

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Никельшпарг Эвелина Ильинична

**Изменения конформации и окислительно-восстановительного
состояния цитохромов дыхательной цепи митохондрий
в препаратах *in vitro* и *in vivo***

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель – *Браже Надежда Александровна, кандидат биологических наук*

Официальные оппоненты – *Лопина Ольга Дмитриевна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биохимии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова*
Олейников Владимир Александрович, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией молекулярной биофизики, института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
Сурин Александр Михайлович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли НИИ общей патологии и патофизиологии

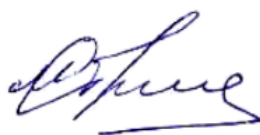
Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/235638275/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ), или дыхательная цепь митохондрий является ключевым звеном в энергообмене клеток. Активность ЭТЦ меняется в зависимости от метаболического состояния клеток и чувствительна к наличию доноров электронов и концентрации АТФ. Например, в условиях нехватки АТФ при повышенной физической активности в мышечных клетках жирные кислоты являются необходимым донором электронов для ЭТЦ, а избыточное накопление липидов приводит к ингибированию ЭТЦ (Coen and Goodpaster 2012). Избыточное накопление сукцината, в норме являющегося донором электронов для комплекса II ЭТЦ, наблюдаемое в условиях гипоксии, приводит к тому, что при реперфузии происходит обратный ток электронов от комплекса II к комплексу I через пул хинонов, что вызывает значительное образование супероксидного анион-радикала (O_2^-) (Chouchani et al. 2014).

Несмотря на хорошую изученность строения и принципов работы ЭТЦ в целом, до сих пор не совсем понятны механизмы ее регуляции на уровне отдельных переносчиков. Гем-содержащие белки – цитохромы, локализованные в комплексах ЭТЦ внутренней мембраны митохондрий, являются одними из ключевых переносчиков электронов в ЭТЦ. Единственным мобильным переносчиком электронов в межмембранном пространстве (ММП) является цитохром С (цитС), переносящий электрон от комплекса III к комплексу IV. Каждый акт переноса электрона сопровождается подстройкой конформации белковой и гемовой частей цитС к своим редокс-партнерам. Известно, что цитС находится в условиях, в которых постоянно изменяются свойства локального окружения: pH, ионный состав ММП, расстояние между внутренней и внешней мембраной митохондрий, мембранный потенциал и распределение зарядов на поверхности комплексов ЭТЦ и мембран. Возможно, при определенных условиях окислительно-восстановительное состояние и конформация цитС будут чувствительны к изменению параметров локального окружения и, таким образом, цитС будет являться «узким местом» в работе дыхательной цепи.

На мутантных формах и диких типах цитС, полученных из разных организмов, было показано, что существует взаимосвязь между конформацией гема и его редокс-потенциалом и что конформация и ориентация гема цитС относительно редокс-партнеров влияет на скорость переноса электронов (Sun et al. 2014; Chertkova et al. 2017). В норме для гема типа С реализуется в основном плоская и скрученная конформация (Ma et al. 1998). Показано, что конформация гема зависит от аминокислотной последовательности и белкового микроокружения в цитС. Так, в работах (Sun et al. 2014;

Chertkova et al. 2017) было обнаружено, что точечные мутации белковой части цитС в области гема приводят к появлению более скрученной гемовой конформации, в результате чего нарушается перенос электрона между цитС и комплексами III и IV.

Эффективность взаимодействия цитС со своими редокс-партнерами зависит также от обратимого изменения конформации белковой части (Alvarez-Paggi, Zitare, and Murgida 2014). В последнее время обсуждается, что такая конформационная подстройка белка цитС может регулировать активность ЭТЦ, увеличивая или уменьшая уровень синтеза АТФ в клетках (Alvarez-Paggi et al. 2017; Guerra-Castellano et al. 2018; Pérez-Mejías et al. 2019). Можно предположить, что электронный транспорт может регулироваться на уровне конформации как белка, так и гема цитС. Однако в настоящее время не существует методов, позволяющих непосредственно исследовать конформацию гемов в интактных митохондриях. Разработка таких методов является необходимой для проведения такого рода исследований.

Целью данной работы было исследовать изменения конформации и окислительно-восстановительного состояния гемов цитохромов С и В в митохондриях при модуляции активности ЭТЦ.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи**:

1. Разработать методический подход, основанный на спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) с использованием серебряных наноструктур, для селективного высокочувствительного усиления сигнала комбинационного рассеяния (КР) от гема цитохрома С в изолированных функционирующих митохондриях;
2. Изучить конформационные изменения гема цитохрома С в изолированных митохондриях с нормально работающей ЭТЦ при стимуляции и ингибировании АТФ-синтазы и при изменении величины потенциала на внутренней мембране митохондрий;
3. Исследовать конформационные изменения гема мембраносвязанного цитохрома С в липосомах в зависимости от разности потенциалов на мембране и сопоставить эти данные с результатами, полученными на митохондриях;
4. Исследовать изменения окислительно-восстановительного состояния и конформации гемов цитохромов С и В в митохондриях клеток при неработающем комплексе IV, а также в условиях избыточного накопления липидов.

Положения, выносимые на защиту:

Разработан методический подход на основе ГКР, в котором серебряные плазмонные наноструктуры используются для многократного усиления сигнала КР от гема окисленного цитС в интактных митохондриях с функционирующей ЭТЦ;

Разработан подход на основе спектроскопии КР в ИК-области для параллельного исследования окислительно-восстановительного состояния цитохромов и количества, состава и свойств липидов в целых клетках;

Избыток липидов в цитоплазме клеток сопровождается накоплением восстановленных цитохромов типа В в ЭТЦ;

Вероятность нахождения гема цитС в плоской или скрученной конформации зависит от величины мембранного потенциала функционирующих митохондрий и активности ЭТЦ.

Научная новизна работы:

Разработан методический подход на основе спектроскопии ГКР для высокочувствительного и селективного исследования конформации гема окисленного цитС в интактных митохондриях в условиях функционирующей дыхательной цепи. Показано, что конформация гема цитС при работающей дыхательной цепи чувствительна к изменению разности потенциалов на внутренней мембране митохондрий и концентрации ионов H^+ в ММП и может служить регулятором активности ЭТЦ. Разработан методический подход для анализа конформации и окислительно-восстановительного состояния цитохромов типа В- и С- в целых клетках. Обнаружена взаимосвязь окислительно-восстановительного состояния цитохромов митохондрий с содержанием липидов.

Научная и практическая значимость:

Полученные данные расширяют имеющиеся представления о способах регуляции активности электронного транспорта в ЭТЦ и поясняют, как при отсутствии нарушений в белковой части цитС и без изменений его количества изменяется активность переноса электронов с его участием. Разработанный подход к исследованию цитС в интактных митохондриях с использованием спектроскопии ГКР может быть применен в экспериментах по изучению конформационных изменений цитС при различных клеточных патологиях и, в частности, дисфункциях митохондрий. Механизм развития окислительного стресса в клетках при накоплении липидных капель может быть связан с накоплением восстановленных форм цитохромов в ЭТЦ, что было выявлено методом КР в ИК-области.

Апробация работы:

Основные результаты работы докладывались на семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ, Российских и международных конференциях (10-ом Европейском биофизическом конгрессе EBSA (Дрезден, 2015), V Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), 19-ом конгрессе международного союза чистой и прикладной биофизики (IUPAB) и 11-ом Европейском биофизическом конгрессе (EBSA) (Эдинбург, 2017), международной конференции «SERS: Faraday Discussions» (Глазго, 2017), 42-ом конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) (Иерусалим, 2017), 20-ой Европейской конференции по биоэнергетике (EBEC) (Будапешт, 2018) и др.).

Публикации:

Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, а также в 16 тезисах в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура диссертации:

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Полный объем диссертации составляет 131 страницу с 63 рисунками и 6 таблицами. Список литературы содержит 189 наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования:

Митохондрии из сердец лабораторных крыс; липосомы диаметром 100 нм из фосфатидилхолина яичного желтка (Sigma-Aldrich) и кардиолипина бычьего сердца (Avanti Polar Lipids) с цитС (Sigma-Aldrich) внутри; субмитохондриальные частицы (СМЧ), полученные из митохондрий сердца быка; клетки линии аденокарциномы толстой кишки НСТ116 дикого типа и с делецией гена сборки комплекса IV SCO2^{-/-}, из-за чего комплекс IV ЭТЦ не функционировал и величина мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi$) была ниже, чем в клетках дикого типа; фиксированные миоциты, полученные биопсией из четырехглавой мышцы от здорового донора и пациента с ожирением.

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) для исследования гема цитохрома С в изолированных митохондриях

Подвижность определенных связей в геме, расположение атома железа относительно плоскости порфиринового цикла и тип деформации гема, влияющие на эффективность переноса электрона, оценивали по спектрам комбинационного рассеяния (КР). Комбинационное рассеяние – это неупругое рассеяние света на молекулах

вещества, при котором происходит смещение частоты рассеянного света относительно возбуждающего на величину разности энергий колебательных подуровней исследуемой молекулы (частотный сдвиг, $\Delta\nu$). Для многоатомных молекул частотный сдвиг на спектрах КР характеризует нормальные колебания групп атомов в молекуле. Низкую интенсивность сигнала КР можно усилить, поместив исследуемую молекулу вблизи поверхности наночастиц металлов. Такой подход называется гигантским комбинационным рассеянием (ГКР). Мы разработали методику на основе спектроскопии ГКР, позволяющую многократно усиливать сигнал от цитохромов внутри функционирующих митохондрий, чтобы исследовать их свойства в естественных условиях функционирования дыхательной цепи. Разбавленную суспензию изолированных митохондрий помещали на поверхность наноструктур и регистрировали спектры ГКР при возбуждении лазерами 514 или 532 нм. Аналогично исследовали состояние цитохромов в липосомах и СМЧ. В работе использовали плазмонные серебряные наноструктуры (СНС), разработанные группой профессора Е.А. Гудилина на факультете Наук о материалах МГУ. Для всех измерений КР и ГКР применяли КР-микроспектрометр inVia Raman (Renishaw, Великобритания).

Комбинационное рассеяние для исследования конформации и окислительно-восстановительного состояния цитохромов и содержания липидов в целых клетках

Митохондрии в составе живых клеток культуры НСТ116 исследовали методом резонансного КР при возбуждении лазером 532 нм. Для одновременного анализа липидного состава липидных капель и окислительно-восстановительного состояния цитохромов в миоцитах мы использовали КР в ИК-области. Спектры КР регистрировали с помощью лазера 785 нм в области липидных капель, окруженных митохондриями.

Другие методы, используемые в работе: для исследования дыхательной активности митохондрий регистрировали концентрацию кислорода электродом Кларка на приборе Эксперт МТХ-001 (Эконикс-Эксперт, Россия); измерение ζ -потенциала и гидродинамического радиуса наночастиц, митохондрий и липосом проводили методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Англия); спектры поглощения митохондрий регистрировали на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss JENA, Германия); величину $\Delta\Psi$ определяли по флуоресценции зонда MitoTrackerCMXRos на спектрометре ИНТЕГРА Спектра (НТ-МДТ, Россия); автофлуоресценцию митохондрий в области 490 нм регистрировали с помощью флуориметра Fluoromax-4 (Horiba Jobin Yvon, Япония).

Статистический анализ проводили с использованием теста Манна-Уитни или Крускала-Валлиса с попарным сравнением по критерию Данна.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Исследование конформации гема цитохрома С в функционирующих изолированных митохондриях методом ГКР

Мы зарегистрировали интенсивный спектр ГКР митохондрий, помещённых на плазмонные СНС (рисунок 1), при возбуждении лазерами 514 или 532 нм (рисунок 2). Спектр ГКР митохондрий обладает рядом интенсивных пиков: 1127, 1170, 1300-1371, 1547, 1570 и 1638 см^{-1} . При этом, при тех же параметрах регистрации спектра ни митохондрии без наноструктур, ни наноструктуры в буферном растворе не обладают спектрами ГКР (рисунок 2 (3-4)). Известно, что при используемых длинах волн возможно регистрировать сигнал только от цитохромов типа В и С, но не от цитохромов типа А (Kakita, Kaliaperumal, and Hamaguchi 2012). Мы обнаружили, что спектр ГКР митохондрий совпадает со спектром ГКР окисленного цитС (рисунок 2 (1-2)).

Следует заметить, что на спектрах ГКР митохондрий отсутствуют пики восстановленного цитС. Наиболее значительные изменения в спектрах ГКР при восстановлении цитохрома – это смещение пика 1371 см^{-1} в положение 1356 см^{-1} и значительное уменьшение интенсивности пика 1638 см^{-1} (рисунок 2 (5-6)). Также на спектре ГКР митохондрий отсутствует пик 1338 см^{-1} , характерный для цитВ, что свидетельствует об отсутствии вклада цитохромов В-типа в ГКР-спектр митохондрий.

Чтобы дополнительно установить происхождение пиков на спектре, мы регистрировали спектры ГКР от субмитохондриальных частиц (СМЧ), помещённых на СНС. СМЧ представляют собой везикулы из вывернутой внутренней мембраны митохондрий с комплексами ЭТЦ. Внутри везикул находится содержимое ММП митохондрий с цитС (Grivennikova, Kozlovsky, and Vinogradov 2017) (рисунок 3). На спектрах ГКР СМЧ присутствуют пики от окисленного цитохрома типа С, но, в отличие от спектра ГКР митохондрий, на спектре ГКР СМЧ также обнаружены пики цитохромов В-типа (1338 см^{-1}) и С-типа в восстановленной форме (1356 см^{-1}) (рисунок 2 (7)).

По различным теоретическим и экспериментальным оценкам максимальное расстояние от плазмонных поверхностей, на котором удастся получить усиление сигнала от молекул, составляет не более 10-15 нм (Ray et al. 2007; Wokaun et al. 1983; Moskovits 1978; Еремина и др. 2018).

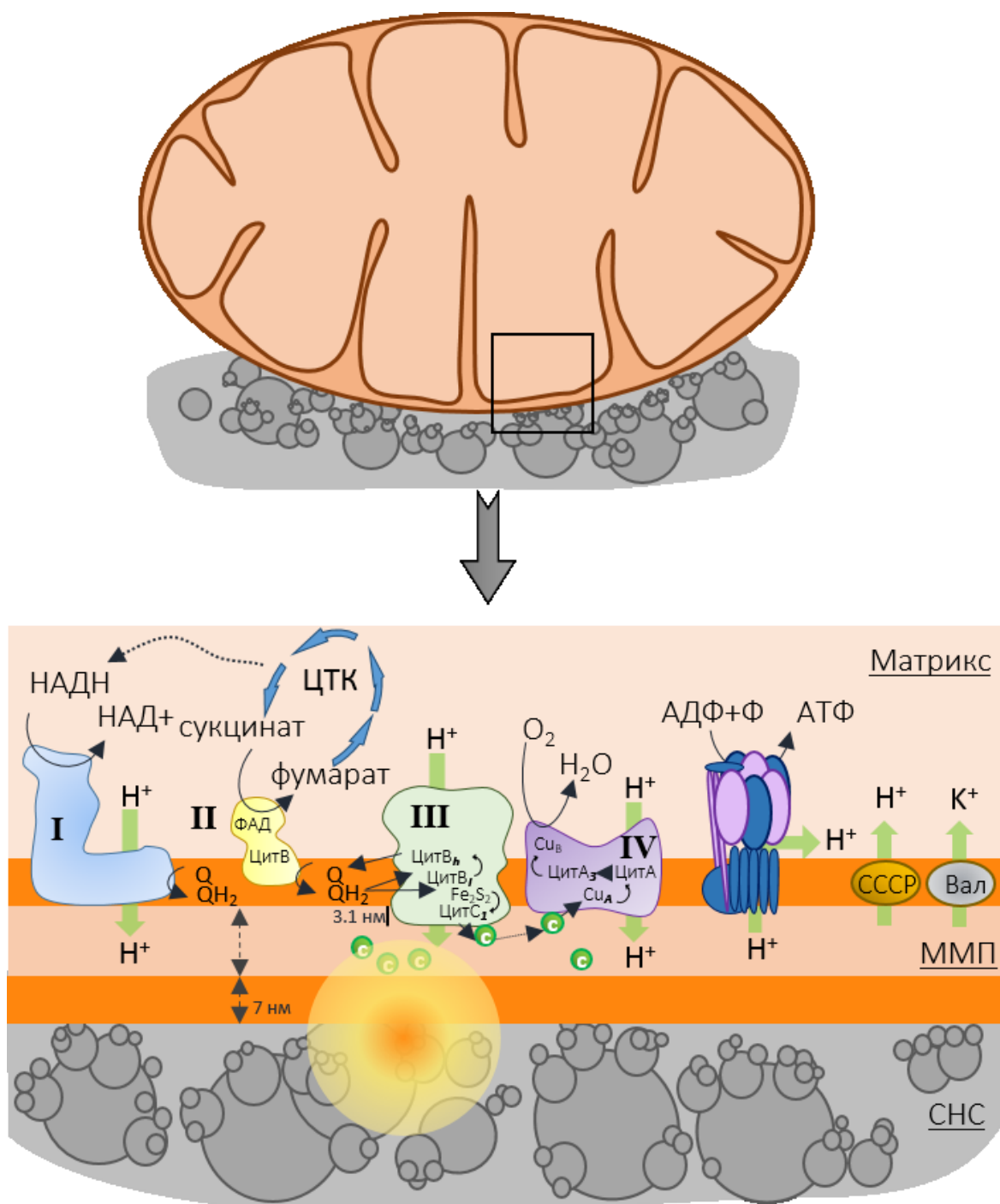


Рисунок 1. Сверху схематично показана митохондрия на поверхности серебряных наноструктур (СНС). Снизу изображена наружная мембрана митохондрий в контакте с СНС, межмембранное пространство (ММП) с диффундирующими молекулами цитС (зеленые кружки), внутренняя мембрана с комплексами ЭТЦ I-IV и АТФ-синтазой. Серые пунктирные стрелки показывают приблизительную ширину внешней мембраны и ММП, черные стрелки – перемещение электронов, зеленые – протонов H^+ через комплексы I, III и IV во время транспорта электронов. Два овала обозначают протонофор СССР и ионофор валиномицин (Вал), транспортирующие H^+ и K^+ из ММП в матрикс митохондрий, соответственно. В ходе цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) восстанавливается НАДН – донор электронов для комплекса I; сукцинат является донором электронов для комплекса II. Субстраты ЦТК (пируват, малат и сукцинат) и АДФ инициируют перенос электронов в ЭТЦ и синтез АТФ. Полупрозрачный желтый кружок показывает приблизительное расстояние от поверхности СНС, на котором наблюдается усиление ГКР.

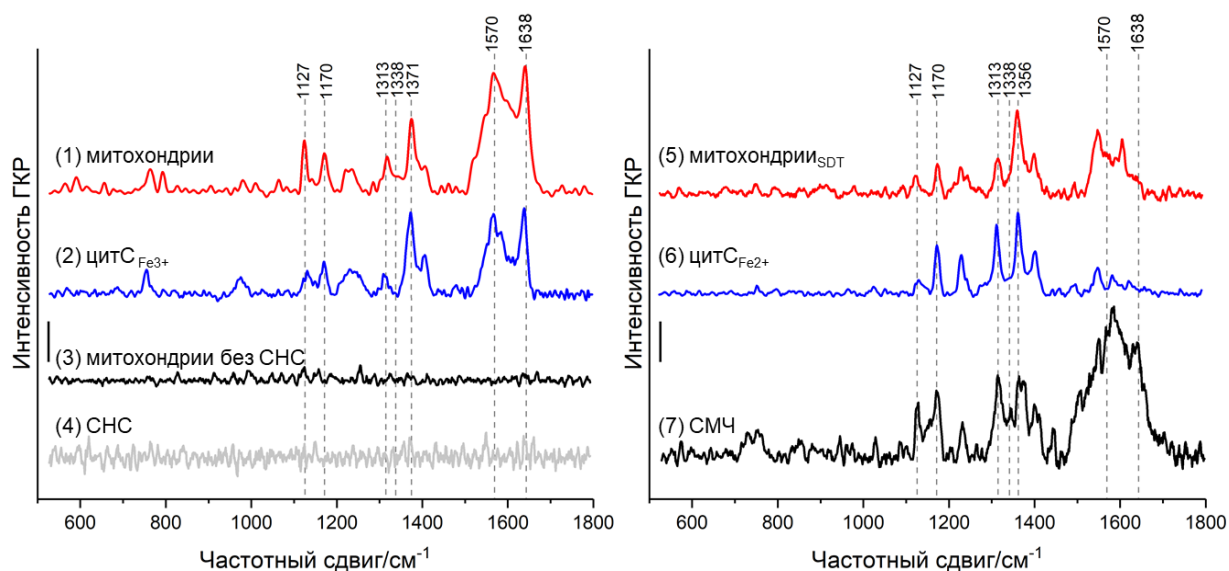


Рисунок 2. Спектры ГКР: (1) суспензии митохондрий при добавлении пирувата, малата, сукцината и АДФ, запускающих дыхательную цепь; (2) раствора очищенного окисленного цитохрома С (цитС_{Fe3+}, 1 мкМ); (3) суспензии митохондрий в отсутствие серебряных наноструктур (СНС); (4) СНС в буферном растворе; (5) суспензии митохондрий после химического восстановления всех переносчиков дитионитом натрия (SDT); (6) восстановленного дитионитом натрия цитС (цитС_{Fe2+}); (7) субмитохондриальных частиц (СМЧ) при активации электронного транспорта добавлением НАДН. Спектры 1-4 нормированы на интенсивность пика 1371 см⁻¹, спектры 5-7 нормированы на интенсивность пика 1356 см⁻¹. Шкала 0.5 отн.ед.

Мы предполагаем, что из-за пространственной организации ММП и внутренней мембраны митохондрий только окисленный цитС может оказываться на таком расстоянии от поверхности СНС. Остальные переносчики ЭТЦ, включая восстановленный цитС, цитС₁, цитВ, расположены на большем удалении от поверхности СНС, следовательно, сигнал ГКР от них не регистрируется. При этом, в СМЧ цитохромы типа В во II и III комплексе располагаются даже ближе к поверхности СНС, чем цитС, поэтому от них спектр ГКР регистрируется, так же как и от восстановленных цитС₁ и цитС в процессе переноса электрона. Таким образом, разработанный нами подход на основе ГКР позволяет высокочувствительно и селективно исследовать окисленный цитС внутри функционирующих митохондрий.

Функциональную активность изолированных митохондрий проверяли по скорости потребления кислорода с помощью платинового электрода Кларка (рисунок 4 (А)). Скорость потребления кислорода увеличивалась при внесении субстратов дыхания, АДФ и протонофора СССР – разобщителя электронного транспорта и синтеза АТФ, вызывающего диссипацию протонного градиента на внутренней мембране (Lanza and Nair 2009). Этот эксперимент доказывает интактность изолированных митохондрий.

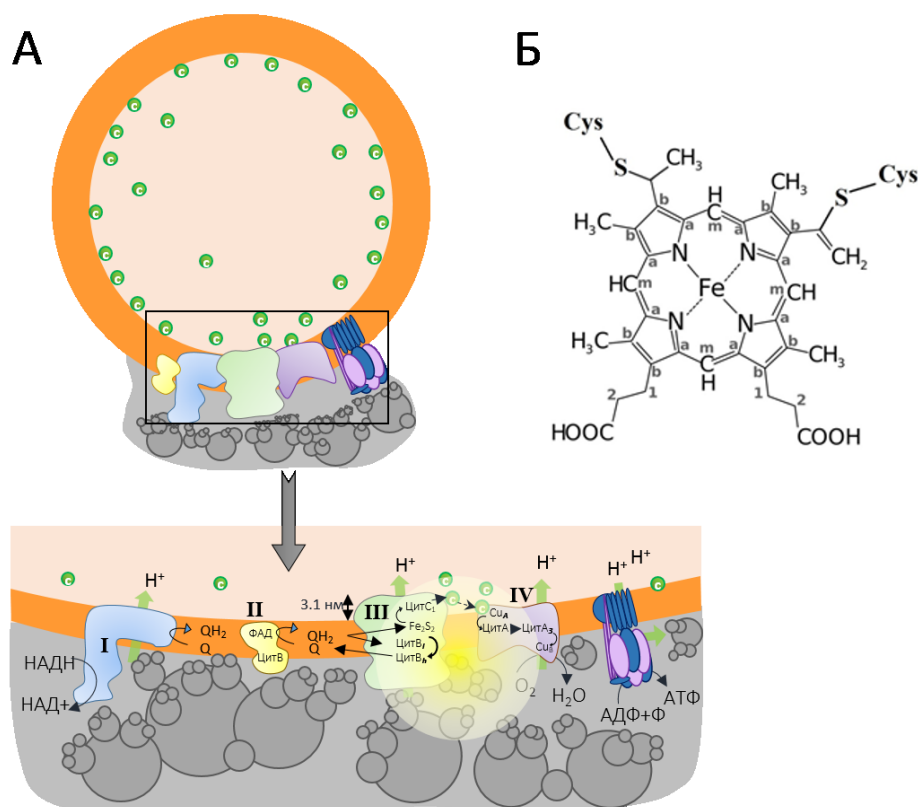


Рисунок 3. (А) Схематическое изображение субмитохондриальных частиц на серебряных наноструктурах (СНС). Обозначения аналогичны представленным на рисунке 1. (А) Гем типа С. Положения атомов углерода помечены буквами и цифрами (Б).

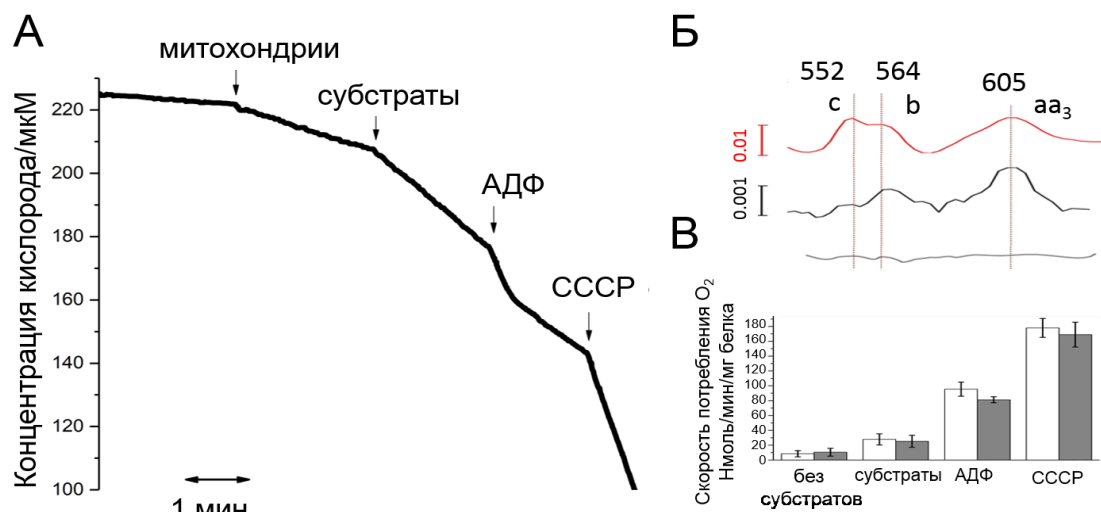


Рисунок 4. (А) Кривая потребления кислорода митохондриями при добавлении субстратов, АДФ и СССР. (Б) Дифференциальный спектр поглощения митохондрий. Красным цветом показан спектр митохондрий с добавлением дитионита натрия, черным цветом – спектр митохондрий после добавления субстратов и АДФ, серым цветом – спектр митохондрий без субстратов, из которых вычитали спектр митохондрий без субстратов. Шкалы показывают величину разностной оптической плотности, абс.ед., для каждого спектра. Положения основных максимумов (нм) показаны цифрами сверху. (В) Скорость потребления кислорода митохондриями без инкубации (белые столбики) и после инкубации с наноструктурами при освещении лазером (серые столбики) (нмоль кислорода/мг белка/мин). Показаны средние значения, разбросы – стандартная ошибка.

Методом дифференциальной спектrophотометрии было продемонстрировано, что добавление субстратов приводит к появлению восстановленных форм цитохромов, что также доказывает функциональную активность ЭТЦ (рисунок 4 (Б)). Мы также проверили, что скорость потребления кислорода одинакова для суспензии митохондрий, инкубированных на СНС при облучении лазером 532 нм (что имитирует эксперимент ГКР), и митохондрий без инкубации и облучения (рисунок 4 (В)), тем самым доказывая, что используемые СНС не оказывают влияние на функционирование митохондрий в условиях эксперимента ГКР. Была получена хорошая воспроизводимость спектров ГКР митохондрий с разных участков применяемых СНС (рисунок 5).

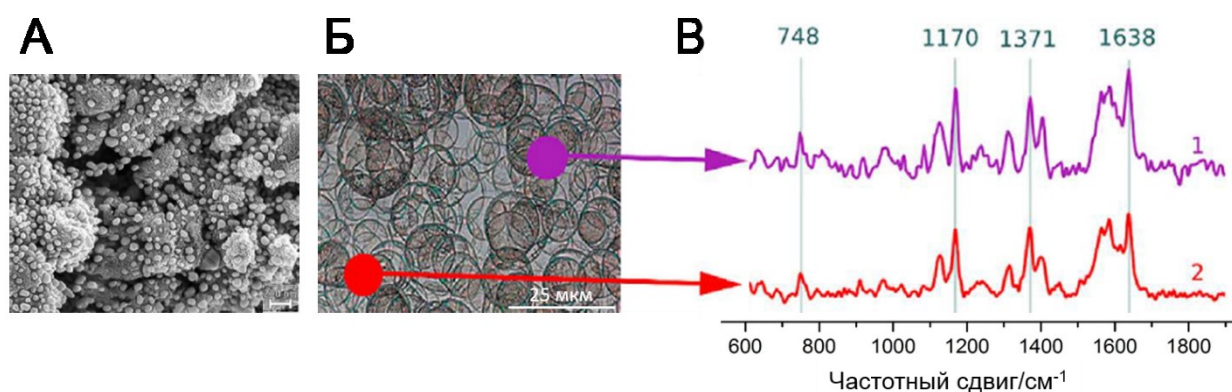


Рисунок 5. (А) Сканирующая электронная микрофотографии наноструктурированных поверхностей типа серебряных колец (шкала 200 нм). (Б) Оптическая фотография стекол с напылением наноструктур (шкала 25 мкм). (В) Спектры ГКР изолированных митохондрий, полученные с разных мест регистрации.

2. Конформационные изменения гема цитохрома С при модуляции активности электронного транспорта в изолированных митохондриях

Каждый пик на спектре ГКР митохондрий характеризует колебания определенных групп атомов в геме окисленного цитС. Так, пик 1638 см^{-1} характеризует колебания метиновых мостиков (C_aC_m , $\text{C}_a\text{C}_m\text{H}$, C_aC_b), пик 1371 см^{-1} – симметричные колебания пиррольных колец (C_aN , C_aC_b), пик 1170 см^{-1} – ассиметричные колебания пиррольных колец, пик 1127 см^{-1} – колебание боковых радикалов (C_bCH_3).

В зависимости от конформации гема выраженность разных колебаний меняется. Колебания метиновых мостиков наиболее вероятны при плоской конформации гема и затруднены при скрученной конформации. Колебания пиррольных колец не чувствительны к конформации гема, но значительно меняются при изменении степени окисления железа. Если окислительно-восстановительное состояние цитохрома не меняется, интенсивности этих пиков можно использовать для нормировки. Пик 1356 см^{-1} характерен только для восстановленного цитС. Отсутствие этого пика на спектрах ГКР митохондрий говорит о том, что спектр регистрируется только от окисленного цитС.

Таким образом, соотношение интенсивностей пиков I_{1638}/I_{1371} можно использовать как маркер конформационных изменений гема окисленного цитС. Чем оно выше, тем выше вероятность нахождения гема цитС в плоской конформации. При увеличении жесткости белкового микроокружения гема колебания боковых радикалов становятся затруднены, что позволяет использовать соотношение интенсивностей I_{1170}/I_{1127} в качестве показателя жесткости белкового микроокружения. Чем оно жестче, тем выше данное соотношение.

Для установления влияния активности ЭТЦ изолированных митохондрий на конформацию гема цитС мы регистрировали спектры ГКР митохондрий без субстратов; с добавлением субстратов дыхания (2 мМ пирувата, 2 мМ малата, 5 мМ сукцината и 0.1 мМ АДФ), а также под влиянием разобщения электронного транспорта и синтеза АТФ протонофором CCCP (0.5 мкМ) (рисунок 6 А).

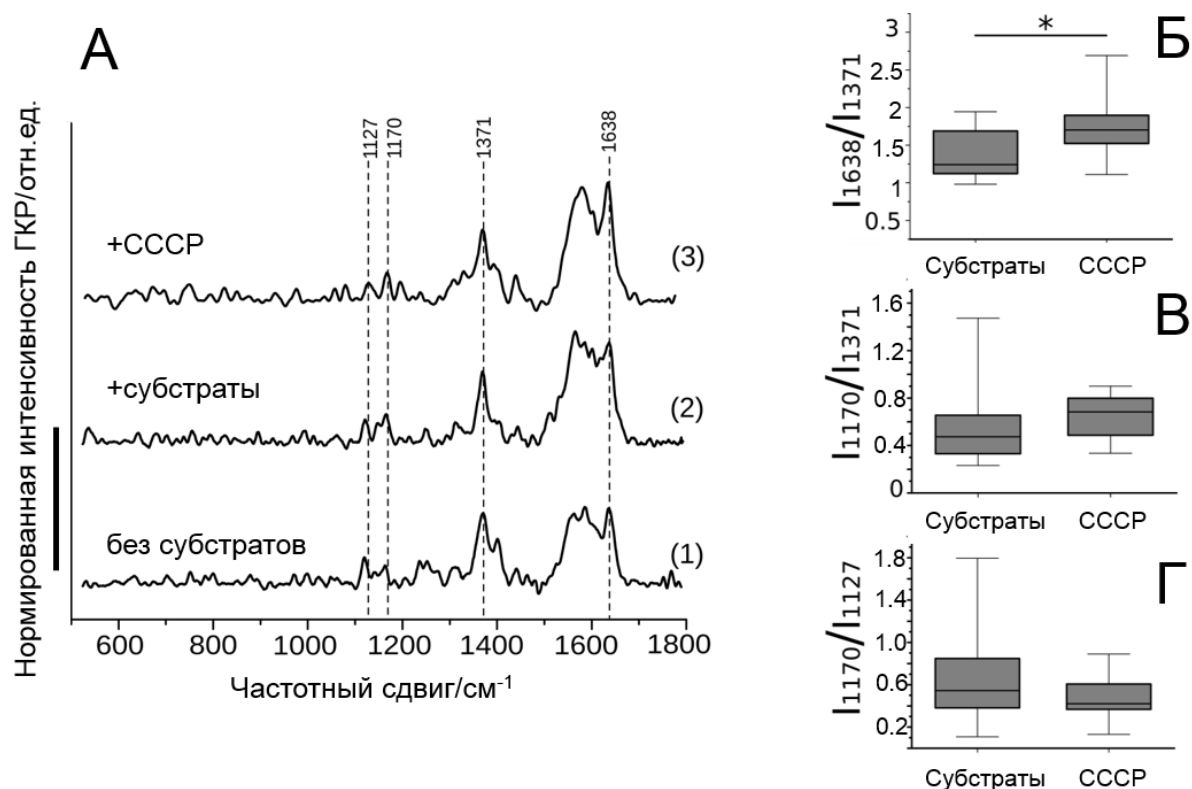


Рисунок 6. Спектры ГКР интактных митохондрий (А) без субстратов (1), при добавлении субстратов дыхания и АДФ (2) и при внесении протонофора CCCP ($5 \cdot 10^{-7}$ М) (3). Длина волны возбуждающего лазера 514 нм. Спектры нормированы на интенсивность пика с положением 1371 см^{-1} и сдвинуты друг относительно друга. Шкала 2 отн.ед. Соотношение интенсивностей пиков: I_{1638}/I_{1371} (Б), I_{1170}/I_{1371} (В), I_{1170}/I_{1127} (Г) представлены в виде диаграмм размаха, где нижняя граница – 25 перцентиль, верхняя граница – 75 перцентиль, горизонтальная черта – медиана, границы вертикальной черты – минимальное и максимальное значение. * $p < 0.05$ ($n = 7$).

При используемой концентрации CCCP происходит встраивание протонофора в мембрану с последующей диссипацией потенциала на внутренней мембране. В первые минуты это вызывает ускорение электронного транспорта в ЭТЦ. Мы показали, что

спектры ГКР митохондрий чувствительны к добавлению субстратов дыхания и АДФ и еще в большей степени протонофора СССР. Соотношение интенсивностей пиков I_{1638}/I_{1371} достоверно возрастает в ответ на ускорение электронного транспорта (рисунок 6 Б). Это говорит о том, что возрастает вероятность нахождения гема цитС в плоской конформации, что, как известно, способствует более эффективному переносу электронов в условиях активно работающей дыхательной цепи. При этом соотношения I_{1170}/I_{1371} и I_{1170}/I_{1127} не изменялись (рисунок 6 В,Г), что говорит о том, что жесткость белкового окружения также не изменилась.

Известно, что СССР приводит и к падению $\Delta\Psi$, и к уменьшению концентрации протонов в ММП. Чтобы проверить отдельно влияние рН в ММП на конформацию гема цитС, мы изменяли значение рН буферного раствора, в котором разводили суспензию митохондрий. При этом в ММП митохондрий устанавливалось такое же значение рН. Увеличение рН в физиологическом диапазоне приводит к тому, что вероятность плоской конформация гема цитС возрастает (рисунок 7 А). При этом, конформация гема изолированного белка в растворе не меняется в ответ на изменение рН даже в более широком диапазоне (рисунок 7 Б). Разница между чувствительностью цитС в растворе и в функционирующих митохондриях можно объяснить особенностью морфологии митохондрий.

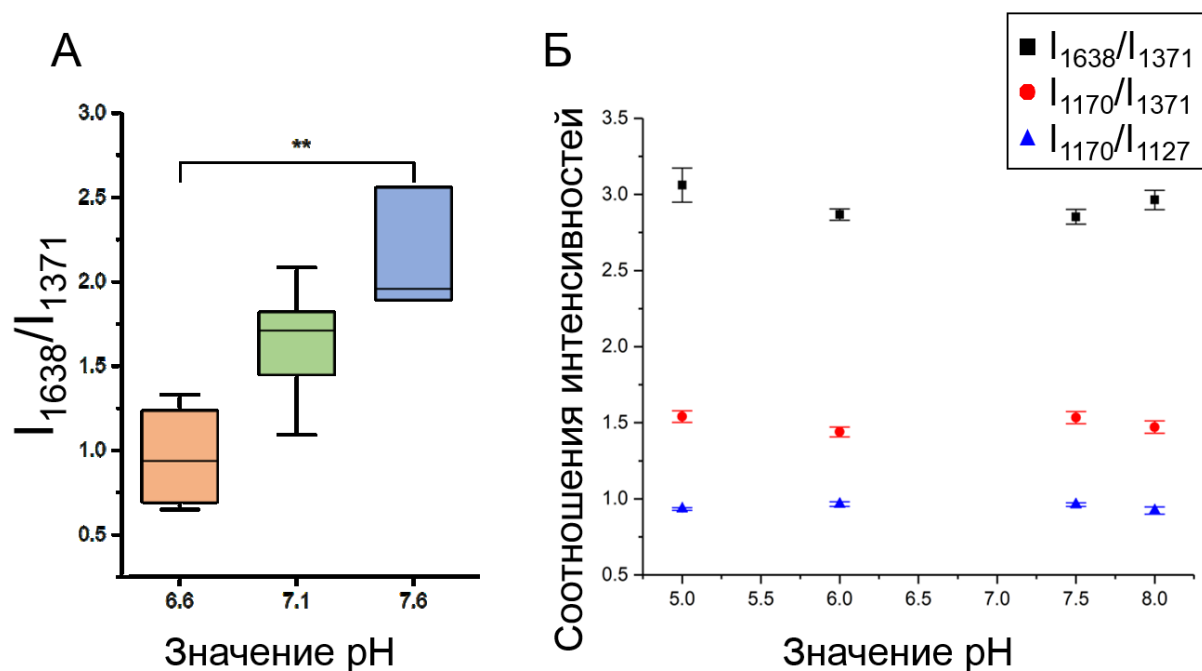


Рисунок 7. (А) Соотношение интенсивностей пиков I_{1638}/I_{1371} спектров ГКР изолированных митохондрий при разных значениях рН представлены в виде диаграмм размаха ($n \geq 3$). (Б) Соотношение интенсивностей пиков I_{1638}/I_{1371} (квадраты), I_{1170}/I_{1371} (кружки), I_{1170}/I_{1127} (треугольники) на спектрах ГКР раствора очищенного окисленного цитС (1 мкМ) при разных значениях рН ($n=6$) представлены в виде среднего значения, разбросы – ошибка среднего, $**p < 0.01$.

Так как величина ММП митохондрий всего в 2–3 раза больше диаметра белка цитС и при этом постоянно изменяется, цитС функционирует в условиях молекулярного краудинга. В этом случае локальные изменения электромагнитных полей, концентрации ионов, распределение зарядов на окружающих молекулах могут играть большую роль, чем в растворе изолированного цитС.

Для проверки чувствительности конформации гема цитС к изменению электрической компоненты потенциала к суспензии митохондрий добавляли переносчик ионов калия – валиномицин (10^{-7} М). В функционирующих митохондриях валиномицин переносит ионы калия из ММП в матрикс, что вызывает значительную деполяризацию мембраны (снижению $\Delta\Psi$) (Morota, Piel, and Hansson 2013). Мы обнаружили, что при добавлении валиномицина к работающим митохондриям вероятность плоской конформации гема цитС увеличивалась, что наблюдали по увеличению соотношения I_{1638}/I_{1371} (рисунок 8 Б, слева). На окислительно-восстановительное состояние и жесткость белкового окружения это не влияло, что видно по отсутствию изменений соотношений I_{1170}/I_{1371} и I_{1170}/I_{1127} (рисунок 8 В, Г, слева). В неработающих митохондриях в отсутствие субстратов, при низкой величине разности потенциалов на внутренней мембране, валиномицин не приводил к изменениям в спектре ГКР (рисунок 8 Б-Г, справа).

В целом, разобщение электронного транспорта и синтеза АТФ при действии СССР или валиномицина приводит к падению величины $\Delta\Psi$. Чтобы исследовать эффект увеличения $\Delta\Psi$, мы ингибировали АТФ-синтазу олигомицином, что приводит к гиперполяризации внутренней мембраны митохондрий. Известно, что в этих условиях существует опасность развития окислительного стресса (Votyakova and Reynolds 2008). Оказалось, что при увеличении $\Delta\Psi$ вероятность нахождения гема цитС в плоской конформации снижается (рисунок 9) и, следовательно, преобладают молекулы цитС в скрученной конформации. При этом, перенос электронов цитС затрудняется, что способствует снижению величины $\Delta\Psi$ и, как следствие, уровня генерации $O_2^{\cdot-}$. Само появление гема цитС в скрученной конформации может служить защитным механизмом против развития окислительного стресса в условиях гиперполяризации внутренней мембраны митохондрий.

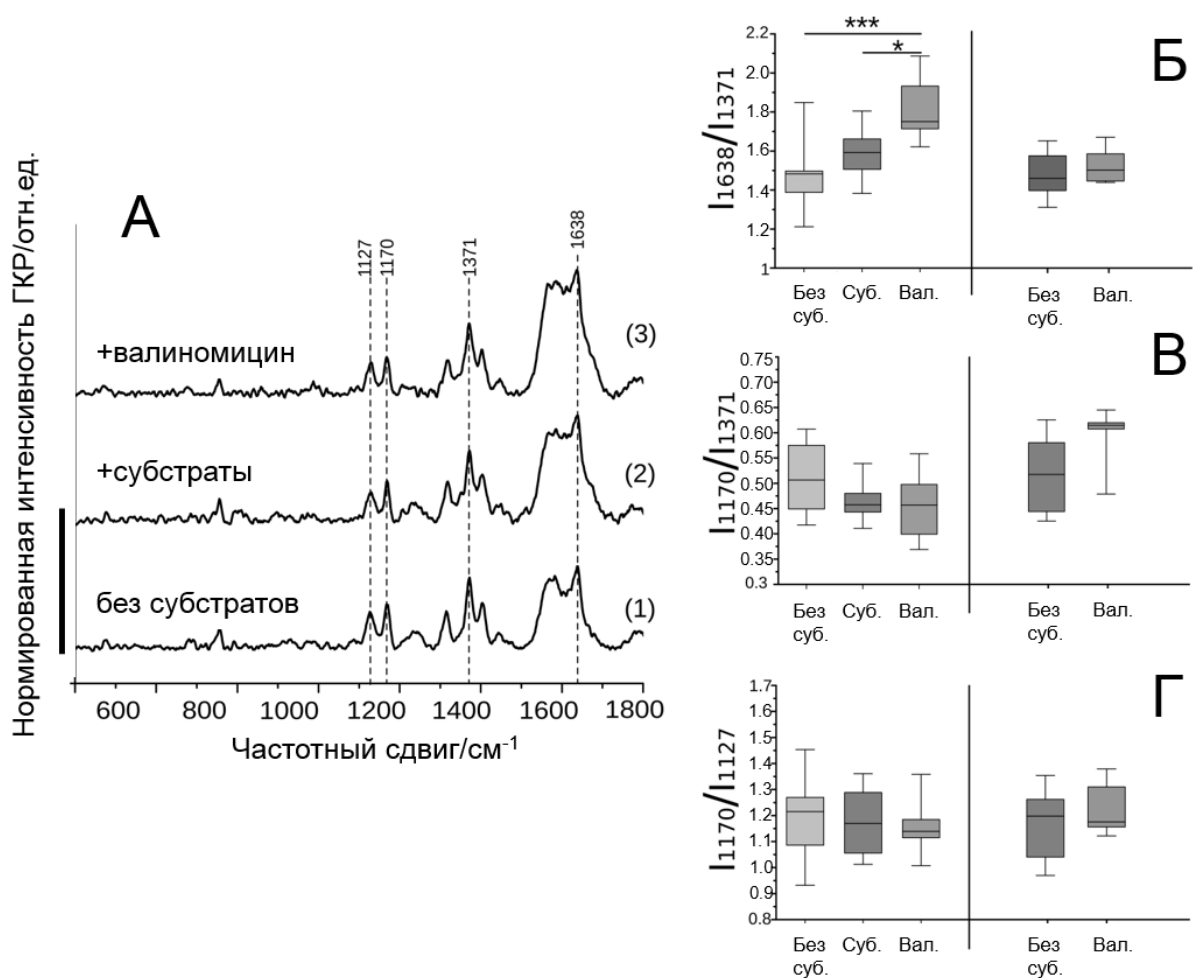


Рисунок 8. Спектры ГКР интактных митохондрий (А) без субстратов (Без суб.) (1), при добавлении субстратов дыхания и АДФ (Суб.) (2) и при внесении ионофора валиномицина (Вал.) (10^{-7} М) (3). Длина волны возбуждающего лазера 532 нм. Спектры нормированы на интенсивность пика с положением 1371 см^{-1} и сдвинуты друг относительно друга. Шкала 2 отн.ед. (Б–Г) Соотношение интенсивностей пиков: I_{1638}/I_{1371} (Б), I_{1170}/I_{1371} (В), I_{1170}/I_{1127} (Г) представлены в виде диаграмм размаха, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ($n \geq 6$).

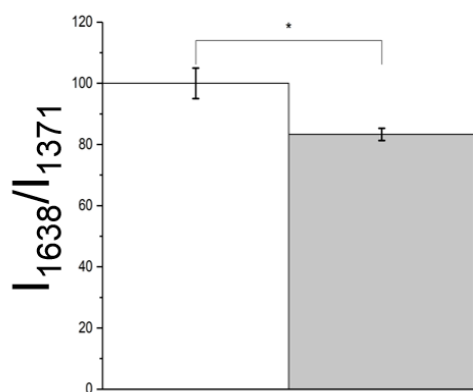


Рисунок 9. Соотношение I_{1638}/I_{1371} на спектрах ГКР митохондрий с добавлением субстратов и АДФ (белый столбик) и при добавлении олигомицина (серый столбик) представлены в виде среднего значения, разбросы – ошибка среднего. За 100% взято значение I_{1638}/I_{1371} на спектрах ГКР митохондрий до внесения олигомицина. * $p < 0.05$ ($n=6$).

Для более детального исследования митохондрий при разных воздействиях (субстраты, АДФ, СССР, валиномицин, олигомицин) мы регистрировали флуоресценцию потенциал-чувствительного зонда MitoTrackerCMXRos, интенсивность

флуоресценции которого обратно пропорциональна величине $\Delta\Psi$. Оказалось, что соотношение I_{1638}/I_{1371} возрастает при снижении $\Delta\Psi$ (рисунок 10 А). Иными словами, при деполяризации мембраны вероятность плоской конформации гема цитС возрастает, а при гиперполяризации мембраны, наоборот, – снижается.

Соотношение I_{1638}/I_{1371} положительно коррелирует со скоростью потребления кислорода митохондриями (рисунок 10 Б). Таким образом, при большей скорости потребления кислорода митохондриями (активности ЭТЦ) преобладает плоская конформация гема цитС, а при сниженной активности ЭТЦ – наоборот, скрученная.

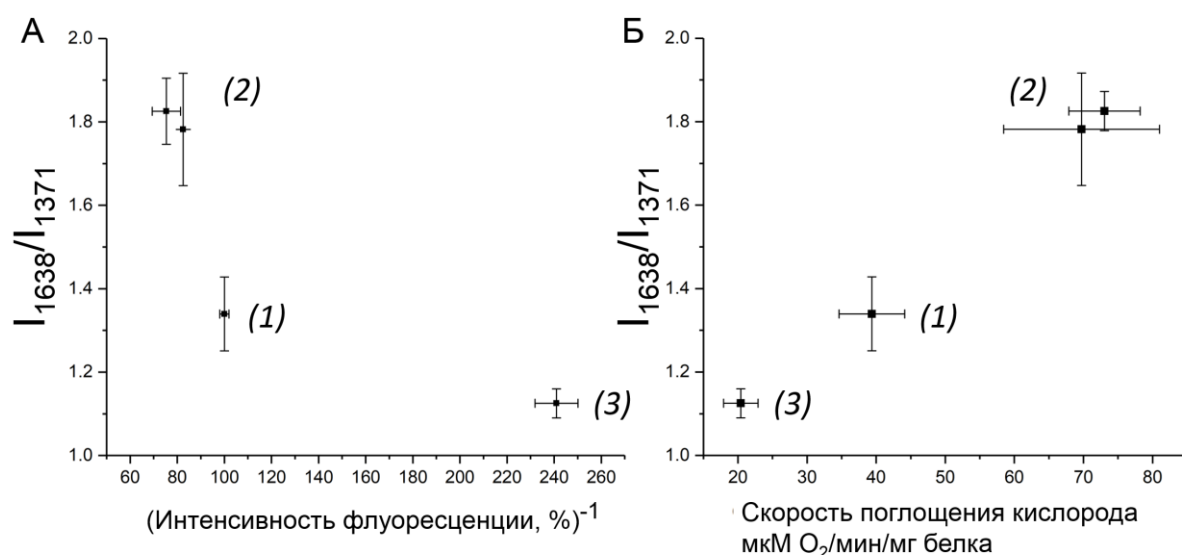


Рисунок 10. Сопоставление соотношения I_{1638}/I_{1371} на спектрах ГКР изолированных митохондрий и (А) обратной интенсивности флуоресценции потенциал-чувствительного зонда MitoTrackerCMXRos, которая прямо пропорциональна величине $\Delta\Psi$; (Б) дыхательной активности. Данные представлены в виде среднего значения, вертикальные и горизонтальные разбросы – ошибка среднего. (1) – митохондрии при добавлении субстратов и АДФ, (2) – при добавлении СССР или валиномицина, (3) – при добавлении олигомицина.

3. Изучение изменений конформации гема цитохрома С в липосомах в ответ на изменения мембранного потенциала

Изменение потенциала на внутренней мембране митохондрий влечет за собой множество изменений, в том числе изменение значения рН в ММП, концентрации связанного кальция, распределения зарядов и т.д. Чтобы проверить наличие конформационных изменений в геме цитС только при изменении электрического потенциала ($\Delta\Psi$) на мембране, мы использовали модельную систему – липосомы с мембрансвязанным цитС внутри. Для этого готовили липосомы из фосфатидилхолина и кардиолипина в соотношении 1:4 по массе. Внутри липосом содержался цитС в буфере 50 мМ Трис*Cl рН 7.5 в отсутствие калия. Липосомы отмывали от внешнего цитС на

хроматографической колонке в том же буфере рН 7.5 с добавлением 150 мМ КСl и в этом же растворе разводили суспензию липосом для измерений ГКР. Добавление валиномицина к таким липосомам вызывало изменение разности потенциалов на мембране.

Обнаружено, что при этом соотношение I_{1638}/I_{1371} увеличивалось (рисунок 12 А), что означает появление цитС с плоской конформацией гема. Эти данные соответствуют результатам, полученным на изолированных митохондриях при деполяризации мембраны. При этом изолированный цитС в растворе не чувствителен к изменению концентрации калия и ионной силы (рисунок 12 Б).

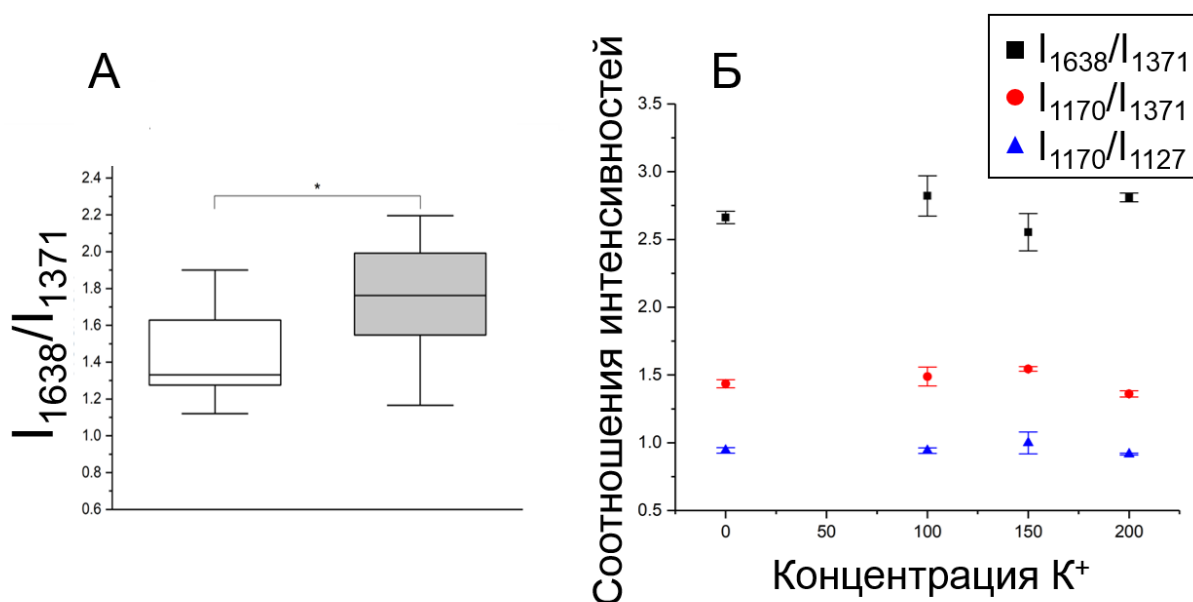


Рисунок 11. (А) Соотношение интенсивностей пиков I_{1638}/I_{1371} на спектрах ГКР липосом с цитС внутри до (белый столбик) и после (серый столбик) добавления валиномицина представлены в виде диаграмм размаха (n=12). (Б) Соотношение интенсивностей пиков I_{1638}/I_{1371} (квадраты), I_{1170}/I_{1371} (кружки), I_{1170}/I_{1127} (треугольники) на спектрах ГКР раствора очищенного окисленного цитС (1 мкМ) в буфере с разным содержанием хлорида калия (0-200 мМ) представлены в виде среднего значения (n=6), разбросы – ошибка среднего, * $p < 0.05$.

4. Исследование окислительно-восстановительного состояния и конформации гемов цитохромов в живых клетках

Для изолированного цитС показано, что интенсивность пика 567 см^{-1} коррелирует со скрученной конформацией гема цитС (Sun et al. 2014). Пик 601 см^{-1} селективен для восстановленного цитС в митохондриях клеток (Kakita, Kaliaperumal, and Hamaguchi 2012). Мы использовали соотношение интенсивностей пиков I_{567}/I_{601} на спектре резонансного КР живых клеток для определения степени скрученности гема цитС *in vivo*. Мы исследовали культуру клеток НСТ116 с мутацией в гене сборки IV комплекса ЭТЦ $SCO2^{-/-}$, из-за чего комплекс IV не функционировал, а АТФ синтезировался

преимущественно посредством гликолиза. Потенциал на внутренней мембране митохондрий данных клеток поддерживался на низком уровне, согласно исследованиям (Antonická et al. 1999; Matoba 2006; Pecina et al. 2003).

Мы обнаружили, что соотношение I_{567}/I_{601} в мутантных клетках ниже, чем в контрольных (рисунок 12). Это говорит о том, что конформация гема цитС в мутантных клетках менее скручена, чем в контрольных, то есть в мутантных клетках выше эффективность переноса электрона на уровне цитС. Это согласуется с данными, полученными на изолированных митохондриях в условиях снижения $\Delta\Psi$.

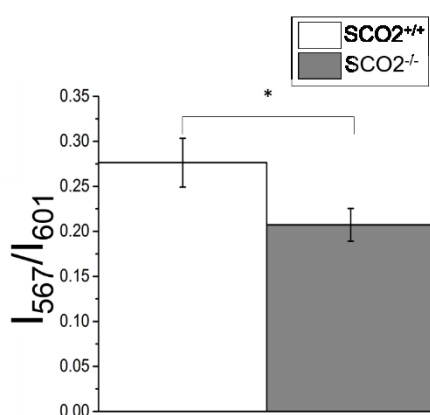


Рисунок 12. Соотношение интенсивностей пиков I_{567}/I_{601} на спектрах КР контрольных клеток SCO2^{+/+} (белый столбик) и мутантных SCO2^{-/-} (серый столбик) представлены в виде среднего значения, разбросы – ошибка среднего, * $p < 0.05$ (n=18).

5. Исследование окислительно-восстановительного состояния цитохромов в клетках при увеличении содержания липидов

Окислительно-восстановительное состояние цитохромов можно оценивать в живых и фиксированных клетках одновременно с липидным составом (липидомом). Мы регистрировали спектры КР скелетных миоцитов четырёхглавой мышцы здорового донора и пациента, страдающего морбидным ожирением, до и после операции по наложению обходного желудочного анастомоза (рисунок 13). Наиболее интенсивные пики на спектре характеризуют жирные кислоты (ЖК) липидов. Пики в области 748-758, 1210-1230 и 1515-1519 cm^{-1} являются гемовыми, при этом гем типа В содержится как в цитВ митохондрий, так и в миоглобине мышечных клеток. Пик 645 cm^{-1} характерен для Fe-S колебаний железо-серных кластеров.

Мы установили, что в митохондриях пациента до и после операции снижено относительное содержание окисленных цитохромов В-типа по сравнению с контролем при неизменном общем количестве цитВ (Рисунок 14 А-Б). При этом не изменялось окислительно-восстановительное состояние и общее количество цитС и C₁ (Рисунок 14 Г-Д), что говорит о сходном содержании ЭТЦ в митохондриях клеток пациента и здорового донора.

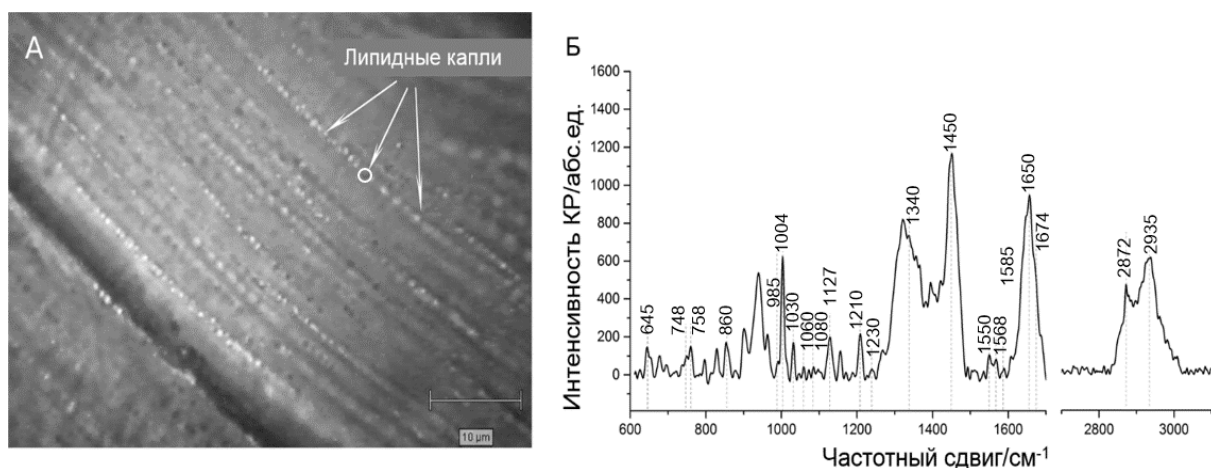


Рисунок 13. (А) Оптическая фотография миоцита пациента, страдающего ожирением, со множеством липидных капель $\times 630$. Кругом показана область регистрации спектра КР при возбуждении лазером 785 нм. (Б) Типичный спектр КР миоцита в районе липидной капли. Положения ключевых пиков показано цифрами.

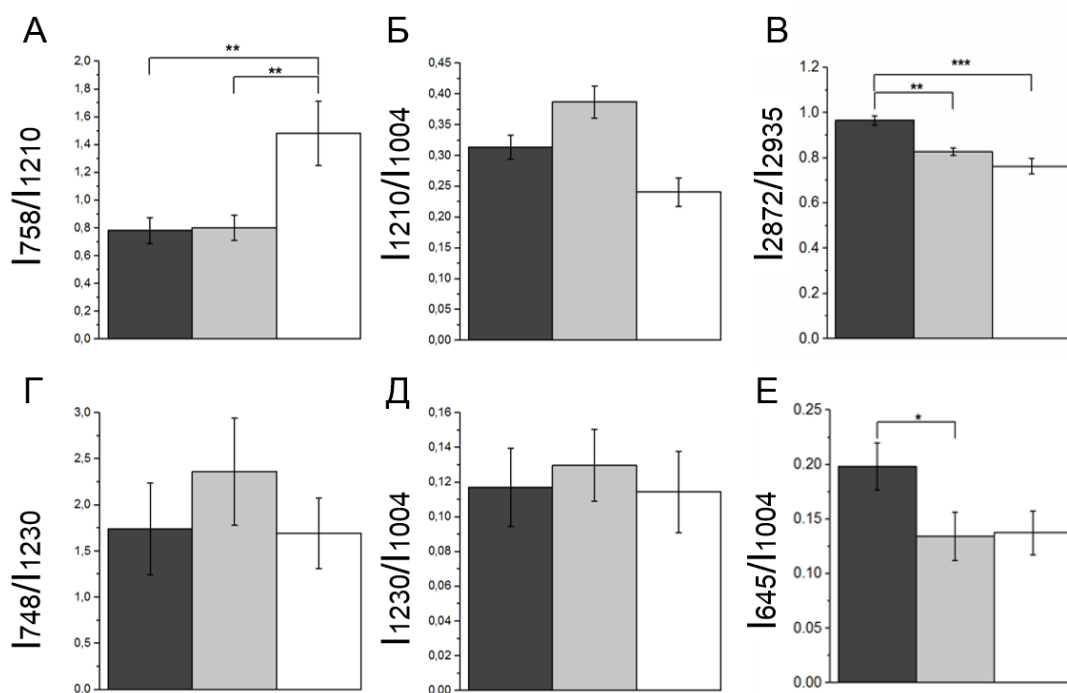


Рисунок 14. Соотношения интенсивностей пиков КР миоцитов здорового донора (белые столбцы) и пациента, страдающего ожирением, до операции (черные столбцы) и после операции (серые столбцы). (А) Относительное количество окисленных гемов В по отношению к общему количеству гемов В; (Б) относительное количество всех гемов В по отношению к общему содержанию белка; (В) относительное содержание холестерина по отношению к общему содержанию липидов; (Г) относительное количество окисленных гемов С по отношению общему количеству цитС; (Д) относительное количество цитохромов С-типа по отношению к общему содержанию белка; (Е) количество железо-серных кластеров, нормированное на общее содержание белка. Столбики показывают средние значения, разбросы – ошибка среднего, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ($n = 17$).

Мы предполагаем, что повышенное количество восстановленных цитохромов В-типа свидетельствует о перегруженности ЭТЦ электронами из-за избытка НАДН,

ФАДН₂ и перевосстановленного пула хинонов в результате смещения метаболизма в сторону окисления ЖК. Это может приводить к повышенной генерации активных форм кислорода (АФК), в первую очередь O₂⁻, на комплексе III и I, что коррелирует с литературными данными об увеличении окислительного стресса в миоцитах при высококалорийной диете и ожирении (Anderson et al. 2009). Окислительный стресс, в свою очередь, может приводить к развитию инсулиновой резистентности (Hahn et al. 2014). Также в липидных каплях миоцитов пациента обнаружено увеличенное содержание холестерина и количества [Fe-S]-кластеров (Рисунок 14 В,Е, соответственно), которое наиболее вероятно происходит за счет увеличения количества комплекса I ЭТЦ митохондрий. Предположительно, мы наблюдаем компенсаторный эффект, связанный с возобновлением разрушенных комплексов ЭТЦ в результате окислительного стресса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как известно, в зависимости от метаболического состояния и потребности в АТФ в нормально функционирующих клетках осуществляется регуляция активности ЭТЦ, что связано с изменением величины потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi$). На препаратах очищенного цитС, адсорбированного на электроде, показано, что конформация гема меняется в зависимости от величины электрического поля (Wackerbarth and Hildebrandt 2003). В работе мы предполагаем, что физиологические значения электрических полей в ММП митохондрий также могут вызывать конформационные переходы гема *in vivo*. Известно, что эффективность электронного транспорта зависит от конформации гема цитС. На препаратах очищенных мутантных цитС и цитС из разных организмов показано, что плоская конформация гема цитС способствует эффективному переносу электрона между цитС и комплексами III и IV, тогда как скрученная конформация затрудняет его (Sun et al. 2014; Chertkova et al. 2017).

Мы предполагаем, что конформация гема цитС может меняться в нормально функционирующих митохондриях в зависимости от активности ЭТЦ и величины $\Delta\Psi$. Для проверки нашей гипотезы мы разработали методичку, основанную на спектроскопии ГКР с использованием плазмонных наноструктур для селективного усиления сигнала КР от окисленного цитС в нормально функционирующих изолированных митохондриях. Ранее в работе, выполненной на нашей кафедре, было продемонстрировано, что соотношение интенсивностей пиков I₁₆₃₈/I₁₃₇₁ на спектре ГКР очищенного цитС, характеризующее вероятность колебаний метиновых мостиков по отношению к колебаниям пиррольных колец в геме окисленного цитС, выше для гема в плоской конформации и ниже для гема в скрученной конформации (Chertkova et al.

2017). Таким образом, в нашей работе соотношение I_{1638}/I_{1371} является спектральным маркером плоской конформации гема. Данный параметр мы использовали для оценки вероятности нахождения гема цитС в плоской конформации в функционирующих митохондриях при модуляции активности электронного транспорта. Мы провели параллельное измерение дыхательной активности митохондрий и величины $\Delta\Psi$ в присутствии субстратов, АДФ, разобщителей электронного транспорта и синтеза АТФ (СССР или валиномицина) и ингибитора АТФ-синтазы (олигомицина).

В различных условиях мы наблюдали переходы между разными состояниями ЭТЦ (рисунок 15). Состояние (1) на рисунке соответствует нормально функционирующим митохондриям при избытке субстратов и АДФ, что соответствует нормальному функционированию клеток.

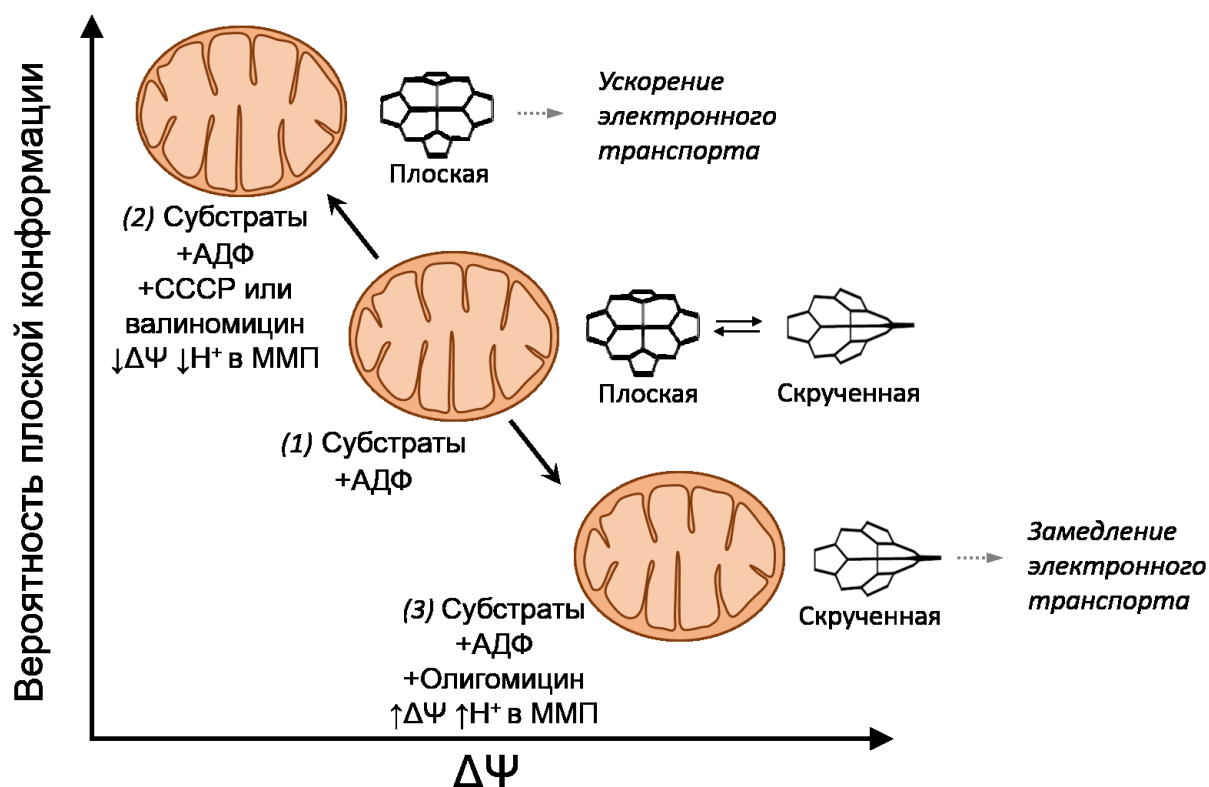


Рисунок 15. Предположительная регуляция электрон-транспортной функции цитС на основе результатов нашей работы. Экспериментальные условия: (1) в изолированных митохондриях с функционирующей ЭТЦ (при добавлении субстратов дыхания и АДФ) существует равновесие между плоской и скрученной конформацией гема цитС; (2) при значительном снижении $\Delta\Psi$ конформация гема цитС становится более плоской, что способствует более эффективному транспорту электронов; (3) при значительном увеличении $\Delta\Psi$, наоборот, вероятность нахождения гема цитС в плоской конформации снижается, что замедляет электронный транспорт в ЭТЦ. По оси абсцисс отложена величина $\Delta\Psi$ — потенциала на внутренней мембране митохондрий (который оценивали по флуоресценции потенциал-чувствительного зонда). По оси ординат — вероятность плоской конформации гема цитС (которую оценивали по соотношению I_{1638}/I_{1371} на спектрах ГКР изолированных митохондрий). ММП — межмембранное пространство.

Состояние (2) (рисунок 15) достигается добавлением СССР ($5 \cdot 10^{-7}$ М) или валиномицина (10^{-7} М), вызывающих значительное снижение $\Delta\Psi$ и концентрации H^+ в ММП, к митохондриям в состоянии (1). Мы обнаружили, что в этом состоянии (2) возрастает вероятность нахождения гема цитС в плоской конформации, что, как известно, способствует более эффективному электронному транспорту. В клетках состояние (2) может наблюдаться при повышенной клеточной активности и работе АТФ-синтазы. Очевидно, в этом состоянии необходимо поддерживать высокую скорость электронного транспорта в ЭТЦ.

Для создания состояния (3) (рисунок 15) мы ингибировали АТФ-синтазу олигомицином (10^{-5} М) в нормально функционирующих митохондриях, что приводило к увеличению $\Delta\Psi$ и накоплению H^+ в ММП. Мы обнаружили, что в состоянии (3) снижается вероятность нахождения гема цитС в плоской конформации, что затрудняет перенос электрона. Клетки могут находиться в состоянии (3) при пониженной клеточной активности, избыточном накоплении субстратов или гипоксии. Как известно, при высоких значениях $\Delta\Psi$ и избыточном накоплении восстановленных переносчиков в ЭТЦ увеличивается генерация АФК, что вызывает развитие окислительного стресса. Следовательно, в состоянии (3) необходимо снизить электронный транспорт в ЭТЦ, чему и способствует увеличение вероятности скрученной конформации гема цитС.

Таким образом, зависимость конформации гема цитС от величины $\Delta\Psi$ и активности ЭТЦ может быть одним из механизмов регуляции скорости электронного транспорта в митохондриях клеток.

ВЫВОДЫ

1. Разработан методический подход, основанный на спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) с серебряными наноструктурами, для селективного и высокочувствительного усиления КР от гема окисленного цитохрома С. Введен спектральный маркер (соотношение I_{1638}/I_{1371}), который используется в качестве показателя вероятности плоской конформации гема;
2. Мы разработали подход для параллельного исследования окислительно-восстановительного состояния цитохромов С и В-типов митохондрий и липидного состава липидных капель в миоцитах на основе спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и показали, что при нарушениях метаболизма и накоплении в клетках липидных капель увеличивается относительное количество восстановленных цитохромов В-типа в ЭТЦ митохондрий, что может приводить к увеличению генерации супероксид-анион радикала O_2^- и окислительному стрессу;

3. При воздействиях, приводящих к деполяризации внутренней митохондриальной мембраны (снижению $\Delta\Psi$) функционирующих митохондрий, а именно: при добавлении CCCP ($0.5 \cdot 10^{-6}$ М) или валиномицина ($0.1 \cdot 10^{-6}$ М), наблюдается преобладание плоской конформации гема цитохрома С. И наоборот, при гиперполяризации мембраны (увеличении $\Delta\Psi$), что достигается ингибированием АТФ-синтазы олигомицином (10^{-5} М), возрастает вероятность скрученной конформации гема цитохрома С;
4. При добавлении валиномицина к липосомам, на мембране которых имеется градиент по калию, возрастает вероятность плоской конформации гема цитохрома С, связанного на внутренней поверхности мембраны липосом;
5. Увеличение вероятности плоской конформации гема цитохрома С в ответ на снижение $\Delta\Psi$ и увеличение рН в межмембранном пространстве митохондрий способствует достижению его оптимальной ориентации относительно гема цитохрома С₁ в комплексе III и активирует перенос электрона между комплексом III и цитохромом С. Аналогичный эффект был показан для цитохрома С в клетках с нефункционирующим комплексом IV и деполяризованной внутренней мембраной. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны, напротив, приводит к уменьшению вероятности плоской конформации гема, что может затруднять его ориентирование относительно гема цитохрома С₁ и замедлять перенос электрона;
6. Суммируя, мы показали, что изменения конформации гема цитохрома С могут играть роль в регуляции активности электронного транспорта в митохондриях, обеспечивая оптимальное количество синтезируемого АТФ и препятствуя образованию избытка O_2^- .

Основные публикации Никельшпарг Эвелины Ильиничны по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.02 - биофизика

1. Monitoring of blood oxygenation in brain by resonance Raman spectroscopy (2018) Brazhe Nadezda A., Kirsten Thomsen, Micael Lønstrup, Brazhe Alexey R., Nikelshparg Evelina I., Maksimov Georgy V., Olga Sosnovtseva, Martin Lauritzen. *Journal of Biophotonics*. Vol. 11. Article number: e201700311. **IF 3,694.**
2. Raman probing of lipids, proteins, and mitochondria in skeletal myocytes: a case study on obesity (2017) Brazhe Nadezda A., Nikelshparg Evelina I., Clara Prats, Flemming Dela,

- Olga Sosnovtseva. *Journal of Raman Spectroscopy* Vol. 48(9). P. 1158-1165. **IF 2,353.**
3. SERS — изучение цитохрома С в живых митохондриях (2016) Никельшпарг Э.И. *Природа* № 3, с. 17-25. IF RINC 0,231.
 4. New nanocomposites for SERS studies of living cells and mitochondria (2016) Sarycheva Asia S., Brazhe Nadezda A., Baizhumanov Adil A., Nikelshparg Evelina I., Semenova Anna A., Garshev Alexey V., Baranchikov Alexander E., Ivanov Vladimir K., Maksimov Georgy V., Sosnovtseva Olga V., Goodilin Eugene A. *Journal of Materials Chemistry B* Vol. 3(4) P. 539-546. **IF 4,959.**
 5. Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy (2015) Brazhe Nadezda A., Evlyukhin Andrey B., Goodilin Eugene A., Semenova Anna A., Novikov Sergey M., Bozhevolnyi Sergey I., Chichkov Boris N., Sarycheva Asya S., Baizhumanov Adil A., Nikelshparg Evelina I., Deev Leonid I., Maksimov Eugene G., Maksimov Georgy V., Olga Sosnovtseva. *Scientific reports* Vol. 5. Article number: srep13793. **IF 4,609.**

Основные тезисы докладов по теме диссертации

1. Resonance Raman spectroscopy to investigate changes in cytochromes under inflammation and metabolic disorders (2018) Nikelshparg E.I., Glukhanuk E., Davies L., Sosnovtseva O., Brazhe N.A. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, P. 75-76.
2. Surface-enhanced Raman spectroscopy as a new tool to study peculiarities of mitochondria bioenergetics (2018) Nikelshparg E., Brazhe N., Baizhumanov A., Deev L., Semenova A.A., Sarycheva A., Goodilin E., Sosnovtseva O., Maksimov G. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, Vol. 1859, P. e.117.
3. Development of sensitive SERS-based approaches to study redox state of cytochrome C (2017) Nikelshparg E.I., Brazhe N.A., Bayzhumanov A.A., Goodilin E.A., Semenova A., Sarycheva A.S., Deev L.I., Sosnovtseva O., Maksimov G.V. *FEBS Journal*, Vol. 284, № Supplement 1, P. 229-230.
4. SERS-based study of cytochrome c properties in heart mitochondria from health and diseased animals (2017) Nikelshparg E.I., Brazhe N.A., Bayzhumanov A.A., Deev L.I., Goodilin E.A., Semenova A.A., Sarycheva A.S., Sosnovtseva O., Maksimov G.V. *European Biophysics Journal*, Vol. 46, № Supp. 1, P. S270.
5. SERS studies of cytochromes inside functional mitochondria using different silver nanostructures (2017) Nikelshparg E.I., Brazhe N.A., Bayzhumanov A.A., Deev L.I., Goodilin E.A., Semenova A.A., Sarycheva A.S., Sosnovtseva O., Maksimov G.V. *Book of Abstracts of Surface Enhanced Raman Scattering - SERS: Faraday Discussions*, P. 49.