

## Возможные механизмы мембранного транспорта белков: перенос цитохрома С через митохондриальные мембраны и его роль в механизме криообновления

В.И.Грищенко, Э.И. АЛЕКСЕЕВСКАЯ

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Possible Mechanisms of Membrane Transport of Proteins: Cytochrome C Transfer Through Mitochondrial Membranes and Its Role in Cryorenewal Mechanism

V.I. GRISCHENKO, E.I. ALEKSEYEVSKAYA

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

Кратко освещается положение, согласно которому системы переноса цитохромов состоят, по крайней мере, из двух молекулярных компонентов: специфического белка-переносчика, который может узнавать полипептиды с помощью рецепторной функции и тем самым облегчать их движение через мембраны; и системы, обеспечивающей передачу энергии молекуле-переносчику, благодаря чему она способна переносить полипептиды через митохондриальные мембраны. Ведущая роль цитохрома С в механизме криообновления обусловлена, в основном, регуляцией низкими температурами генов, под контролем которых находятся цитохром С, а также НАД.Н, участвующий в его транспортной функции через наружную митохондриальную мембрану; и способностью низких температур модифицировать структуру и функцию митохондрий в направлении более благоприятного взаимодействия с ними цитохрома С.

**Ключевые слова:** митохондрии, цитохром С, криообновление, низкие температуры.

Стисло висвітлено положення, відповідно до якого системи переносу цитохромів складаються, як правило, з двох молекулярних компонентів: специфічного білка-переносника, який може пізнавати поліпептиди за допомогою рецепторної функції і, таким чином, полегшувати їх пересування крізь мембрани, і системи, яка забезпечує передачу енергії молекулі-переноснику, завдяки чому вона здатна переносити поліпептиди крізь митохондриальні мембрани. Ведуча роль цитохрому С у механізмі криообновлення обумовлена, в основному, регуляцією низькими температурами генів, під контролем яких знаходяться цитохром С, а також НАД.Н, що бере участь у його транспортній функції крізь зовнішню митохондриальну мембрану; і здатністю низьких температур модифікувати структуру та функцію митохондрий у напрямку більш сприятливої взаємодії з ними цитохрому С.

**Ключові слова:** митохондрії, цитохром С, криообновлення, низькі температури.

There is a briefly illustrated the statement about the composition of cytochrome transfer systems consisting, at least, of two molecular components. One of them is specific protein-carrier, recognising polypeptides by means of receptor function and thereby facilitating their movement through membranes. The second one is the system, providing the energy transfer to a molecule-carrier, due to that it can transfer polypeptides through mitochondrial membranes. The leading role of cytochrome C in cryorenewal mechanism is mostly stipulated by the low temperature regulation of genes, under whose control there are cytochrome C and NAD.H, participating in its transport function through an external mitochondrial membrane, as well as by the capability of low temperatures to modify the structure and function of mitochondria towards more favourable cytochrome C interaction with them.

**Key-words:** mitochondria, cytochrome C, cryorenewal, low temperatures.

Одним из путей повышения жизнеспособности клеток является восстановление их энергетического баланса за счёт активации различных элементов дыхательной цепи. Особого внимания заслуживают работы по восстановлению и активации биоэнергетических процессов с помощью цитохрома С в связи с той ролью, которую он играет в цепи биологического окисления. Известно, что цитохромы в организме выполняют роль ферментов, катализирующих реакции окисления-восстановления, и служат переносчиками электронов. Из всех цитохромов, только цитохром С получен в кристаллическом виде. Он

One of the ways for increasing cell viability is the recovery of their energetic balance due to the activation of different elements of respiratory chain. The works on the recovery and activation of bioenergetic processes using cytochrome C due to its role in biological oxidation chain are of special attention. Cytochromes in an organism are known to perform the role of enzymes, catalysing the oxidation-recovery reactions and serve as the electron carriers. Among all cytochromes only cytochrome C was obtained as crystals. It was isolated from cardiac muscle and yeast. This is a hemoprotein with 13000 molecular mass, containing at least 4-5 fractions.

*Адрес для корреспонденции:* Алексеевская Э.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 772-11-19, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

*Address for correspondence:* Alekseyevskaya E.I., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+38 (057) 7721119, fax: +38 (057) 7720084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

выделен из сердечной мышцы и дрожжей. Это гемопротеид с молекулярной массой 13000, содержащий, по крайней мере, 4-5 фракций.

Цитохром С имеется у всех организмов, обладающих митохондриальными дыхательными цепями: растений, животных и микроорганизмов. Этот препарат улучшает усвоение кислорода, повышает энергетическую мощность клетки и устойчивость организма к травме.

Согласно нашим данным [10], основной механизм криповреждения ядерных клеток костного мозга и крови – потеря ими цитохрома С с последующим снижением биоэнергетических реакций. Через 10 лет другие авторы также пришли к выводу о ведущей роли выхода цитохрома С из митохондрий в снижении дыхательной активности дрожжей [21] и гепатоцитов крыс [24]. Известно, что недостаток цитохрома С в организме вызывает ряд различных заболеваний сердечно-сосудистой системы, развитие инфаркта миокарда, опухолевых новообразований, ишемической, гипоксической, геморрагической и постлучевой патологий организма – основных причин смертности людей и сокращения продолжительности жизни.

Российские учёные изучили механизм лечебного действия цитохрома С. Дефицит цитохрома С создавали обработкой предварительно выделенных митохондрий раствором КСl либо подкожным введением крысам раствора  $CCl_4$  [15]. В обоих случаях в дифференциальных спектрах митохондрий было обнаружено снижение интенсивности полос поглощения в диапазоне волн, специфичных для цитохрома С (520 и 550 нм). Интенсивность полос поглощения, характеризующих цитохромы В, А и  $A_1$ , оставалась без изменений. Расчёт концентраций цитохромов по дифференциальным спектрам с помощью системы линейных уравнений показал, что обработка интактных митохондрий раствором КСl и острая интоксикация крыс  $CCl_4$  сопровождались снижением цитохрома С в митохондриях печени на 40 и 35 % соответственно. Потеря митохондриями цитохрома С повлекла за собой снижение фосфорилирующей способности и нарушение сопряжённости процессов окислительного фосфорилирования и дыхания. Степень эстерификации неорганического фосфата митохондрий после обработки их КСl и при интоксикации крыс  $CCl_4$  снижалась на 75 и 70% соответственно. Результаты высокочастотной электроскопии митохондрий в диапазоне 1-6 МГц свидетельствовали о том, что острая интоксикация организма и обработка митохондрий раствором КСl сопровождаются исчезновением резонансных зон, характерных для цитохрома С. Дефицит цитохрома С в митохондриях печени, независимо от его причин, связан

Cytochrome C is present in all organisms, possessing mitochondrial respiratory chain: plants, animals and microorganisms. It improves oxygen fixation and increases an energetic power of cell and organism's resistance to trauma.

According to our data [10], the main mechanism of cryodamage in nucleated cells of bone marrow and blood is their loss of cytochrome C with following decrease in bioenergetic reactions. Ten years later other authors also concluded about leading role of cytochrome C release out of mitochondria in a decrease of respiratory activity of yeast [21] and rat's hepatocytes [24]. A lack of cytochrome C in an organism is known to cause some different diseases in cardiovascular system, development of myocardial infarction, tumors, ischemic, hypoxic, hemorrhagic and post-radial pathologies of an organism, being the main causes of human death rate and lifetime reduction.

Russian scientists have studied the mechanism of cytochrome C therapeutic effect. The deficit in cytochrome C was induced by treating preliminarily isolated mitochondria with KCl solution, or with subcutaneous introduction of  $CCl_4$  to rats [15]. In both cases in differential spectra of mitochondria there was revealed a decrease in the intensity of absorption bands within the wave range, specific for cytochrome C (520 and 550 nm). The intensity of absorption bands, characterising the cytochromes B, A and  $A_1$  remained without changes. The calculation of cytochrome concentrations according to differential spectra by means of linear equation system demonstrated, that the treatment of intact mitochondria with KCl solution and an acute intoxication of rats with  $CCl_4$  were accompanied with a decrease in cytochrome C in liver mitochondria by 40 and 35%, correspondingly. The cytochrome C loss by mitochondria resulted in a decrease in phospho-rylating capability and a disorder in conjunction of oxidative phosphorylation and respiration processes. The esterification degree of mitochondria inorganic phosphate after KCl treatment and during rat intoxication with  $CCl_4$  decreased by 75 and 70%, correspondingly. The results of high-frequency electroscopy of mitochondria within the 1-6 MHz range testified to the fact that an acute organism intoxication and KCl treatment of mitochondria were accompanied by disappearing of resonance areas, typical for cytochrome C. The cytochrome C deficit in liver mitochondria, irrespective of its causes, is related to the disorder in bioenergetic processes in liver.

The incubation of cytochrome C-deficient mitochondria with cytochrome C and its parenteral introduction to rats with an acute toxic hepatitis were accompanied with an increase in the intensity of oxidative phosphorylation processes and the augmentation of P/O coefficient. When studying the differential spectra in both cases there was observed

с нарушением биоэнергетических процессов в печени.

Инкубирование цитохром С – дефицитных митохондрий с цитохромом С и парентеральное введение его крысам с острым токсическим гепатитом сопровождалось повышением интенсивности процессов окислительного фосфорилирования и увеличением коэффициента Р/О. При изучении дифференциальных спектров в том и другом случае наблюдалось увеличение полос поглощения в диапазоне волн, специфичных для цитохрома С. При расчёте концентраций цитохромов обнаружено достоверное повышение содержания цитохрома С и суммы цитохромов С+С<sub>1</sub> в цитохром С-дефицитных митохондриях печени. Результаты высокочастотной спектроскопии показали, что инкубирование цитохром С-дефицитных митохондрий с цитохромом С и его парентеральное введение крысам при интоксикации ССL<sub>4</sub> приводят к восстановлению на кривой дисперсии высокочастотной электропроводности митохондриальных зон, характерных для цитохрома С.

Аналогичные исследования были проведены на кроликах. Установлено, что хронический токсический гепатит вызывает глубокие нарушения процессов окислительного фосфорилирования, снижение концентрации цитохромов С+С<sub>1</sub> и А+А<sub>1</sub> в митохондриях печени и повышение активности трансфераз в крови. Парентеральное введение кроликам цитохрома С приводило к нормализации процессов окислительного фосфорилирования, повышению концентрации С+С<sub>1</sub> и А+А<sub>1</sub>, снижению активности трансфераз, менее выраженным явлениям жировой инфильтрации гепатоцитов и белковой дистрофии.

Согласно вышеупомянутому, лечение животных с постгеморрагической гипоксией цитохромом С сопровождалось активной стимуляцией процессов тканевого дыхания [6]. Митохондрии отличались высоким дыхательным контролем. Достоверно возрастала скорость фосфорилирования и коэффициент АДФ/О. Все показатели окислительного фосфорилирования достигали уровня нормы, а в отдельных опытах превышали его. Изучение цитохромной системы митохондрий печени кролика при геморрагическом шоке методом субстратного восстановления позволили регистрировать цитохром С, встроившийся в сопрягающую мембрану. Более прочное встраивание цитохрома С наблюдали при его комплексовании с фосфолипидами, в частности с α-токоферолом, что подтверждается данными полярографического исследования ДНФ-стимулирующего дыхания (показатель ДК<sub>ДНФ</sub> возрос до 6,4 против 5,4 в группе животных, которых лечили только цитохромом С). Таким образом,

an increase in absorption bands within the wave range, specific for cytochrome C. When calculating cytochrome concentrations there was found out a statistically significant increase in cytochrome C content and the sum of cytochromes C+C<sub>1</sub> in the cytochrome C-deficient liver mitochondria. The results of high-frequency spectroscopy demonstrated, that the incubation of cytochrome C-deficient mitochondria with cytochrome C and its parenteral introduction to rats at CCl<sub>4</sub> intoxication resulted in the recovery on the dispersion curve of a high-frequency electrical conductivity of mitochondrial zones, typical for cytochrome C.

The similar investigations were carried-out in rabbits. Chronic toxic hepatitis was established to cause the deep disorders in processes of oxidative phosphorylation, a decrease in concentration of C+C<sub>1</sub> and A+A<sub>1</sub> cytochromes in liver mitochondria and an increase in transferase activity in blood. Parenteral introduction of cytochrome C to rabbits resulted in the normalisation of oxidative phosphorylation processes, an increase in C+C<sub>1</sub> and A+A<sub>1</sub> concentration, a decrease in transferase activity, less manifested phenomena of fat infiltration of hepatocytes and protein dystrophy.

According to the mentioned above, the treatment of animals with post-hemorrhagic hypoxia using cytochrome C was accompanied with an active stimulation of processes of tissue respiration [6]. Mitochondria differed by a high respiratory control. There was statistically significant increase in phosphorylation rate and ADP/O coefficient. All indices of oxidative phosphorylation reached the norm level, and even exceeded it in some experiments. The study of cytochrome system of rabbit's liver mitochondria at hemorrhagic shock using the method of substrate recovery allowed to recorder cytochrome C, built into a conjugating membrane. More solid cytochrome C insertion was observed during formation of its complex with phospholipids, with α-tocopherol, in particular, that was confirmed by the data of polarographic study of DNP-stimulating respiration (the DC<sub>DNP</sub> index increased up to 6.4 versus 5.4 in the group of animals, treated with cytochrome C only). Thus, a therapeutic effect of cytochrome C is related to its penetration into cells and interaction with mitochondrial membranes.

In the 80-90s foreign scientists revealed a specific character of cytochrome C movement through an external and internal mitochondrial membranes. It is known that in cell membranes there are transfer systems, capable to accelerate the passing of biologically important dissolved substances. One of the cytochrome C peculiarities is an easy solutility in water. The transfer systems have a substrate specificity, high affinity, as well as they are genetically determined and

лечебный эффект цитохрома С связан с проникновением его в клетки и взаимодействием с митохондриальными мембранами.

В 80-90-х гг. зарубежные учёные выяснили специфику передвижения цитохрома С через наружную и внутреннюю митохондриальные мембраны. Известно, что в клеточных мембранах имеются системы переноса, способные ускорять прохождение биологически важных растворённых веществ. Одной из особенностей цитохрома С является лёгкая растворимость в воде. Системы переноса обладают субстратной специфичностью, высоким сродством, детерминированы генетически и подвержены ингибированию. Какова бы ни была природа переносчиков, сам факт их локализации в мембране не вызывает сомнения. Транспортируемые молекулы белка имеют разные названия: транспортные системы, переносчики, носители, транслоказы.

Вхождение цитохрома С в митохондрии был интенсивно изучен в низших эукариотических клетках. Установлено, что N-конечная часть добавлений функционирует как сигнал к импорту и в его процессе происходит отщепление. Исследованы кодирующие факторы, вовлечённые в митохондриальный импорт цитохрома С (например, Сус-2 дрожжей) [17].

Импорт цитохрома С через наружную митохондриальную мембрану обеспечивает белковый предшественник апоцитохром С, заменяющий рецепторную функцию. Он идёт сравнительно простым путём через наружную митохондриальную мембрану в интермембранное пространство, вовлекая цитохром С гемолиазный фермент [22, 23]. Передвижение апоцитохрома С стимулируется в присутствии 1%-го фенилового спирта, который разрушает кислотные цепные участки бислоя и промоторов переноса митохондриальных предшественников [19]. Импорт цитохрома С через наружную мембрану зависит, прежде всего, от присутствия НАДН и коферментов ФАД или ФМН [23]. НАДН совместно с флавиноклеотидами восстанавливает гем, которому в восстановленном состоянии необходима его ковалентная привязанность к апоцитохрому С. Данную функцию выполняет коэнзим цитохром С гемолиаза для последующего передвижения цитохрома С через наружную митохондриальную мембрану в процессе импорта.

Цитохром С принимает активное участие в транспортных процессах через внутреннюю мембрану митохондрий [15]. Окисленная (ферри) и восстановленная (ферро) формы цитохрома С способны избирательно связывать различные катионы и анионы, АТФ и АДФ, регулировать их транспорт в митохондриях. Ионно-транспортная

subjected to inhibition. Whatever is the origin of carriers, the fact of their localisation in a membrane does not admit of doubt. The transported protein molecules have different names: transport systems, carriers, carrying agents, translocases.

The cytochrome C entering into mitochondria was intensively studied in lower eukaryotic cells. The N-terminal part of additions was established to act as a signal to the import and during its process the detaching occurred. The coding factors, involved into a mitochondrial import of cytochrome C (for example Cys-2 yeast) have been studied [17].

Cytochrome C import through an external mitochondrial membrane is provided by protein precursor of apocytochrome C, replacing a receptor function. It follows quite a simple way through an external mitochondrial membrane into an intermembrane space, involving cytochrome C hemolytic enzyme [22, 23]. The passing of apocytochrome C is stimulated at the presence of 1% phenethyl alcohol, which destroys the bilayer's acid chain sites and transfer promoters of mitochondrial precursors [19]. Cytochrome C import through an external membrane depends first of all on the presence of NADH and coenzymes PAD or PMN [23]. NADH together with flavin-nucleotides recover the haem, which in a recovered state needs its covalent attachment to apocytochrome C. This function is performed by cytochrome C hemolyase coenzyme for the following movement of cytochrome C through an external mitochondrial membrane during import.

Cytochrome C takes an active part in transport processes through an internal membrane of mitochondria [15]. An oxidative (ferri-) and recovered (ferro-) forms of cytochrome C are capable to selectively bind different cations and anions, ATP and ADP, to regulate their transport in mitochondria. Cytochrome C ion-transport function is very important for maintenance of physiological-electrochemical potential of conjugating membrane and related with it process of ATP formation. Therefore the process of cytochrome C import through internal membranes is carried-out under conditions of "energized" state of internal conjugating membrane, i.e. its capability to energetic conjunction. According to the Mitchel's works (1961) the respiration and phosphorylation are related by an electrochemical potential of hydrogen ions on mitochondrial membrane. The conjunction of oxidation and phosphorylation is performed by proton gradient. When transferring electrons through a respiratory chain the generating of proton gradient and membrane potential on internal mitochondrial membrane occurs. The locomotory dynamics of cytochrome C, delivered inside of an intermembrane space of intact mitochondria by means of low pH-diffusion (proton-dependent transport) has been recently studied [16].

функция цитохрома С имеет большое значение для поддержания электрохимического потенциала сопрягающей мембраны и связанного с ним процесса образования АТФ. Поэтому процесс импорта цитохрома С через внутренние мембраны осуществляется при условии “энергизованного” состояния внутренней сопрягающей мембраны, т.е. способности её к энергетическому сопряжению. Согласно Mitchel (1961), дыхание и фосфорилирование связаны между собой электрохимическим потенциалом ионов водорода на митохондриальной мембране. Сопряжение окисления и фосфорилирования осуществляется протонным градиентом. При переносе электронов по дыхательной цепи происходит генерирование протонного градиента и мембранного потенциала на внутренней митохондриальной мембране. Недавно изучена двигательная динамика цитохрома С, доставленного во внутрь интермембранного пространства интактных митохондрий путём низкой рН-диффузии (протон-зависимый транспорт) [16].

Несколько иначе вводится цитохром  $C_1$  в наружную митохондриальную мембрану. Предшественник цитохрома  $C_1$  после синтеза в цитозоле связывается специфически различными участками рецепторов на митохондриальной поверхности. Последующая вставка на наружной мембране осуществляется общим вставочным белком (GIP-медиатор) через транслокационные контактные участки в матриксе мембранно-зависимым способом.

Известна способность гибридного белка pSC<sub>1</sub>-С, содержащего двойную информацию (цитохром С+цитохром  $C_1$ ), импортироваться по тому же пути, что и цитохром С, и затем вновь возвращаться в митохондриальный матрикс путём, зависимым от мембранного потенциала по типу “tug-of-war” (буксирной) реакции [27]. Предполагают, что гидрофобная часть последовательностей цитохрома С может служить вторичным сигналом полипептиду ещё раз импортироваться в матрикс и обратно через внутреннюю мембрану [18].

Итак, системы транспорта цитохромов состоят, вероятно, из 2-х молекулярных компонентов: специфических белков-переносчиков, которые могут узнавать и связывать аминокислоты, тем самым облегчая их движение через мембраны; и систем, обеспечивающих передачу энергии молекуле-переносчику, благодаря чему она становится способной переносить их через митохондриальные мембраны.

Существуют генетически детерминированные молекулярные механизмы доставки цитохрома С, добавленного извне, в места его локализации. Способность фермента, проникая в клетку, восстанавливать функциональную активность

The way for cytochrome  $C_1$  introduction into an external mitochondrial membrane is slightly different. The cytochrome  $C_1$  precursor after synthesis in cytosol is bound with specifically different sites of receptors on mitochondrial surface. The following insertion on external membrane is carried-out by the common inserting protein (GIP-mediator) through the translocation contact sites in the matrix by a membrane-dependent way.

The capability of pSC<sub>1</sub>-C hybrid protein, containing double information (cytochrome C+cytochrome  $C_1$ ) is known to be imported via the same way as cytochrome C and returning then again into a mitochondrial matrix by the way, dependent on membrane potential by “tug-of-war”-type reaction [27]. A hydrophobic part of cytochrome C sequences is suggested to serve as a secondary signal to polypeptide to be imported once again into the matrix and back through an internal membrane [18].

Thus, the systems of cytochrome transport probably consists of 2 molecular components: specific protein-carrier, which can recognize and bind aminopeptides, by thereby facilitating their movement through membranes, and the system, providing the energy transfer to molecule-carrier, due to that it becomes capable to transfer them through mitochondrial membranes.

There are genetically determined molecular mechanisms, providing cytochrome C delivery, added from outside, into the sites of its localisation. The enzyme capability to recover functional activity of mitochondrial membranes, when penetrating into a cell, stipulates therapeutic effect of cytochrome C at many pathological states, accompanying with oxidation-reduction process disorder in tissues.

Which is the role of cytochrome C in cryorenewal mechanism? Earlier these questions were reflected in the book pages [11], atlas [12] and in some papers [3, 4, 13]. However the absence of common judgement of cryobiologists on the possibility of cytochrome C penetration into mitochondrial membranes during a long time period complicated the substantiation of its role in cryorenewal mechanism. Since 1977 the scientists from the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine have been taking the view that cytochrome C is incapable to penetrate through mitochondrial membranes [2, 24]. Its release from cold-damaged mitochondrial membranes is considered as the factor, inducing the lipid peroxidation (LPO) processes. Therefore up to now a new direction has not been widely discussed. Only recent years due to the discovery of genes of cold adaptation, antifreeze polypeptides, proteins of cold shock and *de novo*, the main guidelines on which the conception of cryorenewal is based, the possibility to be back with discussion of

митохондриальных мембран обуславливает лечебное действие цитохрома С при многих патологических состояниях, сопровождающихся нарушением окислительно-восстановительных процессов в тканях.

Какова же роль цитохрома С в механизме криообновления? Ранее подобные вопросы были отражены на страницах книги [11], атласа [12] и ряда статей [3, 4, 13]. Однако отсутствие единого взгляда криобиологов на возможность проникновения цитохрома С в митохондриальные мембраны в течение длительного времени значительно затруднило обоснование его роли в механизме криообновления. С 1977 г. учёные ИПКиК НАН Украины придерживаются мнения, что цитохром С не способен проникать через митохондриальные мембраны [2, 24]. Выход его из повреждённых холодом митохондриальных мембран расценивается как фактор, индуцирующий процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Поэтому до настоящего времени новое направление не было предметом широкой дискуссии. Лишь в последние годы, благодаря открытию генов-холодовой адаптации, антифризных полипептидов, белков-холодового шока и *de novo*, основных “китов”, на которые опирается концепция криообновления, появилась реальная возможность вернуться к обсуждению роли цитохрома С в механизме криообновления.

Разногласия легко устранимы при рассмотрении двух важнейших феноменов в клеточной биологии – апоптоза (программа гибели клетки) и противовеса ему – криообновления (программа реабилитации и перевода клетки на более высокий уровень гомеостаза). Выход из повреждённых митохондрий цитохрома С, взаимодействующего с цитозольным белком Араф-1, обеспечивает переход каспазы 3 (остаток аспарагиновой кислоты) в каталитически активную форму [5], что является одним из пусковых механизмов процесса апоптоза. Недавно на клетках яичника китайского хомячка показано, что проникающая способность митохондрий играет важную роль в регуляции освобождения митохондриального цитохрома С [25]. Это может быть наиболее существенным моментом на пути апоптоза, который приводит клетки к смерти.

Концепция криообновления представляет противовес апоптозу и опирается на многочисленный опыт подобных работ, проведенных в медицинской практике. Способность цитохрома С встраиваться в митохондриальные мембраны и снижать процессы ПОЛ является одним из механизмов его лечебного действия [6, 8, 9, 15]. Роль цитохрома С в механизме криообновления наиболее существенна. Его благоприятный эффект

cytochrome C role in cryorenewal mechanism has occurred to be real.

The contradictions can be easily eliminated when considering two most important phenomena in cell biology, that are the apoptosis (cell death program) and the counterbalance to it: the cryorenewal (program of rehabilitation and cell transfer to higher level of homeostasis). The release out of damaged mitochondria of cytochrome C, interacting with Apaf-1 cytosol protein, provides the transfer of caspase 3 (the asparagic acid residual) into a catalytically active form [5], that is one of the trigger mechanisms of apoptosis process. It has been recently demonstrated in ovarian cells of Chinese hamster, that a penetrating ability of mitochondria is very important in regulating the release of mitochondrial cytochrome C [25]. It can be the most significant moment in the way of apoptosis, resulting in a cells death.

The theory of cryorenewal represents the counterbalance to apoptosis and is based upon the huge experience in similar works, performed in medical practice. The capability of cytochrome C to build in mitochondrial membranes and to reduce the LPO processes is one the mechanisms of its therapeutic effect [6, 8, 9, 15]. The cytochrome C role in cryorenewal mechanism is the most significant. Its favourable effect is stipulated by the effect of low temperatures, which those: regulate genes, under control are cytochrome C and NADH, participating in its transport function through an external mitochondrial membrane [28]; increase cytochrome concentration [7]; strengthen mitochondriogenesis; make cell membranes labile [11]; augment the BBB permeability [1], thereby facilitating the passage of cytochrome C molecule, being the pinocytosis inductor [14] through these barriers; change the structure of mitochondria, that provides a favourable interaction of cytochrome C with them [20].

It is generally evident, that cytochrome C plays a leading role in cryorenewal mechanism via its direct inclusion into an external and internal mitochondrial membranes and interaction with them.

## References

1. Babijchuk G.A., Marchenko V.S., Pastukhov Yu.F. etc. To the mechanisms of regulation of brain blood barrier permeability of cooled brain. Communication 1// Problemy gematologii.– 1995.– N1.– P.10-19.
2. Bondarenko V.A. Lipid peroxidation in mitochondria membranes under low temperature effect: Author's abstract of thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 1977.– 30p.
3. Grischenko V.I., Pankov E.Ya., Oboznaya E.I. Qualitative renewal of cell properties after cryopreservation // Uspekhi biologii.– 1989.– Vol.108.– N2.– P.299-309.
4. Grischenko V.I., Oboznaya-Pechenezhskaya E.I., Pankov E.Ya. Renewal of biological structures and functions by means of

обусловлен действием низких температур, которые: регулируют гены, под контролем которых находятся цитохром С и НАДН, участвующий в его транспортной функции через наружную митохондриальную мембрану [26]; увеличивают концентрацию цитохромов [7]; усиливают митохондриогенез; лабилизируют клеточные мембраны [11]; повышают проницаемость ГЭБ [1], облегчая тем самым прохождение молекулы цитохрома С, являющегося индуктором пиноцитоза [14], через эти барьеры; изменяют структуру митохондрий, что обеспечивает наиболее благоприятное взаимодействие с ними цитохрома С [20].

В целом цитохром С, несомненно, играет ведущую роль в механизме криообновления путём непосредственного включения его во внешнюю и внутреннюю митохондриальные мембраны и взаимодействия с ними.

### Литература

1. *Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Пастухов Ю.Ф. и др.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалогического барьера охлажденного мозга. Сообщение 1 // Пробл. гематологии.– 1995.– №1.– С.10-19.
2. *Бондаренко В.А.* Перекисное окисление липидов в мембранах митохондрий под влиянием низких температур: Автореф. дис... канд.биол.наук – Харьков, 1977. – 30 с.
3. *Грищенко В.И., Панков Е.Я., Обозная Э.И.* Качественное обновление свойств клеток после криоконсервирования // Успехи совр. биологии.– 1989.– Т. 108, №2.– С. 299-309.
4. *Грищенко В.И., Обозная-Печенежская Э.И., Панков Е.Я.* Обновление биологических структур и функций с помощью низких температур и криоконсервирования – новое направление в биологии и медицине // Пробл. криобиологии.– 1995.– №4.– С. 3 -10.
5. *Губский Ю.И.* Токсическая гибель клетки: свободно-радикальное повреждение ДНК и апоптоз // Лікування та діагностика.– 2001.– №4.– С.8-13.
6. *Кривцова И.М., Алексеева Н.Н.* Цитохром С-фосфолипидный комплекс (получение и изучение в эксперименте) // Цитохром С и его клиническое применение. Сб.науч.трудов НИИ гематологии и переливания крови.– Л.,1990.– С.74-78.
7. *Мохова С.Н., Жигачёва И.В.* Концентрация цитохромов в митохондриях и гомогенате печени при адаптации к холоду // Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов.– М.: Наука, 1977.– С.138-143.
8. *Мхитарян Л.М.* Механизм лечебного действия цитохрома С при остром вирусном гепатите "В" // Эксперим. и клин. медицина.–1987.– Т. 27, №6.– С. 585-589.
9. *Новиков В.С.* Применение цитохрома С для коррекции нарушенной резистентности. Цитохром С и его клиническое применение. Сб. науч. трудов НИИ гематологии и переливания крови.– Л., 1990.– С. 52-57.
10. *Обозная Э.И., Маркова О.П.* Некоторые пути восстановления биоэнергетики клеток криоконсервированного костного мозга // Пробл.гематологии.– 1976.– №9.– С.6-10.
11. *Обозная Э.И., Пушкарь Н.С., Маркова О.П., Панков Е.Я.* Цитохимия замороженной клетки.– Киев:Наук.думка, 1981.– 176 с.
- low temperatures and cryopreservation: a new direction in biology and medicine//Problems of cryobiology.– 1995.– N4.– P. 3-10.
5. *Gubsky Yu.I.* Toxic cell death: free-radical damage of DNA and apoptosis // Likuvannya ta diagnostika.– 2001.– N4.– P. 8-13.
6. *Krivtsova I.M., Alekseyeva N.N.* Cytochrome C-phospholipid complex (procurement and study in the experiment) // Cytochrome C and its clinical application: Collection of scientific papers of R&D Institute of Haematology and Blood Transfusion.– Leningrad, 1990.– P. 74-78.
7. *Mokhova S.N., Zhigacheva I.V.* Concentration of cytochromes in mitochondria and liver homogenate at adaptation to cold // Mitochondria. Energy accumulation and regulation of enzyme processes.– Moscow: Nauka, 1977.– P. 138-143.
8. *Mkhitaryan L.M.* Mechanism of therapeutic effect of cytochrome C at an acute hepatitis "B"// Eksp. klin. med.– 1987.– Vol. 27, N6.– P. 585-589.
9. *Novikov V.S.* Cytochrome C application for correcting an impaired resistance. Cytochrome C and its clinical application: Collection of scientific papers of R&D Institute of Haematology and Blood Transfusion.– Leningrad, 1990.– P. 52-57.
10. *Oboznaya E.I., Markova O.P.* Some ways of recovery of cell bioenergy of cryopreserved bone marrow // Problemy gematologii.– 1976.– N9.– P. 6-10.
11. *Oboznaya E.I., Pushkar N.S., Markova O.P., Pankov E.Ya.* Cytochemistry of frozen cell.– Kiev: Naukova dumka, 1981.– 176 p.
12. *Oboznaya E.I., Pankov E.Ya.* Bone marrow cytochemistry during cryopreservation. Atlas.– Kiev: Naukova dumka.– 1989.– 256p.
13. *Oboznaya-Pechenezhskaya E.I., Grischenko V.I., Pankov E.Ya.* Cryobiology of renewal: facts and perspectives // Problems of cryobiology.– 1993.– N4.– P. 11-20.
14. *Seravin L.N.* About different mechanisms of pinocytosis and phagocytosis (A. *Proteus* as an example) // Tsitologiya.– 1968.– 10, N4.– P. 506-526.
15. *Slepneva L.V., Manoilov Yu.S., Krivoruchko L.I.* Study of the mechanism of cytochrome C therapeutic effect // Therapeutic preparations from blood and tissues. Collection of scientific papers of R&D Institute of Haematology and Blood Transfusion.– Leningrad, 1974.– P. 131-133.
16. *Cortese J.D., Hackenbrock C.R.* Motional dynamics of functional cytochrome C delivered by low pH fusion into the intermembrane space of intract mitochondria // Biochim. Biophys. Acta.– 1993.– Vol. 1142, N1-2.– P. 194-202.
17. *Dumont M.E., Schlichter I.V., Cardillo T.S. et al.* Cyc 2 encodes a factor involved in mitochondrial import of yeast cytochrome C // Mol.Cell.Biol.– 1993.– Vol. 13, N10.– P. 6442-6451.
18. *Hartl F.U., Schmidt B., Wachter E., et al.* Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase // Cell.– 1986.– Vol. 47, N6. – P. 939-951.
19. *Jordi W., Nibbeling R, de Kruijff B.* Phenethyl alcohol disorders phospholipid acyl chains and promotes translocation of the mitochondrial precursor protein apocytochrome C across a lipid bilayer // F.E.B.S. Lett.–1990.– Vol. 261, N1.– P. 55-58.
20. *Loncar D.,Bedrica L.,Mayer J. et al.* The effect of intermittent cold treatment of the adiposetissue of the cat. Apparent transformation from white to brown adipose tissue // J. Ultrastruct. and Mol. Struct. Res.–1986.– Vol. 97, N1-3.– P. 119-129.
21. *Mori Y., Suzuki H., Nei T.* Freezing injury in the yeast respiratory system // Cryobiology.– 1986.– Vol.23, N1.– P. 64-71.
22. *Nicholson D.W., Kohler H.,Neupert W.* Import of cytochrome C into mitochondria: cytochrome C heme lyase // Eur. J. Biochem.– 1987.– Vol.164, N1.– P. 147-157.

12. *Обозная Э.И., Панков Е.Я.* Цитохимия костного мозга при криоконсервировании. Атлас.– Киев: Наук.думка.– 1989.–256 с.
13. *Обозная-Печенежская Э.И., Грищенко В.И., Панков Е.Я.* Криобиология обновления: факты и перспективы // Пробл. криобиологии.– 1993.– №4.– С.11-20.
14. *Серавин Л.Н.* О различиях механизмов пиноцитоза и фагоцитоза (на примере *A. Proteus*) // Цитология.–1968.– Т. 10, №4.– С.506-526.
15. *Слепнёва Л.В, Манойлов Ю.С., Криворучко Л.И.* Исследование механизма лечебного действия цитохрома С // Лечебные препараты из крови и тканей. Сб.науч.тр. НИИ гематологии и переливания крови.– Л., 1974.– С.131-133.
16. *Cortese J.D., Hackenbrock C.R.* Motional dynamics of functional cytochrome c delivered by low pH fusion into the intermembrane space of intact mitochondria // Biochim. Biophys. Acta.– 1993.– Vol. 1142, N1-2.– P. 194-202.
17. *Dumont M.E, Schlichter I.V, Cardillo T. S. et al.* Cyc 2 encodes a factor involved in mitochondrial import of yeast cytochrome c // Mol. Cell. Biol.– 1993.– Vol. 13, N10.– P. 6442-6451.
18. *Hartl F.U., Schmidt B., Wachter E., et al.* Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase // Cell.– 1986.– Vol. 47, N6. – P. 939-951.
19. *Jordi W., Nibbeling R, de Kruijff B.* Phenethyl alcohol disorders phospholipid acyl chains and promotes translocation of the mitochondrial precursor protein apocytochrome C across a lipid bilayer // F.E.B.S. Lett.–1990.– Vol. 261, N1.– P. 55-58.
20. *Loncar D.,Bedrica L.,Mayer J. et al.* The effect of intermittent cold treatment of the adipose tissue of the cat. Apparent transformation from white to brown adipose tissue // J. Ultrastruct. and Mol. Struct. Res.–1986.– Vol. 97, N1-3.– P. 119-129.
21. *Mori Y., Suzuki H., Nei T.* Freezing injury in the yeast respiratory system // Cryobiology.– 1986.– Vol.23, N1.– P. 64-71.
22. *Nicholson D.W., Kohler H.,Neupert W.* Import of cytochrome C into mitochondria : cytochrome C heme lyase // Eur. J. Biochem.– 1987.– Vol.164, N1.– P. 147-157.
23. *Nicholson D.W., Neupert W.* Import of cytochrome c into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c // Proc. Natl. Acad. Sci.– 1989.– Vol.86, N12.–P. 4340-4344.
24. *Petrenko A.Yu, Subbota N.P.* Inhibition on the activity of mitochondrial electron transport chain by low temperature: losses of cytochrome C // Cryo-Letters.– 1986.– N7.– P.395-402.
25. *Pritchard DE, Singh J, Carlisle DL, Patierno SR.* Cyclosporin A inhibits chromium(VI)-induced apoptosis and mitochondrial cytochrome c release and restores clonogenic survival in CHO cells // Carcinogenesis.– 2000.– Vol. 21, N11.– P. 2027-2033.
26. *Storey K.B.* Freeze-included gene expression in vertebrates // Cryo-98, 35-th Annual Meeting of the Society for Cryobiology.– Pittsburg, Pennsylvania, USA.–1998.– P.167.
27. *Stuart R.A., Nicholson D.W., Neupert W.* Early steps in mitochondrial protein import: receptor functions can be substituted by the membrane insertion activity of apocytochrome C // Cell.–1990.– Vol. 60, N1.– P. 31-43.
23. *Nicholson D.W., Neupert W.* Import of cytochrome c into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c // Proc. Natl. Acad. Sci.– 1989.– Vol.86, N12.–P. 4340-4344.
24. *Petrenko A.Yu., Subbota N.P.* Inhibition of the activity of mitochondrial electron transport chain by low temperature: losses of cytochrome C // Cryo-Letters.– 1986.– N7.– P.395-402.
25. *Pritchard DE, Singh J, Carlisle DL, Patierno SR.* Cyclosporin A inhibits chromium(VI)-induced apoptosis and mitochondrial cytochrome c release and restores clonogenic survival in CHO cells // Carcinogenesis.– 2000.– Vol. 21, N11.– P. 2027-2033.
26. *Storey K.B.* Freeze-induced gene expression in vertebrates // Cryo-98, 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Pittsburg, Pennsylvania, USA.– 1998.– P.167.
27. *Stuart R.A., Nicholson D.W., Neupert W.* Early steps in mitochondrial protein import: receptor functions can be substituted by the membrane insertion activity of apocytochrome C // Cell.– 1990.– Vol. 60, N1.– P. 31-43.

*Accepted in 12.10.2004*

*Поступила 12.10.2004*