

На правах рукописи

КОНОВАЛОВА

Светлана Александровна

**МЕХАНИЗМЫ ОБРАТИМОЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ДЕПРЕССИИ И
ГИБЕЛИ ГЕПАТОЦИТОВ МИНОГИ РЕЧНОЙ (*Lampetra fluviatilis* L.) В
ПЕРИОД ПРЕДНЕРЕСТОВОЙ МИГРАЦИИ.**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2011

Работа выполнена в лаборатории сравнительной биохимии неорганических ионов Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Научные руководители: доктор биологических наук
Савина Маргарита Васильевна

доктор биологических наук
Никифоров Анатолий Александрович

Официальные оппоненты: член-корр. РАН, доктор
медицинских наук, профессор
Самойлов Владимир Олегович

доктор биологических наук
Морозов Владимир Игоревич

Ведущее научное учреждение: Учреждение Российской академии наук
Институт цитологии РАН

Защита диссертации состоится «14» февраля 2012 года в ___ часов на заседании диссертационного совета (Д 002.127.01) при Учреждении Российской академии наук Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44).

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

М.Н. Маслова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Метаболическая депрессия – адаптивный биологический процесс, направленный на сохранение энергии в неблагоприятных условиях окружающей среды. Одной из актуальных проблем современной биоэнергетики является исследование механизмов метаболической депрессии, которая сопровождает множество заболеваний у высших животных, в том числе и у человека (например, врожденные митохондриальные заболевания, нейродегенеративные заболевания, сепсис [Seppet et al., 2009]). Клинические случаи метаболической депрессии необратимы и часто имеют летальный исход. В то же время обратимая метаболическая депрессия является неотъемлемой частью жизненного цикла многих животных. Учитывая эволюционный консерватизм биоэнергетических процессов, эти животные дают возможность изучать механизмы, обеспечивающие вход в метаболическую депрессию, поддержание жизнедеятельности в период метаболической депрессии и выход из этого состояния.

В настоящее время накоплено некоторое количество данных по молекулярным механизмам развития метаболической депрессии, вызванной дефицитом кислорода. Однако практически отсутствуют исследования, посвященные изучению метаболической депрессии, вызванной голоданием. В частности, динамика митохондриального мембранного потенциала в клетках, переживающих метаболическую депрессию, ранее не была исследована.

Объектом наших исследований были гепатоциты миноги. Эти животные представляют особый интерес в изучении феномена метаболической депрессии. Миноги моноцикличны и на протяжении всего преднерестового периода, который длится 8-9 месяцев, не питаются. В течение всей фазы естественного голодания жизнь миног поддерживается исключительно за счет мобилизации гликогена, липидов и белков, главным образом, мышечной ткани. Большая часть органов в этот период не проявляет каких-либо признаков гипометаболизма, в то время как в печени наблюдается существенное подавление энергетического обмена, связанное с ограничением доступности субстратов. Содержание гликогена в печени очень низкое (50-125 мг%) и не меняется на протяжении всего преднерестового периода [Плисецкая, 1975], также не меняется концентрация белка [Savina and Gamper, 1998]. Липидные капли, которыми заполнены гепатоциты, не расходуются до весны. Система кровоснабжения не в состоянии восполнить недостаток субстратов в печени, поскольку 80% крови поступает в печень через портальную вену, а пищеварительная система миног в этот период полностью атрофирована. Это приводит к глубокой метаболической депрессии.

Однако данная ситуация обратима. Весной под действием гипофизарных гормонов в гепатоцитах активируется липолиз, обеспечивающий энергией синтез вителлогенина – белка, необходимого для созревания икринок [Mommensen and Walsh, 1988]. В этот период энергетические характеристики изолированных гепатоцитов миноги возвращаются к осенним значениям, но на

короткое время. Поскольку многие сразу после нереста погибают, представляло интерес изучение механизмов гибели гепатоцитов.

Гибель клетки может происходить по двум основным путям – некротическому и апоптотическому. Некроз сопровождается разрушением плазматической мембраны и лизисом клеток. В зимний период метаболической депрессии небольшое количество клеток (10-15%) погибают некротической смертью. Остальные гепатоциты весной после окончания синтеза вителлогенина, погибают путем апоптоза. Апоптоз представляет собой более медленный, регулируемый процесс гибели. При этом клетка постепенно фрагментируется и поглощается соседними клетками [Kerr et al., 1972]. Апоптоз – это запрограммированная смерть клетки, сопровождающаяся активацией каскадов каспаз, митохондриальными событиями (образованием поры высокой проводимости во внутренней митохондриальной мембране и выходом цитохрома с из митохондрий) и фрагментацией ядерной ДНК.

Изучение механизмов апоптоза является одним из наиболее актуальных направлений современной медицинской науки. Это связано с тем, что запрограммированная клеточная гибель связана со многими патологическими состояниями. Несмотря на большое количество экспериментальных данных, до сих пор остаются не выясненными многие механизмы этого явления. В частности, остается неизвестным, что является первопричиной биоэнергетических сдвигов при развитии апоптоза, и в какой взаимосвязи находятся различные пути гибели клетки.

Целью настоящей работы было изучение механизмов, лежащих в основе развития и регуляции обратимой метаболической депрессии, а также выявление механизмов гибели гепатоцитов многих речной в период преднерестовой миграции.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить энергетические параметры гепатоцитов многих при развитии метаболической депрессии: концентрации адениновых нуклеотидов (в ткани печени и в гепатоцитах) и митохондриальный мембранный потенциал (ММП).

2. Изучить действие митохондриальных ингибиторов на выживаемость клеток и концентрации АТФ при метаболической депрессии.

3. Определить концентрацию внутриклеточного кальция, и состояние внутриклеточных кальциевых депо при метаболической депрессии.

4. Исследовать динамику внутриклеточного рН при развитии метаболической депрессии.

5. Оценить активность ключевых ферментов митохондриального и лизосомального путей гибели клеток (каспаз 3, 7, 9 и катепсина Б, соответственно), а также определить выход цитохрома с из митохондрий многих в весенний период.

Научная новизна результатов исследования. В результате проведенных исследований выявлена динамика изменений митохондриального мембранного

потенциала, обнаружены изменения концентрации внутриклеточного кальция и рН в клетке при метаболической депрессии. Исследованы механизмы, обеспечивающие контроль метаболической депрессии. Обнаружено параллельное развитие митохондриального и лизосомального путей гибели клеток.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Вход в метаболическую депрессию в гепатоцитах миноги сопровождается снижением концентрации АТФ, энергетического заряда Аткинсона $(\text{ATP}+1/2\text{ADP})/(\text{ATP}+\text{ADP}+\text{AMP})$ и митохондриального мембранного потенциала.
2. Выживаемость клеток в условиях метаболической депрессии обусловлена: снижением внутриклеточного рН, а также умеренным увеличением концентрации цитозольного кальция, создающим условия для координированного ареста ионных каналов через систему обратимого фосфорилирования.
3. Гибель гепатоцитов миноги в весенний период обусловлена выходом цитохрома с из митохондрий и активацией как митохондриального, так и лизосомального путей апоптоза.

Теоретическое и практическое значение работы. Работа имеет, прежде всего, значение для фундаментальной науки в области эволюционной биохимии и биоэнергетики. Теоретическое значение работы состоит в расширении представлений о механизмах развития и регуляции обратимой метаболической депрессии. Результаты исследования могут быть полезны для понимания механизмов гибели клеток и взаимосвязи сигнальных путей, задействованных в этом процессе, а также для выявления возможных механизмов защиты клеток от гибели.

Результаты исследования могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов обратимой метаболической депрессии, а также в прикладных целях, например, при разработке новых методических подходов в диагностике и лечении митохондриальных заболеваний и заболеваний, связанных с развитием апоптоза.

Апробация работы. Результаты исследования докладывались на Седьмой международной конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2009 г.); на Международной конференции «Современные методы микроскопии в биологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2009 г.); на Шестнадцатой Европейской Биоэнергетической конференции (ЕВЕС 2010) (Варшава, Польша, 2010 г.); на Седьмой конференции по митохондриальной физиологии (Обергургл, Австрия, 2010 г.); на XIV Международном совещании и VII Школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2011).

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук и Российского фонда фундаментальных исследований (грант №08-04-00564).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи, одна из которых в зарубежном журнале, и 11 тезисов, 6 из которых опубликованы в иностранных изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методики, результатов исследования, их обсуждения, выводов, списка литературы из источников, включая отечественных и зарубежных, работа изложена на страницах, иллюстрирована рисунками и таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Работа выполнена на самках миног (*Lampetra fluviatilis* L.). Животных вылавливали в сентябре-октябре в дельте Невы во время преднерестовой миграции из Балтийского моря в реку и содержали в аквариумах с чистой, холодной (+2-+4°C) и хорошо аэрируемой водой. Все эксперименты проводились с 2008 по 2011 гг.

Выделение гепатоцитов миноги. Гепатоциты из печени миноги выделяли коллагеназным методом [Mommsen et al, 1994] с модификациями. Печень наркотизированного животного (40 мг нембутала на 50 г живого веса) перфузировали *in situ* через *sinus venosus* охлажденной средой выделения (136.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.81 mM MgSO₄, 0.44 mM KН₂PO₄, 0.33 mM Na₂HPO₄, 5.0 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 5 mM глюкозы, pH 7.6). По окончании перфузии печень изолировали и измельчали ножницами на кусочки размером 1-2 мм. Кусочки отмывали средой для перфузии и инкубировали в той же среде с добавлением 0.1% коллагеназы VIII типа в течение 1 часа при комнатной температуре (20-22°C). Диспергированные кусочки печени пропускали через нейлоновый фильтр. Полученную суспензию клеток отмывали 3 раза путем центрифугирования в течение 3 минут при 60g. Супернатант осторожно сливали, а клеточный осадок ресуспендировали в среде выделения, содержащей CaCl₂ (1.5 mM) и 0.5% бычьего сывороточного альбумина (БСА). С конца октября до середины марта pH сред выделения был 6.5 вместо 7.6, при этом HEPES (pKa = 7.5) во всех растворах был заменен на MES (pKa = 6.1) [Savina and Gamper, 1998].

Определение концентрации адениновых нуклеотидов в гепатоцитах и кусочках печени миноги.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Получение тканевых и клеточных экстрактов. После декапитации животных печень быстро изолировали и немедленно замораживали в жидком азоте. Затем кусочки замороженной ткани растирали до порошкообразного состояния в охлажденной фарфоровой ступке с жидким азотом.

Гомогенизированную ткань обрабатывали 1 М HClO₄ (из расчета 5 мкл/мг ткани) в течение 30 мин, затем гомогенат центрифугировали при 4°C в течение 10 мин при 10000g. Надосадочную жидкость нейтрализовали 1.5 М K₂CO₃, приготовленном на 0.5 М триэтаноламине (45 мкл/100 мкл экстракта) и выдерживали на льду 15 мин, после чего осадок удаляли центрифугированием. Экстракты клеток получали аналогичным образом: к 100 мкл суспензии гепатоцитов, содержащей 5-10 млн клеток, добавляли на льду 100 мкл 1 М HClO₄. Через 20 минут пробу центрифугировали при 4°C в течение 10 мин. Экстракт нейтрализовали 1.5 М K₂CO₃, приготовленном на 0.5 М триэтаноламине (45 мкл/100 мкл экстракта) и выдерживали на льду 10 мин, после чего осадок удаляли центрифугированием. Супернатант хранили до анализа при -80°C.

Условия хроматографирования. Определение нуклеотидов в образцах проводили методом ионообменной ВЭЖХ на хроматографе марки «Кнауег» (Германия) с использованием колонки «Phenomenex Luna NH₂» (4,6 × 250 мм, 5 мкм) (США). Детектирование проводили при длине волны 254 нм. Для полного разделения нуклеотидов применяли линейную градиентную элюцию фосфатного буфера.

При использовании люциферин-люциферазного метода концентрацию АТФ измеряли с помощью стандартных наборов реактивов “Люмтек” (Россия).

Определение митохондриального мембранного потенциала (ММП) в гепатоцитах миноги. Для измерения ММП использовали витальные флуоресцентные красители tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) [Ehrenberg et al., 1988], DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) [Pringle et al., 1989] и MitoTracker Green (MTG) [Zhang Y.Z., 1994]. Окрашенные клетки анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (“Leica Microsystems”, Heidelberg, Germany) и на проточном цитометре EPICS XL (“Beckman Coulter”, USA).

Анализ изображений, полученных на конфокальном микроскопе, проводили с помощью стандартного программного обеспечения Leica, программы Image J 1.41 (Wayane Rasband, National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>), а также с помощью специально разработанной программы MicroPhoto (ИЭФБ РАН). Анализ данных, полученных на проточном цитометре, проводили в программе WinMDI 2.9 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Для определения фоновой флуоресценции использовали клетки, преинкубированные с протонофором carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine (FCCP, 40 мкМ).

Определение ММП с помощью TMRM. Суспензию клеток (1 млн/мл) инкубировали с TMRM (500 нМ) при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Затем гепатоциты отмывали 2 минуты при 60g и ресуспендировали в среде выделения, содержащей 0,25% BSA. Флуоресценцию красителя на конфокальном микроскопе возбуждали синим светом аргонового лазера ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ нм), а регистрировали при длине волны > 560 нм. При анализе клеток на проточном цитометре интенсивность флуоресценции регистрировали во втором канале FL2 (575±15 нм).

Определение ММП с помощью DiOC₆(3). Гепатоциты (1 млн/мл) инкубировали с DiOC₆(3) (1 нМ) в течение 40 минут при комнатной температуре в темноте [Rottenberg and Wu, 1998]. Для выявления погибших клеток к каждой пробе непосредственно перед анализом добавляли пропидий йодид (PI, 5 мкг/мл). При анализе клеток на проточном цитометре флюоресценцию DiOC₆(3) и PI возбуждали синим аргоновым лазером (488 нм), а регистрировали в первом канале FL1 для DiOC₆(3) (525±20 нм) и в третьем канале для PI (620±15 нм). При конфокальной микроскопии интенсивность флюоресценции регистрировали в зеленой области ($\lambda_{em} = 500-520$ нм) при возбуждении синим светом аргонового лазера ($\lambda_{ex} = 488$ нм).

Изображения, полученные на конфокальном микроскопе, были количественно проанализированы с помощью программы Image J. По каждому образцу было проанализировано не менее 50 клеток из неперекрывающихся областей изображения. Для каждой клетки была определена средняя интенсивность флюоресценции TMRM, затем из этого значения вычиталась фоновая флюоресценция (флюоресценция после добавления FCCP в конечной концентрации 40 мкМ). Полученные средние значения флюоресценции TMRM представлены в процентах от исходного значения.

Измерение внутриклеточной концентрации свободного кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Для определения $[Ca^{2+}]_i$ гепатоциты нагружали флуоресцентным зондом Fura 2-AM (5 мкМ). Флуоресценцию клеток измеряли на спектрофлуорофотометре ($\lambda_{ex} = 340$ и 380 нм, $\lambda_{em} = 510$) как в среде содержащей кальций (1.5 мМ), так и в бескальциевой среде (с добавлением ЭГТА (0.5 мМ)). Внутриклеточную концентрацию свободных ионов Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) рассчитывали по уравнению Гринкевича [Grynkiewicz, 1985]. ($[Ca^{2+}]_i = [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] Kd * (Sf_2 / Sb_2)$).

Измерение внутриклеточного pH в гепатоцитах миноги. Для измерения внутриклеточного pH в гепатоцитах миноги использовали pH-чувствительный флуоресцентный краситель SNARF-1 AM (carboxy SemiNaphthoRhodaFluor acetoxymethyl ester). Калибровочную кривую строили по нигерициновому методу [Choe and Hedley, 1997]. Измерения проводили на проточном цитометре. Флуоресценцию SNARF-1 возбуждали синим аргоновым лазером (488 нм), а регистрировали во втором канале FL2 (575±15 нм) и в четвёртом канале FL4 (675±15 нм).

Выживаемость клеток определяли по окрашиванию пропидием йодидом (5 мкг/мл). Флуоресценцию клеток оценивали на проточном цитометре ($\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 675 \pm 15$ нм).

Выявление апоптотических и некротических клеток путем последовательного окрашивания акридиновым оранжевым и пропидием йодидом. Для выявления живых, некротических и апоптотических клеток гепатоциты последовательно окрашивали акридиновым оранжевым (5 мкг/мл) и пропидием йодидом (5 мкг/мл). Флуоресценцию красителей измеряли на конфокальном микроскопе ($\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 525, 620$ нм). Полученные изображения анализировали в программе Image J, как описано в работе Mironova et al. [2007].

Определение активности каспаз 3, 7, 9 и катепсина Б. Активность каспаз (3, 7, 9) определена с помощью Carboxyfluorescein FLICA Apoptosis Detection Kit (Immunochemistry Technologies, LLC). Флюоресценцию FLICA возбуждали синим лазером ($\lambda_{ex} = 488-492$ нм), а регистрировали в зеленой области ($\lambda_{em} = 515-535$ нм). Активность катепсина Б исследована с помощью Magic Red Cathepsin Detection Kit (Immunochemistry Technologies, LLC) ($\lambda_{em} = 628$ нм, $\lambda_{em} = 550-590$ нм). Регистрацию флуоресценции проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе. Анализ изображений, проводили в программе Image J. Оценивали среднюю интенсивность флюоресценции клеток.

Определение выхода цитохрома с из митохондрий методом иммуноблоттинга. Белки, выделенные из лизатов митохондрий и цитоплазмы гепатоцитов, разгоняли на SDS-PAGE [Laemmli, 1970], затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела к цитохрому с (Cytochrome C (H-104) rabbit polyclonal antibody) фирмы Santa Cruz biotechnology, Inc. (США). Для выявления иммунореактивных полипептидов использовали детекционную систему “ECL western blotting detection reagent” фирмы “Amersham” (Великобритания).

Статистическая обработка результатов. Полученные данные обрабатывали статистически с применением двустороннего критерия Стьюдента с использованием пакета прикладных компьютерных программ «Statistica», версия 5.11. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Динамика концентраций адениновых нуклеотидов и митохондриального мембранного потенциала при метаболической депрессии. На протяжении преднерестовой миграции концентрации адениновых нуклеотидов в кусочках печени миноги подвергаются значительным колебаниям (рис. 1). Так, концентрация АТФ с октября по февраль снижается с 0.81 ± 0.04 до 0.23 ± 0.05 нмоль/мг влажной массы, при этом возрастает концентрация АМФ (с 0.10 ± 0.03 до 0.38 нмоль/мг влажной массы), одновременно наблюдается снижение энергетического заряда Аткинсона с 0.75 ± 0.05 до 0.41 ± 0.05 , что указывает на глубокую метаболическую депрессию в зимний период. Весной, начиная с марта, эти показатели возвращаются к осенним значениям.

Поскольку известно, что метаболизм гепатоцитов миноги является исключительно аэробным и зависит от активности фосфорилирующего дыхания, нами была изучена динамика ММП. На рис. 2 показана динамика ММП в гепатоцитах миноги на протяжении всего периода преднерестовой миграции. Максимальные значения ММП (600-700 условных единиц флюоресценции TMRM) были обнаружены в октябре и в марте-апреле, в то время как зимой этот показатель падает до 200 условных единиц. Аналогичная

закономерность прослеживается и при изменении интенсивности флюоресценции DiOC₆(3). Результаты конфокальной микроскопии (рис. 3) подтверждают эти данные. Кроме того, с помощью метода FRET (Fluorescence resonance energy transfer) на конфокальном микроскопе была зарегистрирована деэнергизация митохондрий в зимний период (данные не представлены).

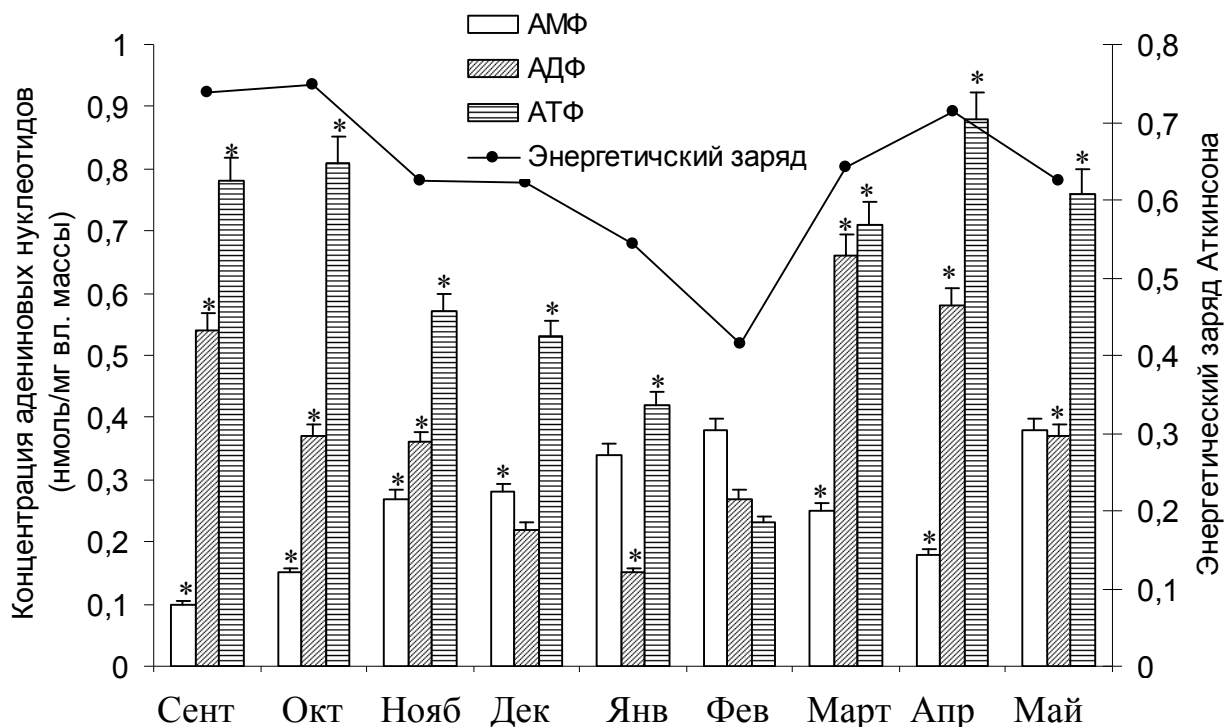


Рис 1. Концентрации адениновых нуклеотидов и энергетический заряд Аткинсона $(\text{АТФ}+0.5\text{АДФ})/(\text{АТФ}+\text{АДФ}+\text{АМФ})$ в ткани печени миноги в различные месяцы преднерестовой миграции. Данные представлены как $M \pm \text{SEM}$. Концентрацию адениновых нуклеотидов определяли методом ВЭЖХ. Число экспериментов в каждом месяце от 10 до 20. * – различия достоверны ($p < 0.05$) в сравнении с февралем.

ММП определяется балансом между выбросом протонов из матрикса в межмембранное пространство митохондрий и процессами возврата протонов в ходе синтеза АТФ и свободной утечки [Nicholls, 2004]. Ранее [Savina and Gamper, 1998] было показано, что осенью и весной процент митохондриального дыхания, ответственного за синтез АТФ (фосфорилирующее дыхание) и дыхания, сопряженного с протонной утечкой, остается относительно постоянным (71-72% и 28-29%, соответственно). Однако зимой ситуация меняется – дыхание, связанное с окислительным фосфорилированием, с октября по февраль уменьшалось более чем в 3 раза, в то время как дыхание, связанное с протонной утечкой, не изменялось. В результате в феврале доля фосфорилирующего дыхания сравнялась с долей протонной утечки (49 и 51%, соответственно). В марте показатели возвращались к осенним значениям.

Таким образом, сезонная динамика концентраций нуклеотидов и ММП находится в соответствии с динамикой дыхательной активности гепатоцитов

миноги: в зимние месяцы падение концентрации АТФ и энергетического заряда Аткинсона сопровождается снижением ММП.

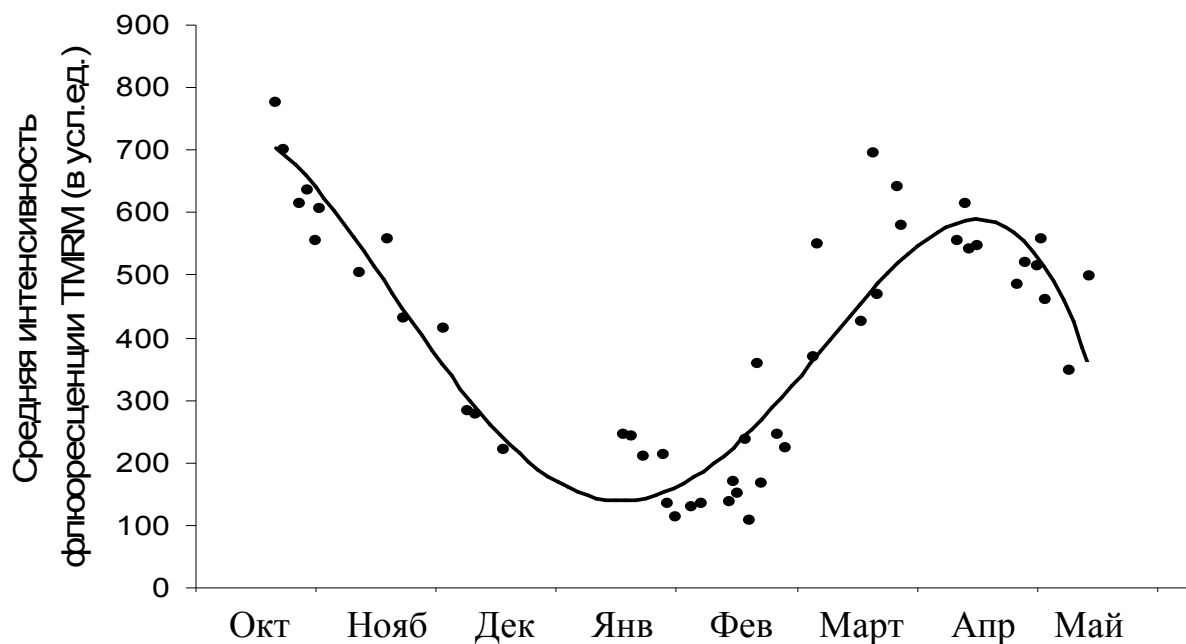


Рис. 2 Сезонные изменения интенсивности флуоресценции TMRM в гепатоцитах миноги, отражающие изменения ММП (данные получены с помощью проточного цитометра). Уравнение, описывающее полиномиальную линию тренда 4-го порядка: $y = -7E-06x^4 + 0.0028x^3 - 0.3088x^2 + 4.1045x + 724.76$, $R^2 = 0.8495$.

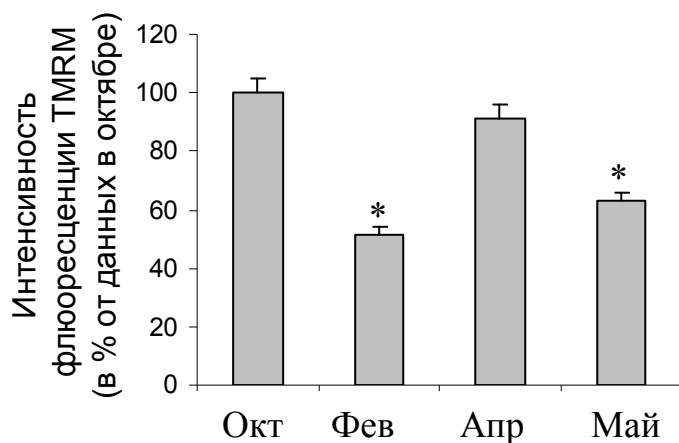


Рис. 3 Сезонные изменения интенсивности флуоресценции TMRM в гепатоцитах миноги. Изображения, полученные на конфокальном микроскопе, были проанализированы с помощью программы Image J, как описано в Материалах и методах. Данные представлены в % от значений в октябре ($M \pm SEM$). Число экспериментов в каждом месяце от 8 до 10. * - различия значимы ($p < 0.05$) в сравнении с октябрём.

Известно, что активация метаболизма в гепатоцитах весной связана с гормонально спровоцированным липолизом липидных капель и необходимостью энергетического обеспечения синтеза вителлогенина – белка, необходимого для окончательного созревания икринок [Mommensen and Walsh, 1988]. Мы предположили, что падение ММП зимой вызвано прекращением липолиза липидных капель и ограничением доступности жирных кислот в

качестве окислительных субстратов. Для подтверждения этой гипотезы была проведена серия экспериментов с применением липолитических агентов: гормонов эпинефрина, 17β -эстрадиола и дбцАМФ.

Гормоны и дбцАМФ увеличивали интенсивность флюоресценции TMRM на 20-30% в октябре и на 30-39% в ноябре (табл. 1, рис. 4). Большие изменения ММП в ноябре связаны с тем, что в октябре гепатоциты еще достаточно активны и имеют высокий ММП в контроле, в ноябре ММП в контроле начинает снижаться и на этом фоне влияние гормонов и дбцАМФ становится более заметным. В декабре действовал только дбцАМФ (интенсивность флюоресценции TMRM по сравнению с контролем увеличивалась на 25%). Возможно, что отсутствие гормонального влияния на ММП связано с изменением активности рецепторов этих гормонов. В январе ни один из используемых нами агентов не действовал на ММП. Таким образом, зимой не действуют ни гормоны, ни вторичные мессенджеры, активирующие липолиз липидных капель – клетки вошли в состояние метаболической депрессии.

Таблица 1. Интенсивность флюоресценции TMRM (в % от контроля) под действием гормонов и дбцАМФ по данным проточной цитометрии. Данные представлены как $M \pm SEM$. Число экспериментов в каждом месяце от 2 до 5.

Воздействие	Октябрь	Ноябрь	Декабрь	Январь	Февраль
Эпинефрин	120 \pm 3	130 \pm 2	99 \pm 5	103 \pm 2	-
дбцАМФ	124 \pm 3	135 \pm 6	126 \pm 4	101 \pm 2	98 \pm 2
17β -эстрадиол	125 \pm 4	139 \pm 9	97 \pm 2	95 \pm 3	-

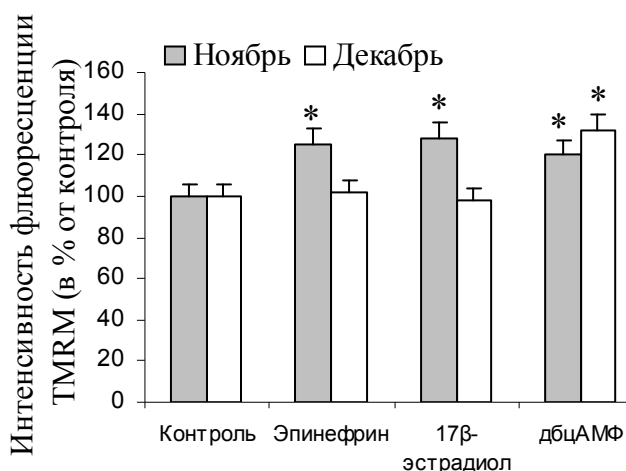


Рис. 4 Эффект гормонов и дбцАМФ на интенсивность флюоресценции TMRM в гепатоцитах миноги в ноябре и в декабре. Клетки были проинкубированы с эпинефрином (10^{-5} М), 17β -эстрадиолом (10^{-5} М) или дбцАМФ (10^{-7} М) в течение 1 часа при комнатной температуре. Полученные на конфокальном микроскопе изображения были проанализированы в программе Image J, как описано в Материалах и методах.

* - различия значимы ($p < 0.05$) в сравнении с контролем.

Для дальнейшего анализа клеток, находящихся в состоянии метаболической депрессии, нами было определено изменение ММП при добавлении субстрата цикла Кребса (пирувата), ингибиторов I, III и IV комплексов дыхательной цепи (ротенона, антимицина А и азида натрия, соответственно) и ингибитора протонного канала F_0 АТФ-синтазы (олигомицина) (табл. 2).

Обнаружено, что при добавлении субстратов цикла Кребса (пирувата) и малата (малат добавлялся с анаплеротическими целями для восполнения оксалоацетата) к гепатоцитам миноги в состоянии метаболической депрессии ММП снижается по сравнению с контролем. Известно, что пируват транспортируется через внутреннюю митохондриальную мембрану в матрикс как анион слабой органической кислоты совместно с протоном [La Noue and Schoolwerth, 1979]. Это увеличивает протонную утечку, вклад которой в этот период в митохондриальное дыхание составляет 51%. В результате, рассеивание ММП преобладает над процессами, обеспечивающими его формирование. Осенью и весной, когда в гепатоцитах миноги фосфорилирующее дыхание преобладает над протонной утечкой, пируват увеличивает ММП.

Зимой (с ноября по март) вместо обычного эффекта олигомицина, при котором ММП увеличивается, мы наблюдали его обратный эффект – снижение ММП, особенно выраженное в январе-феврале. Мы предполагаем, что это связано с увеличением вклада протонной утечки в митохондриальное дыхание в этот период. В октябре и в апреле-мае, олигомицин действует классически – увеличивает ММП.

Ротенон (ингибитор I комплекса дыхательной цепи) в зимний период снижал ММП в меньшей степени по сравнению с осенним и весенним периодами. Возможно, что меньшее влияние ротенона на ММП в зимний период связано с инактивацией I комплекса дыхательной цепи. Ранее было показано подавление интенсивности окисления НАД-зависимых субстратов в митохондриях зимующих миног [Емельянова и др., 2007], что может объясняться частичной инактивацией НАДН-убихинон-редуктазы [Grivennikova and Vinogradov, 2003].

Влияние антимицина А и азида натрия на ММП не изменяется на протяжении всего периода преднерестовой миграции, что может указывать на сохранение активности III и IV комплексов дыхательной цепи в этот период.

Фармакологическая аноксия, вызванная ингибиторами дыхательной цепи (азидом натрия, ротеноном + антимицином или олигомицином), вызывает быстрое и практически полное истощение запасов АТФ в гепатоцитах (через 30 минут концентрация АТФ падает более чем на 95%) (рис. 5). Такое истощение АТФ не связано с гибелью клеток, поскольку жизнеспособность в течение всего эксперимента сохранялась на высоком уровне. Эти данные соответствуют данным, полученным в экспериментах на гепатоцитах угря, в которых аноксия вызывала резкое падение АТФ без потери жизнеспособности [Busk and Boutilier, 2005].

Таблица 2. Влияние пирувата, олигомицина, ротенона, антимицина А и азид натрия на интенсивность флюоресценции TMRM в гепатоцитах миноги в различные периоды преднерестовой миграции по данным проточной цитометрии. Клетки инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Данные представлены в % от контроля ($M \pm SEM$), n – число экспериментов. Флюоресценция в контрольных пробах (без добавления субстратов или ингибиторов) определялась в каждом эксперименте.

Субстраты и ингибиторы	Октябрь (n=5)	Ноябрь (n=8)	Декабрь (n=6)	Январь- Февраль (n=5)	Март (n=5)	Апрель- Май (n=5)
Пируват (5мМ) +Малат (1 мМ)	108±4*	82±3*	38±3	33±4	84±4*	110±4*
Олигомицин (20 мкг/мл)	106±7*	48±2*	37±2*	28±2	54±4*	110±4*
Ротенон (10 мкг/мл)	27±1*	33±1*	57±2*	43±3	19±1*	22±2*
Антимицин А (2 мкг/мл)	15±2	12±1	20±1	17±3	20±2	16±2
Азид натрия (10 мМ)	15±2	13±1	12±1	15±1	17±1	11±1
Азид натрия (10 мМ)+ Олигомицин (20 мкг/мл)	11±2	10±1	12±2	15±3	10±1	12±2

* - различия достоверны ($p < 0.05$) в сравнении с январем-февралем

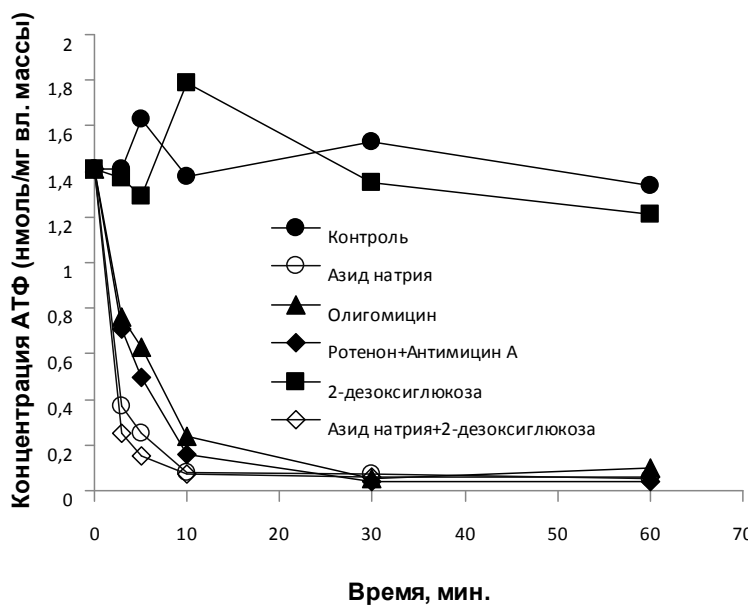


Рис. 5 Изменение концентрации АТФ в гепатоцитах миноги при добавлении ингибиторов дыхательной цепи (ротенона (10 мкг/мл), антимицина А (2 мкг/мл) и азид натрия (10 мМ)), ингибитора F_0F_1 -АТФазы (олигомицина (20 мкг/мл)) и ингибитора гликолиза (2-дезоксиглюкозы (5 мМ)). Инкубацию проводили при 20°C. Концентрация АТФ была определена люциферин-люциферазным методом.

Эксперименты с ингибитором гликолиза (2-дезоксиглюкоза), в которых концентрация АТФ оставалась на уровне контроля, подтверждают аэробный характер метаболизма гепатоцитов миноги.

Обратимся к данным по выживаемости гепатоцитов под действием митохондриальных ингибиторов при разной температуре (на льду/при комнатной температуре) и разных рН среды инкубации (6.5/7.6) (табл. 3). Снижение температуры и рН среды инкубации приводит к тому, что при 118-часовой инкубации с ингибиторами выживаемость гепатоцитов такая же, как в контроле (18-25%), при этом концентрация АТФ в живых клетках ничтожно мала и составляет не более 0.04-0.05 нмоль/мг влажной массы. Возникает вопрос, каким образом эти клетки могут энергетически обеспечивать работу Na^+, K^+ -АТФазы и поддерживать потенциал на плазматической мембране. Ранее было показано [Gamper et al., 2001], что активный транспорт калия в гепатоцитах миноги не меняется при изменении концентрации АТФ в пределах 1-2.5 нмоль на млн. клеток (примерно 1 мг влажной массы) и начинает снижаться при концентрации АТФ ниже 0.8 нмоль на млн. клеток. Из данных этой работы следует, что концентрация АТФ в живых клетках может падать намного ниже этого значения.

2. Роль кальция в регуляции метаболической депрессии

Для того, чтобы выяснить, каким образом клетки, имеющие критически низкий энергетический потенциал, способны сохранять жизнеспособность, была изучена динамика цитозольной концентрации кальция – важнейшего внутриклеточного мессенджера, который регулирует ионные каналы, обменники, насосы, фосфолипазы, протеинкиназу С, кальмодулин, кальпаин и осуществляет множество других функций.

Таблица 3. Выживаемость гепатоцитов миноги после инкубации с ингибиторами при различной температуре и рН среды. Данные выражены в процентах от исходных значений. Эксперименты проведены в декабре.

Ингибитор	рН среды	Температура*	Время инкубации (ч)			
			17	20	40	118
Контроль	7.6	1	64	58	59	8
		2	15	3	-	-
	6.5	1	60	61	64	23
		2	33	13	-	-
Олигомицин (20 мкг/мл)	7.6	1	70	71	64	5
		2	4	5	-	-
	6.5	1	69	70	63	20
		2	3	2	-	-
Ротенон (10 мкг/мл)	7.6	1	77	75	69	11
		2	22	2	-	-
	6.5	1	74	75	73	21
		2	41	8	-	-
Антимицин А (2 мкг/мл)	7.6	1	75	76	72	10
		2	16	3	-	-
	6.5	1	72	78	73	25
		2	41	9	-	-
Ротенон (10 мкг/мл) + Антимицин А (2 мкг/мл)	7.6	1	76	78	69	3
		2	23	2	-	-
	6.5	1	69	81	75	18
		2	35	8	-	-
Азид натрия (10 мМ)	7.6	1	85	80	57	3
		2	13	5	-	-
	6.5	1	76	79	74	2
		2	30	14	-	-

* - Температура инкубация клеток: 1- на льду и 2 – при комнатной температуре.

Было обнаружено (рис. 6), что внутриклеточная концентрация Ca^{2+} в зимний период возрастает в 1.5-2 раза (до 154 ± 7 нМ) по сравнению с периодами активного метаболизма осенью (95 ± 7 нМ) и весной (74 ± 5 нМ). Динамика внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , описанная нами на гепатоцитах миноги в зимний период преднерестовой миграции, в точности соответствует таковой в нейронах черепах *Chrysemys picta* (раскрашенная черепаха) и *Trachemys scripta* (красноухая черепаха), переживающих длительную аноксию (5-6 месяцев). В этот период в нейронах этих черепах наблюдается увеличение концентрации цитозольного кальция, вследствие чего активируются протеинкиназы и/или протеинфосфатазы, что в свою очередь приводит к координированному «аресту» ионных каналов [Bicker, 2002].

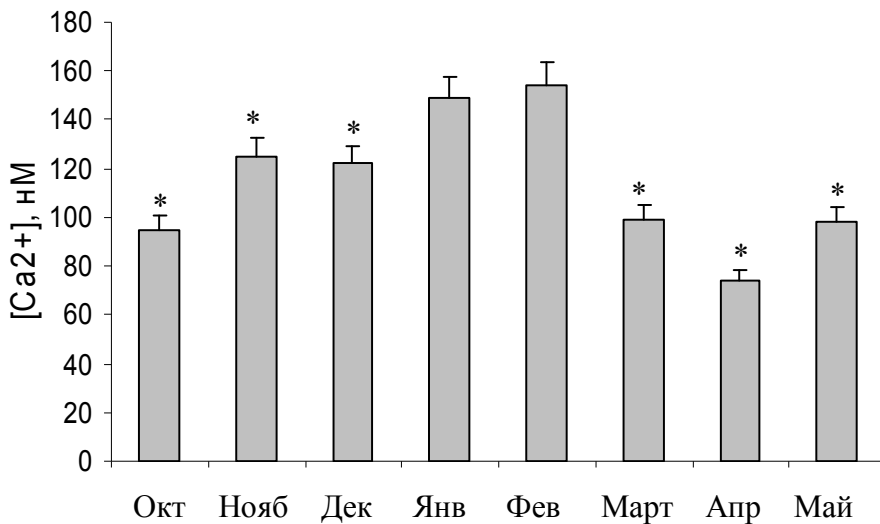


Рис. 6 Сезонные изменения внутриклеточной концентрации кальция в гепатоцитах миноги. Число экспериментов в каждом месяце от 5 до 8. * - различия достоверны ($p < 0.05$) в сравнении с февралем.

Для того, чтобы охарактеризовать активность Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума (SERCA) и Ca^{2+} -АТФаз аппарата Гольджи, а также оценить состояние этих кальциевых депо, мы использовали тапсигаргин (специфический ингибитор SERCA) и брефелдин А (антибиотик, разрушающий цистерны аппарата Гольджи).

Было показано, что в гепатоцитах миноги внутриклеточные депо (аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум) пусты зимой и содержат Ca^{2+} в весенний и осенний периоды (рис. 7А), т. е. в зимний период процессы активного транспорта Ca^{2+} в аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум подавлены. На это также указывают данные экспериментов, в которых 17β -эстрадиол не вызывал увеличение концентрации внутриклеточного кальция в зимний период (рис. 7Б). Возможно, такое снижение активности Ca^{2+} -АТФаз также направлено на уменьшение потребления АТФ в период гипометаболизма, что лежит в общем русле стратегии на снижение энергозатрат.

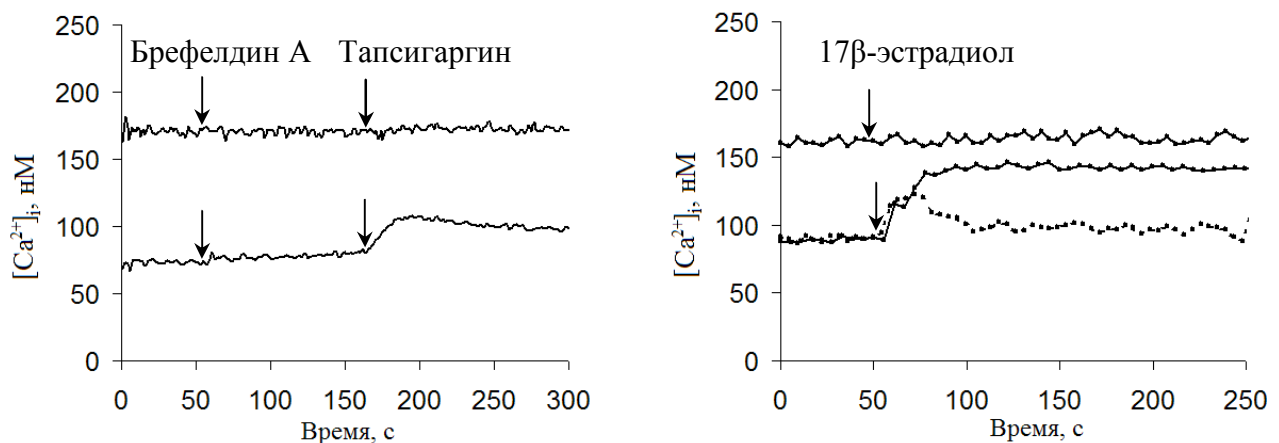


Рис. 7 Типичные кальциевые ответы в гепатоцитах миноги: А – в среде без кальция добавлены брефелдин А (50 мкМ) и тапсигаргин (1 мкМ): кривая 1 – зимой, 2 – весной; Б – 17β -эстрадиол (10 мкМ) добавлен: 1 – зимой в среде с кальцием, 2 – весной в среде с кальцием, 3 – весной в среде без кальция.

Анализ полученных нами данных по изменению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в ответ на действие эстрадиола, приводит нас к выводу, к которому пришли исследователи, изучавшие влияние 17β -эстрадиола на внутриклеточные уровни Ca^{2+} в почечных канальцах собаки [Chen, 2002]: 17β -эстрадиол мобилизует Ca^{2+} из внутриклеточных депо, одновременно повышая вход внешнего Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны.

3. Снижение внутриклеточного pH при метаболической депрессии

Ранее было обнаружено, что гепатоциты, выделенные из печени миноги в зимний период в средах с pH 7.6, имели вздутия на цитоплазматической мембране (blebbing) и через короткое время погибали. При этом снижение pH среды выделения с 7.6 до 6.5 позволяло получать суспензии долгоживущих гепатоцитов [Savina, Gamper, 1998]. Кроме того, известно, что депрессия энергетического метаболизма часто сопровождается сдвигом в кислую область pH внутриклеточного пространства в тканях позвоночных животных. В связи с этим, нами было проведено исследование с определением внутриклеточного pH гепатоцитов миноги речной в разные месяцы преднерестового периода.

Из данных рис. 8 видно, что в период с октября по февраль происходит постепенное закисление внутриклеточного пространства гепатоцитов миноги. Полученные данные свидетельствуют о том, что сами клетки при замедлении энергетического метаболизма снижают внутриклеточный pH, что дает им возможность выживать в низкоэнергизованном состоянии в течение нескольких месяцев. В весенний период, при активации энергетического метаболизма, pH клеток повышается.

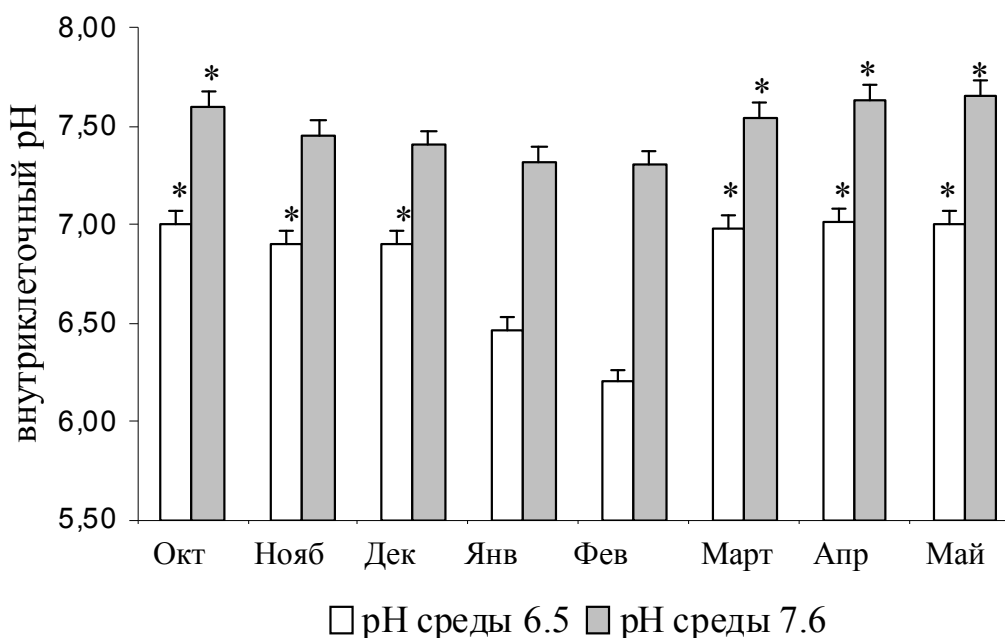


Рис. 8 Значения pH в гепатоцитах миноги в различные периоды преднерестовой миграции при pH среды инкубации 6.5 и 7.6. Число экспериментов в каждом месяце 5. * - различия достоверны ($p < 0.05$) в сравнении с февралем.

Механизмы протектирующего эффекта закисления до сих пор остаются гипотетическими, поскольку в поддержании внутриклеточного pH принимают участие многие клеточные процессы. Среди них Na^+/H^+ и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменники плазматической мембраны, функционирование которых находится под контролем внутриклеточных сигнальных путей [Ahmed, 2006] и протонные АТФ-азы вакуолярного типа в мембранах лизосом, эндосом и аппарата Гольджи [Covi and Hand, 2005]. Источниками протонов при метаболической депрессии могут быть ускоренный гидролиз АТФ, повышенное производство молочной кислоты, снижение буферной емкости белков из-за снижения скорости замены деградированных белков новыми вследствие ингибирования синтеза белка при метаболической депрессии [Donohoe, 1998].

Защита клетки, по-видимому, состоит в том, что внутриклеточный ацидоз замедляет аутолитические процессы деградации (например, протеолиз или гидролиз фосфолипидов), инициируемые при истощении АТФ. В последнее время появились данные о том, что закисление внутриклеточной среды предотвращает образование поры во внутренней митохондриальной мембране [Zorov, 2009].

4. Механизмы гибели гепатоцитов. Апоптоз и аутофагия

После нереста миноги погибают, поэтому дальнейшие наши исследования были посвящены изучению механизмов гибели гепатоцитов после весенней активации метаболизма. Обнаруженное в поздний весенний период снижение ММП позволило предположить, что в процессе гибели клеток задействован митохондриальный путь апоптоза.

Для подтверждения этой гипотезы, мы определяли цитохром с в цитозольных и митохондриальных фракциях гепатоцитов миноги в зимний и в весенний периоды. Обнаружено, что в зимний период цитозоль гепатоцитов практически не содержит цитохром с, в то время как весной в цитозоле четко выявляется его наличие (рис. 9). Дальнейшие наши исследования мы направили на определение активности ключевых протеолитических ферментов митохондриального пути апоптоза: каспазы 9, активация которой происходит только после выхода цитохрома с из митохондрий, и каспаз 3 и 7, активируемых, в свою очередь, каспазой 9. Была выявлена сезонная активность этих каспаз в весенний период (рис. 10).

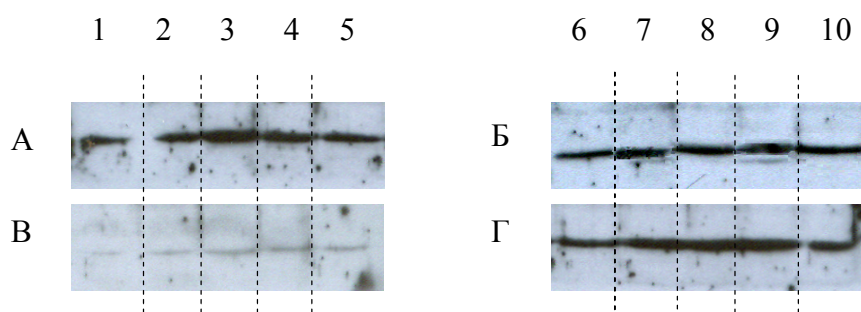


Рис. 9 Определение цитохрома с методом иммуноблоттинга в митохондриальных (А, Б) и цитозольных фракциях (В, Г) гепатоцитов миноги зимой (А, В, 1-5) и весной (Б, Г, 6-10).

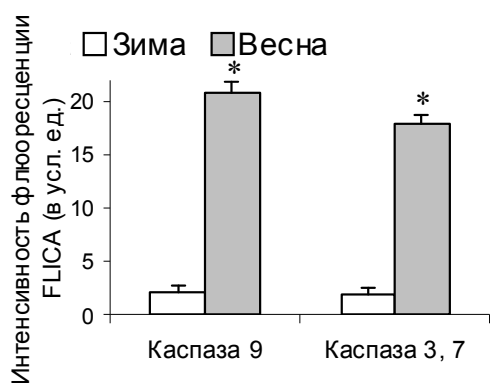


Рис. 10 Активность каспаз 9, 3 и/или 7 зимой и весной. Число экспериментов в каждом периоде 5. * - различия достоверны ($p < 0.001$) в сравнении с зимним периодом.

Таким образом, можно утверждать, что в определенный период жизненного цикла миноги, а именно весной, образуются поры во внешней митохондриальной мембране гепатоцитов, в результате цитохром с выходит из митохондрий и вместе с белком АРАФ-1 и прокаспазой 9 образует апоптосому. В присутствии АТФ прокаспаса 9 превращается в активную каспазу 9, которая, в свою очередь, активирует каспазу 3 и начинается деструкция белков клетки каспазами (сериновыми и цистеиновыми протеазами). Отметим, что в весенний период, согласно нашим данным, в гепатоцитах миног содержится достаточное количество АТФ для реализации апоптоза.

Кроме апоптоза и некроза, существует еще один способ программируемой гибели клетки – аутофагия. Ранее аутофагии приписывалась главным образом катаболическая функция по утилизации поврежденных органелл в ходе длительного голодания, т. е. считалось, что аутофагия – стратегия выживания. Однако в последние годы все чаще высказывается точка зрения о лизосомальном пути смерти клетки.

Лизосомальный путь гибели клеток в самые последние годы был выявлен при патологических ситуациях. Активные катепсины – лизосомальные протеазы, играющие ключевую роль в деградации белков при аутофагии, были обнаружены в апоптотических клетках центральной нервной системы после ишемии и при нейродегенеративных процессах, в печени – после обструкции желчных протоков, и в раковых клетках [Yin et al., 2008, Du et al., 2011]. Отметим, что печень миноги уникальна тем, что в ходе метаморфоза лишается и желчного пузыря и желчных протоков и таким образом представляет природную модель для изучения лизосомального пути смерти. В весенний период нами была зарегистрирована активность катепсина Б в гепатоцитах миноги (рис. 11).

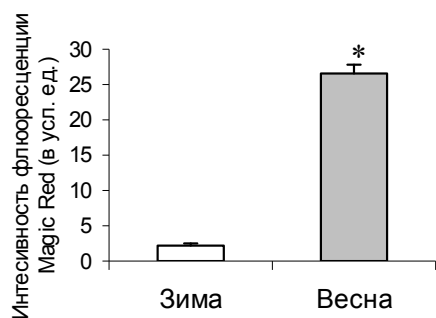


Рис. 11 Активность катепсина Б в гепатоцитах миноги зимой и весной. Число экспериментов в каждом периоде 5. * - различия достоверны ($p < 0.001$) в сравнении с зимним периодом.

В настоящее время созданы гипотетические схемы сигнальных путей лизосомальных протеаз, вышедших в цитозоль и регулирующих апоптотические белки, провоцирующие выход из митохондрий цитохрома с, образование апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) и других апоптогенных факторов.

Таким образом, в гепатоцитах миноги в весенний период параллельно с апоптозом, вызванным внутриклеточным митохондриальным путем, развивается лизосомальный путь гибели клеток.

ВЫВОДЫ

1. В гепатоцитах миноги в зимний период преднерестовой миграции наблюдается обратимая метаболическая депрессия, характеризующаяся снижением концентрации АТФ и энергетического заряда Аткинсона и нарастанием концентрации АМФ.
2. Обратимая метаболическая депрессия в гепатоцитах миноги сопровождается снижением митохондриального мембранного потенциала в 2-3 раза по сравнению с периодами метаболической активности.
3. В период метаболической депрессии в гепатоцитах миноги внутриклеточная концентрация свободных ионов кальция умеренно возрастает (на 50-80%), при этом внутриклеточные кальциевые депо опустошены.
4. В период метаболической депрессии наблюдается стойкое снижение внутриклеточного рН, что может являться одним из механизмов, защищающим клетки от гибели.
5. Гепатоциты миноги, изолированные в период метаболической депрессии, способны выживать в условиях химической аноксии *in vitro* в течение нескольких суток.
6. Гибель гепатоцитов миноги в весенний период обусловлена выходом цитохрома с из митохондрий и активацией как митохондриального, так и лизосомального путей апоптоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Savina M.V., **Konovalova S.A.**, Zubatkina I.S., Nikiforov A.A. Reversible metabolic depression in lamprey hepatocytes during prespawning migration: Dynamics of mitochondrial membrane potential // *Comp. Bioch. Physiol. Part B*. 2011. V. 160. P. 194-200.
2. **Коновалова С.А.**, Зубаткина И.С., Савина М.В., Никифоров А.А. Внутриклеточный рН в гепатоцитах миноги речной *Lampetra fluviatilis L.* в период преднерестовой миграции // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2011. Т. 47. № 4. С. 332-333.
3. **Коновалова С.А.**, Савина М.В., Никифоров А.А. Изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в гепатоцитах миноги (*Lampetra*

- fluviatilis L.) в период преднерестовой миграции // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2011. Т. 47. № 2. С. 172-173.
4. Зубаткина И.С., **Коновалова С.А.**, Савина М.В., Никифоров А.А. Мембранный потенциал митохондрий в гепатоцитах миноги речной (*Lampetra fluviatilis* L.) в периоды метаболической депрессии и активности // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2011. Т. 47. № 1. С. 85-87.

Тезисы докладов

1. **Коновалова С.А.**, Савина М.В., Никифоров А.А. Энергетика гепатоцитов миноги (*Lampetra fluviatilis* L.) в период преднерестовой миграции // Тезисы докладов и лекций Четырнадцатого международного совещания и седьмой школы по эволюционной физиологии. Санкт-Петербург. 2011. С. 97
2. **Konvalova S.**, Savina M. Evolutionary model for study of human liver diseases // *Hepatol Int. Abstr. The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver.* 2011. V. 5. № 1. P. 326.
3. **Коновалова С.А.** Изменения внутриклеточного рН в гепатоцитах миноги (*Lampetra fluviatilis* L.) в период метаболической депрессии // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2011». Москва. 2011. С. 52.
4. **Konvalova S.A.** Mitochondrial function of lamprey hepatocytes during metabolic depression // *Abstr. 7th Conference on Mitochondrial Physiology.* Obergurgl. 2010. P. 88.
5. **Коновалова С.А.**, Зубаткина И.С., Емельянова Л.В., Савина М.В. Энергетика клетки в состоянии метаболической депрессии и активности (гепатоциты миноги *Lampetra fluviatilis* L.) // Тез. XXI Съезд физиологического общества, Калуга. 2010. С. 293.
6. **Konvalova S.A.**, Zubatkina I.S., Savina M.V. The influence of estradiol, epinephrine and cAMP on mitochondria energization and intracellular free Ca^{2+} concentration in lamprey hepatocytes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 2010. V. 1797. Supplement 1. P. 126-127.
7. Emelyanova L., **Konvalova S.**, Zubatkina I., Savina M. Evolutionary approach to problems of medicine // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 2010. V. 1797. Supplement 1. P. 124.
8. Zubatkina I.S., **Konvalova S.A.**, Savina M.V. Mitochondrial membrane potential and pH in lamprey hepatocytes during pre-spawning migration // *Abstr. 16th European Bioenergetics Conference.* Warsaw. 2010. P. 6.
9. **Konvalova S.A.**, Emelyanova L.V., Zubatkina I.S., Savina M.V., Brailovskaya I.V. Confocal laser microscopy as applied to investigation of lamprey hepatocytes bioenergetics // *Abstr. Modern Microscopy Techniques in Biology and Medicine.* Saint Petersburg. 2009. P. 7-8.
10. Savina M., Korotkov S., Emelyanova L., Brailovskaya I., **Konvalova S.**, Zubatkina I., Nadeev A. Regulated permeability transition pore in low conductance state in lamprey liver mitochondria // *Comparative Biochemistry*

and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2009. V. 154. Issue 1. Supplement 1. 2009. P. 29-30.

11. Савина М.В., Емельянова Л.В., **Коновалова С.А.**, Зубаткина И.С., Надеев А.Д. Биоэнергетика гепатоцитов и митохондрий печени с билиарной атрезией, холестазом и стеатозом в ходе многомесячного голодания миноги речной (*Lampetra fluviatilis* L.) // Тез. 7^{ой} Международной конференции “Механизмы функционирования висцеральных систем”. Санкт-Петербург. 2009. С. 378-379.

Коновалова С.А. Механизмы обратимой метаболической депрессии и гибели гепатоцитов миноги речной (*Lampetra fluviatilis* L.) в период преднерестовой миграции // Автореф. дис. канд. биол. наук – СПб., 2011. – с.

Подписано в печать 00.11.2011. Заказ № _____
Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.