

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ЭРАСТИНА И G3139 НА МИТОХОНДРИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Ю.Л. Бабурина\*, А.И. Звягина, И.В. Одинокова, О.В. Крестинина

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,  
142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 3; \*эл. почта: byul@rambler.ru

Исследовано влияние модуляторов VDAC-каналов — G3139 и эрастина — на функционирование митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore, мПТР), а также на изменения в содержании белков, регулирующих работу мПТР (VDAC, CNPaза и TSPO) в митохондриях печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией. Показано, что митохондрии печени крыс, получавших этанол, более чувствительны к индукции мПТР. Более того, под воздействием этанола происходят изменения в экспрессии белков-регуляторов мПТР. G3139 и эрастин также способны влиять на исследуемые митохондриальные параметры, причём их действие в митохондриях печени крыс, получавших этанол, более выражено по сравнению с митохондриями печени контрольных крыс. Мы предполагаем, что результаты этого исследования могут помочь выяснить механизмы хронического действия этанола на митохондрии и внести вклад в разработку новых терапевтических стратегий для лечения патологий, связанных с потреблением этанола.

**Ключевые слова:** митохондриальная неспецифическая пора (мПТР); потенциал-зависимый анионный канал (VDAC); хроническая алкогольная интоксикация; эрастин

**DOI:** 10.18097/PBMC20236901062

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема лечения заболеваний, вызванных хроническим злоупотреблением алкоголем, остаётся по-прежнему актуальной во всем мире. Так как основной метаболизм этанола в организме происходит в печени, именно этот орган в первую очередь страдает от последствий хронической алкогольной интоксикации. Вызванные этанолом повреждения приводят к различным заболеваниям, таким как стеатоз, цирроз, алкогольный стеатогепатит, фиброз и гепатоцеллюлярный рак. Механизмы действия хронического потребления этанола на печень остаются до конца не выясненными. Однако, несомненно, что ключевую роль в них играют митохондрии [1]. Хроническое употребление алкоголя приводит к нарушениям митохондриальных функций и механизмов антистрессовой защиты и активации проапоптотических сигнальных путей [2-4]. Дисфункцию митохондрий связывают, в первую очередь, с изменением проницаемости митохондриальных мембран. Поскольку внутренняя мембрана непроницаема для водорастворимых метаболитов, то транспорт через нее осуществляется специфическими транспортными белками. Внешняя же мембрана проницаема для водорастворимых метаболитов, и они проникают в межмембранное пространство через потенциал-зависимые анионные каналы (voltage dependent anion channel, VDAC), известные также как порины. Активность VDAC регулируется различными факторами, включая белки, связывающиеся с этими каналами [5-7]. В связанном с VDAC состоянии эти белки

способны переводить каналы в закрытое состояние. При этом состоянии VDAC каналов снижается поток метаболитов, увеличивается проницаемость для ионов кальция, и, таким образом, митохондрии становятся более чувствительными к сигналам апоптоза [8, 9]. Показано, что действие этанола вызывает изменение активности VDAC и изменение проницаемости митохондриальных мембран, что приводит к формированию мПТР [10, 11]. Функционирование поры приводит к падению мембранного потенциала, набуханию митохондрий, нарушению ионного гомеостаза, в частности  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемому выходу кальция, а также выходу апоптогенных факторов, которые в цитоплазме вызывают каскад реакций, инициирующих программируемую гибель клеток. До недавнего времени VDAC считался структурным компонентом мПТР, в настоящее время дискуссии о его участии в мПТР продолжаются, однако остаётся несомненным, что VDAC принимает участие в регуляции поры [8, 12, 13]. Появляется всё больше данных о нарушении функционирования мПТР при алкогольной интоксикации [14-16]. В связи с вышесказанным актуальным является изучение взаимодействия VDAC с мПТР для поиска новых мишеней воздействия алкоголя и способов защиты от последствий алкогольного отравления.

Целью настоящей работы было исследование действия модуляторов VDAC-каналов — G3139 и эрастина — на функционирование митохондрий печени крыс в условиях хронической алкогольной интоксикации.

*Принятые сокращения:* ANT – транслоказа адениновых нуклеотидов (adenine nucleotide translocase); мПТР – пора неспецифической проницаемости (mitochondrial permeability transition pore); TSPO – транслокаторный белок; VDAC – потенциал-зависимый анионный канал.

## МЕТОДИКА

### *Животные и их обработка*

Для изучения влияния алкоголя на функции митохондрий на крысах линии Wistar мы использовали модель хронической алкогольной интоксикации Либера-ДеКарли, которая позволяет добиться потребления алкоголя в высоких дозах [17]. Смеси для приготовления жидких кормов были произведены компанией “BioServ” (США). Контрольная диета содержала жиры, белки, углеводы, микроэлементы и витамины, причём 18% от общего количества калорий приходилось на белки, 35% — на жиры и 47% — на углеводы. В алкогольной диете 36% калорий из углеводных компонентов были заменены калориями из этанола, концентрация которого в конечном рационе составила 5%. В этой модели использовано изокалорийное парное вскармливание животных. Для этого самцов крыс одного возраста и веса, разделённых на пары, содержали в отдельных клетках, оборудованных специальными градуированными поилками, без доступа к воде и твёрдой пище. В экспериментах использовали восемь крыс (в возрасте двух месяцев), по четыре в каждой группе. Продолжительность эксперимента составляла 2 месяца. Крысы, получавшие алкогольную диету, имели свободный доступ к пище в течение дня, а контрольные крысы получали количество пищи, эквивалентное количеству пищи, потребляемой их парными крысами; потребление пищи измерялось ежедневно. В течение 10-дневного периода привыкания крысы получали постепенно увеличивающееся количество этанола (0,1%, 2%, 3%, 4% и 5%) с пищей, а затем получали пищу, содержащую 5% этанола в течение 8 недель. В начале эксперимента средний вес крыс составлял 167,87 г. За время эксперимента прибавка в весе составила  $182,54 \pm 9,65$  г для контрольных крыс и  $163,12 \pm 11,55$  г для крыс с алкогольной интоксикацией. Крысы потребляли в среднем 60-80 калорий в день, а крысы, потребляющие этанол, получали 14,86-16,25 г этанола на 1 кг веса крысы, что согласуется с опубликованными данными [17].

### *Гистологический анализ*

Для гистологического анализа фрагменты перипортальной зоны долек печени быстро отрезали скальпелем от целой печени сразу после извлечения из брюшной полости и быстро промывали холодным фосфатно-солевым буфером для удаления крови. Затем образцы фиксировали в нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч при комнатной температуре по стандартной методике. После завершения фиксации фрагменты трижды отмывали от избытка фосфатов в дистиллированной воде и погружали в среду O.C.T. Compound (Optimal cutting temperature compound, “Compound Tissue Tek”, Япония) на 12 ч при температуре 4°C. Наборы из трёх последовательных поперечных срезов толщиной 9 мкм были приготовлены с использованием Shandon CRYOTOME 620E (“Thermo Fisher Sci.”, США) с шагом 30 мкм. Каждый набор из трёх соседних

срезов окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и двумя дифференциальными трихромными методами окрашивания. Для получения общей картины алкогольного повреждения печени были сняты гистотопограммы на микроскопической станции Nikon Eclipse Ti-E (“Nikon”, Япония) с использованием программного обеспечения Nis Elements AR4.13.05 (Build933).

Фиброз как показатель алкогольного повреждения печени оценивали двумя методами: трихромным окрашиванием Малори и трихромным окрашиванием Лилли. Процент фиброзных изменений перипортальной зоны печени оценивали по оцифрованным изображениям (не менее пяти областей анализа из каждого среза) с использованием некоммерческого программного обеспечения ImageJ [18]. Степень фиброза оценивали по приросту депонированного коллагена (синие области на срезе) в ткани и рассчитывали как площадь, занимаемую коллагеном, выраженную в процентах от общей площади анализируемой области. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

### *Выделение митохондрий печени крыс*

Митохондрии печени крыс выделяли из крыс линии Wistar стандартным методом с использованием среды гомогенизации, содержащей 210 мМ маннит, 70 мМ сахарозы, 1 мМ этиленгликоль-бис ( $\beta$ -аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту (ЭГТА), 0,05% бычий сывороточный альбумин (БСА) фракции V и 10 мМ Трис (pH 7,3). Гомогенат центрифугировали при 800 g в течение 10 мин для осаждения ядер и повреждённых клеток. Супернатант, содержащий митохондрии, центрифугировали 10 мин при 9000 g. Осаждённые митохондрии дважды промывали в среде без ЭГТА и БСА в течение 10 мин при 9000 g и ресуспендировали в той же среде. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда. Концентрация белка в суспензии изолированных митохондрий печени составляла 45-50 мг/мл.

### *Определение митохондриальных функций*

Митохондрии (1 мг белка/мл) инкубировали при 25°C в среде, содержащей 125 мМ KCl, 10 мМ Трис (pH 7,4) и 2 мМ  $K_2HPO_4$ . В экспериментах в качестве респираторных субстратов использовали 5 мМ глутамат и 5 мМ малат. Потoki  $Ca^{2+}$  в митохондриях определяли с помощью  $Ca^{2+}$ -чувствительных электродов (“Нико Аналит”, Россия) в термостатируемой ячейке объёмом 1 мл [19]. Открытие мРТР было вызвано пороговой концентрацией  $Ca^{2+}$  (каждая добавка  $Ca^{2+}$  содержала 50 нмоль  $Ca^{2+}$  на мг белка). Митохондрии предварительно инкубировали с исследуемыми веществами (G3139, эрастин) в течение 10 мин.

Набухание митохондрий печени крысы определяли по изменению рассеивания в митохондриальной суспензии при длине волны 540 нм (спектрофотометр Tecan I Control Infinite 200, “TECAN”, Австрия). Стандартная среда инкубации содержала 125 мМ KCl,

10 мМ Трис, 2 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , глутамат (5 мМ) и малат (5 мМ). Набухание инициировали добавлением пороговой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , которая составляла 250 мкМ. Концентрация белка в кювете составляла 0,35 мг/мл, измерения проводили при 25°C.

## *Электрофорез и вестерн-блот анализ*

Для получения образцов при определении изменений уровней митохондриальных белков (VDAC, TSPO и CNPазы) из термостатируемой ячейки при измерении функции митохондрий отбирали аликвоты объёмом 50 мкл в различных условиях (контроль и  $\text{Ca}^{2+}$ , в присутствии/отсутствии ингибиторов), центрифугировали 5 мин при 10000 g, отделяли осадок митохондрий и добавляли буфер Лэммли ("Bio-Rad", США) для солиubilизации митохондриальных белков. Образцы нагревали до 95°C в течение 5 мин. На каждую дорожку геля наносили по 20 мкг митохондриального лизата. В качестве маркеров использовали наборы фирмы "Bio-Rad", содержащие маркерные белки от 10 кДа до 250 кДа. Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (0,2 мкм, "Bio-Rad") осуществляли на аппарате для полусухого переноса ("Bio-Rad") методом вестерн-блот.

В работе использовали антитела к VDAC (1:1000, "Calbiochem", США), поликлональные антитела к TSPO (1:1000, "Abcam", США). Моноклональные анти-CNP-антитела (анти-CNP Ab) получали, как описано в [20], и использовали в разведении 1:10000. В качестве контроля белковой нагрузки использовали поликлональные антитела к Tom20 (1:1000, "SantaCruz", США). Иммунореактивность детектировали с использованием соответствующих вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена ("Jackson Immuno Research", США). Пероксидазную активность определяли с помощью ECL (Enhanced chemiluminescence, "Bio-Rad") с использованием ChemiDoc Touch Imaging System ("Bio-Rad"). Количественный анализ проводили с помощью денситометрии (программа Image Lab, "Bio-Rad").

## *Статистический анализ*

Для статистического анализа брали среднее значение параметров, вычисленное по результатам пяти-шести экспериментов  $\pm$  SD. Статистическую значимость различий между парами значений оценивали с помощью теста ANOVA типа 2 (Стьюдента-Ньюмена-Кейлса). На рисунках показаны результаты типичных экспериментов, на диаграммах представлены средние данные не менее, чем из пяти экспериментов.  $p < 0,05$  свидетельствует о достоверной разнице в уровне коллагена по отношению к контролю.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

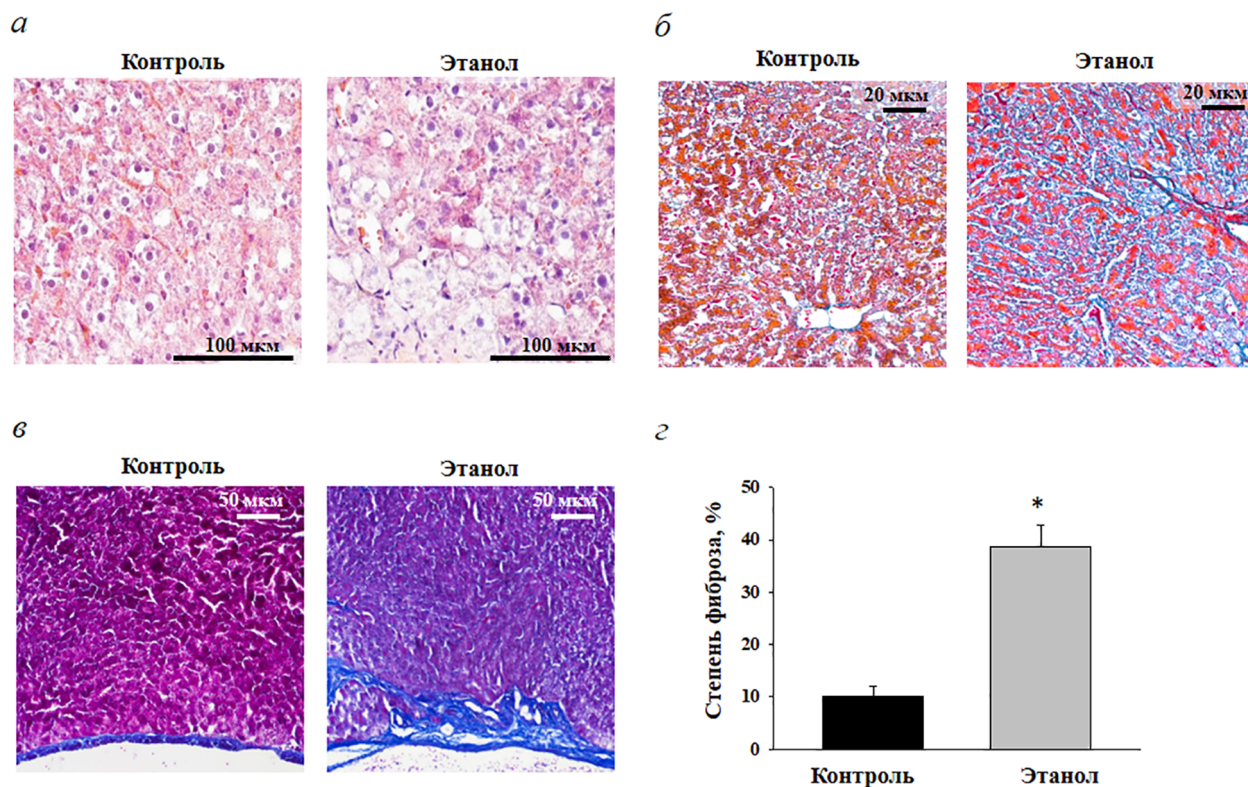
Поскольку печень является основным барьером на пути токсических веществ в организме, в ней происходит основной метаболизм этанола при алкогольной интоксикации. Метаболизм

этанола в печени приводит к образованию различных гепатотоксических побочных продуктов и значительному окислительному стрессу в печени, и, как следствие, к гибели гепатоцитов [21].

Сначала мы оценили степень повреждения ткани печени при алкогольной интоксикации. Для оценки степени и характера алкогольного повреждения ткани печени и определения его локализации проводили анализ гистотопограмм образцов перипортальных зон ткани печени в двух группах животных. Кроме того, оценивали депонирование коллагена в стенках центральных сосудов (рис. 1а) и в паренхиме (рис. 1б). Во фрагментах ткани печени крыс, подвергнутых алкогольной интоксикации, наблюдали накопление коллагена в стенках крупных сосудов и паренхиме печени (рис. 1в). Кроме того, отмечены признаки развития паренхиматозного фиброза и утолщение сосудистых стенок с формированием фиброзных септ. При этом прирост фиброзных изменений в этой группе крыс, оцененный с помощью макросов из ImageJ, был значительно больше, чем в контрольных образцах (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение  $38,8 \pm 3,9\%$  против  $10,0 \pm 3,0\%$ ,  $p < 0,001$ ;  $n = 10$ ) (рис. 1б). Также сравнительное изучение клеточной структуры ткани показало, что в группе крыс с алкогольной интоксикацией имелись признаки набухания и некроза гепатоцитов, сопровождающегося фрагментацией и/или полным разрушением ядер (рис. 1в).

Возникающие при потреблении этанола патологии связаны в первую очередь с нарушением структуры и функций митохондрий; в частности происходит нарушение про-апоптотических сигнальных путей, окислительный стресс и, как следствие, нарушение антистрессовых защитных механизмов [3, 22, 23]. Так как одной из ключевых характеристик функционирования митохондрий является открытие мПТР, мы исследовали влияние хронического потребления этанола на параметры её функционирования. Существуют данные, что алкогольная интоксикация приводит к нарушениям в функционировании мПТР [14-16]. Хроническое потребление алкоголя приводит к повышению чувствительности митохондрий к индукции мПТР, и, следовательно, к увеличению проницаемости внутренней митохондриальной мембраны, а также к её деполяризации, набуханию и повреждению внешней мембраны [15]. В настоящее время продолжается изучение состава и структуры поры. В последние годы всё чаще высказываются мнения, что мПТР не имеет постоянных структурных компонентов, а в различных ситуациях в её формирование могут вовлекаться разные белковые компоненты и каналы [24-26]. На основании недавних исследований, проведённых в нашей лаборатории, мы предположили наличие в митохондриях печени в условиях хронического алкоголизма компенсаторной системы, формируемой белками регуляторами мПТР (CNP, VDAC, TSPO) [14, 27, 28].

Первоначально VDAC считали структурным компонентом поры, позднее эксперименты с нокаутными мышами показали, что выключение (нокаут) всех трёх изоформ VDAC не препятствует



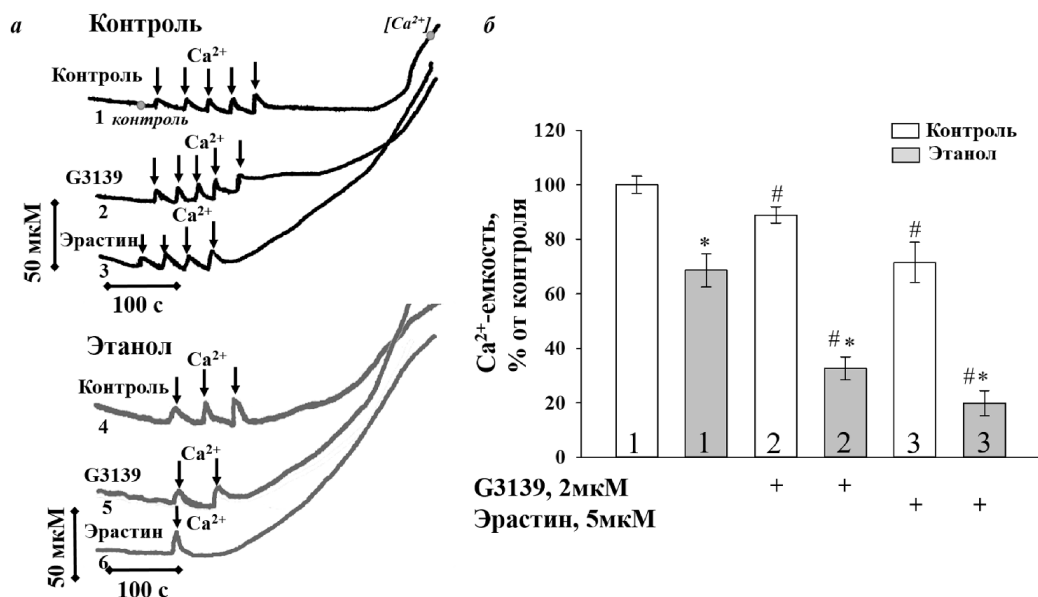
**Рисунок 1.** Фрагменты гистотопограмм перипортальных областей ткани печени крыс. Световая микроскопия: **а** – окраска трихром по Массону (коллаген/фиброз – синим, неколлаеновые компоненты – розовым, ядра клеток – тёмно-малиновым), линейка 100 мкм; **б** – окраска трихром по Малори (коллаген/фиброз – синим, неколлаеновые компоненты – оранжевые/красные, ядра клеток – красные), линейка 20 мкм. Микрофотографии периваскулярных гепатоцитов печени крыс: **в** – Н&Е (ядра клеток выделены фиолетовым цветом, эритроциты – красным, цитоплазма клеток – розовым), линейка 50 мкм. **г** – диаграмма, отражающая прирост депонированного коллагена в перипортальной области печени каждой группы крыс. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение пяти независимых экспериментов. \* –  $p < 0,05$  свидетельствует о достоверной разнице в уровне коллагена по отношению к контролю. Статистическую значимость различий между парами средних значений оценивали с помощью теста ANOVA типа 2 (Стьюдента-Ньюмена-Кейлса). Цветной рисунок доступен в электронной версии статьи.

функционированию мПТР [29]. Однако в настоящее время появляется большое количество работ, сообщающих о новых доказательствах участия VDAC в мПТР [8, 13, 30, 31].

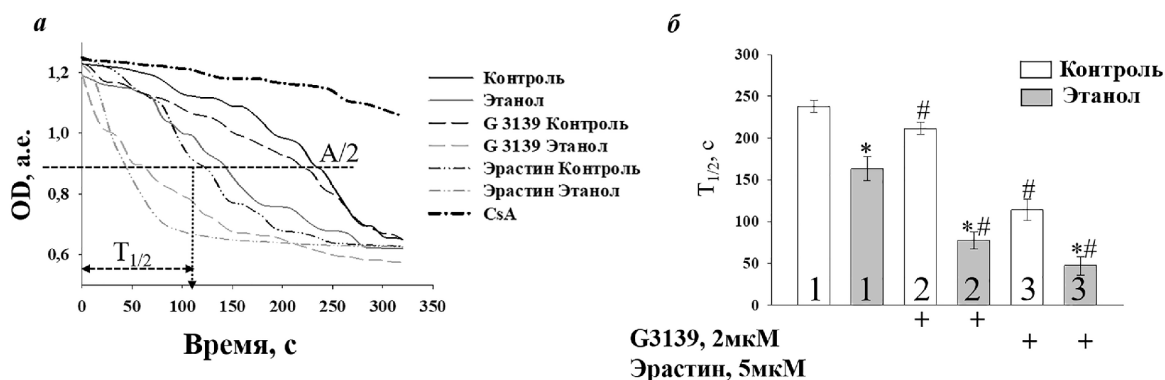
В работе было исследовано влияние двух модуляторов VDAC каналов: эрастина (2 мкМ) и G3139 (5 мкМ). Эрастин — VDAC-связывающая небольшая молекула, которая уменьшает скорость окисления NADH в изолированных митохондриях дрожжей, экспрессирующих одну изоформу VDAC2 [32], и увеличивает проникновение NADH в липосомы, содержащие VDAC2 человека [33]. Эрастин взаимодействует со VDAC, вызывая митохондриальную дисфункцию, высвобождение активных форм кислорода (АФК) и, в конечном итоге, вызывая гибель клеток [32].

Другое исследуемое вещество — G3139 (Oblimersen Genasense, Bcl-2 antisense), синтетический фосфоротиоат олигодезоксирибонуклеотида ДНК, разработанный для снижения экспрессии мРНК *bcl-2*, широко используемый как ингибитор VDAC каналов [34]. Ранее была показана способность G3139 стимулировать открытие мПТР в митохондриях мозга и печени крыс [35].

С целью выявления эффекта эрастина и G3139 на функционирование мПТР в митохондриях печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией мы измеряли один из ключевых параметров поры —  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкость — количество кальция, необходимое для достижения пороговой концентрации и открытия мПТР. Как показано на рисунке 2, добавление эрастина и G3139 вызывало уменьшение  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости, что соответствует инициации открытия поры. Однако в митохондриях печени крыс с алкогольной интоксикацией (серые столбцы на рисунке 2б) оба вещества усиливали свой эффект. Так,  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкость митохондрий контрольных животных в присутствии G3139 была меньше на 15% по сравнению с соответствующим контролем (без добавок, белый столбик 1 vs белый столбик 2), в то время как в митохондриях крыс с алкогольной интоксикацией  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкость в присутствии G3139 снижалась в 2 раза по сравнению с контролем без добавок (серый столбик 1 vs серый столбик 2). Та же тенденция наблюдалась и в присутствии эрастина (эффект эрастина увеличивался от 30% до 45% в митохондриях печени крыс с алкогольной интоксикацией по сравнению с контрольными).



**Рисунок 2.** Влияние G3139 и эрастина на  $Ca^{2+}$ -ёмкость митохондрий печени крыс: **а** – транспорт  $Ca^{2+}$  в митохондриях, **б** – количественный анализ пороговой  $[Ca^{2+}]$ . Значения показаны в % относительно контроля, контрольное значение  $Ca^{2+}$ -ёмкости (у контрольных животных без добавок) – 150 нмоль  $Ca^{2+}$  на мг белка. Представлены значения трёх независимых экспериментов. \* –  $p < 0,05$  сравнение значений этанольной группы относительно соответствующего показателя контрольной группы (серые столбики vs белые). # –  $p < 0,05$  сравнение значений в присутствии добавок (G3139 и эрастина) относительно значений в отсутствии добавок (столбики 3 и 2 относительно 1). Серыми точками показаны места отбора проб для проведения вестерн-блот анализа, результаты которого представлены на рисунках 3 и 4.



**Рисунок 3.** Влияние G3139 и эрастина на набухание митохондрий печени крыс. Набухание инициировали добавкой  $Ca^{2+}$ , соответствующей пороговой концентрации – 250 нмоль  $Ca^{2+}$  на мг белка. Представлены значения трёх независимых экспериментов. **а** – кривые набухания митохондрий печени, **б** – полупериод набухания (время достижения 1/2 от амплитуды набухания,  $T_{1/2}$ ) митохондрий. \* –  $p < 0,05$  сравнение значений этанольной группы относительно соответствующего показателя контрольной группы (серые столбики vs белые). # –  $p < 0,05$  сравнение значений в присутствии добавок (G3139 и эрастина) относительно значений в отсутствии добавок (столбики 3 и 2 относительно 1).

Таким образом, мы выяснили, что эрастин и G3139 усиливают своё действие в митохондриях печени крыс с алкогольной интоксикацией по сравнению с действием в митохондриях печени контрольных животных.

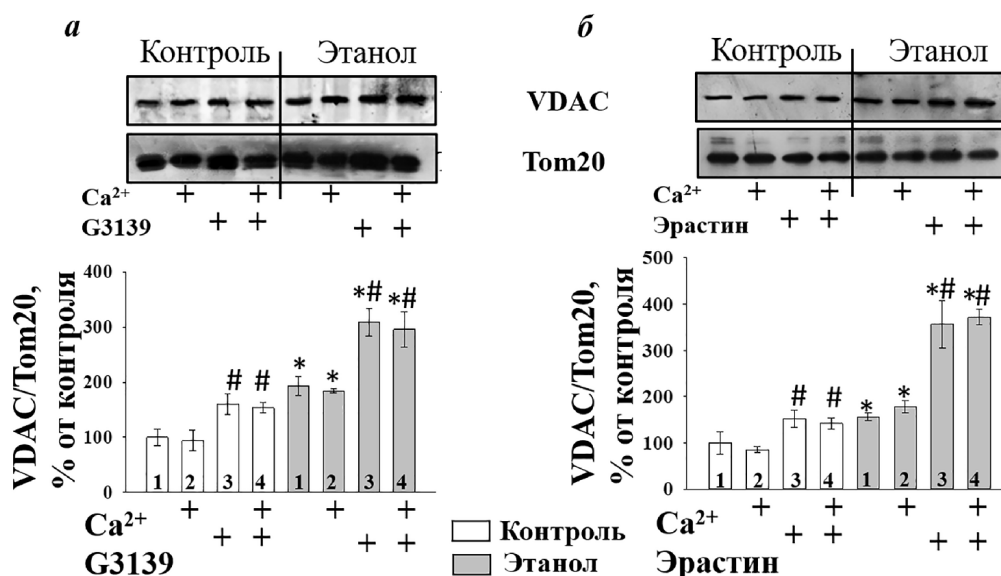
Чтобы подтвердить данный эффект, мы исследовали другой параметр, характеризующий открытие мРТР — кальций-индуцированное набухание митохондрий. Добавление  $Ca^{2+}$  в пороговой концентрации к суспензии митохондрий, инкубированных в стандартной среде, вызывало уменьшение светорассеяния, что свидетельствует о набухании, при этом митохондриальные мембраны становятся проницаемыми для веществ с низкой

молекулярной массой. Количественно процесс набухания характеризовался временем достижения полумаксимального сигнала светорассеяния ( $T_{1/2}$ ). На рисунке 3 представлены результаты исследования. В целом, они повторяют полученные ранее данные, подтверждая усиление эффекта модуляторов VDAC каналов в условиях воздействия этанола. При этом следует отметить, что как и на  $Ca^{2+}$ -ёмкость эффект эрастина на набухание митохондрий был сильнее, чем эффект G3139. В присутствии G3139 в контрольных митохондриях время полупериода ( $T_{1/2}$ ) уменьшалось на 10%, а в присутствии эрастина — практически в два раза. В митохондриях крыс

с алкогольной интоксикацией G3139 вызывал увеличение скорости набухания митохондрий в 2 раза, а эрастин — в 3 раза. Таким образом, было установлено, что митохондрии, изолированные из печени крыс с хронической алкоголизацией, были более чувствительны к индукции мПТР, вызванной разными агентами, по сравнению с митохондриями, изолированными из контрольных животных. Индукция мПТР была во всех случаях циклоспорин-чувствительной. Разницу в эффекте G3139 и эрастина на инициацию открытия мПТР и стимуляцию высокоамплитудного набухания митохондрий можно объяснить различием мест воздействия этих соединений на VDAC. Полученные данные позволяют нам предположить, что в патологических условиях хронического воздействия алкоголя в митохондриях могут происходить изменения в структуре мПТР или в механизмах её регуляции. Данные изменения могут быть компенсаторным ответом на возникающие при интоксикации повреждения. Мы предполагаем, что VDAC вовлекается в функционирование этой системы, а модуляторы VDAC могут использоваться для её регуляции. В литературе имеются сведения о роли VDAC в функционировании мПТР при других патологиях [8, 12, 30]. Вероятно, эта система возникает в ответ на повреждения митохондрий различной этиологии.

Далее мы проверили влияние исследуемых модуляторов VDAC каналов на уровень содержания белка VDAC в митохондриях контрольных крыс и крыс с хронической интоксикацией. Исследования проводили в условиях закрытой и открытой мПТР. Мы не обнаружили изменений в уровне белка

при открытой мПТР по сравнению с закрытой. G3139, как и эрастин, повышал содержание VDAC в митохондриях печени контрольных крыс на ~50-60% как при открытой, так и при закрытой поре (белые столбики 1 и 2 vs 3 и 4 на рис. 4а,б). Здесь следует отметить, что подобные изменения наблюдались нами и ранее, например, при исследовании влияния лигандов TSPO на митохондрии печени крыс при алкогольной интоксикации. В настоящий момент мы предполагаем, что преинкубация митохондрий с модуляторами VDAC каналов приводит, наряду с инициацией поры, ещё и к некоторым конформационным изменениям в белковых комплексах, что, в свою очередь, отражает изменения в уровне белков. Немаловажно, что белки, в которых происходят изменения, находятся на внешней мембране митохондрий. Более того, активность протеаз в контроле, в зависимости от типа гидролизуемого белка, может быть выше или ниже, чем в других условиях. Выяснение механизма обнаруженных изменений является целью наших дальнейших исследований. Под воздействием хронического потребления этанола уровень белка повышался приблизительно в 2 раза (без добавок, серые столбики 1 и 2 vs белые столбики 1 и 2, рис. 4а,б). В митохондриях печени крыс с хроническим потреблением этанола в присутствии G3139 содержание VDAC увеличивалось в 1,5 раза, а в присутствии эрастина в 2 раза по сравнению с контролем (серые столбики 3 и 4 vs серые столбики 1 и 2). Таким образом, влияние модуляторов VDAC каналов на распределение данного белка в митохондриях усиливается при нарушениях, связанных с алкогольной интоксикацией.



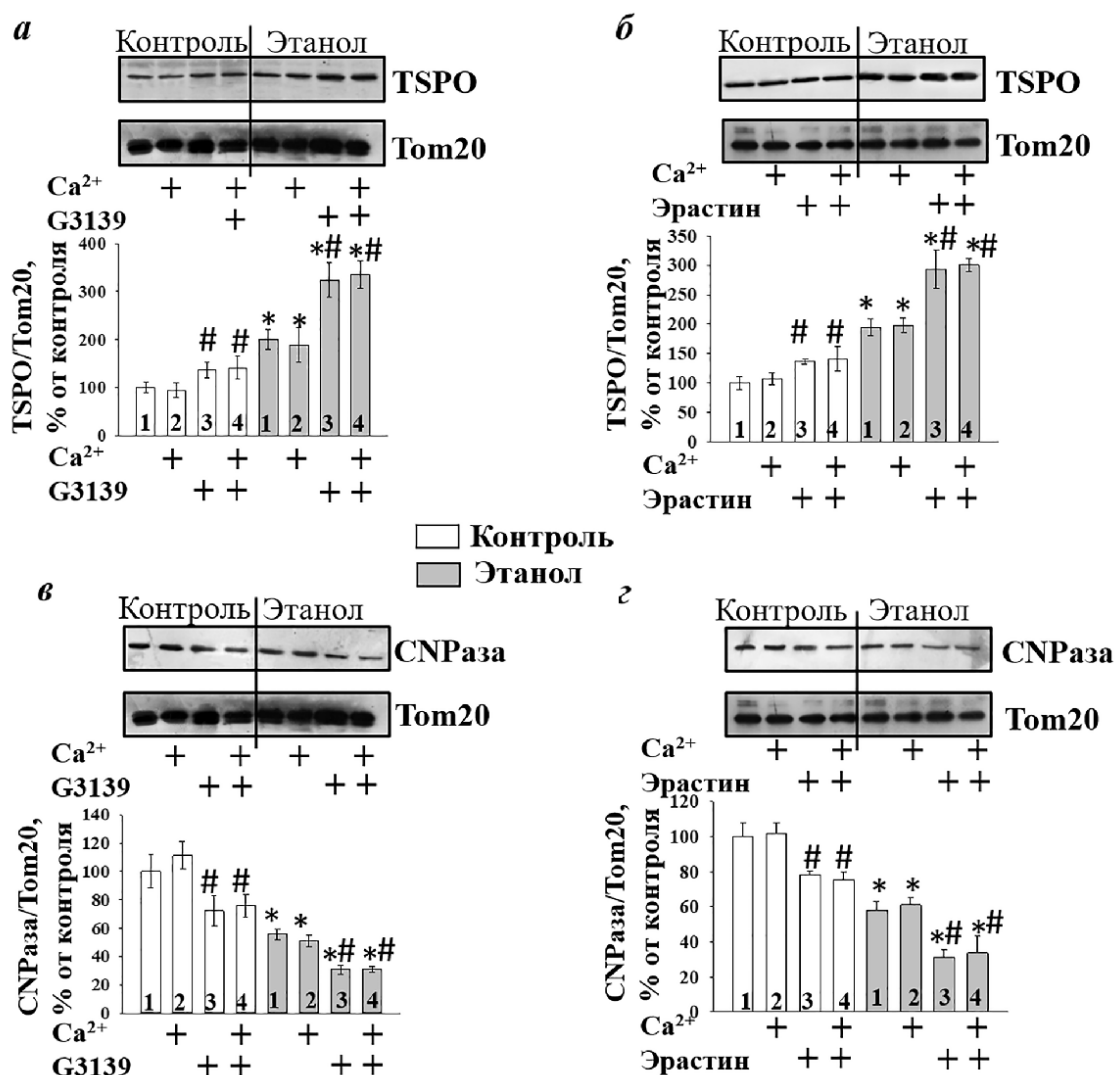
**Рисунок 4.** Изменение содержания VDAC в присутствии 5 мкМ G3139 (а) и 2 мкМ эрастина (б) в митохондриях печени крыс в отсутствии/присутствии пороговой концентрации Ca<sup>2+</sup>. В качестве контроля белковой нагрузки использовали антитела к Tom20. Представлены значения трёх независимых экспериментов. Верхняя часть рисунка — иммуноблоты, окрашенные соответствующими антителами, нижняя часть — диаграммы, количественно отражающие изменения в содержании VDAC в процентах относительно контроля (белый столбик 1, митохондрии крыс контрольной группы без добавок), нормированных на Tom20. \* —  $p < 0,05$  сравнение значений этанольной группы относительно соответствующего показателя контрольной группы (серые столбики vs белые). # —  $p < 0,05$  сравнение значений в присутствии добавок (G3139 и эрастина) относительно значений в отсутствии добавок (столбики 3 относительно 1 и 4 относительно 2).



## ДЕЙСТВИЕ ЭРАСТИНА И G3139 ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Поскольку мы обнаружили изменения в содержании VDAC, мы решили проверить, изменяется ли содержание митохондриальных белков, которые, как предполагается, являются партнёрами VDAC в митохондриях, а также считаются регуляторами мПТР. Одним из таких белков является белок-транслокатор (TSPO), известный ранее как периферический бензодиазепиновый рецептор (PBR), который, согласно нашим исследованиям, может вовлекаться в регуляцию проницаемости митохондриальных мембран и регуляцию мПТР [14, 35]. Ранее мы показали, что лиганды TSPO (протопорфирин IX и PK 11195) могут вовлекаться в регуляцию мПТР в митохондриях печени при хронической алкогольной интоксикации [14]. Поскольку исследования нашей группы, а также литературные данные

указывают на тесную взаимосвязь между TSPO и VDAC [14, 36, 37], мы исследовали также действие модуляторов VDAC на уровни TSPO в митохондриях контрольных животных и животных с хронической алкогольной интоксикацией. В результате проведённых исследований мы обнаружили, что под воздействием G3139 и эрастина содержание TSPO, аналогично VDAC, повышается у контрольных животных и снижается у животных с хронической алкогольной интоксикацией. Кроме того, следует отметить значительное повышение уровня TSPO в митохондриях печени при хронической алкогольной интоксикации по сравнению с контрольными значениями в условиях закрытой и открытой мПТР. Количественные характеристики данных эффектов можно увидеть на рисунке 5а,б.



**Рисунок 5.** Изменение содержания TSPO (а и б) и CNPазы (в и г) в присутствии G3139) и эрастина в митохондриях печени крыс в отсутствии/присутствии пороговой концентрации Ca<sup>2+</sup>. В качестве контроля белковой нагрузки использовали антитела к Tom20. Представлены значения трёх независимых экспериментов. Верхняя часть рисунка – иммуноблоты, окрашенные соответствующими антителами, нижняя часть – диаграммы, количественно отражающие изменения в содержании VDAC в процентах относительно контроля (белый столбик 1, митохондрии крыс контрольной группы без добавок), нормированных на Tom20. \* –  $p < 0,05$  сравнение значений этанольной группы относительно соответствующего показателя контрольной группы (серые столбики vs белые). # –  $p < 0,05$  сравнение значений в присутствии добавок (G3139 и эрастина) относительно значений в отсутствии добавок (столбики 3 относительно 1 и 4 относительно 2).

Другим белком-партнёром VDAC является фосфодиэстераза циклических нуклеотидов (2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase; CNРаза) — белок миелиновой оболочки, обнаруженный нами в митохондриях немиелинизированных тканей [38]. Мы также показали ранее, что CNРаза в митохондриях ко-локализуется со VDAC и принимает участие в регуляции работы мРТР [39]. Результаты работы показали, что уровень содержания CNРаза снижается при алкогольной интоксикации, и обнаруженное снижение усиливается под действием G3139 и эрастина в митохондриях печени животных, подвергнутых хронической алкогольной интоксикации (рис. 5в,г).

Таким образом, мы обнаружили, что в митохондриях печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией под воздействием G3139 и эрастина наблюдается снижение уровня CNРаза с одной стороны и повышение TSPO и VDAC с другой стороны, что может говорить о наличии взаимосвязи между исследуемыми белками в данных условиях.

В литературе имеются сведения о существенной роли VDAC в различных митохондриальных патологиях [8, 12, 40, 41], однако механизмы данных процессов остаются невыясненными. Мы предполагаем функциональное взаимодействие между TSPO, CNРазой и VDAC в митохондриях в ответ на вызванные этанолом дегенеративные изменения. Необходимы дополнительные исследования для выяснения механизма этого взаимодействия и его функционального значения. Однако наши исследования показывают, что эти белки являются потенциальными мишенями для терапевтического регулирования. Эрастин и G3139 способны влиять на функцию этой системы и, таким образом, могут быть фармакологическими агентами для целенаправленного лечения последствий алкогольной интоксикации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований мы показали, что модуляторы VDAC каналов эрастин и G3139 способны инициировать открытие мРТР в митохондриях животных с интоксикацией. Кроме того, мы обнаружили, что их присутствие изменяет уровень белков регуляторов мРТР (CNРаза, VDAC, TSPO), и эти изменения являются синхронными. Такие результаты предполагают наличие комплекса этих белков в митохондриях. Механизм действия этого комплекса в настоящее время неизвестен и является темой наших дальнейших исследований, однако наши результаты позволяют предположить, что комплекс играет ключевую роль в регуляции проводимости каналов VDAC в митохондриях печени крыс при хронической алкогольной интоксикации и, следовательно, в регуляции проницаемости митохондриальной мембраны и запрограммированной гибели клеток при поражении алкоголем.

## БЛАГОДАРНОСТИ

В настоящей работе были использованы приборы ЦКП Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Госзадания Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (№ 075-01027-22-00 и № 075-01025-23-00).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии общепринятыми международными нормами обращения с животными (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22.09.2010 г) и одобрены комиссией по биологической безопасности и этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (протокол №05/2022 от 05 марта 2022).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Khambu B., Wang L., Zhang H., Yin X.M.* (2017) The activation and function of autophagy in alcoholic liver disease. *Curr. Mol. Pharmacol.*, **10**(3), 165-171. DOI: 10.2174/1874467208666150817112654
2. *Bonet-Ponce L., Saez-Atienzar S., da Casa C., Flores-Bellver M., Barcia J.M., Sancho-Pelluz J., Romero F.J., Jordan J., Galindo M.F.* (2015) On the mechanism underlying ethanol-induced mitochondrial dynamic disruption and autophagy response. *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**(7), 1400-1409. DOI: 10.1016/j.bbdis.2015.03.006
3. *Manzo-Avalos S., Saavedra-Molina A.* (2010) Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **7**(12), 4281-4304. DOI: 10.3390/ijerph7124281
4. *Samuvel D.J., Li L., Krishnasamy Y., Gooz M., Takemoto K., Woster P.M., Lemasters J.J., Zhong Z.* (2022) Mitochondrial depolarization after acute ethanol treatment drives mitophagy in living mice. *Autophagy*, **18**(11), 2671-2685. DOI: 10.1080/15548627.2022.2046457
5. *Rostovtseva T.K., Sheldon K.L., Hassanzadeh E., Monge C., Saks V., Bezrukov S.M., Sackett D.L.* (2008) Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(48), 18746-18751. DOI: 10.1073/pnas.0806303105
6. *Shoshan-Barmatz V., Ben-Hail D.* (2012) VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion*, **12**(1), 24-34. DOI: 10.1016/j.mito.2011.04.001
7. *Pediaditakis P., Kim J.S., He L., Zhang X., Graves L.M., Lemasters J.J.* (2010) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by protein kinase A in rat liver mitochondria and hepatocytes. *Biochem. J.*, **431**(3), 411-421. DOI: 10.1042/BJ20091741



8. Camara A.K.S., Zhou Y., Wen P.C., Tajkhorshid E., Kwok W.M. (2017) Mitochondrial VDAC1: A key gatekeeper as potential therapeutic target. *Front. Physiol.*, **8**, 460. DOI: 10.3389/fphys.2017.00460
9. Shoshan-Barmatz V., De S., Meir A. (2017) The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1, Ca<sup>2+</sup> transport, apoptosis, and their regulation. *Front. Oncol.*, **7**, 60. DOI: 10.3389/fonc.2017.00060
10. Holmuhamedov E., Lemasters J.J. (2009) Ethanol exposure decreases mitochondrial outer membrane permeability in cultured rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **481**(2), 226-233. DOI: 10.1016/j.abb.2008.10.036
11. Lemasters J.J., Holmuhamedov E.L., Czerny C., Zhong Z., Maldonado E.N. (2012) Regulation of mitochondrial function by voltage dependent anion channels in ethanol metabolism and the warburg effect. *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**(6), 1536-1544. DOI: 10.1016/j.bbame.2011.11.034
12. Kim J., Gupta R., Blanco L.P., Yang S., Shteinfur-Kuzmine A., Wang K., Zhu J., Yoon H.E., Wang X., Kerkhofs M., Kang H., Brown A.L., Park S.-J. et al. (2019) VDAC oligomers form mitochondrial pores to release mtDNA fragments and promote lupus-like disease. *Science*, **366**(6472), 1531-1536. DOI: 10.1126/science.aav4011
13. Navaneetha Krishnan S., Rosales J.L., Lee K.Y. (2020) mPTP opening caused by Cdk5 loss is due to increased mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *Oncogene*, **39**(13), 2797-2806. DOI: 10.1038/s41388-020-1188-5
14. Baburina Y., Odinkova I., Krestinina O. (2020) The effects of PK11195 and protoporphyrin IX can modulate chronic alcohol intoxication in rat liver mitochondria under the opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Cells*, **9**(8), DOI: 10.3390/cells9081774
15. King A.L., Swain T.M., Mao Z., Udoh U.S., Oliva C.R., Betancourt A.M., Griguer C.E., Crowe D.R., Lesort M., Bailey S.M. (2014) Involvement of the mitochondrial permeability transition pore in chronic ethanol-mediated liver injury in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **306**(4), G265-G277. DOI: 10.1152/ajpgi.00278.2013
16. Lamarche F., Carcenac C., Gonthier B., Cottet-Rousselle C., Chauvin C., Barret L., Leverve X., Savasta M., Fontaine E. (2013) Mitochondrial permeability transition pore inhibitors prevent ethanol-induced neuronal death in mice. *Chem. Res. Toxicol.*, **26**(1), 78-88. DOI: 10.1021/tx300395w
17. Lieber C.S., de Carli L.M. (1989) Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol.*, **24**(3), 197-211.
18. ImageJ. Retrived January 20, 2023 from <https://imagej.nih.gov/ij/>
19. Azarashvili T., Grachev D., Krestinina O., Evtodienko Y., Yurkov I., Papadopoulos V., Reiser G. (2007) The peripheral-type benzodiazepine receptor is involved in control of Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore opening in rat brain mitochondria. *Cell Calcium*, **42**(1), 27-39. DOI: 10.1016/j.ceca.2006.11.004
20. Reiser G., Kunzelmann U., Steinhilber G., Binnmoller F.J. (1994) Generation of a monoclonal antibody against the myelin protein CNP (2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) suitable for biochemical and for immunohistochemical investigations of CNP. *Neurochem. Res.*, **19**(12), 1479-1485.
21. Han J., Lee C., Hur J., Jung Y. (2022) Current therapeutic options and potential of mesenchymal stem cell therapy for alcoholic liver disease. *Cells*, **12**(1), 22. DOI: 10.3390/cells12010022
22. Cederbaum A.I., Lu Y., Wu D. (2009) Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch. Toxicol.*, **83**(6), 519-548. DOI: 10.1007/s00204-009-0432-0
23. Mantena S.K., King A.L., Andringa K.K., Eccleston H.B., Bailey S.M. (2008) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, **44**(7), 1259-1272. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.029
24. Briston T., Selwood D.L., Szabadkai G., Duchon M.R. (2019) Mitochondrial permeability transition: A molecular lesion with multiple drug targets. *Trends Pharmacol. Sci.*, **40**(1), 50-70. DOI: 10.1016/j.tips.2018.11.004
25. Federico M., de la Fuente S., Palomeque J., Sheu S.S. (2021) The role of mitochondria in metabolic disease: A special emphasis on heart dysfunction. *J. Physiol.*, **599**(14), 3477-3493. DOI: 10.1113/JP279376
26. Rottenberg H., Hoek J.B. (2021) The mitochondrial permeability transition: Nexus of aging, disease and longevity. *Cells*, **10**(1), 79. DOI: 10.3390/cells10010079
27. Baburina Y., Odinkova I., Krestinina O. (2021) Carbenoxolon is capable to regulate the mitochondrial permeability transition pore opening in chronic alcohol intoxication. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(19), 10249. DOI: 10.3390/ijms221910249
28. Krestinina O., Odinkova I., Sotnikova L., Krestinin R., Zvyagina A., Baburina Y. (2022) Astaxanthin is able to prevent alcohol-induced dysfunction of liver mitochondria. *Antioxidants (Basel)*, **11**(10), 2019. DOI: 10.3390/antiox11102019
29. Baines C.P., Kaiser R.A., Sheiko T., Craigen W.J., Molkentin J.D. (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell. Biol.*, **9**(5), 550-555.
30. Zhou H., Hu S., Jin Q., Shi C., Zhang Y., Zhu P., Ma Q., Tian F., Chen Y. (2017) Mff-dependent mitochondrial fission contributes to the pathogenesis of cardiac microvasculature ischemia/reperfusion injury via induction of mROS-mediated cardiolipin oxidation and HK2/VDAC1 disassociation-involved mPTP opening. *J. Am. Heart Assoc.*, **6**(3), e005328. DOI: 10.1161/JAHA.116.005328
31. Chaudhuri A.D., Choi D.C., Kabaria S., Tran A., Junn E. (2016) MicroRNA-7 regulates the function of mitochondrial permeability transition pore by targeting VDAC1 expression. *J. Biol. Chem.*, **291**(12), 6483-6493. DOI: 10.1074/jbc.M115.691352
32. Yagoda N., von Rechenberg M., Zaganjor E., Bauer A.J., Yang W.S., Fridman D.J., Wolpaw A.J., Smukste I., Peltier J.M., Boniface J.J., Smith R., Lessnick S.L., Sahasrabudhe S., Stockwell B.R. (2007) RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*, **447**(7146), 864-868. DOI: 10.1038/nature05859
33. Bauer A.J., Gieschler S., Lemberg K.M., McDermott A.E., Stockwell B.R. (2011) Functional model of metabolite gating by human voltage-dependent anion channel 2. *Biochemistry*, **50**(17), 3408-3410. DOI: 10.1021/bi2003247
34. Tan W., Loke Y.H., Stein C.A., Miller P., Colombini M. (2007) Phosphorothioate oligonucleotides block the VDAC channel. *Biophys. J.*, **93**(4), 1184-1191. DOI: 10.1529/biophysj.107.105379
35. Azarashvili T., Krestinina O., Baburina Y., Odinkova I., Grachev D., Papadopoulos V., Akatov V., Lemasters J.J., Reiser G. (2015) Combined effect of G3139 and TSPO ligands on Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition in rat brain mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **587**, 70-77. DOI: 10.1016/j.abb.2015.10.012
36. Guo Y., Sun Z., Wang L., Jiang R., Shu Q., Xu G. (2022) Increased expression of TSPO-VDAC complex is correlated with NLRP3 inflammasome activation in diabetic retinopathy. *Mol. Med. Rep.*, **26**(6), 353. DOI: 10.3892/mmr.2022.12869

37. Hiser C., Montgomery B.L., Ferguson-Miller S. (2021) TSPO protein binding partners in bacteria, animals, and plants. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **53**(4), 463-487. DOI: 10.1007/s10863-021-09905-4
38. Azarashvili T., Krestinina O., Galvita A., Grachev D., Baburina Y., Stricker R., Evtodienko Y., Reiser G. (2009) Ca<sup>2+</sup>-dependent permeability transition regulation in rat brain mitochondria by 2',3'-cyclic nucleotides and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **296**(6), C1428-C1439.
39. Baburina Y., Azarashvili T., Grachev D., Krestinina O., Galvita A., Stricker R., Reiser G. (2015) Mitochondrial 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) interacts with mPTP modulators and functional complexes (I-V) coupled with release of apoptotic factors. *Neurochem. Int.*, **90**, 46-55. DOI: 10.1016/j.neuint.2015.07.012
40. He Y., Wang W., Yang T., Thomas E.R., Dai R., Li X. (2022) The potential role of voltage-dependent anion channel in the treatment of Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2022**, 4665530. DOI: 10.1155/2022/4665530
41. Klapper-Goldstein H., Verma A., Elyagon S., Gillis R., Murninkas M., Pittala S., Paul A., Shoshan-Barmatz V., Etzion Y. (2020) VDAC1 in the diseased myocardium and the effect of VDAC1-interacting compound on atrial fibrosis induced by hyperaldosteronism. *Sci. Rep.*, **10**(1), 22101. DOI: 10.1038/s41598-020-79056-w

Поступила в редакцию: 24. 11. 2022.  
После доработки: 27. 01. 2023.  
Принята к печати: 27. 01. 2023.

## THE EFFECT OF ERASTIN AND G3139 ON RAT LIVER MITOCHONDRIA IN CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION

*Yu.L. Baburina\*, A.I. Zvyagina, I.V. Odinkova, O.V. Krestinina*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Science,  
3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290 Russia; \*e-mail: byul@rambler.ru

The effect of modulators of VDAC channels — G3139 and erastin on the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) functioning and changes in the content of proteins involved in regulation of mPTP (VDAC, CNPase, and TSPO) has been investigated in liver mitochondria of rats with chronic alcohol intoxication. It was shown that the mitochondria of rats treated with ethanol were more sensitive to mPTP induction. Moreover, ethanol induced changes in the expression of mPTP regulator proteins. G3139 and erastin were also able to influence the studied mitochondrial parameters, and they increased their effect in the liver mitochondria of rats treated with ethanol, as compared to the mitochondria of control rats. We hypothesize that the results of this study may help to elucidate the mechanisms of chronic action of ethanol on mitochondria and contribute to the development of new therapeutic strategies for treating the consequences of ethanol-related diseases.

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

**Key words:** mitochondrial nonspecific pore (mPTP); voltage-dependent anion channel (VDAC); chronic alcohol intoxication; erastin

**Funding.** The work was carried out within the framework of the State Assignment of the Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences (No. 075-01027-22-00).

Received: 24.11.2022; revised: 27.01.2023; accepted: 27.01.2023.