4. Vorobyeva N.S., Mazeika A.N., Davydova L.A., Velansky P.V., Tsybulsky A.V., Kostetsky E.Y., Sanina N.M. The effects of triterpene glycosides and phospholipids from marine invertebrates in the composition of tubular immunostimulating complexes on the immunogenicity of human cerum albumin. *Russian Journal of Marine Biology*, 2015, vol. 41, pp. 69-77.

5. Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunzt C., Harrison S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A resolution. *Nature*, 1995, vol. 375, pp. 291-298.

6. Kiermayr S., Stiasny K., Heinz F.X. Impact of quaternary organization on the antigenic structure of the tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E. *J.Virol*., 2009, vol. 83, pp. 8482–8491.

7. Schneider B., Junge F., Shirokov V.A., Durst F., Schwarz D., Dötsch V., Bernhard F. Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol. Biol*., 2010, vol. 601, pp. 165–186.

8. Kostetsky E.Y., Sanina N.M., Mazeika A.N., Tsybulsky A.V., Vorobyeva N.S., Shnyrov V.L. Tubular immunostimulating complex based on cucumarioside A2-2 and monogalactosyldiacylglycerol from marine macrophytes. *J. Nanobiotechnology*, 2011, vol. 9, no. 35.

9. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Khabibullina N.F., Kopeina G.S., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Mineev K.S., Tikhonov R.V., Shingarov L.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P. Lipid-protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: Comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, vol. 1818, pp. 349-358.

АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ МЫШЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ МАЛЫХ ДОЗ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Фаткуллина ЛД., Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Козаченко А.И., Наглер Л.Г., Бурлакова Е.Б.
ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ
e-mail: bcp-lfat@mail.ru

Аннотация. В работе исследовали действие природных эфирных масел орегано, гвоздики или смеси эфирного масла лимона и экстракта имбиря на антиоксидантный статус органов интактных мышей. Найдено, что эфирные масла, принимаемые мышами в течение 6 месяцев даже в очень малых дозах (300 нг в сутки), проявили себя *in vivo* как эффективные биоантиоксиданты. Они снижали интенсивность перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов, а также в печени и мозге мышей. Эфирные масла увеличивали устойчивость липидов печени и мозга к окислению и повышали активность антиоксидантных ферментов печени. В эритроцитах самым активным биоантиоксидантом было эфирное масло гвоздики, в печени и мозге – смесь эфирного масла лимона и экстракта имбиря.

Ключевые слова: эфирные масла, биоантиоксиданты, перекисное окисление липидов, эритроциты, печень и мозг интактных мышей.

ANTIOXIDANT STATUS OF ORGANS AND TISSUES OF MICE WITH THE EFFECTS OF LOW DOSE ESSENTIAL OILS

Fatkullina L.D., Misharina T.A., Alinkina E.S., Kozachenko A.I., Nagler L.G., Burlakova E.B.
Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS
ul. Kosygina, 4, Moscow, 119334, Russia
e-mail: bcp-lfat@mail.ru

Abstract. The effect of natural essential oils from oregano, clove bud, or mixture of lemon essential oil and ginger extract on antioxidant status of intact mice organs was studied. It was found that essential oils taken by the mice within 6 months, even in very small doses (300 ng per day), proved in vivo as an effective biologic antioxidants. They reduced the intensity of lipid peroxidation in membranes of erythrocytes as well as in liver and brain of mice. Essential oils increased the stability of the lipids of liver and brain and increased the activity of antioxidant enzymes of the liver. The most active bioantioxidant in erythrocytes was essential oil from clove bud, a mixture of lemon essential oil and ginger extract was more active in the liver and brain.

Key words: essential oils, bioantioxidants, lipid peroxidation, erythrocytes, liver and brain of intact mice.

Известно, что антиоксиданты (АО) являются универсальными модификаторами состава, структуры и функциональной активности мембран и многие закономерности их влияния на клеточный метаболизм могут быть объяснены с этих позиций. Существующие неблагоприятные факторы окружающей среды, развитие патологических процессов в организме приводят к нарушению отдельных звеньев этой отлаженной системы и к развитию окислительного стресса [1]. Для снижения и предотвращения его последствий используют дополнительные экзогенные АО, среди которых интересными и перспективными являются эфирные масла (ЭМ) пряно-ароматических растений, употребляемых в пищу [2].

Применение АО в биологических объектах требует проведения специальных исследований их роли и механизма действия. Изучение таких процессов является крайне сложной задачей. В настоящее время нет ни одного метода, позволяющего выявить реальный механизм действия даже индивидуального антиоксиданта в

биологических объектах и тем более - смесей веществ с различными антиоксидантными свойствами [3, 4]. Как следует из литературных данных, исследований биоантиоксидантного (БАО) действия ЭМ в живых организмах *in vivo* крайне мало [3]. Сложность таких исследований связана с многокомпонентностью их состава. Компоненты ЭМ обладают различными химическими и биологическими свойствами, начиная с различий по скорости всасывания, транспорта, экскреции, способности к проникновению и накоплению в клетке и заканчивая их непосредственным влиянием на окислительный стресс в различных клеточных компартментах. С одной стороны это недостаток, с другой – преимущество, так как по сравнению с индивидуальным веществом, многокомпонентный препарат имеет сразу несколько активных соединений, которые могут действовать по нескольким различающимся механизмам и усиливать активность друг друга.

Цель работы – изучение *in vivo* влияния эфирных масел гвоздики, орегано и смеси эфирного масла лимона и экстракта имбиря, принимаемых мышами в малых дозах с питьевой водой в течение 6 месяцев на показатели окислительного стресса в эритроцитах, печени и мозге.

В работе использовали ЭМ из листьев и цветов растения орегано *Origanum vulgare* L. , из почек гвоздики *Caryophyllus aromaticus* L., из кожуры лимона *Citrus limon* L. и экстракт имбиря *Zingiber officinale* R. производства компании Plant Lipids Ltd. Индия. Эксперименты *in vivo* проводили на самках мышей линии Balb. Контрольная группа мышей получала чистую питьевую воду *ad libitum.* Животные трех опытных групп на протяжении всего эксперимента употребляли питьевую воду с добавлением 150 нг/мл ЭМ орегано, гвоздики или смеси (1:1) ЭМ и экстракта имбиря. Через 6 месяцев приема ЭМ у мышей из каждой группы отбирали кровь, мозг и печень для биохимических исследований.

Определение содержания ТБК-АП в мембранах эритроцитов, в свежеполученных и хранившихся при 2-5 ºС в течение 3-7 дней печени и мозге мышей проводили по методике, приведенной в [5].

Определение микровязкости мембран эритроцитов проводили методом ЭПР-спектроскопии с помощью двух парамагнитных зондов, локализующихся в поверхностном слое липидов мембран на разной глубине: 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд 1) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетра-метил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболин-3-оксил (зонд 2). Время вращательной корреляции зондов τ_c имеет значение промежутка времени, за который спин радикала успевает переориентироваться на угол $\pi/2$ и характеризует микровязкость компонентов мембраны [6].

Активность антиоксидантных ферментов печени супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП) и глутатион-S-трансферазы (ГТ) определяли в гомогенате печени мышей по методикам, приведенным в работе [7]. Активность ферментов в опытных образцах выражали по отношению к активности контрольного образца, который принимали за 100 %.

Для исследования биологической активности в экспериментах на животных мы выбрали ЭМ, которые имели высокую и очень высокую антирадикальную активность в реакции со свободным стабильным дифенилпикрилгидразил радикалом [8]. Это были ЭМ гвоздики и орегано, а также смесь ЭМ лимона и экстракта имбиря, такое сочетание используют в народной медицине для профилактики и лечения некоторых видов заболеваний. Основной целью наших исследований была оценка влияния систематического приема малых доз ЭМ на антиоксидантный статус органов мышей. Из трех масел самым изученным было ЭМ орегано. Так, нами было показано, что это масло в модельной системе эффективно ингибировало окисление полиненасыщенных жирных кислот, выделенных из липидов мозга мышей. Его постоянный прием в малых дозах увеличивал среднюю и максимальную продолжительность жизни мышей, сохранял на высоком уровне содержание полиненасыщенных жирных кислот в мозге стареющих и очень старых мышей, то есть оно проявляло свойства биоантиоксиданта . Следует отметить, что ЭМ орегано имеет близкий качественный состав компонентов с ЭМ чабера и тимьяна, а также эти масла, различающиеся по соотношению и суммарной концентрации фенолов – карвакрола и тимола, были близки по антирадикальной активности [8]. Величины антирадикальной эффективности АЕ и скорости реакций компонентов этих трех ЭМ с радикалом были практически одинаковы, поэтому данные, полученные для ЭМ орегано, вероятно, могут быть экстраполированы и на ЭМ чабера и тимьяна.

В таблице 1 приведены степень гемолиза, микровязкость мембран и содержание ТБК-АП в эритроцитах мышей контрольной и трех опытных групп.

Степень гемолиза эритроцитов является характеристикой устойчивости клеточных мембран к механическому разрушению, прочность мембран зависит от степени перекисного окисления их липидов (ПОЛ) [1]. Видно (см. табл.1), что прием ЭМ гвоздики снижал величину степень гемолиза эритроцитов на 34 %, ЭМ орегано – на 14 %, а смеси ЭМ лимона и экстракта имбиря – на 11 %. Это означает, что все ЭМ при их употреблении в течение 6 месяцев увеличивали резистентность мембран эритроцитов благодаря снижению в них интенсивности ПОЛ, критерием является содержание продуктов расщепления пероксидов жирных кислот в липидах, в основном малонового диальдегида, дающего окрашенные азометиновые комплексы с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) [5]. Как видно из таблицы 1, величины ТБК-АП для мембран эритроцитов в опытных группах мышей были меньше, чем в контрольной группе, при этом самым активным было ЭМ гвоздики, его прием снижал содержание ТБК-АП на 41 %. Следует отметить, что такое сильное биоантиоксидантное действие ЭМ *in vivo* найдено впервые. Меньшее содержание пероксидов жирных кислот в мембранах эритроцитов мышей из опытных групп отражалось также на величинах микровязкости липидов мембран. Как видно из табл.1, ЭМ гвоздики и орегано снижали τ_c зонда 1 на 20-30 % , а зонда 2 – на 7-8 %. Аналогичное поведение зонда 1 в липидах мембран было найдено в случае введения мышам синтетических АО

ионола и эмоксипина [9]. Таким образом, все изученные ЭМ снижали интенсивность ПОЛ в мембранах эритроцитов, это приводило к увеличению их резистентности, к снижению микровязкости и сохранению структурной целостности и функциональной активности.

Таблица 1 – Влияние ЭМ на биохимические параметры эритроцитов, печени и мозга мышей

Параметр		Величины параметров и их изменение по сравнению с контролем (%) в группах мышей			
		Контроль	ЭМ орегано	ЭМ гвоздики	ЭМ лимона + экстракт имбиря
Степень гемолиза эритроцитов, %		100,0±6,8	85,0±6,2	66,3±6,9	91,7±6,1
Микровязкость поверхностных липидов эритроцитов, τ_c 10^{-10} с		0.32±0.02	0.25±0.03	0.22±0.02	0.32±0.03
Микровязкость прибелковых липидов эритроцитов, τ_c 10^{-10} с		1.22±0.08	1.12±0.07	1.14±0.05	1.23±0.07
ТБК-АП эритроцитов, мкмоль/л эритроцитарной массы		14.1±1,5	10.7± 0,4	8.25±0,37	11,00±0,38
ТБК-АП в печени, нмоль/г ткани	0 дней	3,14±0,23 (100%)	2,95±0,20 (94 %)	2,23±0,19 (71%)	1,92± 0,16 (61%)
	7 дней	11,21±0,36 (357%)*	7,12±0,23 (241%)*	4,85±0,20 (223%)*	3,26±0,18 (170%)*
ТБК-АП в мозге, нмоль/г ткани	0 дней	1,72±0,24 (100%)	1.58±0,15 (92%)	1.30±0,10 (75%)	1.22±0,12 (71%)
	3 дня	3,72±0,39 (216%)*	1,89±0,34 (120%)*	2,92±0,38 (225%)*	2,52±0,32 (207%)*

* - по сравнению с содержанием ТБК-АП в свежих печени и мозге мышей такой же группы (0 дней)

Прием ЭМ снижал величины ТБК-АП в органах мышей: ЭМ орегано – на 6 % в печени и на 8 % в мозге, ЭМ гвоздики – на 29% в печени и на 25 % в мозге мышей по сравнению с контролем (см. табл. 1). Самой высокой активностью обладало ЭМ лимона в смеси с экстрактом имбиря, величины ТБК-АП снижались на 39 % в печени мышей и на 29 % в мозге. Полученные данные свидетельствуют о том, что ЭМ являлись биоантиоксидантами. Более того, мы нашли, что при длительном употреблении компоненты ЭМ и экстрактов увеличивали устойчивость липидов печени и мозга мышей к окислению. Так, через 7 дней хранения при 2-5 ^oC в печени мышей контрольной группы содержание ТБК-АП увеличилось в 3,6 раза, тогда как содержание ТБК-АП в печени мышей опытных групп по сравнению со свежими образцами печени увеличилось, но в 1.7-2.4 раза (см. табл. 1). Это означает, что длительный прием (6 мес.) ЭМ приводил к снижению интенсивности ПОЛ в печени в 1.5 раза (ЭМ орегано), 1.6 раза (ЭМ гвоздики) и 2 раза (ЭМ лимона с экстрактом имбиря). Аналогичным образом ЭМ действовали на устойчивость липидов в тканях мозга мышей, при этом наиболее эффективным было ЭМ орегано (см. табл.1). Активное биоантиоксидантное действие смеси ЭМ масла лимона и экстракта имбиря в печени мышей может быть обусловлено тем, что экстракт имбиря содержал около 70 % нелетучих веществ, многие из которых обладают АО свойствами (флавоноиды, замещенные метоксифенолы) [10], эти соединения способны накапливаться в тканях органов мышей и оказывать пролонгированное АО действие. Такие исследования *in vivo* ранее не проводились.

Найдено, что ЭМ влияли на активности АО ферментов в гомогенате печени (см. табл. 2). Видно, что ЭМ увеличивали активность фермента первой линии антирадикальной защиты СОД в 1.2-1.5 раза, что является важным вкладом в повышение антиоксидантного статуса организма. Активность ГП заметно увеличивалась только при приеме ЭМ гвоздики (на 28 %).

Таблица 2 – Действие эфирных масел на активности АО ферментов в печени мышей

Опытные группы, принимавшие эфирное масло	Активность фермента по сравнению с контролем, %			
	СОД	ГП	ГТ	СОД/ГП
ЭМ орегано	151±7	94±8	158±9	166±10
ЭМ гвоздики	128±8	128±9	198±10	102±10
ЭМ лимона + экстракт имбиря	125±8	107±8	116±10	116±10

Соотношение активностей СОД/ГП является показателем функционирования антиоксидантных ферментов как единой целой системы [11]. Из таблицы 2 видно, что прием ЭМ орегано увеличивал этот показатель по сравнению с контролем на 66%, ЭМ лимона – на 16 % и ЭМ гвоздики – всего на 2 %. Это означает, что при приеме ЭМ орегано самый весомый вклад в защиту от активных форм кислорода вносили ферменты первой линии антиоксидантной защиты, вклад ферментов глутатион-зависимого звена был менее значим. При

употреблении ЭМ гвоздики и смеси ЭМ лимона и экстракта имбиря защита от разрушающего действия активных форм кислорода осуществлялась сбалансировано, так как соотношение СОД/ГП изменялось незначительно по сравнению с контролем. Полученные данные показали, что и в отсутствие окислительного стресса изученные ЭМ, изменяя баланс АО ферментов, оказывали позитивное влияние на АО статус, снижали интенсивность ПОЛ (см. табл. 1) и формировали устойчивость к окислительному стрессу.

Самое сильное влияние ЭМ оказывали на активность третьего фермента - глутатион- трансферазы. ЭМ гвоздики и лимона увеличивали ее активность в 2 раза, орегано – в 1.6 раза (см. табл. 2). ГТ эффективно восстанавливает гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (линолевой и арахидоновой), фосфолипидов, а также гидроперекиси мононуклеотидов и ДНК, участвуя тем самым в их репарации [12]. Этот фермент является важнейшим компонентом системы детоксикации и АО защиты, включая эндогенные метаболиты, образующиеся при окислительном стрессе [13]. Прием ЭМ оказывал самое сильное влияние на активность именно этого фермента. Нельзя не принимать во внимание, что компоненты ЭМ могли восприниматься печенью мышей как экзогенные токсиканты, так как повышение активности глутатион-зависимых ферментов на фоне повышенной активности СОД в некоторых работах объясняют некоторой интоксикацией организма компонентами ЭМ. В таких случаях наблюдали дополнительную активность систем детоксикации с выработкой активных форм кислорода, а также и АО ферментов, контролирующих их уровень. Но в нашем случае дозы ЭМ были крайне малы, суммарное содержание принимаемых за 6 мес ЭМ было как минимум на порядок меньше цитотоксической дозы, поэтому нет оснований говорить о том, что причиной увеличения активности ферментного звена АО защиты организма была токсичность ЭМ.

Таким образом, проведенное исследование показало, что ЭМ, принимаемые мышами в малых дозах в течение 6 месяцев с питьевой водой, проявили себя *in vivo* как эффективные биоантиоксиданты. Все изученные ЭМ снижали интенсивность ПОЛ в мембранах эритроцитов, это приводило к увеличению их резистентности, к снижению микровязкости и сохранению структурной целостности и функциональной активности. Наиболее активным было ЭМ гвоздики. Прием ЭМ снижал содержание продуктов ПОЛ в печени и мозге животных, более того, ЭМ увеличивали устойчивость липидов в этих органах к автоокислению. Максимальную эффективность в этом процессе имела смесь ЭМ лимона и экстракта имбиря. Прием ЭМ индуцировал активность системы антиоксидантных ферментов в печени мышей, повышал АО статус организма. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейших исследований ЭМ и экстрактов пряно-ароматических растений в качестве профилактических и терапевтических средств при различных заболеваниях.

Список литературы / References:

1. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. *Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты*, М: СЛОВО, 2006, 576 с. [Menschikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.T., Bondar I.A., Krugovych N.F., Trufakin V.A. *Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants*, Moscow: SLOVO, 2006, 576 p. (In Russ.).]

2. Dragland S., Senoo H., Wake K., Holte K., Blomhoff R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J. Nutr.*, 2003, vol. 133, pp. 1286-1290.

3. Frankel E.N. Antioxidants in Food and Biology. Facts and Fiction. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 4901-4908.

4. Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric Food Chem*, 2005, vol. 53, pp. 3101-3113.

5. Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl4 intoxication, and vitamin E deficiency. *Biochem. Med*, 1980, vol. 23, pp. 302-311.

6. Бинюков В.И., Борунова С.Ф., Гольдфельд М.Г., Жукова Л.Г., Кудлай Д.Г., Кузнецов А.Н., Шапиро А.Б., Островский Д.Н. Исследование структурных переходов в биологических мембранах методом спинового зонда. *Биохимия*, 1971, т. 36, с. 1149-1155. [Binukov V. I., Borunova S. F., Goldfeld M. G., Zhukova G. L., Kudlay D. G., Kuznetsov A.N., Shapiro, A. B., Ostrovsky D. N. The study of structural transitions in biological membranes by the method of spin probe. *Biochimia*, 1971, vol. 36, pp. 1149-1155. (In Russ.)]

7. Вартанян Л.С. Исследование определения СОД активности в тканях животных с тетранитротетразоливым синим. *Вопр. мед. химии*, 1982, вып. 5, с. 23-56. [Vartanyan L.S. Study of the determination of SOD activity in animal tissues wih tetranitromethane blue. *Vopr. Med. Khimii*, 1982, vol. 5, pp. 23-56. (In Russ.)]

8. Бурлакова Е.Б., Мишарина Т.А., Воробьева А.К., Алинкина Е.С., Фаткуллина Л.Д., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. Торможение процессов старения мышей при приеме композиции эфирных масел. *ДАН*, 2012, т. 444, с. 676-679. [Burlakova E.B., Misharina T.A.,Vorobyova A.K., Alinkina E.S., Fatkullina L. D., Terenina M.B., Krikunova N.I. The inhibition of aging mice when receiving the composition of essential oils. *Doklady PAS*, 2012, vol. 444, pp. 676-679. (In Russ.)]

9. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты и синтетические ингибиторы радикальных процессов. *Успехи химии.* 1975, т. 44, с.1871-1879. [Burlakova E.B. Biologic antioxidants and synthetic inhibitors of radical processes. *Uspekhi khimii*, 1975, vol. 44, pp.1871-1879. (In Russ.)]

10. Funk J.L., Frye J.B., Oyarzo J.N., Timmermann B.N. Comparative effects of two gingerol-containing Zingiber officinale extracts on experimental rheumatoid arthritis. *J. Nat. Prod*, 2009, vol. 72, pp. 403-407.

11. Вашанов Г.А., Каверин Н.Н. Взаимосвязи между основными антиоксидантными системами крови телят разного возраста. *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*, 2009, вып. 1, с. 58-61.

12. Lam L., Ying L. Hasegawa S. Effects of citrus limonoids on glutathione S-transferase activity in mice. *J. Agric. Food Chem*, 1989, vol. 37, pp. 878-880. [Vashanov G. A., Kaverin N. N. The relationship between the main antioxidant systems of blood of calves of different ages. *Bulletin of VSU, Series: Chemistry. Biology. Farmacia*, 2009, vol. 1, pp. 58-61. (In Russ.)]

13. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы. *Успехи соврем. биол.*, 1989, т. 107, с. 179-194. [Kolesnichenko L.S., Kulinsky V.I. Glutathione Transferases. *The successes modern biol.*, 1989, vol. 107, pp. 179-194. (In Russ.)]

МТТ ДЕПОЛЯРИЗУЕТ МИТОХОНДРИИ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ

Шарипов Р.Р. [1], Лисина О.Ю. [1,2], Красильникова И.А. [3], Вышенская Т.В. [2], Пинелис В.Г. [3], Сурин А.М. [1,3,4]

[1] ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

ул. Балтийская, 8, г. Москва, 125315 ,РФ

[2] Московский технологический университет

пр. Вернадского, 78, г. Москва, 119454, РФ

[3] ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России

Ломоносовский пр, 2, стр.1, г. Москва, 119991, РФ

[4] Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117513, РФ

Аннотация: МТТ-анализ – один из наиболее используемых методов определения выживаемости клеток в культуре при различных фармакологических воздействиях. Внутриклеточные дегидрогеназы восстанавливают МТТ (3-(4,5-ди**М**етил**Т**иазол-2-ил)-2,5-дифенил**Т**етразолий бромид) до формазана, который сильно поглощает свет области короче ~600нм. Формазан образует агрегаты и обнаруживается в клетках по появлению темных «зерен». В настоящей работе выполнено исследование влияния МТТ на митохондриальный потенциал (ΔΨm) и поглощение света в культивируемых нейронах мозжечка крысы методами световой микроскопии. Изменения потенциала регистрировали с помощью флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда родамин 123 (Rh123). Добавление МТТ (0,1мМ) вызывало быстрое и практически полное тушение флуоресценции Rh123, которое через 5-10 мин сменялось ростом флуоресценции в нуклеоплазме. Зонд выходил из митохондрий в цитозоль с последующей диффузией в ядро, что является характерным признаком падения ΔΨm. Столь же быстрым было тушение флуоресценции митотрекера зеленого (MTG), которое не сменялось ростом флуоресценции, поскольку MTG связывается с митохондриями необратимо. Рост флуоресценции Rh123 совпадал с началом снижения интенсивности света, проходящего сквозь клетки, в результате образования формазана. МТТ вызывал также необратимое снижение автофлуоресценции нейронов, обусловленной NADH. Восходящая фаза сигнала Rh123 и снижение интенсивности проходящего сквозь клетки света отражает, вероятно, прекращение окисления NADH комплексом 1 дыхательной цепи вследствие того, что NADH тратится на восстановление МТТ до формазана. В итоге прекращается работа комплекса 1 дыхательной цепи и развивается деполяризация митохондрий. Полученные результаты указывают на то, что МТТ (при концентрациях 0,1мМ и выше) вызывает быструю дисфункцию митохондрий и поэтому следует относиться с осторожностью к интерпретации данных о выживаемости клеток и активности дегидрогеназ на основании количества формазана, образовавшегося при инкубации клеточных культур с МТТ.

Ключевые слова: нейроны, митохондриальный потенциал, флуоресцентная микроскопия, МТТ.

MTT DEPOLARIZE MITOCHONDRIA IN CULTURED NEURONS

Sharipov R.R. [1], Lisina O.Yu. [1,2], Krasilnikova I.A. [3], Vyshenskaya T.V. [2], Pinelis V.G. [3], Surin A.M. [1,3,4]

[1]Institute of General Pathology and Pathophysiology

Baltiiskaya str., 8. Moscow, 125315, Russia

[2]Moscow Technological Institute

Vernadskogo av., 78, Moscow, 119454, Russia

[3]Federal State Autonomous Institution «Scientific Center for Children's Health» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Lomonosovsky av., 2/1, Moscow, 119991, Russia

[4]Pirogov Russian National Research Medical University

Ostrovityanova str., 1, Moscow, 117997, Russia

Abstract: MTT assay is one of the widespread methods of determining the viability of cells in culture with different pharmacological treatment. Intracellular dehydrogenases reduce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to formazan, which absorbs light in the spectral region <600nm. Formazan forms aggregates in the cells which appeared as dark spots. In the present work, we performed a light microscopy study on the impact of MTT on mitochondrial potential (ΔΨm) and the light absorption by cultured neurons from rat cerebellum. Changes of ΔΨm were recorded employing fluorescent potential-sensitive probe rhodamine123 (Rh123). Application of MTT (0.1mM) caused a rapid and almost complete quenching of fluorescence Rh123, followed by (in 5-10 min) fluorescence increase in the nucleoplasm. Rh123 diffused out of the mitochondria to the cytosol followed by diffusion into the nucleus, which is a characteristic feature of the ΔΨm fall. Equally rapid has been quenching of the MitoTrecker