

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ФИБРОБЛАСТОВ ЛИНИИ BJ В УСЛОВИЯХ ГЛЮКОЗНОГО ГОЛОДАНИЯ И ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ РОТЕНОНА

В.В. Иванова¹, И.Г. Старостина¹, Е.В. Мартынова¹, С.П. Перейра²,
П.Дж. Оливейра², А.А. Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Центр неврологии и клеточной биологии, Университет Коимбры, Коимбра, Португалия

Analysis of Bj fibroblasts mitochondrial respiratory chain function under glucose starvation and exposure to different doses of rotenone: Implications for neurodegenerative diseases

V.V. Ivanova¹, I.G. Starostina¹, E.V. Martynova¹, S.P. Pereira², P.J. Oliveira², A.A. Rizvanov¹

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

² Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

При некоторых нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др., наблюдается дисфункция митохондрий и нарушения митохондриогенеза, что приводит к патологическим изменениям в центральной нервной системе. В связи с этим, большой интерес вызывают изменения в работе электрон-транспортной цепи митохондрий, приводящие к энергетической дисфункции в нервных клетках, а также клетках соединительной ткани в норме и при патологии. Фибробласты участвуют в формировании микроокружения различных типов специализированных клеток, в том числе и нервной системы, и их дисфункция также может вносить вклад в патогенез заболеваний. Нами были созданы стрессовые условия, приближающие фибробласты человека к патологическому фенотипу, наблюдаемому при болезни Паркинсона. Изучена экспрессия и активность основных белковых комплексов дыхательной цепи митохондрий, в том числе транслоказы TOM20, в условиях ингибирования НАД-Н дегидрогеназы и окислительного стресса.

Ключевые слова: митохондриальные заболевания, TOM20, OXPHOS, болезнь Паркинсона, ротенон, клеточная линия Bj.

Введение

Известно, что старение характеризуется структурными и нейрофизиологическими изменениями в головном мозге, что приводит к когнитивным нарушениям различной степени, и зачастую сопровождается нейродегенеративными заболеваниями. С увеличением продолжительности жизни нейродегенеративные расстройства становятся все более распространенными и представляют одну из основных проблем здравоохранения. При этом этиология заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, изучена недостаточно и является очень сложной и многофакторной [1, 2]. Некоторые случаи указанных заболеваний связывают с генетической предрасположенностью, тогда как большая часть, как показано, зависит от экзогенных факторов [3]. Современные исследования патогенеза болезни Паркинсона демонстрируют, что изменения в регуляции функций митохондрий в нервных клетках могут влиять на развитие болезни [4]. Нарушения функции и структуры митохондрий ведет к увеличению проницаемости их мембраны для катионов, разобщению дыхания и окислительного фосфорилирования, что является одним из основных факторов в процессе старения и демиелинизации [5, 6]. Известно, что митохондриальная недостаточность и дисрегуляция металлопротеиназ семейства AAA и транслоказ наружной мембраны митохондрий семейства TOM,

Certain neurodegenerative diseases, such as Parkinson and Alzheimer, are characterized by an impairment in mitochondrial function and biogenesis, which may lead to pathological changes in the central nervous system. From this putative link stems a growing interest in changes to the mitochondrial electron transport chain and the ensuing energy dysfunction in neuronal cells and connective tissue cells under normal and pathological conditions. Fibroblasts involved in the formation of microenvironments of different types of specialized cells from the nervous system and their dysfunction may contribute to the pathogenesis of disease as well. In this regard, we have obtained stressful conditions of human dermal fibroblasts approximating of the pathological phenotype observed in Parkinson's disease. Was studied the expression and activity of the protein complexes of the mitochondria respiratory chain including translocase TOM20 under inhibition of NADH dehydrogenase and maintaining of oxidative stress.

Keywords: mitochondrial diseases, TOM20, OXPHOS, Parkinson's disease, rotenone, Bj cell line.

ответственных за созревание белковых комплексов дыхательной цепи, могут быть связаны со многими нейродегенеративными заболеваниями, в том числе и болезнью Паркинсона [7]. На клеточной модели данного заболевания *in vitro* показано, что процедуры, направленные на восстановление гомеостаза митохондрий, являются весьма эффективными для возможной реверсии заболевания и восстановления работы дофаминэргических нейронов [8, 9]. Таким образом, накопление продуктов окисления и нарушение митохондриогенеза приводит к тому, что основная функция митохондрий в нейронах — поддержание трансмембранного градиента и энергетического обмена при синаптической передаче, а также Ca^{2+} гомеостаза нарушается [10–12]. Также митохондрии являются главными производителями токсичных свободных радикалов в клетке, поэтому мутации в их ДНК происходят чаще, чем в ядерной ДНК клеток [13, 14]. Показано, что нарушение функций митохондрий приводит к развитию нейродегенеративных изменений, сопровождающихся нарушением энергетического обмена и синаптической передачи в нейронах [15].

Дефицит дофаминэргических нейронов могут восполнить клетки собственного организма, а именно основные клетки соединительной ткани — фибробласты. Недавно был предложен метод репрограммирования фибробластов до стадии плюрипотентных стволовых клеток, а затем нового «программирования»

e-mail: Vilenavita@gmail.com

(дифференцировки) этих клеток в нейроны. Ученые Гарвардского университета подобным образом получили нейроны из фибробластов, выделенных от обезьян, больных болезнью Паркинсона. Показано, что полученные нейроны экспрессировали дофамин и были успешно трансплантированы в мозг больных обезьян. При этом была зарегистрирована кратковременная регрессия заболевания [16]. Однако пути эффективного репрограммирования фибробластов с последующим восстановлением митохондриогенеза в нейронах к настоящему времени не найдены. Таким образом, для более глубокого понимания процессов клеточного и митохондриального метаболизма нами были созданы и оптимизированы клеточные модели с митохондриальной дисфункцией на базе иммортализованной клеточной культуры фибробластов человека Bj (BJ ATCC® CRL-2522™).

В ходе нашего исследования клетки линии Bj культивировали в среде с содержанием галактозы вместо глюкозы и ингибировали комплекс I дыхательной цепи митохондрий ротеноном [17]. Нами были подобраны условия, приближенные к патологическим при болезни Паркинсона и оптимизированы условия для поддержания клеток в стрессовом состоянии [18]. Благодаря этому, мы смогли проследить некоторые аспекты поведения митохондрий, в частности экспрессию белковых комплексов дыхательной цепи и ферментативную активность дегидрогеназ внутри клетки в условиях стресса. Также была подобрана оптимальная концентрация ротенона, поддерживающего клетки в состоянии окислительного стресса, при этом сохраняя их жизнеспособность.

Материал и методы

Варианты культивирования Bj

Для оценки экспрессии белковых субъединиц электрон-транспортной цепи фибробластов клетки линии Bj пассажа 13 и 15 (BJ ATCC® CRL-2522™) выращивали в чашках Петри на среде DMEM (Sigma, США) (1 mM пируват натрия, 21 mM бикарбонат натрия, 25 mM глюкозы или 10 mM галактозы, 4 mM глутамин, 10% FBS; Ph 7,2–7,3), до 70–80% плотности монослоя. Концентрация сахаров 25 mM или 10 mM галактозы принята за 100%. Пересев клеток проводили в соотношении 1:4. Затем при достижении 50% плотности монослоя клетки были помещены в среду с 50% галактозы – 50% глюкозы, 75% галактозы – 25% глюкозы и 100% галактозы соответственно. Через 72 ч. культивирования клетки были помещены в среду DMEM со 100% галактозы. Контрольные клетки в среде со 100% глюкозы были помещены в новую среду со 100% глюкозы, в то же время, что и экспериментальная группа клеток. После 24 ч. клетки при 90% плотности монослоя пересевали, и часть клеток была осаждена и заморожена на -80°C для дальнейшего анализа.

Клетки, выращенные в среде со 100% содержанием глюкозы до 80% плотности монослоя (слияние, конfluence) пересевали 1:3 и заменяли среду на DMEM с содержанием 50% галактозы, 50% глюкозы, 75% галактозы, 25% глюкозы, и 100% галактозы, контролем послужили клетки в среде со 100% содержанием глюкозы. Клетки, культивируемые в среде со 100% содержанием галактозы, не выжили. Клетки с 50% содержанием галактозы и 50% глюкозы были выращены до 80% плотности монослоя и заморожены для иммуноблоттинга, контрольные клетки также были заморожены на этом этапе.

Клетки, выращенные в среде со 100% содержанием глюкозы до 90% плотности монослоя были пассированы 1:6 и культивировались в среде с 50% галактозы, 50% глюкозы, 75% галактозы, 25% глюкозы и 100% глюкозы как контрольные клетки. Затем после 24 ч. инкубации клетки были помещены в среду с различным содержанием глюкозы и галактозы; после достижения 80% плотности монослоя клетки пересевали 1:2. Часть клеток использовали для последующего анализа экспрессии белковых комплексов дыхательной цепи методом иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг (вестерн-блот)

Осадок клеток был разморожен на льду и растворен в 20–50 мкл 1X лизирующего буфера (Thermo scientific MSDS lysis buffer 10 x, США) с последующим криолизом. Концентрацию белка в лизатах клеток определяли с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Далее клеточные лизаты Bj экспериментальных и контрольных групп были аликвотированы с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, США).

Использовали первичные антитела к белку TOM20 (Santa Cruz Biotechnology, США) и к белковым субъединицам электрон-транспортной цепи – OXPHOS (Abcam, Великобритания) 1:500. Вторичные антитела: Goat anti rabbit SC2007 and Goat anti mice SC2009 (Santa Cruz Biotechnology, США) использовались в рекомендованной для иммуноблоттинга концентрации.

Электрофорез и перенос белков на PVDF мембрану был произведен с использованием стандартного протокола для электрофореза белков в денатурирующих условиях. Для визуализации результатов использовался раствор Ponceau S (Sigma, США) и набор реагентов для хемилюминесцентной детекции Vistra ECFTM (Sigma, США). Для количественной оценки результатов была использована система визуализации (Biospectrum 500, США) и программное обеспечение ImageJ. Валидацию результатов проводили с помощью программного обеспечения ImageJ по отношению яркости пикселей окрашивания Ponceau S и ECFTM.

Измерения активности комплекса I дыхательной цепи митохондрий в условиях добавления различных концентраций ротенона

Клетки линии Bj 15 и 16 пассажа культивировали в чашках Петри до 90% плотности монослоя, после обработки различными концентрациями ротенона, разведенного в 70% этаноле. Далее клетки в концентрации 7×10^6 , эквивалентные примерно 2 мг белка, трипсинизировали и промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (ПанЭко, Россия) с дальнейшим центрифугированием 500 g в течение 10 мин. при 4°C, и ресуспендированы в ФСБ при 4°C. Клетки содержались при -80°C до использования.

Осадок клеток растворяли в 50 мкл лизирующего буфера с последующим криолизом и определением концентрации белка. Для измерения активности комплекса I дыхательной цепи митохондрий использовали буфер (25 mM K_2HPO_4 , pH 7,4, 5 mM $MgCl_2$, 0,25% бычий сывороточный альбумин, 3,7 мкМ антимицина и 2 mM KCN) в объеме, согласно количеству образцов (120 мкл анализируемой смеси на

1 лунку 96-луночного планшета) а также количество, необходимое для разбавления образцов.

Образцы клеток после оттаивания и лизиса были разведены в буфере для измерения до 75 и 37,5 мкг белка на лунку. В тестовые и контрольные лунки 96-луночного планшета был добавлен буфер для измерения активности комплекса I. Далее в опытные лунки было добавлено по 5 мкл 70% этанола и по 5 мкл 5,7 мМ НАД-Н, в контрольные лунки было добавлено по 5 мкл 0,36 мМ ротенона в 70% этаноле и по 5 мкл 5,7 мМ НАД-Н. Затем в контрольные и экспериментальные лунки было добавлено по 10 мкл клеточных лизатов до заданных конечных концентраций. Смесь инкубировали в течение 5 мин. при 37°C. Реакцию инициировали добавляя 2,8 мМ CoQ1 (коэнзим Q) во все лунки. Измерение уменьшения оптической плотности в течение 15 мин. определяли при длине волны 340 нм с референсным значением 380 нм.

Скорость реакции (Δ поглощение / мин.) с учетом молярного коэффициента экстинкции НАД-Н ($4,8 \text{ мм}^{-1} \text{ см}^{-1}$; при 340 нм) была рассчитана согласно методу Шервуда и Херста [18].

Активность комплекса I дыхательной цепи была рассчитана путем вычитания скоростей реакций в присутствии и в отсутствие ротенона, по формуле: $\text{ЕА/мг клеточного белка} = ((\Delta \text{ поглощение} / \text{мин}) \times (\text{коэффициент разбавления}) \times (1 / \varepsilon) (1 / 0,18) (1000 \text{ мкг} / \text{мг})) / (\text{мкг} / \text{мкл белка}) = \text{активность фермента} / \text{мг белка}$, где Δ поглощение / мин. —

изменение оптического поглощения в мин.; длина пути ячейки спектрофотометра уже была рассчитана в машине во время кинетики; и ε — молярный коэффициент поглощения, для окисления НАД-Н при 340 нм $\varepsilon = 6,81 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ согласно методу [18].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна — Уитни.

Результаты и обсуждение

Оценка экспрессии белковых субъединиц OXPHOS и белка TOM20 в зависимости от условий культивирования.

В ходе исследования было использовано два пути адаптации фибробластов к безглюкозной среде DMEM D5030 (среда OXPHOS) с различным процентным содержанием галактозы при сменах среды или пересева клеток. Предполагалось, что данная среда приведет клетки линии Bj к условиям стресса и усилению работы дыхательной цепи митохондрий.

Согласно первому способу культивирования фибробластов, наблюдалось повышение экспрессии ($p \leq 0,01$) белковых субъединиц V и III — АТФ-синтазы и цитохром bc1 комплекса, 54 и 48 кДа соответственно, по отношению к клеткам, выращенным в среде, содержащей 100% глюкозы (рис. 1).

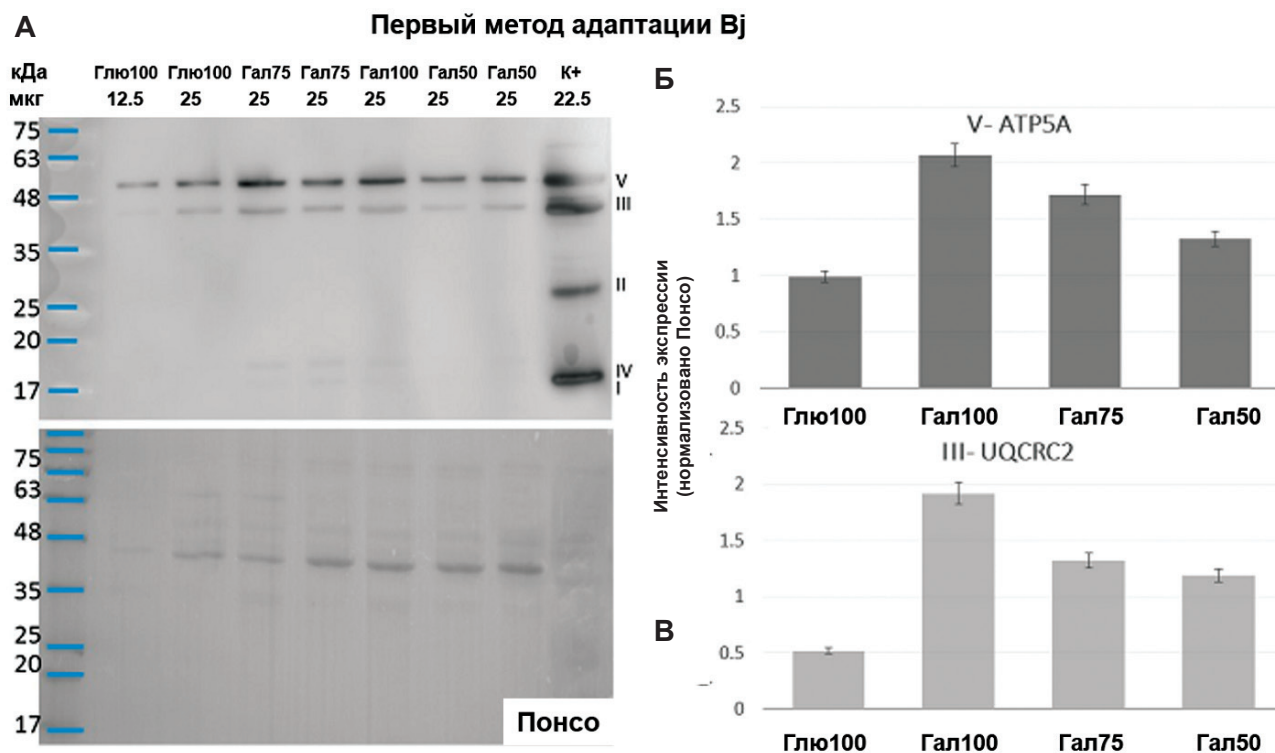


Рис. 1. Результаты иммуноблоттинга OXPHOS после первого метода культивирования:

А — K^+ -митохондриальный экстракт бычьего сердца из набора OXPHOS MS601 с конечной концентрацией белка на лунку геля 22,5 мкг. Глю100 — лизат клеток Bj, выращенных в среде со 100% глюкозы, концентрация белка на лунку 12,5 мкг. Глю100 — лизат клеток Bj, выращенных в среде со 100% глюкозы, 25 мкг. Гал75 — лизат клеток Bj, 25% глюкоза и 75% галактоза, 25 мкг. Гал100 — лизат клеток Bj, 100% галактоза, 25 мкг. Гал50 — лизат клеток Bj, 50% глюкоза и 50% галактоза, 25 мкг. Понсо — краситель белков по пептидным группам; Б — количественное представление результатов иммуноблоттинга экспрессии V комплекса АТФ-синтазы; В — III комплекса цитохрома bc1; I — НАД-Н дегидрогеназа; IV — цитохром c-оксидаза

Также по отношению к контролю (клетки, выращенные на глюкозной среде DMEM) наблюдалась незначительная экспрессия I и IV белковых комплексов НАД-Н дегидрогеназы и цитохром с оксидазы, 18 и 30 кДа соответственно. Отмечено отсутствие экспрессии комплекса II дыхательной цепи сукцинат дегидрогеназы. Можно предположить, что отсутствие ввода в дыхательную цепь дополнительных электронов за счёт окисления сукцината не является обязательным для фибробластов линии Vj при данных условиях культивирования (рис. 1).

В клетках линии Vj в стрессовых условиях, достигнутых при использовании первого пути культивирования в OXPHOS среде с различным % содержанием галактозы, наблюдалось достоверное повышение ($p \leq 0,01$) экспрессии транслоказы TOM20, принимающей участие в созревании белковых субъединиц электрон-транспортной цепи, прямо пропорциональное повышению уровня галактозы в среде (рис. 2). Это подтверждает полученные нами данные по повышению экспрессии белковых субъединиц III – и цитохром bc1 комплекса и V – АТФ-синтазы.

Согласно второму пути культивирования фибробластов, где был использован более жесткий подход к адаптации клеток линии Vj к среде OXPHOS с использованием пересева клеток было обнаружено аналогичное повышение экспрессии белковых субъединиц III – цитохром bc1 комплекса и V – АТФ-синтазы по отношению к клеткам, выращенным в среде, содержащей 100% глюкозы и более выраженное повышение экспрессии I и IV белковых комплексов НАД-Н дегидрогеназы и цитохром с-оксидазы по отношению к контрольным клеткам, выращенным в среде DMEM со 100% содержанием глюкозы (рис. 3). Отмечено, что наибольшее повышение экспрессии I и IV белковых комплексов наблюдалось в случае 75% содержания галактозы, что, вероятно, является наиболее оптимальным для индукции стресса клеток линии Vj ($p \leq 0,05$). Наблюдалось также достоверное повышение экспрессии транслоказы TOM20 ($p \leq 0,05$) по отношению к контрольным клеткам, но меньше, чем при первом варианте культивирования, что может быть связано с нарушением метаболизма клеток при пересеве, в связи с более жесткой непостепенной адаптацией клеток к среде OXPHOS (рис. 4).

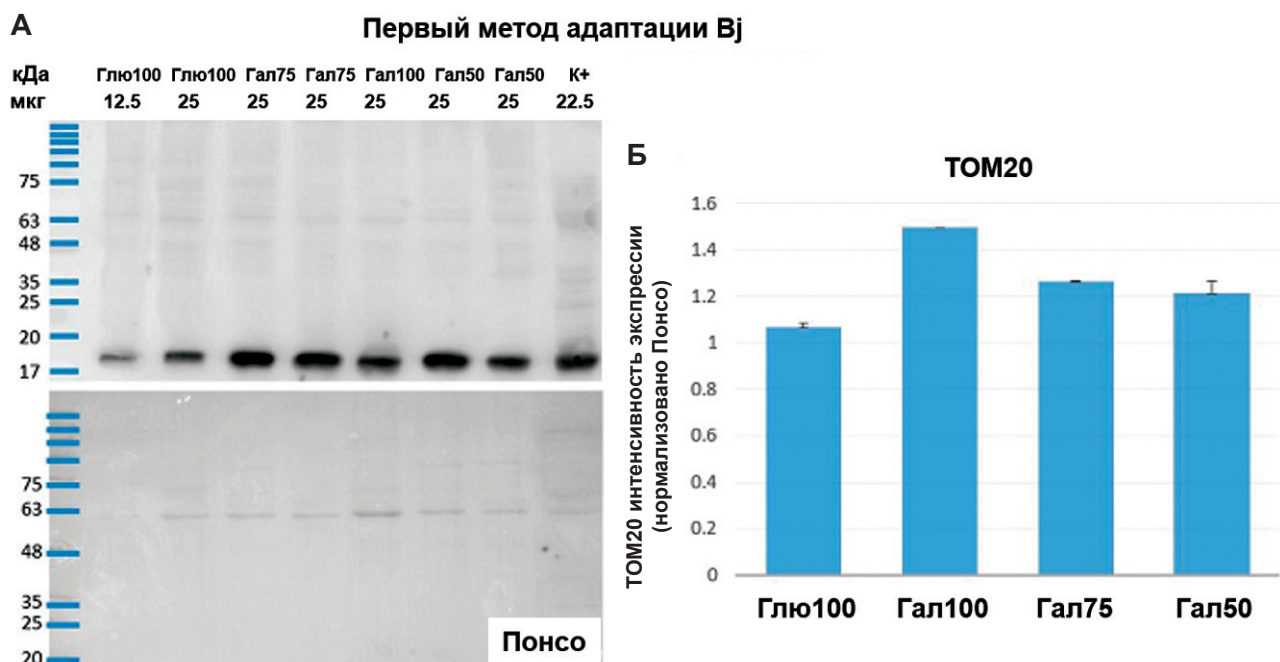


Рис. 2. Результаты иммуноблоттинга TOM20 после первого метода культивирования:

А – К⁺ – митохондриальный экстракт из бычьего сердца из набора OXPHOS MS601 с конечной концентрацией белка на лунку 22,5 мкг; Глю100 – Vjs лизат, клеток, выращенных в среде со 100% глюкозы, 12,5 мкг белка на лунку; Глю100 – Vjs лизат, клеток, выращенных в среде со 100% глюкозы, 25 мкг; Гал75 – Vjs лизат, 25% глюкоза и 75% галактоза, 25 мкг; Гал100 – Vjs лизат, 100% галактоза, 25 мкг; Гал50 – Vjs лизат, 50% глюкоза и 50% галактоза, 25 мкг; Понсо – краситель белков по пептидным группам;

Б – Количественное представление результатов иммуноблоттинга экспрессии белков TOM20 после первого варианта культивирования: Глю – глюкоза, Гал – галактоза

На основании полученных результатов можно заключить, что клетки Vj, выращенные в OXPHOS среде, характеризовались значительным увеличением экспрессии белковых субъединиц дыхательной цепи и транслоказы TOM20 по сравнению с клетками, выращенными в среде DMEM, содержащей 100% глюкозы ($p \leq 0,05$). Клетки после первого пути адаптации имеют более выраженную экспрессию по сравнению с клетками, адаптированными вторым путем культивирования с помощью пересева. Vj клетки после второго пути адаптации в среде, содержащей 100% галактозы, оказались нежизнеспособны.

Фибробласты, в частности иммортализованные, отличаются достаточно медленным механиз-

мом активации митохондрий и адгезии. Мгновенное повышение свободных радикалов и разобщение окислительного фосфорилирования в галактозной OXPHOS среде может привести к нарушению целостности и функционирования электрон-транспортной цепи митохондрий фибробластов и наступления апоптоза [19, 20].

Мы предполагаем, что адаптация к стрессовым условиям также зависит от плотности монослоя клеток, так как первый путь адаптации клеток при плотности монослоя более 80% и без пересева клеток является наиболее эффективным в индукции стресса при сохранении высокой жизнеспособности клеток.

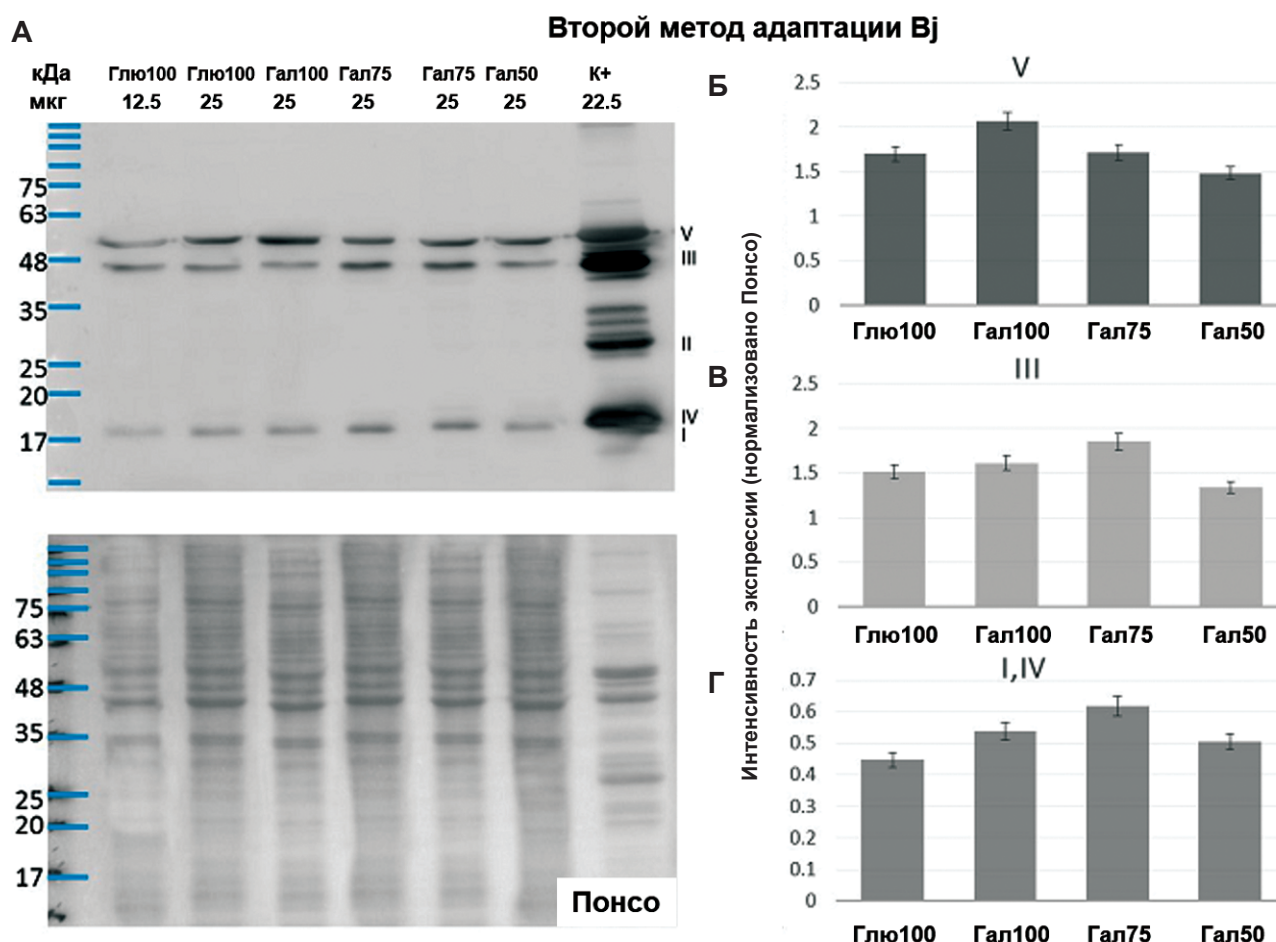


Рис. 3. Результаты иммуноблоттинга OXPHOS после второго метода культивирования:

А – К⁺ – митохондриальный экстракт из бычьего сердца из набора OXPHOS MS601 с конечной концентрации белка на лунку 22,5 мкг; Глю100 – Vjs лизат, клеток, выращенных в среде со 100% глюкозы, 12,5 мкг; Глю100 – Vjs лизат, клеток, выращенных в среде со 100% глюкозы, 25 мкг; Гал100 – Vjs лизат, 100% галактоза, 25 мкг; Гал75 – Vjs лизат, 25% глюкоза и 75% галактоза, 25 мкг; Гал50 – Vjs лизат, 50% глюкоза и 50% галактоза, 25 мкг белка на лунку. Понсо – краситель белков по пептидным группам;

Б – Количественное представление результатов иммуноблоттинга экспрессии V комплекса АТФ-синтазы;

В – III комплекса цитохрома bc1.

Г – I – НАД-Н дегидрогеназы и IV – цитохром c-оксидазы

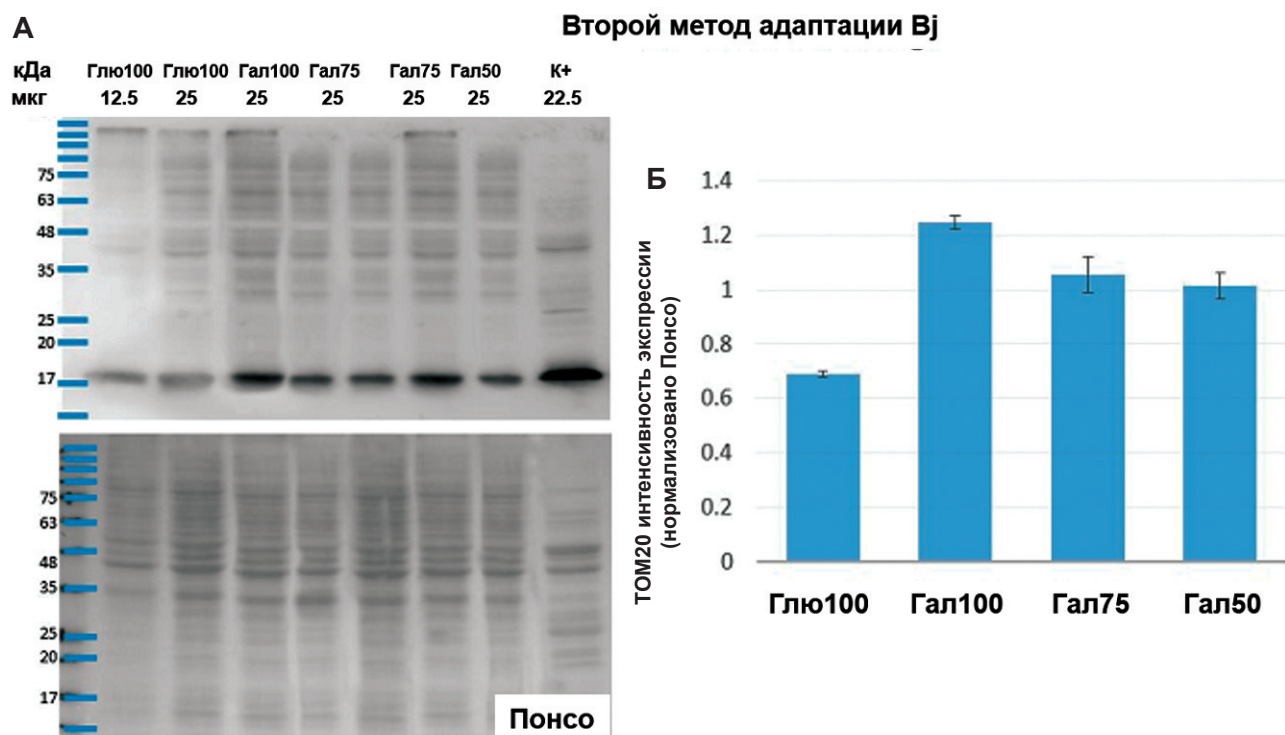


Рис. 4. Результаты иммуноблоттинга TOM20 после второго метода культивирования: А – K⁺ – митохондриальный экстракт из бычьего сердца из набора OXPHOS MS601 с конечной концентрацией белка на лунку 22,5 мкг; Глю100 – Bjс лизат, клеток, выращенных в среде со 100% глюкозы, 12,5 мкг; Глю100 – Bjс лизат, клеток, выращенных в среде со 100% глюкозы, 25 мкг; Гал100 – Bjс лизат, 100% галактоза, 25 мкг; Гал75 – Bjс лизат, 25% глюкоза и 75% галактоза, 25 мкг; Гал50 – Bjс лизат, 50% глюкоза и 50% галактоза, 25 мкг; Понсо – краситель белков по пептидным группам; Б – Количественное представление результатов иммуноблоттинга экспрессии белков TOM20 после второго метода культивирования: Гал – галактоза, Глю – глюкоза

Оценка активности комплекса I фибробластов человека линии Bj в присутствии различных доз ротенона

Клетки линии фибробластов пассажа 15 и 16 были выращены до плотности монослоя 90% в условиях добавления различных доз ингибитора комплекса I дыхательной цепи ротенона (инкубация 24 ч.). После проведения подготовки интактных клеток было произведено измерение активности

комплекса I дыхательной цепи в течение 15 мин. в отсутствие и в присутствии ротенона, согласно протоколу, описанному в материалах и методах.

Результаты энзиматической кинетики показали значительное снижение активности НАД-Н дегидрогеназы с увеличением дозы ротенона, что подтверждается отсутствием окисленного комплексом I НАД-Н, которое было рассчитано путем вычитания скоростей реакций с учетом Δ Поглощения (340–380 нм) в присутствии и в отсутствие ротенона (рис. 6).

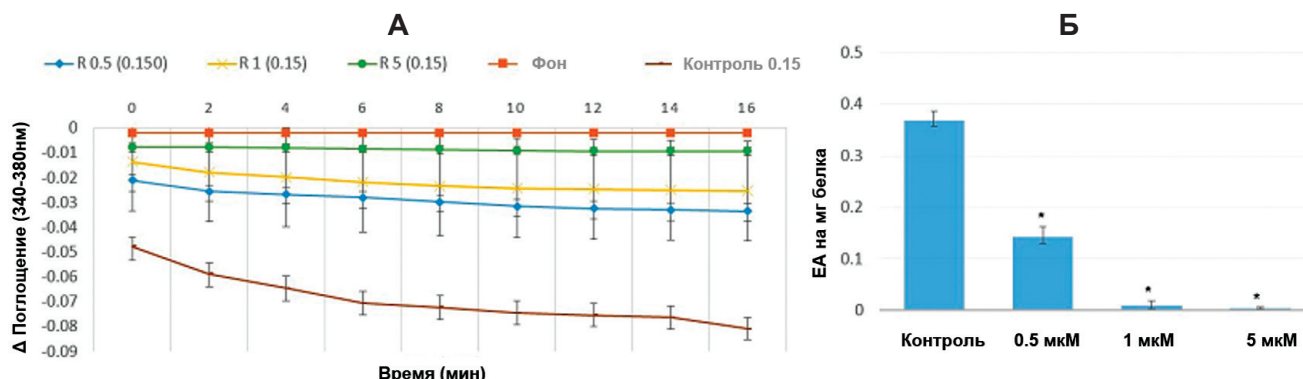


Рис. 5. Коэффициенты активности комплекса I дыхательной цепи Bj: А – R0.5(0.15) – клетки, обработанные ротеноном в концентрации 0,5 мкМ с конечной концентрацией 0,15 мкг клеточного белка; R1(0,15) – 1 мкМ и 0,15 мкг клеточного белка; R5(0,15) – 5 мкМ и 0,15 мкг клеточного белка. Фон – фон реакции без клеток; контроль – клетки, инкубированные в отсутствие ротенона с концентрацией 0,15 мкг клеточного белка; Б – средняя ферментативная активность (ЕА) на мг белка в течение 16 мин. после инкубации клеток Bj в присутствии различных доз ротенона; контроль – без ротенона, 0,15 мкг клеточного белка

Исходя из полученных данных, можно заключить, что добавление 1 и 5 мкМ ингибитора комплекса I ротенона приводит к значительному снижению ферментативной активности НАД-Н дегидрогеназы. Также происходит снижение жизнеспособности фибро-

бластов линии Vj. Использование 0,5 мкМ конечной концентрации ротенона приводит к достоверному снижению ферментативной активности комплекса I и незначительному снижению жизнеспособности клеток линии Vj (рис. 7).

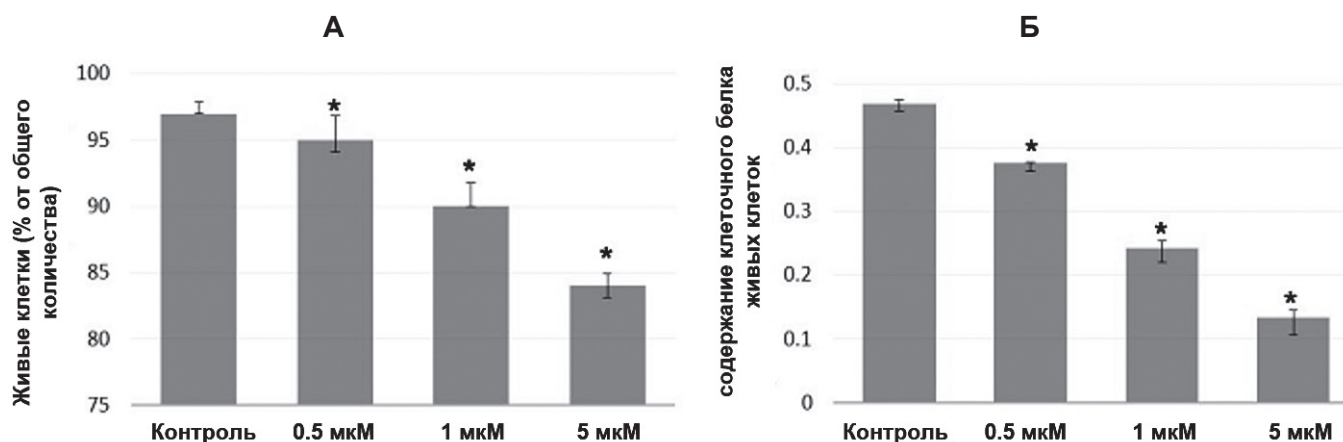


Рис. 6. Влияние различных доз ротенона на жизнеспособность фибробластов Vj; *Контроль – без ротенона с конечной концентрацией 0,15 мкг клеточного белка. Достоверность по U-критерию Манна – Уитни * $p \leq 0,05$

Таким образом, оптимизированные протоколы иммуноблоттинга и измерения ферментативной активности комплекса I фибробластов Vj в совокупности с полученными данными позволят продолжить изучение метаболической и физиологической активности фибробластов в стрессовых условиях, моделирующих митохондриальные дисфункции при нейродегенеративных заболеваниях [21, 22].

В дальнейшем планируется провести модификацию функционирования митохондрий при нейродегенеративной патологии с использованием новейших эпигенетических подходов, например, с помощью малых интерферирующих РНК с целью приостановления и реверсии заболевания [23].

Благодарности

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки России (ID RFMEFI59414X0003) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

- Migliore L., Coppede F. Genetics environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat. Res.* 2009; 667: 82-97.
- Correia S.C., Carvalho C., Cardoso S. et al. Mitochondrial preconditioning a potential neuroprotective strategy. *Front Aging Neurosci.* 2010; 2: 138.
- Migliore L., Coppede F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat. Res.* 2009; 674: 73-84.
- Bishop N.A., Lu T., Yankner B.A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 2010; 464: 529-35.
- Boveris A., Navarro A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life* 2008; 60: 308-14.
- Choi H.S., Kim H.J., Oh J.H. et al. Therapeutic potentials of human adipose-derived stem cells on the mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* 2015; 36: 2885-92.
- Lin M.T., Beal M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443: 787-95.
- Moreira P.I., Zhu X., Wang X. et al. Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1802: 212-20.
- Haigis M.C., Yankner B.A. The aging stress response. *Mol. Cell.* 2010; 40: 333-44.
- Navarro A., Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci.* 2010; 2: 34.
- Navarro A., Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2007; 292: 670-86.
- Boveris A., Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 44: 224-9.
- Gilmer L.K., Ansari M.A., Roberts K.N., Scheff S.W. Age-related changes in mitochondrial respiration and oxidative damage in the cerebral cortex of the Fischer 344 rat. *Mech. Ageing Dev.* 2010; 131: 133-43.

- Knott A.B., Bossy-Wetzel E. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 2008; 1147: 283-92.
- Hallett P.J., Deleidi M., Astradsson A. et al. Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* 2015; 16(3): 269-74.
- Lovas J.R., Wang X. The meaning of mitochondrial movement to a neuron's life. *Biochim Biophys. Acta. Disease. Free Radic. Res.* 2015; 49(5): 681-91.
- Tyurina Y.Y., Polimova A.M., Maciel E. et al. LC/MS analysis of cardiolipins in substantia nigra and plasma of rotenone-treated rats: Implication for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Free Radic. Res.* 2015; 49(5): 681-91.
- Kramer K.A., Oglesbee D., Hartman S.J. et al. Automated spectrophotometric analysis of mitochondrial respiratory chain complex enzyme activities in cultured skin fibroblasts. *Clinical Chemistry* 2005; 51: 2110-6.
- Petrosillo G., Matera M., Casanova G. et al. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochem. Int.* 2008; 53: 126-31.
- Arduino D.M., Esteves A.R., Oliveira C.R., Cardoso S.M. Mitochondrial metabolism modulation: a new therapeutic approach for Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets* 2010; 9: 105-19.
- Rahimmi A., Khosrobakhsh F., Izadpanah E. et al. N-acetylcysteine prevents rotenone-induced Parkinson's disease in rat: An investigation into the interaction of parkin and Drp1 proteins. *Brain Res. Bull.* 2015; 113: 34-40.
- Valente A.X., das Neves R.P., Oliveira P.J. Epigenetic engineering to reverse the Parkinson's expression state. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012; 18: 717-21.

Поступила: 18.10.2015