура.

DOI: 10.1134/S0006302918040087

В настоящей работе на сердечных митохондриях неожиданно было обнаружено, что сигнал гипоксии индуцирует функциональную перестройку системы окислительного фосфорили-

Сокращения: ОКСФОС – окислительное фосфорилирование, ТАН – транслокатор адениновых нуклеотидов, МУРН – малоугловое рассеяние нейтронов, ЭМ – электронная микроскопия, КАТР – карбоксиатрактилозид, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, СМЧ – субмитохондриальные частицы.



**Рис. 1.** Эффект формирования ультраструктуры внутренней мембраны в условиях глубокой гипоксии: (а) – «бескristные» митохондрии печени, полученные в изотонической среде в условиях гипоксии, зафиксированные также в гипоксических условиях в атмосфере азота сразу после выделения; (б) – вторая половина того же препарата митохондрий после инкубации в атмосфере азота через 2,5 ч при температуре 1–3°C; (в) – электронная микроскопия митохондрий печени после продолжительной инкубации в условиях гипоксии густой суспензии митохондрий без специальной защиты от воздуха.

рования (ОКСФОС), переводя эту систему в режим работы суперкомплекса.

Ранее [1] нами было подробно исследован эффект слабого осмотического стресса на функциональное состояние системы ОКСФОС. При этом было показано, что слабый осмотический стресс, индуцированный снижением тоничности среды инкубации с 600 до 120 мОсм, индуцирует переход системы ОКСФОС в режим работы суперкомплекса. В настоящей работе мы обнаружили, что после воздействия гипоксии (гипоксического стресса) в митохондриях наблюдается функциональное состояние ОКСФОС, которое соответствует работе этой системы в режиме суперкомплекса. В этой серии экспериментов было показано, что диссоциированная форма ОКСФОС устойчиво формируется в гипертонии. При нормальных условиях (300 мОсм) состояние системы неустойчиво; результаты измерений, как правило, совпадают с гипотонией (120 мОсм).

Более подробное исследование функционального состояния ОКСФОС [2] показало, что транслокатор адениновых нуклеотидов (ТАН), контролирующей работу АТФ-синтазной системы при гипотонии, отслеживает состояние всей системы: в условиях перехода ОКСФОС в режим суперкомплекса ТАН функционирует как димер, а при гипертонии – как мономер. При этом было обнаружено, что в изотонических условиях (300 мОсм) ТАН в свежее выделенных митохондриях печени функционирует, как мономер. На этой модели удалось показать, что в процессе хранения препарата митохонд-

рий в форме густой суспензии в течение одного часа происходит неконтролируемый переход ТАН в режим работы димера, как и при снижении тоничности. Это явилось указанием на возможность перехода ОКСФОС в режим работы суперкомплекса под действием гипоксии, которая должна возникать в условиях хранения в наших экспериментах в суспензии митохондрий в результате поглощения кислорода митохондриями.

Цель настоящей работы – получение экспериментального обоснования эффекта перехода системы ОКСФОС в митохондриях сердца в режим работы суперкомплекса. В задачу работы входило выяснение физиологической значимости перехода системы ОКСФОС в режим суперкомплекса. В работе были использованы методы малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН), электронной микроскопии (ЭМ) и функциональные исследования.

Проведенное нами на митохондриях печени специальное предварительное исследование изменений, которые происходят в митохондриях в гипоксии (аноксии в атмосфере азота), показало [1], что в таких условиях при температуре 1–3°C в течение двух часов произошло глубокое изменение ультраструктуры внутренней мембраны. Резко увеличился объем межмембранного пространства митохондрий и во внутренней мембране митохондрий сформировались узкие кристоподобные электроноплотные кластеры (рис. 1а,б). Ультраструктура митохондрий в глубокой гипоксии оказалось неотличима от ультраструктуры митохондрий, наблюдаемой в

густой суспензии митохондрий без специальных условий, ограничивающих поступление кислорода в инкубируемые митохондрии. Сопоставление результатов (рис. 1) показало, что условия, возникающие при стандартных условиях хранения препаратов митохондрий в процессе опыта, индуцируют в митохондриях гипоксический стресс, который переводит систему ОКСФОС в режим работы суперкомплекса (по критерию Баума).

В настоящей работе на митохондриях сердца исследованы изменения ультраструктуры в условиях гипоксии. Методами МУРН и ЭМ было обнаружено присутствие упорядоченных структур в составе крист митохондрий. Исследование функциональных параметров системы ОКСФОС методом двойного ингибиторного анализа показало, что система ОКСФОС митохондрий сердца после длительного воздействия гипоксии функционирует в режиме суперкомплекса.

Полученные результаты позволили нам считать, что сигнал гипоксии является вторым фактором, который, так же как и слабый осмотический стресс, стабилизирует ОКСФОС в режиме работы суперкомплекса.

В настоящей работе впервые принята попытка индуцировать перестройку ультраструктуры мембран суперкомплекса двумя последовательными сигналами (осмотическим и гипоксическим стрессом), каждый из которых способен индуцировать переход функционирования ОКСФОС в режим суперкомплекса. Полученные результаты показали, что сигналы различны и при последовательном воздействии этих сигналов возникают очень глубокие перестройки структуры внутренней мембраны, при которой внутренняя мембрана трансформируется в двухфазную систему.

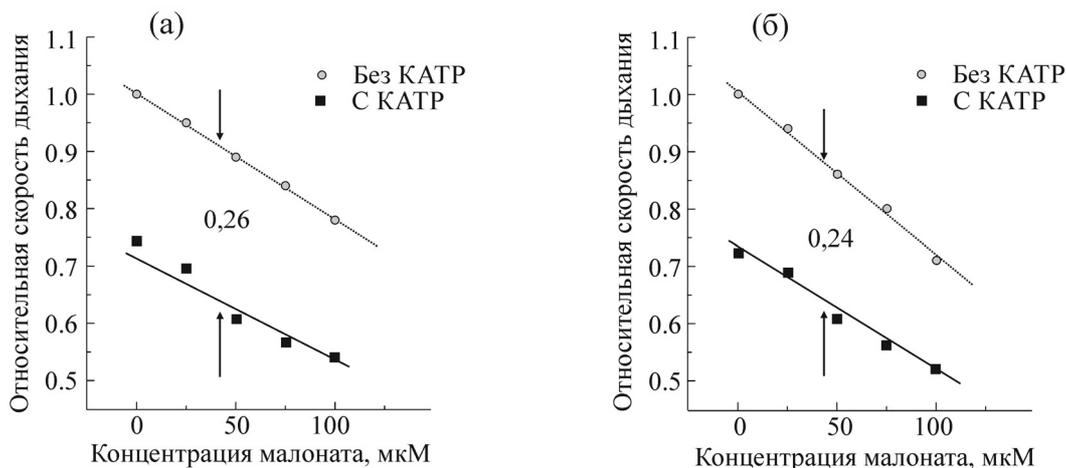
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение митохондрий печени крыс.** Митохондрии выделяли из печени взрослых крыс породы Wistar по методике дифференциального центрифугирования [3]. После декапитации печень быстро вырезали и помещали в среду объемом 20 мл, содержащую 210 мМ Д-маннитола, 40 мМ сахарозы, 10 мМ НЕРЕС, 0,5 мМ ЭДТА, рН 7,5. Все последующие операции проводили на льду или при 4°C. Печень продавливали и затем гомогенизировали в 25 мл холодной среды выделения (210 мМ Д-маннитола, 40 мМ сахарозы, 10 мМ НЕРЕС, 0,5 мМ ЭДТА, 0,05% бычьего сывороточного альбумина, рН 7,5). Гомогенат доводили до 80 мл средой инкубации и затем центрифугировали 8 мин

при 500 g. Затем полученный супернатант центрифугировали 10 мин при 12000 g. Осадок ресуспендировали в 4 мл среды промывки (того же состава, что и среда выделения) и медленно гомогенизировали за два пассажа в маленьком гомогенизаторе. Гомогенат доводили до 80 мл холодной средой промывки и центрифугировали 10 мин при 12000 g. Осадок ресуспендировали в 4 мл среды промывки и медленно гомогенизировали за один пассаж в маленьком гомогенизаторе. Гомогенат доводили до 80 мл холодной средой промывки и центрифугировали 10 мин при 12000 g. Осадок собирали и ресуспендировали в среде промывки до конечного объема приблизительно 0,3 мл. Концентрацию митохондриального белка определяли биуретовым методом [4]. Она составляла 70–180 мг/мл.

**Выделение митохондрий сердца крыс.** Митохондрии выделяли из сердца взрослых крыс породы Wistar по методике дифференциального центрифугирования. Обычно для одного выделения использовали двух–трех крыс. После декапитации сердце быстро вырезали, надрезали, промакивали для удаления крови и помещали в среду выделения объемом 20 мл, содержащую 210 мМ Д-маннитола, 70 мМ сахарозы, 10 мМ НЕРЕС, 5 мМ ЭГТА, 1% бычьего сывороточного альбумина, рН 7,5 при температуре 4°C. Все последующие операции проводили на льду или при 4°C. Сердце несколько раз (обычно два–три) полоскали в чистой среде выделения, затем вырезали сосуды и соединительную ткань, нарезали ножницами на маленькие кусочки, промывали средой выделения, затем гомогенизировали в 25 мл холодной среды выделения. Гомогенат доводили до 80 мл средой инкубации и затем центрифугировали 10 мин при 800 g. Затем полученный супернатант центрифугировали 10 мин при 10000 g. Осадок ресуспендировали в 4 мл среды промывки (210 мМ Д-маннитола, 70 мМ сахарозы, 10 мМ НЕРЕС, рН 7,5) и медленно гомогенизировали за два пассажа в маленьком гомогенизаторе. Гомогенат доводили до 80 мл холодной средой промывки и центрифугировали 10 мин при 10000 g. Осадок собирали и ресуспендировали в среде промывки до конечного объема приблизительно 0,2 мл. Концентрацию митохондриального белка определяли биуретовым методом. Она составляла 70–180 мг/мл.

**Полярографические исследования, метод двойного титрования.** Титрование фосфорилирующего дыхания митохондрий сердца проводили в трех средах разной осмолярности: гипертонической (600 мОсм), изотонической (300 мОсм) и гипотонической (120 мОсм, ус-



**Рис. 2.** Эксперименты по двойному титрованию ингибиторами ТАН (КАТРОм) и сукцинатдегидрогеназы (малонатом) фосфорилирующего дыхания митохондрий сердца в условиях окисления сукцината. Опыты проведены в средах инкубации разной тоничности: (а) – гипотоническая среда (120 мОсм), (б) – изотоническая среда (300 мОсм). Числами показано, какая доля дыхания снизилась (в условных единицах) после добавки КАТРО.

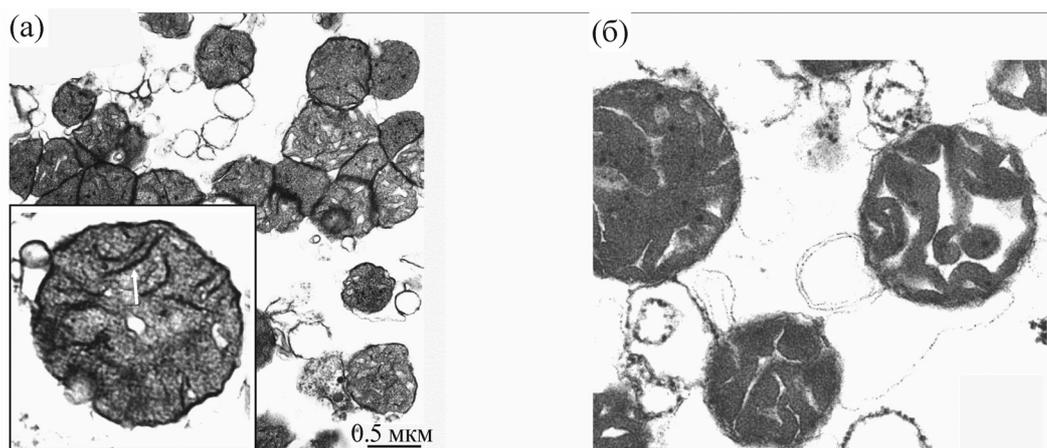
ловия низкоамплитудного набухания митохондрий). Осмолярность среды измерения регулировали путем изменения концентрации D-маннитола. Среда измерения состояла из 40 мМ сахарозы, 10 мМ  $\text{HEPES}$ , 2 мМ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 мМ ЭДТА, и D-маннитола (533, 210 или 67 мМ в случае соответственно гипертонической, изотонической или гипотонической среды), рН 7,5. Скорость дыхания митохондрий измеряли полярографически электродом типа Кларка при комнатной температуре (23–25°C).

Для метода двойного титрования в каждой из тоничностей проводили измерения с ингибитором транслокатора адениновых нуклеотидов карбоксиатрактилазидом (КАТРО) и без него. В полярографическую ячейку объемом 1 мл после добавки митохондрий (конечная концентрация митохондрий в ячейке 1 мг/мл) добавляли следующие вещества: 1 мкМ ротенона, 5 мМ сукцината, 2 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ АДФ (таким образом, АДФ в ячейке находился в избытке). Далее дожидались перехода фосфорилирующего дыхания в стационарное состояние (состояние 3 по Чансу [5]). В одном случае в полярографическую ячейку добавляли КАТРО в концентрации 0,67 мкМ. Затем одинаково проводили титрование нарастающими концентрациями ингибитора сукцинатдегидрогеназы малоната.

Результаты экспериментов сопоставляли по построенным графикам зависимости скорости дыхания от концентрации малоната (рис. 2). Полярографические данные, полученные для каждого эксперимента, были линейно нормированы: значение скорости фосфорилирующего

дыхания в состоянии 3 до добавки КАТРО принято за единицу, нулевая скорость принята за ноль.

**Малоугловое рассеяние нейтронов. Метод вариации контраста.** Митохондрии инкубировали в среде, содержащей 1 мМ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 мМ трис, 10 мМ  $\text{KCl}$ , 0,25 мМ ЭДТА, 200 или 58 мМ сахарозы (в случае изотонической или гипотонической среды соответственно), рН 7,5. Среда инкубации для различных образцов содержали различные доли  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$ : 42% (для регистрации рассеяния на липидной составляющей) и 100%  $\text{D}_2\text{O}$  (для регистрации рассеяния на всей белково-липидной мембране). Перед каждым экспериментом густую суспензию митохондрий осаждали с помощью центрифугирования в среде инкубации. Затем образцы ресуспендировали в среде инкубации и переливали в кварцевые кюветы (Helma Analytics, Германия), которые были закреплены в кассетном держателе, размещенном в боксе с контролируемой температурой, соединенном с термостатом (Lauda, Германия). Рассеяние нейтронов на митохондриях измеряли с помощью установки ЮМО, расположенной на канале № 4 импульсного реактора ИБР-2 (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия) в системе с двумя детекторами [6]. Согласно работе [7], митохондрии даже после эксперимента сохраняют дыхательную активность и способность генерации электрического потенциала. В процессе измерений температуру поддерживали постоянной с точностью до 0,03°C. Измерения проводили при 16°C в течение 10–30 мин. Результаты были обрабо-



**Рис. 3.** Электронно-микроскопические снимки митохондрий печени: (а) – в условиях гипотонии, наблюдаются сухие кристы (смотри стрелку на рисунке); (б) – в условиях гипоксии в изотонических средах видны начальные стадии вклинивания межмембранного пространства в матрикс митохондрий в виде узких белых линий.

таны с помощью программы SAS [8]. Кривые рассеяния во всех случаях имели пик, который был выделен из общей кривой рассеяния путем построения графика  $Iq^2(q)$ . Пик выделяли путем вычитания базовой линии из кривой  $Iq^2$ . Затем его аппроксимировали функцией распределения Гаусса вида  $A \exp(-(q - q_m)^2/2w)$ , где  $A$ ,  $w$ ,  $q_m$  определяли в процессе аппроксимации. Структурный параметр ( $d$ ) был рассчитан как  $d = 2\pi/q_m$ .

Подробнее методика анализа данных МУРН на митохондриях приведена в работах [7,9,10].

В настоящей работе использовали метод вариации контраста, который позволяет путем вариации содержания  $D_2O$  в среде инкубации митохондрий в кювете получать рассеяние от всей белково-липидной мембраны (при 100%  $D_2O$ ), только от липидной (при 42%  $D_2O$ /58%  $H_2O$ ) или же только от белковой (при 12%  $D_2O$ /88%  $H_2O$ , данные не приведены) компонент мембраны.

**Электронная микроскопия.** Для электронно-микроскопического исследования 10 мкл образца выделенных митохондрий с концентрацией белка 1 мг/мл фиксировали 3%-м раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере, рН 7,4, в течение 2 ч при 4°C; затем дофиксировали 1%-м раствором четырехоксида осмия в буфере в течение 1,5 ч и обезвоживали в растворах спиртов с возрастающей концентрацией спирта (70%-й спирт был насыщен уранилацетатом).

Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Серийные ультратонкие срезы делали алмазным ножом на ультрамикротоме ULTRACUT UCT (Leica, Германия). Срезы помещали на бленды, покрытые формваровой пленкой, и

контрастировали в цитрате свинца по методу, описанному в работе [11]. Исследование проводили на электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония).

Негативы сканировали и оцифрованные изображения обрабатывали с помощью программы Photoshop.

При обработке данных электронной микроскопии после вычисления толщины кристы ( $t$ ) для получения расстояния между центрами мембран кристы ( $d$ ) делали поправку на толщину мембраны (50 Å), т.е.  $d = t - 50$ .

**Метод индукции гипоксического стресса в густой суспензии митохондрий.** В работе [13] было показано, что в клетках митохондрий печени гипоксия индуцирует медленный процесс стабилизации ультраструктуры внутренней мембраны митохондрий. Проведенные нами эксперименты показали, что при глубокой гипоксии (аноксия в атмосфере азота) в митохондриях печени также набухают кристы.

На следующем этапе было показано, что ультраструктура мембран митохондрий, которые инкубировали более 1 ч в густой суспензии (20–60 мг/мл белка) при температуре 1–3°C (рис. 1б), практически неотличима от ультраструктуры внутренней мембраны митохондрий, которые формируются без специальной защиты от доступа кислорода (рис. 1в). Ультраструктура митохондрий, образующаяся при гипоксии, не имеет ничего общего с сухими кристами, формирующимися при мягком осмотическом стрессе в гипотонии (рис. 3а). В опытах с индукцией гипоксии зарегистрирован эффект набухания крист (межмембранного пространства) митохондрий (рис. 1б,в), при этом формируются электронноплотные мембранные кластеры. На

срезах можно видеть бесцветные структуры, окаймленные срезом внутренней мембраны митохондрий.

Эти опыты показали, что в препаратах выделенных митохондрий существует система сигнализации гипоксии, которая во времени стимулирует набухание межмембранного пространства (крисст), что приводит к формированию ультраструктуры внутренней мембраны (рис. 1б), неотличимой от структуры, образующейся при инкубации митохондрий в густой суспензии без специальной защиты от доступа воздуха (рис. 1в).

Результат проведенных экспериментов позволил нам использовать эффект формирования специфической ультраструктуры митохондрий в условиях густой суспензии митохондрий в качестве метода индукции гипоксического стресса. При этом препарат густой суспензии свежевыделенных митохондрий (15–60 мг/мл) инкубируют в закрытой пробирке типа «эппендорф» при температуре 1–3°C в течение 1 ч. В процессе инкубации густая суспензия митохондрий перемешивается один–два раза. Эти условия практически полностью совпадают со стандартными условиями хранения препарата выделенных митохондрий в процессе эксперимента. Исключением является требование продолжительной инкубации в пробирке.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Система окислительного фосфорилирования митохондрий сердца функционирует в режиме суперкомплекса после воздействия сигнала гипоксии.** В работе методом двойного ингибиторного анализа показано, что после длительной инкубации препарата митохондрий сердца в условиях гипоксии (см. раздел «Методы») система ОКСФОС функционирует в режиме полного суперкомплекса, включающего сукцинатдегидрогеназу (СДГ), АТФазу и транслокатор адениновых нуклеотидов. Эксперименты были проведены в нормальных средах (тоничность 300 мОсм) и в гипотонических средах тоничностью 120 мОсм, вызывающих низкоамплитудное набухание матрикса.

При двойном титровании были использованы два ингибитора – карбоксиатрактилозид и малонат. КАТР является специфическим ингибитором ГАН, который избирательно взаимодействует только с той фракцией ГАН, которая включена в процесс синтеза АТФ. КАТР обладает высоким сродством к ферменту ГАН и может рассматриваться как необратимый ингибитор ГАН (и всего АТФ-синтезного блока). Малонат – конкурентный ингибитор СДГ

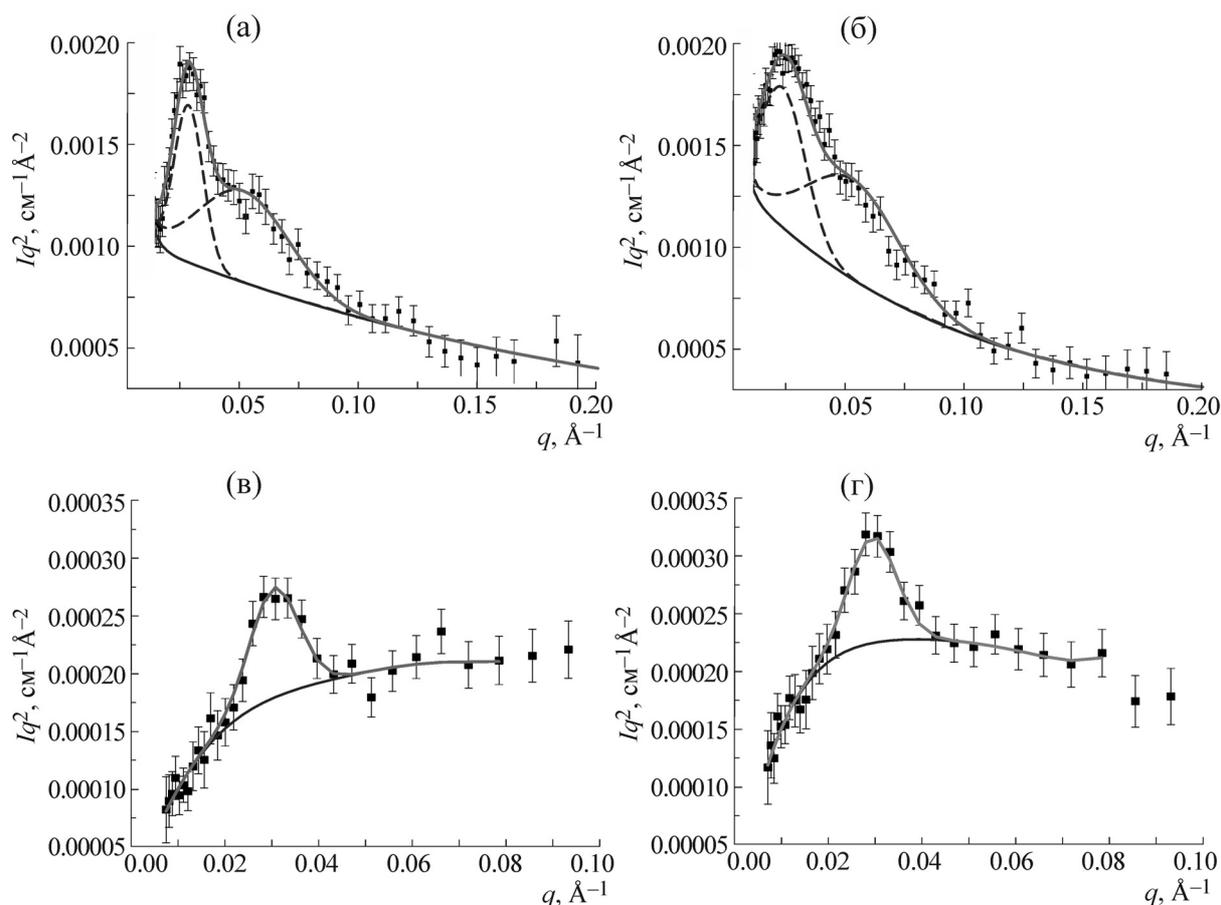
с относительно низким сродством к ферменту. В процессе титрования КАТР добавляли первым в таком количестве, чтобы подавить фосфорилирующее дыхание на 50%. Затем проводили титрование малыми добавками малоната. Малонатом титровали также контрольную пробу без КАТР (см. раздел «Методы»).

Добавление КАТР создает в системе ОКСФОС двукратное превышение активной формы сукцинатаоксидазы (по сравнению с количеством оставшейся активной формы АТФ синтетазной системы, которая не подавлена ингибитором КАТР). Из рис. 2а,б можно видеть, что, несмотря на избыток СДГ, КАТР не снизил чувствительность фосфорилирующего дыхания ко второму ингибитору, который подавляет СДГ, – малонату. Из расчета углов наклона кривых титрования следует, что чувствительность ОКСФОС к малонату и в присутствии КАТР, и в контроле не соответствует диссоциированной форме системы ОКСФОС.

В соответствии с теорией [2] полученный результат (рис. 2а,б) говорит о том, что КАТР подавил активность не только ГАН, но и собственную активность АТФ-синтетазной системы. При этом он также блокировал активность СДГ в результате того, что в условиях опыта СДГ и АТФ синтетазная система работают в режиме жесткой стыковки, как единое целое. В то же время, как было показано в нашей работе [2], в случае диссоциированной формы (которая присутствует при тоничности 600 мОсм) ингибирующее действие низких концентраций малоната было близко к нулю.

Таким образом, согласно экспериментам по двойному титрованию фосфорилирующего дыхания, система ОКСФОС митохондрий сердца функционирует в режиме суперкомплекса после воздействия сигнала гипоксии (эффект гипоксии, более подробно см. раздел «Методы»).

**Эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов на мембранах митохондрий сердца: обнаружение фракции высокоупорядоченных структур в составе мембран в условиях гипоксии.** Метод МУРН позволяет регистрировать рассеяние нейтронов только в густой суспензии (в гипоксии) в деэнергизованном состоянии. Эксперименты показали (рис. 4), что в условиях гипоксии на митохондриях сердца методом МУРН регистрируются структурные пики, свидетельствующие о присутствии в мембранах митохондрий упорядоченных белок-липидных кластеров. Исследования, проведенные в нормальных изотонических средах, позволили оценить расстояния между элементами в этих упорядоченных структурах, оно составило 220 Å (рис. 4, таблица).



**Рис. 4.** Интерференционные пики, полученные методом малоуглового рассеяния нейтронов на митохондриях сердца, представленные в координатах  $Iq^2(q)$ . Условия эксперимента: (а) – изотоническая среда, содержащая 100%  $D_2O$ ; (б) – гипотоническая среда, содержащая 100%  $D_2O$ ; (в) – изотоническая среда, содержащая 42%  $D_2O$ ; (г) – гипотоническая среда, содержащая 42%  $D_2O$ . Пики на кривых рассеяния нейтронов в средах с содержанием 42%  $D_2O$  получены на упорядоченных липидных составляющих крист. Рассчитанные значения структурных параметров, соответствующие позиции максимумов наблюдаемых пиков на кривых, приведены в таблице.

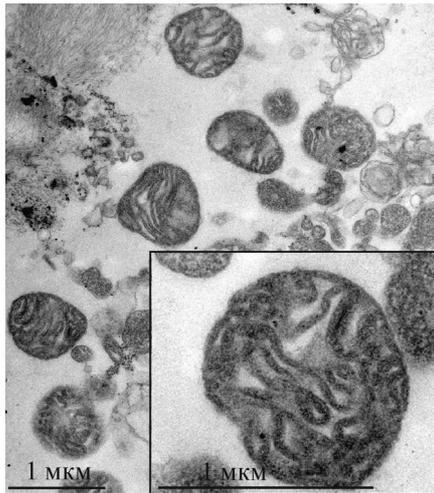
Методом вариации контраста было показано, что липидная составляющая митохондрий участвует в появлении пика в кривых рассеяния в условиях гипоксии. Расстояние между центрами липидных компонент, рассчитанное из положения максимумов структурных пиков при нормальных условиях, имело значения, близкие  $210 \text{ \AA}$  (см. таблицу).

Структурные пики регистрировали как в условиях инкубации в изотонической, так и в гипотонической среде в суспензиях митохондрий, содержащих высокую концентрацию белка ( $10\text{--}15 \text{ мг/мл}$ ) при длительной экспозиции ( $15\text{--}30 \text{ мин}$ ) после длительной инкубации препарата в густой суспензии (более 4 ч). При таких условиях в образце во время измерения неиз-

Значения структурных параметров – расстояния между центрами мембран в кристах митохондрий (в  $\text{\AA}$ )

Содержание $D_2O$ в среде инкубации, %	Митохондрии сердца		Митохондрии печени	
	Изотоническая среда	Гипотоническая среда	Изотоническая среда	Гипотоническая среда
100% $D_2O$	$220 \pm 10$ (105)	$260 \pm 10$ (120)	$190 \pm 10$	$190 \pm 10$
42% $D_2O$	$210 \pm 10$	$215 \pm 10$	Нет данных	$170 \pm 10$

Примечание. Расчет сделан по данным МУРН. Данные на митохондриях сердца получены при выполнении настоящей работы, данные на митохондриях печени взяты из работы [7]. В скобках указано положение второго пика. Графа 42%  $D_2O$  соответствует расстоянию между центрами липидных упорядоченных бислоев, составляющими кристы митохондрий.



**Рис. 5.** Электронно-микроскопические снимки митохондрий сердца в изотонических условиях (300 мОсм), зафиксированных сразу же после эксперимента по МУРН (длительное воздействие гипоксии). Расстояние между центрами мембран составляет  $\sim 210 \text{ \AA}$ .

бежно вторично создается гипоксия. В начале опытов в гипотонических средах на эффект гипоксии накладывается эффект осмотического стресса. При этом регистрацию рассеяния нейтронов в митохондриях проводили на фоне воздействия на ультраструктуру митохондрий двух факторов – гипоксии и осмотического стресса. Таким образом, в этих экспериментах влияние слабого осмотического стресса исследовано на фоне предварительного воздействия гипоксии на ОКСФОС.

Метод вариации контраста позволил отдельно зарегистрировать рассеяние на липидной составляющей мембран при содержании 42%  $D_2O$  в среде инкубации (рис. 4в,г). При содержании 100%  $D_2O$  регистрируемый пик соответствует составной белково-липидной мембране (рис. 4а,б). Опыты проводились и в изотонических (рис. 4а,в), и в гипотонических средах (рис. 4б,г). Пики, выделенные из кривых рассеяния, позволили рассчитать (см. раздел «Методы») структурные параметры упорядоченных элементов мембран митохондрий. Интерпретация этих параметров сделана в рамках ламеллярной модели плоскопараллельных структур, образованных внутренней мембраной митохондрий. Структурные параметры при этом соответствуют расстоянию между центрами ламеллярных элементов крист (см. таблицу).

Из таблицы видно, что в митохондриях сердца в изотонических средах под действием только гипоксии (то есть без воздействия осмотического стресса) расстояние между центра-

ми липидных бислоев и центрами липидно-белковых мембран почти одинаковы ( $\sim 215 \text{ \AA}$ ).

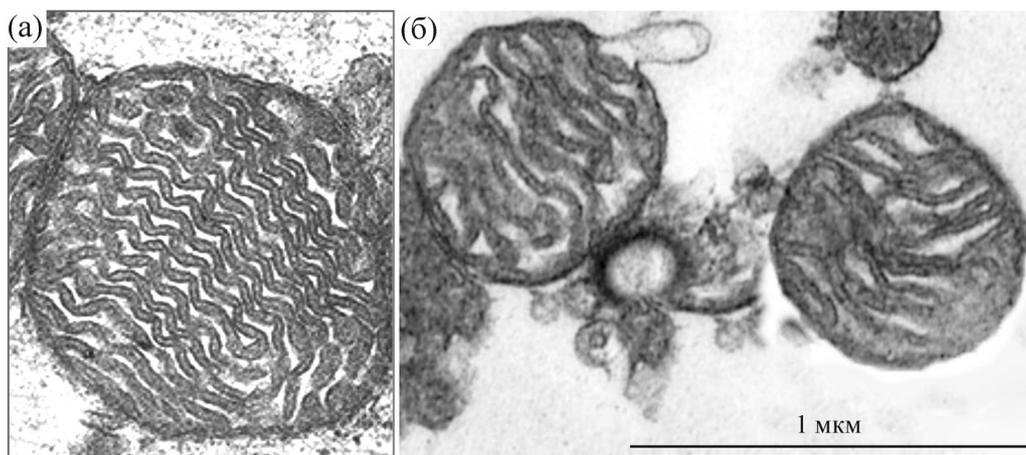
**О структурно-функциональном состоянии митохондрий сердца в условиях гипоксии. Обнаружение «аномального» фазового перехода в мембранах митохондрий сердца при последовательном воздействии гипоксического сигналов и слабого осмотического стресса.** В гипотонических средах при последовательном воздействии гипоксического и осмотического стресса расстояние между центрами липидных составляющих в кристах такое же, как при изотонии ( $\sim 215 \text{ \AA}$ ) (см. таблицу). Однако измеренный параметр полной белково-липидной фракции в гипотонических условиях составляет  $260 \text{ \AA}$ , т.е. гораздо больше, чем расстояние между центрами липидных компонент крист, и разница равна  $45 \text{ \AA}$ , что близко к толщине липидного бислоя ( $50 \text{ \AA}$ ). Это является результатом резкого изменения взаимного расположения липидов и белков по толщине мембраны с увеличением расстояния между белковой компонентой и центрами кристы.

В нормальных средах (изотоническая, 300 мОсм, и гипотоническая, 120 мОсм) кривая рассеяния нейтронов на митохондриях сердца содержит два пика, соотношение которых примерно равно 1 к 2. Это показывает, что оба пика рассеяния могут определяться одним и тем же множеством плоскопараллельных высокоупорядоченных структур.

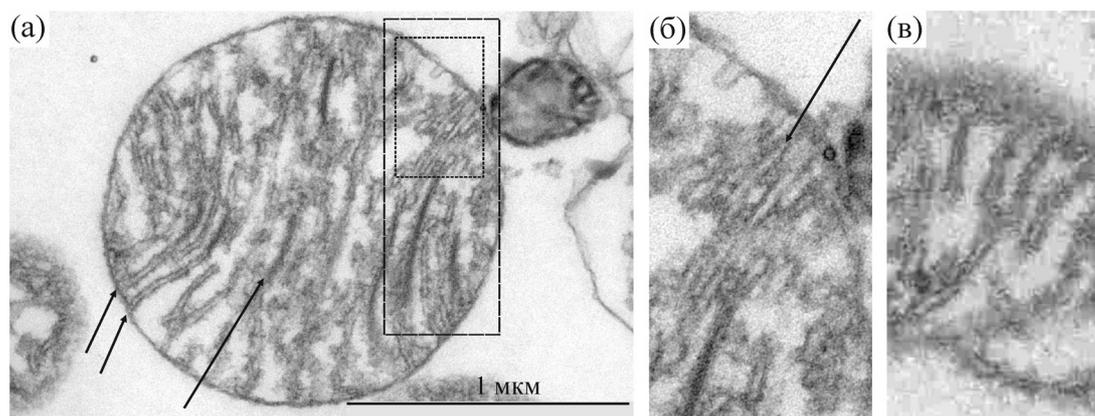
Оказалось, что при рассеянии нейтронов на фракции белков, которое теоретически должно наблюдаться при содержании 12%  $D_2O$  в среде инкубации, был обнаружен слабый дифракционный пик, соответствующий структурному параметру  $100 \text{ \AA}$  (данные не приведены), который почти совпадает со вторым пиком на рис. 4а,б. Поэтому второй пик на рис. 4а,б может включать в себя дифракцию белковой компоненты.

**Электронно-микроскопические исследования ультраструктуры дезэнергизованных митохондрий, образовавшейся в процессе нейтронных исследований.** После окончания нейтронных экспериментов была сразу выполнена фиксация митохондрий. На рис. 5 представлены результаты ЭМ, полученные на митохондриях, зафиксированных сразу после измерений рассеяния нейтронов в нормальных средах (300 мОсм). Данные, полученные обоими методами, хорошо согласуются друг с другом: расстояния между центрами мембран в кристах митохондрий оказались соизмеримыми и составили  $\sim 220 \text{ \AA}$ .

После нейтронного эксперимента кристы митохондрий сердца заполнены электронноплотным матриксным материалом и мало отличаются от крист энергизованных митохондрий



**Рис. 6.** Электронно-микроскопические снимки митохондрий сердца в изотонической среде (300 мОсм). Фиксацию проводили в энергизованном состоянии (в присутствии сукцината). (а) – Кристы митохондрий образуют зигзагообразную структуру, расстояние между центрами мембран в кристах составляет  $\sim 210 \text{ \AA}$ ; (б) – кристы митохондрий после короткого воздействия гипоксии образуют ламеллярную структуру; расстояние между центрами мембран в кристах составляет  $\sim 210 \text{ \AA}$ .

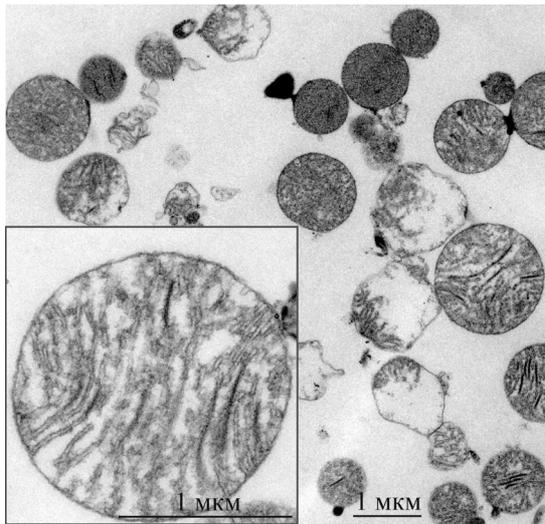


**Рис. 7.** Электронно-микроскопические снимки крист митохондрий сердца в гипотонической среде (120 мОсм), зафиксированных сразу после окончания эксперимента по МУРН (длительная инкубация в условиях гипоксии). На снимке (а) можно видеть появление «пустых» крист, в объеме которых отсутствует электронноплотный матриксный материал, в отличие от опыта в изотонической среде (см. рис. 5). Электронноплотный материал локализован в большом количестве в межмембранном пространстве (длинная стрелка на рис. (а)). Значительная часть электронноплотного материала (белка) связана с поверхностью крист, в меньшем (рис. (б)) или большем (рис. (в)) количестве. Наблюдаемая картина должна рассматриваться как результат частичного распада крист, связанного с выбросом матриксного материала в межмембранное пространство (СМЧ-подобные кристы). Наблюдаемое методом МУРН увеличение расстояния структурно упорядоченного белка (см. таблицу) соответствует изображениям на рис. (б) и (в).

сердца, которые инкубировались в изотонической среде после предварительного воздействия гипоксии (рис. 6б). На этом снимке можно видеть, что воздействие гипоксии увеличило объем межмембранного пространства по сравнению с интактными митохондриями, также резко изменилась общая конфигурация этих структур (рис. 6а). Следует обратить особое внимание на то обстоятельство, что внутренняя мембрана митохондрий в изотонии остается

интактной и отсутствует выброс матриксного материала в межмембранное пространство.

Ультраструктура крист митохондрий, образовавшаяся в процессе нейтронных измерений в условиях дополнительного воздействия осмотического стресса и гипоксии, имеет важную особенность. В этом случае митохондрии сердца, очевидно, имеют обращенную ориентацию. В норме в них локализован матрикс, но в условиях нашего эксперимента они утратили значительную часть электронноплотного мат-



**Рис. 8.** Электронно-микроскопические снимки митохондрий сердца в условиях гипотонии (120 мОсм), зафиксированных сразу же после эксперимента по МУРН (длительное воздействие гипоксии). Расстояние между центрами мембран составляет ~210 Å.

риксного вещества (рис. 7, 8). В отдельных митохондриях с интактной внешней мембраной появилась большая часть крист, резко обедненной электронноплотной материей (стрелка на рис. 5). При этом на срезах четко прослеживаются электронноплотная фракция (белка), связанная с поверхностью мембран крист (рис. 9а,б), и образование «пустых» крист. При этом электронноплотный материал (в гранулированной форме) обнаруживается в межмембранном пространстве. Наблюдаемая аномалия обусловлена очень сильным набуханием межмембранного пространства, которое происходит при гипоксии (при осмотическом стрессе набухает матриксное пространство).

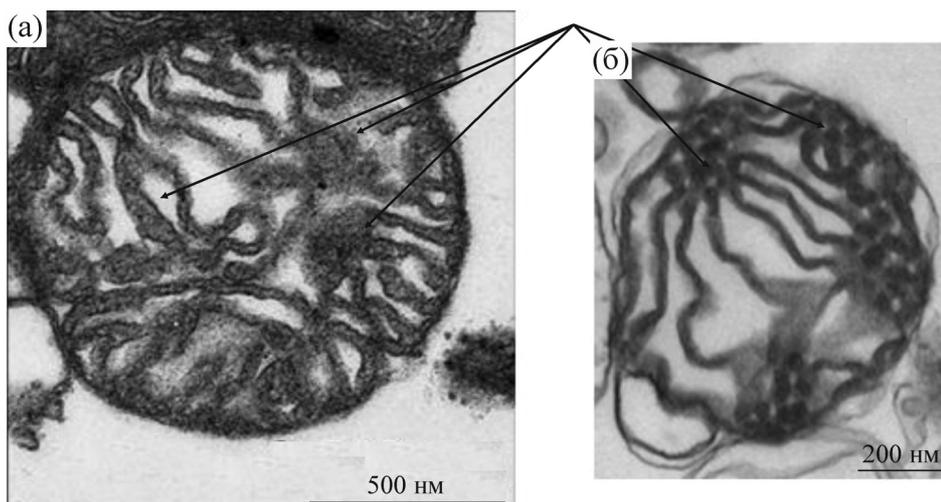
Сопоставление данных МУРН и ЭМ позволяет заключить, что наблюдаемая аномалия распределения белков по толщине мембраны (см. таблицу) связана с образованием кристоподобных структур, описанных в работе [14], в которых, как в субмитохондриальных частицах (СМЧ), в основном сохранены мембранные белки, значительная часть которых вынесена, как известно, за внешнюю границу мембраны. В частности, резко выступают из поверхности мембраны СМЧ такие белки, как АТФ-синтетаза, фрагменты комплекса I и сукцинатдегидрогеназы. Усиление этого эффекта в условиях нашего эксперимента и в СМЧ, по-видимому, является причиной наблюдаемого эффекта.

Подобный тип перестройки всегда наблюдается в процессе образования СМЧ из митохондрий [15]. В то же время хорошо известно,

что СМЧ-подобные структуры, которые были получены в условиях инкубации митохондрий в растворах трегалозы, описаны в работах [16, 17]. Авторы этих работ четко показали, что АТФ-синтетаза находится на внешней поверхности этих кристоподобных структур.

Сердечные митохондрии имеют по сравнению с печеночными митохондриями гораздо большую площадь и создают складчатую структуру, в которой мембраны в зависимости от условий могут сближаться как матриксной стороной, так и внешней межмембранной стороной. Очевидно, что структурные изменения в кристах, которые мы наблюдали методом МУРН и ЭМ, связаны именно с такой перестройкой, которая происходит под воздействием двух факторов – гипоксии и гипотонии. Эти воздействия не согласованы и приводят к глубокой, но не летальной перестройке структуры мембран митохондрий и соответственно системы ОКСФОС, поскольку фосфорилирующая активность при воздействии двух факторов сохраняется так же, как в СМЧ. Прямое указание на это получено в опытах по титрованию фосфорилирующего дыхания (рис. 2б).

**Изучение ультраструктуры энергизованных митохондрий сердца после последовательного воздействия гипоксии и слабого осмотического стресса на систему окислительного фосфорилирования. Трансформация внутренней мембраны в двухфазную гетерогенную систему.** Как было показано в нашей предыдущей работе [1] (см. также раздел «Методы»), при инкубации митохондрий в густой суспензии в течение 1 ч всегда возникает гипоксия. Добавление такого препарата в полярографическую ячейку с гипотонической средой инкубации (120 мОсм) вызывает дополнительный (осмотический) стресс. Наши измерения (рис. 2) показали, что энергизованные митохондрии после этого сохраняют фосфорилирующую активность. В настоящем разделе приводятся данные экспериментов, в которых методом ЭМ были обнаружены различные стадии трансформации ультраструктуры энергизованных митохондрий сердца под воздействием только гипоксического стресса (рис. 6б) при инкубации в изотонических средах (300 мОсм). Как и в опытах с МУРН, ультраструктура митохондрий изменяется очень мало; хотя полностью сохраняется целостность мембран, заметно повышается межмембранное расстояние (между кристами). В следующей серии опытов изучено последовательное воздействие гипоксического и осмотического стрессов (120 мОсм), когда суспензию митохондрий после длительной инкубации помещали в гипотоническую среду в присутствии янтарной ки-



**Рис. 9.** Метаморфозы митохондрий, трансформация внутренней мембраны в двухфазную систему. Электронная микроскопия митохондрий сердца в гипотонической среде (120 мОсм) в энергизованном состоянии. Препарат митохондрий предварительно короткое время инкубировали с сукцинатом. (а) – Начальная стадия формирования двухфазной системы: образование утолщенных крист, расстояние между центрами мембран в кристах  $\sim 300\text{--}700$  Å, на срезе видна начальная стадия образования неламинарных структурированных кластеров (указано стрелками), сформированных из внутренней мембраны. (б) – Препарат подвергали более длительному воздействию гипоксии; происходит образование двухфазной системы в кристах отдельной митохондрии из ламеллярной фазы и неламинарной фазы, имеющей упорядоченное строение. На срезе стрелками указаны сечения кластеров, сформированных из трубчатых структур, связанных с ламеллярными кристами (расстояние между центрами ламеллярных структур  $\sim 150$  Å).

слоты (рис. 9). На рис. 9б представлена ультраструктура митохондрий сердца после воздействия двух вышеуказанных факторов, зарегистрированы две стадии образования двухфазных структур, сформированных из внутренней мембраны митохондрий.

Из рис. 9а можно видеть, что характерным признаком начального воздействия гипоксии и гипотонии являются локальные утолщения крист (до  $700$  Å) и межкристного пространства. При последовательном воздействии гипоксии и гипотонии в этой системе удастся наблюдать глубокие структурные изменения, так же как и в экспериментах по МУРН (см. таблицу). Образование двухфазной системы во внутренней мембране митохондрий при последовательном воздействии двух стрессовых факторов представлено на рис. 9 (рис. 9а – начальная стадия, рис. 9б – более поздняя стадия). На этом рисунке можно видеть ламеллярную мембранную составляющую этих структур и связанные с мембраной электронноплотные кластеры, которые обладают упорядоченным внутренним строением. На рис. 9а можно видеть стадию зарождения этих неламинарных кластеров, которые указаны стрелками, а также эффект неравномерного набухания электроноплотного матрикса митохондрий, размер которого достигает в поперечном сечении  $700$  Å

(см. стрелки). В этих опытах было показано, что ультраструктура митохондрий в условиях, при которых обычно измеряется фосфорилирующая активность, может иметь достаточно сложное строение и существенно изменяться в процессе проведения эксперимента. На рис. 9б представлена ультраструктура митохондрий, которые подвергались более длительному воздействию гипоксии и гипотонии в густой суспензии митохондрий.

Таким образом, данные, полученные на модели энергизованных митохондрий, показали также возникновение специфических изменений структуры во внутренней митохондриальной мембране. Однако характер этих изменений отличается от характера изменений в дезэнергизованных митохондриях (рис. 5 и 8), зафиксированных после МУРН. В целом полученные результаты говорят о том, что воздействие гипоксии и осмотического стресса не идентично, несмотря на то, что метод двойного титрования в обоих случаях показывает, что функциональная активность ОКСФОС соответствует режиму работы суперкомплекса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что при последовательном воздействии гипоксии и осмотического

стресса методом МУРН было зарегистрировано очень значительное изменение в картине малоуглового рассеяния – изменение взаимного расположения липидной и белковой составляющих в мембране митохондрий. Метод ЭМ указывает, что этот эффект, вероятно, сопряжен с «обращением» ориентации мембран крист (как в СМЧ). При этом специфическое изменение в кривых рассеяния должно быть обусловлено упорядоченным расположением липидных и белковых структур, входящих в состав крист митохондрий. Сопоставление данных МУРН и ЭМ позволяет заключить, что упорядоченные структуры заключены в кристах. Мы не исключаем той возможности, что условием образования упорядоченных структур митохондрий может быть формирование суперкомплекса системы ОКСФОС, обусловленное сигналом гипоксии.

На препаратах выделенных митохондрий сердца методом двойного ингибиторного анализа по Бауму [18] было показано, что после воздействия гипоксического стресса система ОКСФОС митохондрий функционирует в режиме суперкомплекса. Сигналы гипоксии играют ключевую роль в регуляции метаболизма клетки, поскольку сигнальные каскады этой системы включены в систему переключения режимов дыхания и гликолиза. Существование системы регуляции этого звена метаболизма было давно обнаружено и связано с именами Пастера и Крэбтри.

К настоящему времени хорошо изучена система сигнализации, связанная с фактором HIF1. Недавно вышла работа [13], в которой показана ключевая роль каскада IF1 OPA1, активирующегося в условиях гипоксического стресса и стабилизирующего структуру и активность димера АТФ-синтетазы  $F_1F_0$ . При этом происходит стабилизация формы крист и создаются необходимые структурные изменения, обеспечивающие встраивание АТФ-синтетазы в митохондриальную мембрану, в которую встроена также вся система протонных помп.

Совершенно очевидно, что стабилизация АТФ-синтетазного блока является необходимым условием стабилизации полного суперкомплекса, существование которого предсказывают изучение функциональных особенностей работы ОКСФОС и обнаружение эффекта присутствия упорядоченных структур в кристах митохондрий.

В работе обнаружен новый физиологически значимый фактор, индуцирующий переход ОКСФОС в режим суперкомплекса. Этим фактором является гипоксия, возникновение которой вызывает полную перестройку энергетики клет-

ки. Показано что в таких условиях параллельно происходит структурно-функциональное изменение транслокатора нуклеотидов, который переходит в агрегированную форму димера. Таким образом, было показано, что функциональная перестройка согласована со структурно-функциональным изменением одного из важнейших звеньев сопряжения работы электрон-транспортной системы и АТФ-синтетазы.

Впервые установлена корреляционная связь между переходом системы ОКСФОС в режим суперкомплекса и изменением функционального состояния энергетики митохондрий при переходе от аэробного дыхания к режиму гипоксии. Эффект наблюдался двумя разными способами на митохондриях печени и сердца.

Методами МУРН и ЭМ обнаружено в условиях перехода ОКСФОС в режим суперкомплекса присутствие высокоупорядоченных структур в мембранах митохондрий сердца в условиях гипоксии. Проведено сопоставление рассчитанных из данных МУРН и ЭМ структурных параметров крист в дезэнергизованных митохондриях в условиях гипоксии. Результаты измерений двумя методами совпадают. Путем последовательного воздействия сигналов гипоксии и слабого осмотического стресса доказано качественное различие этих сигналов, тем самым показано присутствие двух типов сигнальных систем, индуцирующих переход функционирования системы ОКСФОС в режим суперкомплекса.

В работе установлена взаимосвязь процессов функционального перехода ОКСФОС в режим суперкомплекса с важнейшей перестройкой энергетического метаболизма клетки, который происходит при возникновении гипоксии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-01043) и Российского научного фонда (грант № 14-24-00107).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. S. Moiseeva, T. N. Murugova, I. M. Vangeli, and I. M. Byvshev, *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **11** (4), 321 (2017).
2. I. P. Krasinskaya, V. N. Marshansky, S. F. Dragunova, and L. S. Yaguzhinsky, *FEBS Lett.* **167**, 176 (1984).
3. D. Johnson and H. Lardy, in *Methods Enzymol.* (Elsevier, 1967), pp. 94–96.
4. C. Watters, *Anal. Biochem.* **88**, 695 (1978).
5. B. Chance and G. R. Williams, *J. Biol. Chem.* **217**, 409 (1955).
6. A. I. Kuklin, A. K. Islamov, and V. I. Gordeliy, *Neutron News* **16**, 16 (2005).

7. T. N. Murugova, V. I. Gordeliy, A. I. Kuklin, et al., *Biophysics* **51**, 882 (2006).
8. A. G. Soloviev, T. M. Solovjeva, O. I. Ivankov, et al., *J. Physics: Conf. Series* **848** (1), 012020 (2017).
9. T. N. Murugova, I. M. Solodovnikova, V. I. Yurkov, et al., *Neutron News* **22**, 11 (2011).
10. T. N. Murugova, V. I. Gordeliy, A. I. Kuklin, et al., *Crystallogr. Rep.* **52**, 521 (2007).
11. E. S. Reynolds, *J. Cell Biol.* **17**, 208 (1963).
12. J. C. Fiala and K. M. Harris, *J. Am. Med. Inform. Assoc.* **8**, 1 (2001).
13. D. Faccenda, J. Nakamura, G. Gorini, et al., *Cell Rep.* **18**, 1869 (2017).
14. K. M. Davies, M. Strauss, B. Daum, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 14121 (2011).
15. W. Kühlbrandt, *BMC Biol.* **13**, (2015).
16. A. W. Mühleip, C. E. Dewar, A. Schnauffer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 992 (2017).
17. A. W. Mühleip, F. Joos, C. Wigge, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 8442 (2016).
18. H. Baum, G. S. Hall, J. Nalder, and R.B.Beechey, in *Energy Transduct. Respir. Photosynth.*, Ed. by E. Quagliariello, S. Papa and G. S. Rossi (Adriatica Editrice, Bari, 1971), pp. 747–755.

## Signal of Hypoxia as a Potential Inducer of the Formation of the Oxidative Phosphorylation System Supercomplex in Heart Mitochondria

**I.M. Byvshev\***, **T.N. Murugova\* \*\***, **O.I. Ivankov\* \*\* \*\*\***, **A.I. Kuklin\* \*\***,  
**I.M. Vangeli\*\*\*\***, **V.V. Teplova\*\*\*\*\***, **V.I. Popov\*\*\*\*\***,  
**S.V. Nesterov\* \*\*\*\*\***, and **L.S. Yaguzhinskiy\* \*\*\*\*\***

\*Molecular Mechanisms in Aging and Age-related Diseases Research Center,  
Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Moscow, Dolgoprudny, 141701, Russia

\*\*Frank Laboratory of Neutron Physics, Joint Institute for Nuclear Research,  
Joliot-Curie 6, Dubna, Moscow Region, 141980, Russia

\*\*\*Institute for Safety Problems of Nuclear Power Plants, National Academy of Sciences of Ukraine,  
ul. Lysogirskaya 12, 03028, Kyiv, Ukraine

\*\*\*\*Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory, 1/40, 119992, Moscow, Russia

\*\*\*\*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

\*\*\*\*\*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

\*\*\*\*\*Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, ul. 6-ya Radialnaya 24/14, Moscow, 115404 Russia

The correlation between transition of oxidative phosphorylation system into a supercomplex state and changes of functional state of mitochondrial energetics was established under the conditions of transition of mitochondrial energetics from aerobic respiration to hypoxia regime. The effect was observed by two different methods on heart and liver mitochondria. Small-angle neutron scattering and electron microscopy study during transition of oxidative phosphorylation system to a supercomplex revealed the presence of highly ordered structures in the membranes of heart mitochondria exposed to hypoxia. The parameters of the mitochondrial cristae calculated according to the data obtained were compared. The results of measurements by the two methods coincide. Through successive exposure to hypoxia and weak osmotic stress signals, we proved qualitative differences in signaling events. It has been shown that successive exposure to these signals – first, to hypoxia, then, to weak osmotic stress, leads to the impairment of mitochondrial integrity. The effect is registered using small-angle neutron scattering and electron microscopy. Thus, it has been shown that there exist two qualitatively different signals (hypoxia and weak osmotic stress) which induce the transition of oxidative phosphorylation system to a supercomplex.

*Keywords: mitochondrion, oxidative phosphorylation system, supercomplex, volume regulation system, hypoxia, ultrastructure*