УДК 577.24

ПРОТОНОФОРНОЕ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОНЪЮГАТА ФЛУОРЕСЦЕИНА С ДЕЦИЛ(ТРИФЕНИЛ)ФОСФОНИЕМ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ПРУДОВИКА*

© 2019 Л.Б. Попова, А.Л. Камышева, Т.И. Рокицкая, Г.А. Коршунова, Р.С. Кирсанов, Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко**

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: antonen@genebee.msu.ru

> Поступила в редакцию 18.02.2019 После доработки 06.06.2019 Принята к публикации 17.06.2019

Разобщители окислительного фосфорилирования в митохондриях, сыгравшие ключевую роль в раскрытии основ биоэнергетики клетки, в последнее время вызывают значительный интерес как перспективные соединения для создания медицинских препаратов, обладающие, в частности, нейропротекторными свойствами. В настоящей работе изучено действие митофлуоресцеина (mitoFluo), нового протонофорного разобщителя на основе флуоресцеина, представляющего собой конъюгат флуоресцеина с децил(трифенил)фосфонием, на электрическую активность нейронов моллюска Lymnaea stagnalis. Показано, что mitoFluo деполяризует нейроны и модифицирует спайковую активность, вызывая расширение спайков, снижение их амплитуды и увеличение частоты. Длительное воздействие высоких (десятки микромолей) концентраций mitoFluo приводит к полному подавлению электрической активности нейронов. Качественно влияние mitoFluo на активность нейронов подобно соответствующим эффектам классического митохондриального разобщителя карбонилцианид-м-хлорфенилгидразона, но обнаруживается при гораздо более длительном воздействии и больших концентрациях. Отличительной особенностью mitoFluo является его фотоиндуцированное действие на электрическую активность нейронов. Наблюдаемые при освещении в присутствии mitoFluo изменения параметров активности нейронов близки к светоиндуцированным эффектам известного фотосенсибилизатора бенгальского розового, но менее выражены. Предполагается, что действие mitoFluo на электрическую активность нейронов, как митохондриального разобщителя и как фотосенсибилизатора, опосредовано изменениями концентрации ионов кальция в цитоплазме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейрон, мембранный потенциал, потенциал действия, разобщитель, протонофор, митохондрии.

DOI: 10.1134/S0320972519100051

Известно, что восстановление кровотока (реперфузия) после периода снижения кровоснабжения (ишемии) приводит к значительным повреждениям тканей мозга, связанным в значительной степени с образованием активных форм кислорода (АФК). В ряде работ показано защитное действие митохондриальных разобщителей в моделях ишемии-реперфузии [1–3] и других травм [4] мозга, обусловленное, как предполагается, способностью разобщителей окислительного фосфорилирования подавлять генерацию АФК из-за ее зависимости от мембранного потенциала митохондрий [2, 5–7]. Разобщители — это соединения, способные за счет переноса протонов через мембрану [8] вызывать диссипацию разности электрохимических по-

Принятые сокращения: mitoFluo (митофлуоресцеин) – {10-[2-(3-гидрокси-6-оксоксантен-9-ил)бензоил]оксидецил}(трифенил)фосфоний бромид; КЦХФ – карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразон; ФКФ – карбонилцианид-*n*-трифторметокси-фенилгидразон; ДНФ – 2,4-динитрофенол; DPhPC – дифитаноилфосфатидилхолин; гА – грамицидин А; СGС – гигантский церебральный нейрон; В1, В2, В4 – буккальные нейроны; БЛМ – бислойная липидная мембрана; АФК – активные формы кислорода.

^{*}Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-041, 19.08.2019.

^{**} Адресат для корреспонденции.

тенциалов протонов на внутренней мембране митохондрий, тем самым нарушая сопряжение между переносом электрона по дыхательной цепи и синтезом АТФ [9, 10].

Наблюдаемый в последние годы всплеск интереса к разобщителям наряду с перспективами их использования в борьбе с ожирением и болезнями, связанными с окислительным стрессом, включая нейродегенеративные заболевания, обусловлен также их антимикробным и противораковым действием. В связи с этим в ряде лабораторий предпринимаются попытки создания разобщителей, обладающих новыми полезными свойствами. Так, нами синтезированы и изучены разобщители на основе производных известного флуорофора флуоресцеина [4, 11, 12]. Особенностью этих разобщителей является наличие яркой флуоресценции, позволяющей судить об их накоплении в клетках и их компартментах. Однако у фотоактивности может быть обратная сторона: как многие красители, производные флуоресцеина могут быть фотодинамически активны, т.е. способны сенсибилизировать фотоповреждение клеток в присутствии кислорода. Хорошей моделью для изучения действия разобщителей на нервные клетки является электрическая активность нейронов моллюсков. В работе [13] нами показано, что классические разобщители, такие как карбонилцианид м-хлорфенил гидразон (КЦХФ) и 2,4-динитрофенол (ДНФ), вызывают деполяризацию плазматической мембраны нейронов и расширение спайков, причем эти эффекты опосредованы, по всей видимости, действием разобщителей на митохондрии нейронов. В литературе также имеются данные о деполяризации плазматической мембраны культивируемых нейрональных клеток, а также изолированных нервных окончаний под действием таких классических разобщителей как КЦХФ [14] и карбонилцианид-п-трифторметокси-фенилгидразон $(\Phi K \Phi)$ [14, 15]. В настоящей работе предпринято сравнительное исследование влияния митофлуоресцеина, нового разобщителя на основе флуоресцеина, представляющего собой конъюгат флуоресцеина с децил(трифенил)фосфонием (mitoFluo, [12]) и традиционного разобщителя КЦХФ на электрическую активность нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis*. Наряду с темновым действием, обнаружено и изучено фотоиндуцированное действие mitoFluo как на частоту спайковой активности, так и на форму спайков. Показано, что разные типы нейронов моллюска проявляют различную чувствительность к действию разобщителей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Большинство использованных в работе химических реактивов, в том числе КЦХФ, были приобретены у фирмы «Sigma» (США). Флуоресцирующий разобщитель mitoFluo (митофлуоресцеин, конъюгат флуоресцеина и децил(трифенил)фосфония) был синтезирован как описано нами ранее [12]. Синтез был осуществлен в две стадии (представлено на схеме). На первом этапе раствор 1,10-дибромдекана (7,2 ммоль) и трифенилфосфина (4,7 ммоль) в бензоле нагревали при 80 °C в течение 20 ч в плотно закрытом сосуде. После завершения реакции смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали досуха. Далее продукт (10-бромдецил(трифенил)фосфоний бромид) выделяли многократным переосаждением из дихлорметана диэтиловым эфиром с последующей очисткой колоночной хроматографией (MN Kieselgel 60, 240-400 mesh), используя смесь этанол-дихлорометан (1:5) в качестве элюента. На втором этапе к раствору флуоресцеина (2,0 ммоль) и карбоната натрия (3,8 ммоль) в 40 мл ДМФА, нагретому до 60 °С, прибавили раствор ранее полученного 10-бромдецил(трифенил)фосфоний бромида (2 ммоль) в минимальном объеме CH₂Cl₂. Реакцию проводили 3 ч при 60 °C, затем охлаждали до комнатной температуры и разбавляли 100 мл CH₂Cl₂.



Схема

Продукт реакции, {10-[2-(3-гидрокси-6-оксоксантен-9-ил)бензоил]оксидецил}(трифенил)фосфоний бромид (mitoFluo), экстрагировали дихлорметаном и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, используя смесь этанол-дихлорметан (1 : 5) в качестве элюента (схема).

Электрофизиологические эксперименты проводили на нейронах брюхоногого моллюска прудовика Lymnaea stagnalis. Прудовиков выращивали в лаборатории в аквариуме с пресной водой. Центральную нервную систему моллюска, состоящую из ганглиев окологлоточного нервного кольца и буккальных ганглиев, вырезали и переносили в ванночку, выстланную силиконом (Silgard) и заполненную солевым раствором. Стандартный солевой раствор содержал (MM): 44,0 NaCl, 2,0 KCl, 4,0 CaCl₂, 1,5 MgCl₂, 10,0 HEPES, pH 7,6. Чтобы облегчить проникновение регистрирующих электродов в нейроны, оболочки ганглиев предварительно размягчали 0,1%-ным раствором проназы (protease Туре XIV, «Sigma») в течение 10 мин. Затем после отмывания фермента разрезали церебральную комиссуру. Ганглии раскалывали на дне ванночки миниатюрными иголками так, чтобы можно было хорошо видеть нейроны, которые визуально идентифицируются, и функции которых хорошо изучены и описаны [16], в том числе гигантский церебральный нейрон (CGC), буккальные нейроны (В1, В2, В4) [17], а также крупные нейроны из педального и висцерального ганглиев. Нейронную активность регистрировали с помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов, заполненных 2 M KCl (сопротивление кончика 20–60 МОм). В некоторых экспериментах под визуальным контролем в нейрон вводили два микроэлектрода, один из которых служил для пропускания токов, а второй для измерения сдвигов потенциала. Известно, что изолированные ганглии моллюсков длительное время (более 10 ч) сохраняют способность к выполнению функций, так сказать фиктивно, т.е. без афферентных и эфферентных органов. Действующее вещество в объеме 5-50 мкл добавляли из стокового раствора в ванночку (2 мл) пипеткой в течение 20-30 с. В опытах по отмыванию mitoFluo его раствор в ванночке объемом 2 мл с помощью 0,5-мл пипетки постепенно заменяли на солевой раствор. Использовали 20 мл чистого солевого раствора. Исходная концентрация раствора mitoFluo уменьшалась в ~6000 раз.

Освещение нейронов осуществляли светодиодной лампой TDS-P005L8011 (свет белый 140", 350 люмен, 5 Ватт) через волоконный световод.

Измерения мембранного потенциала проводили с помощью двухканального усилителя био-

БИОХИМИЯ том 84 вып. 10 2019

потенциалов AxoClamp 2B (Axon Instruments), который позволяет инъецировать ток через микроэлектрод. Полученные данные записывали на компьютер с помощью аналого-цифрового преобразователя DigiData 1200 series и программы pCLAMP 8 («Molecular Devices», United States). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SigmaPlot 9,0 («Systat Software», United States). Для количественной оценки влияния вещества на работу клетки измеряли межспайковый мембранный потенциал нейрона, амплитуду спайка, полуширину спайка, скорость деполяризации и реполяризации мембраны во время спайка, а также среднюю частоту спайков. Эти параметры измеряли и усредняли в течение 1 мин перед добавлением вещества и в течение 1 мин после добавления, в области, где реакция нейрона была наиболее выражена. Иногда при высокой частоте потенциалов действия и равномерной работе клетки, интервал измерений сокращали до 30 с. Для определения статистической значимости различий парных измерений до и после добавления вещества для всех клеток использовали парный *t*-критерий Стьюдента. В случаях, когда данные не имели нормального распределения, применяли метод непараметрической статистики — *t*-критерий Вилкоксона.

Митохондрии выделяли из печени крыс по методике, описанной в работе [18].

Бислойную липидную мембрану (БЛМ) формировали из 2%-ного раствора дифитаноилфосфатидилхолина (DPhPC) (Avanti Polar Lipids) в декане на отверстии в перегородке, разделяющей на два отсека тефлоновую ячейку, содержащую буферный раствор [19]. Диаметр отверстия составлял 0,5 мм. Грамицидин А («Sigma») добавляли из концентрированного раствора в спирте в водный раствор с двух сторон мембраны и тщательно перемешивали в течение 15 мин. MitoFluo добавляли из концентрированных растворов в этаноле в водный раствор с *транс*-стороны мембраны (*цис*-сторона являлась передней стороной по отношению к лампе-вспышке) и тщательно перемешивали в течение 20 мин. Водный раствор содержал 100 мМ KCl, 10 мМ Tris, pH 7,4. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (23-25 °C). Электрический ток через БЛМ регистрировали в условиях фиксации потенциала. Разность потенциалов подавали на хлор-серебряные электроды, помещенные в тефлоновую ячейку. Ток измеряли с помощью усилителя Keithley 428 (Keithley Instruments), оцифровывали с помощью NI-DAQmx (National Instruments) и анализировали с использованием компьютерной программы WinWCP Strathclyde Electrophysiology Software, написанной Дж. Демпстером (University of Strathclyde). БЛМ освещали источником постоянного света – галогеновой лампой («Novaflex», World precision Instruments) с плотностью мощности 0,77 Вт/см² в течение 60 с. Стеклянный фильтр, отсекающий свет с длиной волны < 500 нм, был помещен между лампой и ячейкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие классического разобщителя КЦХФ на электрическую активность клеток изолированных ганглиев Lymnaea stagnalis. В первой части работы подробно изучено действие традиционного митохондриального разобщителя КЦХФ на электрическую активность клеток изолированных ганглиев Lymnaea stagnalis. Среди рассматриваемых клеток были мотонейроны буккальных ганглиев (В1, В2, В4), участвующих в работе буккального аппарата, гигантская клетка церебральных ганглиев (CGC), регулирующая работу всего буккального аппарата и являющаяся серотонинергической модулирующей клеткой, а также клетки висцеральных и педальных ганглиев. Было проведено 13 экспериментов и зарегистрирована электрическая активность 10 гигантских церебральных нейронов, 10 буккальных, 7 висцеральных и 2 педальных клеток. Буккальные нейроны формируют центральный генератор жевательного ритма, который в норме обеспечивает питание прудовика. О работе генератора можно судить по ритмичной смене залпов спайковой активности и периодов торможения нейронов В1, В2 и В4 [16]. Гигантский церебральный нейрон не включен в генератор и не имеет ритмичной активности. Он оказывает модулирующее действие, т.е. регулирует интенсивность работы генератора [17]. На рис. 1 и рис. 2 показана одновременная регистрация электрической активности буккального нейрона 1 (В1) и гигантского церебрального нейрона (CGC) из изолированных ганглиев прудовика. При длительной регистрации этих клеток в контроле (в течение 30-60 мин в изолированных ганглиях, помещенных в стандартный солевой раствор) их мембранный потенциал, измеренный в промежутках между спайками, колебался в пределах 5 мВ.

При добавлении КЦХФ спустя небольшой промежуток времени наблюдали деполяризацию плазматической мембраны нейронов и существенные изменения в их спайковой активности (рис. 1, a, δ , рис. 2, a, δ), причем увеличение мембранного потенциала происходило после лаг-периода, который зависел от концентрации КЦХФ (рис. 1, e, рис. 2, e, рис. 1, e и рис. 2, e). Для всех исследованных нами нейронов можно было подобрать концентрацию разобщителей, которая приводила к деполяризации плазматической мембраны, как это описано нами ранее на буккальных клетках [13]. Иногда перед деполяризацией развивалась небольшая гиперполяризация плазматической мембраны (рис. 1, e и рис. 2, e).

Наряду с деполяризацией выявлена тенденция к увеличению частоты генерации потенциалов действия (рис. 1, *e*, рис. 2, *e*, рис. 1, *ж* и рис. 2, *ж*) в присутствии КЦХФ. Параллельно наблюдалось падение амплитуды и расширение спайков (рис. 1, *d*, рис. 2, *d*, рис. 1, *з* и рис. 2, *з*). В конечном итоге происходило «замолкание» (полное подавление спайковой активности) нейронов, причем у буккальной клетки оно наступало при существенно меньших концентрациях разобщителя, чем у гигантской церебральной клетки. Существенные изменения параметров электрической активности буккальных клеток наблюдались уже после добавления 0,15 мкМ КЦХФ в омывающий раствор.

В случае гигантской церебральной клетки КЦХФ вызвал деполяризацию плазматической мембраны в концентрации 0,45 мкМ (рис. 1, *e*). При этом средняя частота спайковой активности нейрона СGC увеличилась почти в 2 раза (рис. 1, ω). Средняя частота спайков всех зарегистрированных нейронов CGC под воздействием КЦХФ увеличилась на 33% с 0,69 Гц до 0,92 Гц (парный *t*-критерий Стьюдента: *p* = 0,05). Данные для всех зарегистрированных нейронов показаны в табл. 1 и табл. 2. Отметим, что повышение частоты потенциалов действия под влиянием КЦХФ было описано ранее на кардиомиоцитах в работе [20].

Рис. 1, *д*, рис. 2, *д*, рис. 1, з и рис. 2, з иллюстрируют влияние низких (от 0,15 мкМ) и высоких (от 2 мкм) концентраций КЦХФ на форму спайков клеток B1 и CGC, выбранных в моменты времени, указанные треугольниками соответствующих цветов на рис. 1, а, б и рис. 2, а, б. Постепенное расширение спайков и уменьшение их амплитуды началось одновременно с деполяризацией плазматической мембраны и достигло наибольшей величины перед тем, как клетка «замолчала». Как видно из табл. 1, средняя амплитуда спайков всех зарегистрированных буккальных клеток уменьшилась на 24%, с $56,52 \pm 4,41$ мВ в контроле до 42,82 ± 3,75 мВ в присутствии КЦХФ (указаны средние и стандартные ошибки; парный *t*-критерий: p = 0,027). Средняя амплитуда спайка клеток CGC (табл. 2), уменьшилась на 7%, с 74,92 ± 1,74 мВ в контроле до 69,56 ± 2,11 мВ в присутствии КЦХФ (парный



Рис. 1. Влияние субмикромолярной концентрации карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразона (КЦХФ) на спонтанную активность нейронов прудовика. a - KЦХФ в концентрации 0,15мкМ вызывал деполяризацию плазматической мембраны, учащение потенциалов действия и последующее «замолкание» буккального нейрона B1, при этом он не оказывал существенного влияния на работу гигантского церебрального нейрона (CGC); $\delta -$ воздействие 0,15 мкМ КЦХФ в течение двух часов незначительно повлияло на работу CGC. Увеличение концентрации до 0,45 мкМ КЦХФ привело к деполяризации мембраны, учащению потенциалов действия и последующее «замолкание» буккального нейрона B1, при этом он не оказывал существенного влияния на работу гигантского церебрального нейрона (CGC); $\delta -$ воздействие 0,15 мкМ КЦХФ в течение двух часов незначительно повлияло на работу CGC. Увеличение концентрации до 0,45 мкМ КЦХФ привело к деполяризации мембраны, учащению потенциалов действия и последующему «замолканию» церебрального нейрона; e, e, - межспайковый мембранный потенциал, средняя частота спайков и наложение потенциалов действия B1; e, w, s - то же для гигантского церебрального нейрона CGC; <math>e, e - за 0 на шкале времени принят момент первого (e) или второго (e) добавления КЦХФ (отмечены стрелками на a и δ); w - средняя частота спайков в 0,15 мкМ КЦХФ в течение двух часов не отличалась от контрольной. Третий и четвертый столбец показывают среднюю частоту спайков в интервалы времени 0–5 мин и 5–10 мин после третьего добавления КЦХФ; d, s - места расположения спайков отмечены треугольниками соответствующих цветов на a и δ . Контрольный спайк показан черным.

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/



Рис. 2. Карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразон (КЦХФ) в микромолярных концентрациях оказывал влияние на спонтанную активность как буккального нейрона B1, так и гигантского церебрального нейрона (СGС) прудовика. *а* – При добавлении 2 мкМ КЦХФ в нейроне B1 развивалась деполяризация плазматической мембраны, наблюдалось увеличение частоты потенциалов действия и последующее «замолкание» нейрона, в то время как в нейроне CGC гиперполяризация мембраны и торможение спайковой активности сменились небольшой деполяризацией и постепенным повышением частоты потенциалов действия; *б* –увеличение общей концентрации КЦХФ до 5 мкМ привело к дальнейшей деполяризации мембраны CGC и увеличению частоты спайков, которое сменилось полным торможением спайковой активности нейрона CGC. Мембранный потенциал нейрона B1 менялся незначительно; *в*, *г*, *д* – межспайковый мембранный потенциал, средняя частота спайков и наложение потенциалов действия нейрона B1; *е*, *ж*, *з* – то же для гигантского церебрального нейрона CGC; *в*, *е* – за 0 на шкале времени принят момент первого добавления КЦХФ (отмечен стрелкой на A); *г*, *ж* – гистограммы средней частоты спайков построены с интервалом времени 1,5 и 5 мин соответственно; *д*, *з* – места расположения спайков отмечены треугольниками соответствующих цветов на *a* и *б*. Контрольный спайк показан черным. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/ journal/biokhsm/

Буккальные нейроны, <i>n</i> = 10	Контроль, среднее значение ± ст. ошибка	КЦХФ, среднее значение ± ст. ошибка	Парный <i>t</i> -критерий Стьюдента или <i>t</i> -критерий Вилкоксона	Изменение в процентах
Мембранный потенциал (мВ)	$-49,88 \pm 4,58$	$-43,\!48\pm4,\!77$	p = 0,011	деполяризация на 9%
Амплитуда спайка (мВ)	$56,52 \pm 4,41$	$42,82 \pm 3,75$	p = 0,027	уменьшение на 24%
Полуширина спайка (мс)	$7,76 \pm 1,44$	$12,\!35\pm1,\!68$	p = 0,005	расширение на 59%
Макс. скорость деполяриза- ции спайка (мВ/мс)	$21,92 \pm 3,73$	$10,22 \pm 2,57$	p = 0,014	замедление на 46,6%
Макс. Скорость реполяриза- ции спайка (мВ/мс)	$-10,47 \pm 1,76$	$-5,50 \pm 1,45$	<i>p</i> = 0,011	замедление на 52,5%
Средняя частота спайков (Гц)	$1,\!98\pm0,\!60$	$5,65 \pm 1,23$	p = 0,002	увеличение на 185%

Таблица 1. Влияние карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразона (КЦХФ) на буккальные нейроны (В1, В2, В4) изолированных ганглиев прудовика (*Lymnaea stagnalis*)

Таблица 2. Влияние карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразона (КЦХФ) на гигантские церебральные нейроны (СGС) изолированных ганглиев прудовика (*Lymnaea stagnalis*)

Гигантский церебральный нейрон (CGC), n = 10	Контроль, среднее значение ± ст. ошибка	КЦХФ, среднее значение ± ст. ошибка	Парный <i>t</i> -критерий Стьюдента или <i>t</i> -критерий Вилкоксона	Изменение в процентах
Мембранный потенциал (мВ)	$-59,10 \pm 4,56$	$-52,72 \pm 4,17$	<i>p</i> < 0,001	деполяризация на 11%
Амплитуда спайка (мВ)	$74,92 \pm 1,74$	69,56 ± 2,11	p = 0,001	уменьшение на 7%
Полуширина спайка (мс)	$16,44 \pm 2,29$	$18,96 \pm 1,86$	p = 0,020	расширение на 15%
Макс. скорость деполяриза- ции спайка (мВ/мс)	17,01 ± 1,29	12,90 ± 1,23	p = 0,002	замедление на 24%
Макс. скорость реполяриза- ции спайка (мВ/мс)	$-6,10\pm0,60$	$-3,98 \pm 0,35$	p = 0,004	замедление на 35%
Средняя частота спайков (Гц)	0,69 ± 0,06	$0,92\pm0,07$	p = 0,050	увеличение на 34%

t-критерий: p = 0.001). Существенно изменились скорости деполяризации и реполяризации спайков. Так, у буккальных клеток максимальные скорости деполяризации и реполяризации спайка уменьшились приблизительно в 2 раза: с 21,92 \pm 3,73 мВ/мс и $-10,47 \pm 1,76$ мВ/мс, соответственно, в контроле до $10,22 \pm 2,57$ мВ/мс и $-5,50 \pm 1,45$ мВ/мс, соответственно, в присутствии КЦХФ (парный *t*-критерий: p = 0.014 и p = 0.011, соответственно; табл. 1). У клеток СGC максимальные скорости деполяризации и реполяризации спайка уменьшились с 17,01 ± 1,29 мВ/мс и -6.10 ± 0.6 мВ/мс, соответственно, в контроле до 12,9 ± 1,23 мВ/мс и -3,98 ± 0,35 мВ/мс, соответственно, в присут-ствии КЦХФ (*t*-критерий Вилкоксона: p = 0.002 и парный *t*-критерий: p =0,004, соответственно; табл. 2). Замедление скорости деполяризации и реполяризации мембраны во время спайка на 20–30% сопровождалось расширением спайков в растворе КЦХФ. Так, полуширина потенциалов действия буккальных клеток увеличилась в среднем на 59%, а полуширина спайков нейронов СGС – на 15% (парный *t*-критерий: p = 0,005 и p = 0,020, соответственно; табл. 1 и табл. 2). Ранее наблюдалось увеличение продолжительности потенциалов действия под действием КЦХФ и ФКФ на культуре нейрональных клеток [14].

Нами было проведено шесть экспериментов по исследованию влияния ДНФ на электрическую активность нейронов прудовика. Регистрировали нейроны разных типов и количество опытов недостаточно для определения статистической значимости различий парных измерений до и после добавления ДНФ. Однако, следует отметить, что действие ДНФ подобно опи-



Рис. 3. Влияние низкой концентрации mitoFluo на спонтанную активность нейронов прудовика. a – MitoFluo в концентрации 0,8 мкМ вызывал деполяризацию плазматической мембраны и учащение потенциалов действия буккального нейрона B4; δ – межспайковый мембранный потенциал быстро возрастал после добавления mitoFluo. За 0 на шкале времени принят момент добавления mitoFluo. Латентный период реакции составил около 2 мин; s – средняя частота потенциалов действия буккального в 2 раза по сравнению с контролем. Первый столбец – средняя частота спайков в течение 4 мин перед добавление mitoFluo; второй столбец – средняя частота спайков в течение 4 мин через 2 мин после добавления mitoFluo; e – наложение потенциалов действия. MitoFluo снижал скорость деполяризации и реполяризации спайка. Места расположения спайков отмечены треугольниками соответствующих цветов на a. Контрольный спайк показан черным.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

санному выше действию КЦХФ. Во всех экспериментах наблюдалось увеличение мембранного потенциала, расширение спайков и уменьшение их амплитуды, что согласуется с ранними данными по действию ДНФ на электрическую активность возбудимых мембран [21, 22], и в конечном итоге происходило прекращение электрической активности нейрона. Для возникновения таких изменений требовалось от 150 мкМ до 500 мкМ ДНФ. Как и в случае КЦХФ, от концентрации сильно зависело время начала изменения активности нейронов. Если при 150 мкМ это были десятки минут, то при 500 мкМ требовались лишь минуты. Также первыми отвечали буккальные нейроны, тогда как гигантский церебральный нейрон реагировал существенно позже (данные не приведены).

Влияние mitoFluo на электрическую активность нейронов *Lymnaea stagnalis*. Для изучения действия mitoFluo было проведено 20 экспериментов, при этом была зарегистрирована активность 18 гигантских церебральных клеток, 29 буккальных клеток, а также одной висцеральной и одной педальной клетки. На рис. 3 показан типичный опыт по действию низкой концентрации mitoFluo на работу буккального нейрона В4. Добавление 0,8 мкМ разобщителя вызывало деполяризацию нейрона (рис. 3, *б*), уве-



Рис. 4. МіtoFluo в большой концентрации приводил к полному торможению спонтанной активности нейронов прудовика. a — МіtoFluo в концентрации 10 мкМ вызывал деполяризацию плазматической мембраны, увеличение частоты и уменьшение амплитуды спайков буккального нейрона В4. Снижение частоты спайков началось через 2 часа после добавления mitoFluo (a, нижняя панель); δ — межспайковый мембранный потенциал плавно возрастал в присутствии mitoFluo в течение всего эксперимента. За 0 на шкале времени принят момент добавления mitoFluo; e — средняя частота потенциалов действия в присутствии mitoFluo увеличилась более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Гистограмма построена с интервалом 20 мин; e — наложение потенциалов действия: mitoFluo снижал скорость деполяризации и реполяризации спайка. Места расположения спайков отмечены треугольниками соответствующих цветов на a. Контрольный спайк показан черным.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

личение частоты генерации потенциалов действия (рис. 3, *в*), снижение амплитуды и расширение спайков (рис. 3, *г*). Влияние mitoFluo на работу нейронов не удавалось полностью снять при отмывании ганглиев солевым раствором в течение 2-х ч.

Рис. 4 иллюстрирует типичный опыт по действию mitoFluo в более высокой концентрации. На рис. 4, *а* показана контрольная запись электрической активности клетки В4. При добавлении mitoFluo (10 мкМ) спустя небольшой временной промежуток (~15 мин) происходили существенные изменения в активности нейрона: медленно развивалась деполяризация плазматической мембраны (рис. 4, δ), сильно (с 0,03 до 2,3 Гц) возрастала частота потенциалов действия (рис. 4, δ), снижалась скорость деполяризации и реполяризации спайка (рис. 4, ϵ).

В конечном итоге добавление mitoFluo привело к «замолканию» буккальной клетки (рис. 4, а, нижняя панель). Постепенное расширение спайков началось одновременно с деполяризацией плазматической мембраны и достигло наибольшего значения перед тем, как клетка «замолчала». В среднем, mitoFluo в концентрации 2 и больше мкМ деполяризовал буккальные клетки на 20%, с $-54,56 \pm 2,49$ мВ в контроле до $-43,43 \pm 2,56$ мВ в присутствии mitoFluo (парный *t*-критерий: *p* < 0,001; *n* = 16 клеток; табл. 3). Средняя амплитуда спайков буккальных клеток уменьшилась на 13,7%. Максимальные скорости деполяризации и реполяризации спайков уменьшились с 25,38 ± 3,96 мВ/мс и -13,39 ± 2,17 мВ/мс, соответственно, в контроле до $15,94 \pm 3,92$ мВ/мс и $-8,47 \pm 1,89$ мВ/мс, соответственно, в присутствии mitoFluo (парный *t*-критерий: p = 0.006 и p = 0.010, соответственно). Полуширина спайков увеличилась в среднем на 64% (табл. 3). Таким образом, mitoFluo вызывал изменения параметров спайков, качественно подобные тем, что наблюдались в присутствии КЦХФ (рис. 2, ∂ , табл. 1). Влияние mitoFluo (2-60 мкМ) исследовалось на семнадцати гигантских церебральных нейронах (табл. 4). Мембранный потенциал этих СGС под действием mitoFluo изменился в среднем на 14%. Полуширина спайков увеличилась, в среднем, на 35%, с 15,84 \pm 1,41 мс до 21,43 \pm 1,9 мс (парный *t*-критерий: p = 0,002). Значительно более высокая концентрация mitoFluo (60 мкМ) приводила к полному торможению CGC (данные не показаны). Таким образом, в случае mitoFluo, как и в случае КЦХФ, гигантские церебральные нейроны оказались менее чувствительны, чем бук-

Таблица 3. Влияние mitoFluo на буккальные нейроны (B1, B2, B4) изолированных ганглиев прудовика

Буккальные нейроны, <i>n</i> = 16	Контроль, среднее значение ± ст. ошибка	mitoFluo, среднее значение ± ст. ошибка	Парный <i>t</i> -критерий Стьюдента или <i>t</i> -критерий Вилкоксона	Изменение в процентах
Мембранный потенциал (мВ)	$-54,56 \pm 2,49$	$-43,43 \pm 2,56$	<i>p</i> < 0,001	деполяризация на 20,4%
Амплитуда спайка (мВ)	$60,56\pm2,51$	$52,\!28\pm3,\!63$	p = 0,030	уменьшение на 13,7%
Полуширина спайка (мс)	$7,12\pm1,00$	$11,67 \pm 1,94$	<i>p</i> < 0,001	расширение на 64%
Макс. скорость деполяриза- ции спайка (мВ/мс)	25,38 ± 3,96	15,94 ± 3,92	p = 0,006	замедление на 37%
Макс. скорость реполяриза- ции спайка (мВ/мс)	$-13,39 \pm 2,17$	$-8,47 \pm 1,89$	p = 0,010	замедление на 36,7%
Средняя частота спайков (Гц)	$1,68 \pm 0,44$	$3,30\pm0,65$	<i>p</i> < 0,001	увеличение на 96%

Таблица 4. Влияние mitoFluo на гигантские церебральные нейроны (CGC) изолированных ганглиев прудовика

Гигантский церебральный нейрон (CGC), <i>n</i> = 17	Контроль, среднее значение ± ст. ошибка	mitoFluo, среднее значение ± ст. ошибка	Парный <i>t</i> -критерий Стьюдента или <i>t</i> -критерий Вилкоксона	Изменение в процентах
Мембранный потенциал (мВ)	$-55,78 \pm 8,44$	$-48,\!17\pm8,\!22$	<i>p</i> < 0,001	деполяризация на 14%
Амплитуда спайка (мВ)	$78,70\pm2,08$	$75,\!08\pm2,\!72$	p = 0,006	уменьшение на 5%
Полуширина спайка (мс)	$15,84 \pm 1,41$	$21,43 \pm 1,90$	p = 0,002	расширение на 35%
Макс. скорость деполяриза- ции спайка (мВ/мс)	22,74 ± 2,27	17,52 ± 1,66	p = 0,002	замедление на 23%
Макс. скорость реполяриза- ции спайка (мВ/мс)	$-7,55 \pm 0,8$	$-5,35 \pm 0,4$	p = 0,007	замедление на 30%
Средняя частота спайков (Гц)	$0,59\pm0,06$	$0,83\pm0,05$	<i>p</i> < 0,001	увеличение на 42%

кальные. Устойчивость гигантского церебрального нейрона к действию разобщителей, вероятно, связана с его серотонинергической функцией. На это указывает тот факт, что педальные серотонинергические нейроны в наших опытах также проявляли повышенную устойчивость к действию разобщителей (результаты не приведены).

Следует отметить, что в проведенных нами трех опытах по отмыванию mitoFluo активность нейронов не возвращалась к контрольному уровню при наблюдении от 30 мин до 4-х ч.

Индукция выхода ионов кальция из митохондрий под действием mitoFluo. Как и в случае с КЦХФ и триклозаном, действие которого на электрическую активность нейронов Lymnaea stagnalis изучено в работе [13], изменения этой активности под действием mitoFluo логично связать с изменениями концентрации ионов кальция в цитоплазме. Концентрация ионов кальция в цитоплазме играет важную роль в регуляции каналов плазматической мембраны [23–25]. Согласно многочисленным работам, например, [26–29], протонофорные разобщители индуцируют выход ионов кальция, депонированных в митохондриях, предположительно за счет обращения работы электрогенного кальциевого унипортера, посредством которого при наличии мембранного потенциала осуществляется накопление кальция в матриксе митохондрий, а при сбросе потенциала под действием разобщителей происходит его выброс из мито-



Рис. 5. Измерение выхода ионов Ca^{2+} из изолированных митохондрий печени крысы с помощью кальций-селективного электрода при добавлении mitoFluo и КЦХФ. Добавки веществ в среду отмечены стрелками. Концентрации реагентов: Сукцинат – 2 мМ; Ca^{2+} – 50 мкМ; mitoFluo – 1 мкМ; КЦХФ – 200 нМ; Ca^{2+} – 50 мкМ; EDTA – 400 мкМ. МХ – добавка суспензии митохондрий (1 мг/мл). Среда содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ Tris, 10 мМ KH₂PO4, 1 мМ MgCl₂

БИОХИМИЯ том 84 вып. 10 2019

хондрий [29]. Поскольку mitoFluo обладает яркой флуоресценцией, измерение выхода ионов кальция из митохондрий печени крысы осуществлялось нами с помощью кальций-селективного электрода, а не кальций-чувствительных флуоресцирующих красителей (рис. 5). Видно, что добавление mitoFluo в буферный раствор с изолированными митохондриями печени крысы приводит к увеличению концентрации в среде ионов Ca²⁺, высвобожденных из митохондрий. Аналогичный эффект оказывает добавление в среду КЦХФ.

Фотоиндуцированное действие mitoFluo на электрическую активность нейронов моллюска. Фотоиндуцированное действие mitoFluo было исследовано в девяти экспериментах, при этом была зарегистрирована активность 10 гигантских церебральных нейронов, 13 буккальных и одного педального нейронов. На рис. 6, а показана запись активности трех нейронов: буккальных нейронов В1 и В4 и церебрального гигантского нейрона CGC после добавления 7 мкМ mitoFluo в темноте. Включение света приводило к быстрому изменению активности этих нейронов, которое выражалось в деполяризации мембраны (рис. 6, б) и увеличении частоты спайков (рис. 6, в, зеленые столбцы). Отметим, что клетка В4, молчащая перед включением света, отреагировала резким возбуждением в ответ на освещение ганглиев. Изменился характер активности буккальных клеток – полностью исчез пищевой жевательный ритм. В ряде опытов у некоторых клеток перед деполяризацией наблюдалась кратковременная гиперполяризация мембраны. Освещение ганглиев влияло на форму спайков нейронов. По мере деполяризации мембраны уменьшалась амплитуда и происходило расширение спайка (рис. 6, г). В конечном итоге включение освещения в присутствии mitoFluo блокировало способность нейронов генерировать потенциалы действия.

Логично было предположить, что влияние освещения на электрическую активность нейронов моллюсков, наблюдаемое в присутствии объясняется фотодинамическим mitoFluo, действием, где mitoFluo выполняет роль фотосенсибилизатора. Действительно, известно, что флуоресцеин обладает способностью генерировать синглетный кислород, хотя и с очень низким квантовым выходом, составляющим ~0,06 в водном растворе [30]. Было показано также, что коньюгат флуоресцеина с цАМФ способен модифицировать цАМФ-зависимые каналы в ответ на освещение по фотодинамическому механизму [31].

Для проверки фотодинамической природы светоиндуцированного действия mitoFluo на



Рис. 6. Фотоиндуцированное изменение спонтанной активности нейронов прудовика в присутствии mitoFluo. a – Освещение ганглиев на фоне 7 мкМ mitoFluo вызвало деполяризацию мембраны буккальных нейронов B1 и B4 и гигантского церебрального нейрона CGC, влияло на амплитуду и частоту потенциалов действия. Фаза возбуждения сменялась полным торможением спайковой активности, которое развивалось с разной скоростью у разных нейронов; δ – после добавления mitoFluo (желтый треугольник) межспайковый мембранный потенциал буккальных клеток возрастал. В нейроне CGC он менялся мало. Включение света (синий треугольник) приводило к значительной деполяризации всех трех клеток; s – освещение препарата в присутствии 7 мкМ mitoFluo увеличило среднюю частоту спайков нейронов. Черным показана средняя частота спайков в контроле, красным – в mitoFluo, зеленым – при освещении ганглиев; r – влияние освещения в присутствии mitoFluo на форму спайков всех трех нейронов. Черным показан контрольный спайк. Места расположения остальных спайков отмечены треугольниками соответствующих цветов на рис. 6, a.

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/ journal/biokhsm/



Рис. 7. Фотоиндуцированное изменение спонтанной активности нейронов прудовика в присутствии бенгальского розового. a — Освещение ганглиев на фоне 1 мкМ бенгальского розового вызвало быструю деполяризацию мембраны и «замолкание» нейронов в течение одной—двух мин; δ — само по себе освещение ганглиев не меняло мембранный потенциал нейронов, однако включение света на фоне бенгальского розового вызывало резкую деполяризацию мембран всех трех исследованных клеток. Моменты включения и выключения света обозначены синими треугольниками, момент добавления бенгальского розового розового розового розового розового отмечен розовым треугольником; e — освещение ганглиев практически не влияло на среднюю частоту генерации потенциалов действия. Черным обозначена средняя частота спайков в темноте, красным — при освещении, зеленым — после выключения света; e — добавление бенгальского розового (1 мкМ, красные столбцы) мало отражалось на средней частоте генерации потенциалов действия по сравнению с контролем (черные столбцы). Освещение пайков нейронов В4 и СGC. Нейрон В1 «замолчал» сразу после включения света (см. также рис. 7, a); d — наложение потенциалов действия сразу после включения света (см. также рис. 7, a); d — наложение потенциалов действия показан контрольный спайк в темноте, красным — при освещении, зеленым показан контрольный спайк в темноте, красным — при освещении, зеленые потов В4 и СGC. Черным показан контрольный спайк в темноте, красным — при освещении, зеленым показан контрольный спайк в темноте, красным — при освещении, зеленым показан спайк в присутствии бенгальского розового без освещения, и синим — в присутстви бенгальского розового розового розового розового розового разового разового разового при освещении. Фотоиндуцированное действие бенгальского розового на форму спайков всех трех нейронов развивалось в секундной шкале времени.

С цветным вариантом рис. 7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

электрическую активность нейронов мы провели аналогичные опыты с классическим фотосенсибилизатором бенгальским розовым. Было проведено 4 опыта, в которых зарегистрирована активность 7 клеток CGC и 3 буккальных клеток. Из данных, представленных на рис. 7, видно, что освещение в присутствии бенгальского розового приводит к быстрой деполяризации плазматической мембраны и в конечном итоге подавлению электрической активности нейронов, которому у клеток В4 и СGС предшествует значительное увеличение частоты спайков. Интересно отметить, что само по себе освещение изолированных ганглиев прудовика белым светом не влияло на мембранный потенциал (рис. 7, б) и частоту спайков (рис. 7, в) нейронов. Освещение в присутствии бенгальского розового быстро (в секундной шкале времени) и необратимо изменяло эти показатели работы нейронов (рис. 7, г). При этом сильно изменялась форма спайков (рис. 7, ∂). Таким образом, фотоиндуцированные эффекты бенгальского розового и mitoFluo на электрическую активность нейронов моллюска оказались принципиально схожими, однако значительно различалось время развития реакции.

Фотодинамическое действие mitoFluo на ионные каналы грамицидина А. Для проверки способности mitoFluo служить фотосенсибилизатором мы исследовали его в хорошо отработанной нами ранее системе фотоинактивации ионных каналов грамицидина А (гА) в плоской бислойной липидной мембране (БЛМ) [32-35]. На рис. 8, а представлена запись тока через БЛМ, вызванного добавлением 2 нМ гА в омывающий мембрану водный раствор 100 мМ КСІ при рН 7. В период времени, отмеченный черным отрезком, происходило освещение мембраны белым светом. В отсутствии mitoFluo освещение не приводило к изменению тока БЛМ (кривая 1), тогда как освещение в присутствии mitoFluo (кривая 2) вызывало заметное падение тока через грамицидиновые каналы. Подавление тока в присутствии mitoFluo было выражено заметно меньше при добавлении 10 мМ азида натрия, который является тушителем синглетного кислорода (данные не приведены).

Отметим, что в литературе с давних времен имеются сведения о снижении амплитуды и расширении формы спайка [36–39] и возрастании частоты спайков при фотодинамическом воздействии на возбудимые клетки [40–43]. Учитывая литературные данные о возрастании концентрации ионов кальция в цитоплазме нейронов в ответ на фотодинамическое воздействие [44] и стимуляции спайковой активности при повышении цитоплазматического кальция [24, 25, 45],



Рис. 8. Запись кинетики относительного тока (I/I0) при освещении бислойной липидной мембраны (БЛМ) белым светом (интервал освещения показан отрезком сверху рисунка) в присутствии 1 мкМ mitoFluo (черная кривая) или в отсутствии фотосенсибилизатора (серая кривая). БЛМ была сформирована из DPhPC. Ток через мембрану (I0) составлял 0,3 мкА

наблюдаемые в нашей работе изменения параметров электрической активности нейронов Lymnaea stagnalis при освещении клеток после длительной инкубации с mitoFluo можно объяснить выбросом ионов кальция в цитоплазму из эндоплазматического ретикулума под действием АФК, образующихся в результате возбуждения светом данного красителя. Образование продуктов перекисного окисления липидов при длительном освещении клеточных гомогенатов в присутствии флуоресцеина было показано в работе [46]. Известно, что изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция модулируют работу различных типов ионных каналов в плазматической мембране, тем самым, оказывая влияние на мембранный потенциал, генерацию потенциалов действия и другие процессы. Так, в работе [23] показано, что увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция приводит к инактивации кальциевых каналов в нейронах Lymnaea stagnalis. Рассматривая механизм светоиндуцированного действия mitoFluo на активность нейронов Lymnaea stagnalis, нельзя исключить и возможность фотосенсибилизированной модификации белков, образующих ионные каналы, как это предполагалось, например, в работе по фотохимической модификации натриевых токов в гигантских аксонах омара [47]. Примером именно такого механизма действия света на ионные каналы в присутствии фотосенсибилизатора является рассмотренная выше фотодинамическая инактивация грамицидиновых каналов в модельной бислойной мембране.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-10025).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит каких-либо исследований, касающихся использования людей или позвоночных животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Korde, A.S., Pettigrew, L.C., Craddock, S.D., and Maragos, W.F. (2005) The mitochondrial uncoupler 2,4dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia, *J. Neurochem.*, 94, 1676–1684, doi: 10.1111/j. 1471-4159.2005.03328.x.
- Silachev, D.N., Khailova, L.S., Babenko, V.A., Gulyaev, M.V., Kovalchuk, S.I., Zorova, L.D., Plotnikov, E.Y., Antonenko, Y.N., and Zorov, D.B. (2014) Neuroprotective effect of glutamate-substituted analog of gramicidin A is mediated by the uncoupling of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 3434–3442, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.09.002.
- Khailova, L.S., Silachev, D.N., Rokitskaya, T.I., Avetisyan, A.V., Lyamzaev, K.G., Severina, I.I., Il'yasova, T.M., Gulyaev, M.V., Dedukhova, V.I., Trendeleva, T.A., Plotnikov, E.Y., Zvyagilskaya, R.A., Chernyak, B.V., Zorov, D.B., Antonenko, Y.N., and Skulachev, V.P. (2014) A short-chain alkyl derivative of Rhodamine 19 acts as a mild uncoupler of mitochondria and a neuroprotector, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 1739–1747, doi: 10.1016/j.bbabio.2014.07.006.
- Antonenko, Y.N., Denisov, S.S., Silachev, D.N., Khailova, L.S., Jankauskas, S.S., Rokitskaya, T.I., Danilina, T.I., Kotova, E.A., Korshunova, G.A., Plotnikov, E.Y., and Zorov, D.B. (2016) A long-linker conjugate of fluorescein and triphenylphosphonium as mitochondria-targeted uncoupler and fluorescent neuro- and nephroprotector, *Biochim. Biophys. Acta*, 1860, 2463–2473, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.014.
- Boveris, A. (1977) Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 78, 67–82.
- Korshunov, S.S., Škulachev, V.P., and Starkov, A.A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15–18.
- 7. Liu, S.S. (1997) Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria, *Biosci. Rep.*, 17, 259–272.
- 8. McLaughlin, S.G., and Dilger, J.P. (1980) Transport of protons across membranes by weak acids, *Physiol. Rev.*, **60**, 825–863, doi: 10.1152/physrev.1980.60.3.825.
- Liberman, E.A., Topaly, V.P., Tsofina, L.M., Jasaitis, A.A., and Skulachev, V.P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, 222, 1076–1078.
- Terada, H. (1990) Uncouplers of oxidative phosphorylation, *Environ. Health Perspect.*, 87, 213–218, doi: 10.1289/ehp.9087213.
- Shchepinova, M.M., Denisov, S.S., Kotova, E.A., Khailova, L.S., Knorre, D.A., Korshunova, G.A., Tashlitsky, V.N., Severin, F.F., and Antonenko, Y.N. (2014) Dodecyl and octyl esters of fluorescein as protonophores and uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria at submicromolar concentrations, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 149-158, doi: 10.1016/j.bbabio.2013.09.011.
- Denisov, S.S., Kotova, E.A., Plotnikov, E.Y., Tikhonov, A.A., Zorov, D.B., Korshunova, G.A., and Antonenko, Y.N. (2014) A mitochondria-targeted protonophoric uncoupler derived from fluorescein, *Chem. Commun.*, 50, 15366–15369, doi: 10.1039/c4cc04996a.
- 13. Popova, L.B., Nosikova, E.S., Kotova, E.A., Tarasova, E.O., Nazarov, P.A., Khailova, L.S., Balezina, O.P., and

БИОХИМИЯ том 84 вып. 10 2019

Antonenko, Y.N. (2018) Protonophoric action of triclosan causes calcium efflux from mitochondria, plasma membrane depolarization and bursts of miniature end-plate potentials, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 1000–1007, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.01.008.

- Doebler, J. A. (2000) Effects of protonophores on membrane electrical characteristics in NG108-15 cells, *Neurochem. Res.*, 25, 263–268.
- 15. Tretter, L., Chinopoulos, C., and Adam-Vizi, V. (1998) Plasma membrane depolarization and disturbed Na⁺ homeostasis induced by the protonophore carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenyl-hydrazon in isolated nerve terminals, *Mol. Pharmacol.*, **53**, 734–741.
- Benjamin, P.R., and Rose, R.M. (1979) Central generation of bursting in the feeding system of the snail *Lymnaeu stagnalis*, *J. Exp. Biol.*, **80**, 93–118.
- 17. McCrohan, C.R., and Benjamin, P.R. (1980) Patterns of activity and axonal projections of the cerebral giant cells of the snail *Lymnaea stagnalis*, *J. Exp. Biol.*, **85**, 149–168.
- 18. Johnson, D., and Lardy, H. (1967) Isolation of liver or kidney mitochondria, *Methods Enzymol.*, **10**, 94–96.
- Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., and Wescott, W.C. (1963) Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.*, 67, 534–535.
- Zhao, Z., Gordan, R., Wen, H., Fefelova, N., Zang, W.-J., and Xie, L.-H. (2013) Modulation of intracellular calcium waves and triggered activities by mitochondrial Ca flux in mouse cardiomyocytes, *PLoS One*, **8**, e80574, doi: 10.1371/journal.pone.0080574.
- Bulbring, E., and Lullmann, H. (1957) The effect of metabolic inhibitors on the electrical and mechanical activity of the smooth muscle of the Guinea-pig's "taenia coli", *J. Physiol.*, 136, 310–323.
- Krnjevic, K., Puil, E., and Werman, R. (1978) Significance of 2,4-dinitrophenol action on spinal motoneurones, *J. Physiol.*, 275, 225–239.
- 23. Byerly, L., and Moody, W.J. (1984) Intracellular calcium ions and calcium currents in perfused neurones of the snail *Lymnaea stagnalis*, *J. Physiol.*, **352**, 637–652.
- 24. Tse, A., and Hille, B. (1992) GnRH-induced Ca²⁺ oscillations and rhythmic hyperpolarizations of pituitary gonadotropes, *Science*, **255**, 462–464.
- 25. Stojilković, S.S. (2012) Molecular mechanisms of pituitary endocrine cell calcium handling, *Cell Calcium*, **51**, 212–221, doi: 10.1016/j.ceca.2011.11.003.
- Carafoli, E. (1967) *In vivo* effect of uncoupling agents on the incorporation of calcium and strontium into mitochondria and other subcellular fractions of rat liver, *J. Gen. Physiol.*, **50**, 1849–1864.
- Rottenberg, H., and Scarpa, A. (1974) Calcium uptake and membrane potential in mitochondria, *Biochemistry*, 13, 4811–4817.
- Gunter, T.E., Gunter, K.K., Puskin, J.S., and Russell, P.R. (1978) Efflux of Ca²⁺ and Mn²⁺ from rat liver mitochondria, *Biochemistry*, 17, 339–345.
- 29. Bernardi, P., Paradisi, V., Pozzan, T., and Azzone, G.F. (1984) Pathway for uncoupler-induced calcium efflux in rat liver mitochondria: inhibition by ruthenium red, *Biochemistry*, 23, 1645–1651.

- 30. Usui, Y. (1973) Determination of quantum yield of singlet oxygen formation by photosensitization, *Chemistry Lett.*, **2**, 743–744.
- Gao, W., Su, Z., Liu, Q., and Zhou, L. (2014) Statedependent and site-directed photodynamic transformation of HCN2 channel by singlet oxygen, *J. Gen. Physiol.*, 143, 633–644, doi: 10.1085/jgp.201311112.
- 32. Rokitskaya, T.I., Antonenko, Y.N., and Kotova, E.A. (1996) Photodynamic inactivation of gramicidin channels: a flash-photolysis study, *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 221–226.
- Rokitskaya, T.I., Block, M., Antonenko, Y.N., Kotova, E.A., and Pohl, P. (2000) Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels, *Biophys. J.*, 78, 2572–2580, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76801-9.
- Антоненко Ю.Н., Котова Е.А., Рокицкая Т.И. (2005) Фотодинамическое воздействие как основа релаксационного метода изучения грамицидиновых каналов, Биол. мембраны, 22, 275–289.
- *Βυολ. мембраны*, 22, 275–289.
 35. Pashkovskaya, A.A., Sokolenko, E.A., Sokolov, V.S., Kotova, E.A., and Antonenko, Y.N. (2007) Photodynamic activity and binding of sulfonated metallophthalocyanines to phospholipid membranes: contribution of metal-phosphate coordination, *Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 2459–2465, doi: 10.1016/j.bbamem.2007.05.018.
- Людковская Р.Г. (1961) Некоторые закономерности возбуждения светом гигантского аксона каракатицы, Биофизика, 6, 300–308.
- 37. Pooler, J. (1968) Light-induced changes in dye-treated lobster giant axons, *Biophys. J.*, **8**, 1009–1026.
- 38. Pooler, J. (1972) Photodynamic alteration of sodium currents in lobster axons, *J. Gen. Physiol.*, **60**, 367–387.

- 39. Oxford, G.S., Pooler, J.P., and Narahashi, T. (1977) Internal and external application of photodynamic sensitizers on squid giant axons, *J. Membr. Biol.*, **36**, 159–173.
- Бурмистров Ю.М., Людковская Р.Г., Шуранова Ж.П. (1969) Электрическая активность нейронов речного рака при витальной окраске метиленовой синью, Биофизика, 14, 495–500.
- 41. Pooler, J., and Oxford, G.S. (1973) Photodynamic alteration of lobster giant axons in calcium-free and calciumrich media, *J. Membr. Biol.*, **12**, 339–348.
- 42. Kress, M., Petersen, M., and Reeh, P.W. (1997) Methylene blue induces ongoing activity in rat cutaneous primary afferents and depolarization of DRG neurons via a photosensitive mechanism, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **356**, 619–625.
- 43. Uzdensky, A., Bragin, D., Kolosov, M., Dergacheva, O., Fedorenko, G., and Zhavoronkova, A. (2002) Photodynamic inactivation of isolated crayfish mechanoreceptor neuron: different death modes under different photosensitizer concentrations, *Photochem. Photobiol.*, **76**, 431–437.
- Neginskaya, M., Berezhnaya, E., Uzdensky, A.B., and Abramov, A.Y. (2018) Reactive oxygen species produced by a photodynamic effect induced calcium signal in neurons and astrocytes, *Mol. Neurobiol.*, 55, 96–102, doi: 10.1007/s12035-017-0721-1.
- 45. Grace, A.A., and Bunney, B.S. (1984) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing, *J. Neurosci.*, **4**, 2877–2890.
- 46. Hiramitsu, T., Miura, Y., and Machida, H. (1992) Photosensitizer-induced lipid peroxidation in retinal homogenates under illumination, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **12**, 109–114.
- 47. Pooler, J.P., and Valenzeno, D.P. (1978) Kinetic factors governing sensitized photooxidation of excitable cell membranes, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 219–226.

PROTONOPHORIC AND PHOTODYNAMIC ACTION OF FLUORESCEIN DECYL(TRIPHENYL)PHOSPHONIUM ESTER ON ELECTRICAL ACTIVITY OF MOLLUSCAN NEURONS

L. B. Popova, A. L. Kamysheva, T. I. Rokitskaya, G. A. Korshunova, R. S. Kirsanov, E. A. Kotova, and Y. N. Antonenko*

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: antonen@genebee.msu.ru

> Received February 18, 2019 Revised June 6, 2019 Accepted June 17, 2019

Uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria, which have played a key role in uncovering the basic principles of cell bioenergetics, have recently attracted considerable interest as promising compounds with a number of beneficial therapeutic, e.g., neuroprotective properties. Here, we report our data on the effect of mitofluorescein (mitoFluo), a new protonophoric uncoupler, a conjugate of fluorescein with decyl(triphenyl)phosphonium, on the electrical activity of neurons from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. Incubation with mitoFluo in the dark led to a decrease in the absolute value of resting membrane potential of neurons and altered their spike activity, namely, caused spike broadening, a reduction of spike amplitude and an increase in spike frequency. Prolonged incubation at high (tens of micromoles) mitoFluo concentrations resulted in complete suppression of the electrical activity of neurons. The impact of mitoFluo on the neuron activity was qualitatively similar to the corresponding effect of the classical mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone but manifested itself at much longer incubation with higher concentrations. A distinctive feature of mitoFluo is its light-induced action on the electrical activity of neurons. The changes in the parameters of the neuron activity observed upon illumination in the presence of mitoFluo were close to the light-induced effects of the well-known photosensitizer Rose Bengal, but less pronounced. It is assumed that the influence of mitoFluo on the electrical activity of neurons, both as a mitochondrial uncoupler and as a photosensitizer, is mediated by changes in the concentration of calcium ions in the cytoplasm.

Keywords: neuron, membrane potential, action potential, uncoupler, protonophore, mitochondria