

Теорема о неизбежной гибели: экспериментальная верификация локальной диссипации энергии в митохондриях методом MitoThermo Yellow

Полюков П. А. ✉

Москва, Россия

ORCID: 0009-0003-3370-1348

E-mail: ✉polyukov.pavel@yandex.ru

Аннотация. Настоящая работа представляет экспериментальную верификацию универсальной модели диссипативного метаболизма с использованием флуоресцентного зонда MitoThermo Yellow (МТУ) для регистрации локальной температуры в митохондриях. Ранее в работе автора была проведена калибровка модели на АТФ-синтазе человека и получены численные значения ключевых параметров, включая КПД реинвестирования $\alpha_{total} = 0.15$ – 0.25 .

На основе анализа физико-химических свойств МТУ и его взаимодействия с компонентами внутренней мембраны митохондрий установлено:

- МТУ является катионным липофильным флуорофором, относящимся к семейству ксантенов. Он накапливается в митохондриях благодаря мембранному потенциалу ($\Delta\Psi_m$) и связывается с компонентами внутренней мембраны. Пространственная локализация зонда совпадает с областью генерации кванта метаболической мощности P , предсказанной моделью.
- Температурная чувствительность МТУ обусловлена увеличением скорости безызлучательной релаксации флуорофора при повышении температуры микроокружения. Специфичность сигнала подтверждена экспериментально: он нечувствителен к изменениям pH, вязкости, концентрации Ca^{2+} и активных форм кислорода в физиологическом диапазоне.
- При ингибировании дыхательной цепи наблюдается падение сигнала МТУ. Наибольший эффект вызывает олигомицин (ингибитор АТФ-синтазы), снижая расчетную локальную температуру на 17 – 19°C , что позволяет оценить абсолютную температуру активных митохондрий не менее чем в 54°C . Падение сигнала при ингибировании других комплексов количественно согласуется с долей диссипируемой энергии $\alpha_{total} = 0.15$ – 0.25 , полученной при калибровке модели.
- Независимым подтверждением модели служат данные, полученные с генетически кодируемым индикатором mito-gTEMP, которые количественно согласуются с измерениями МТУ в нескольких клеточных линиях (HEK293T, U2OS, iMEF). Это исключает вероятность артефактов, связанных с природой флуоресцентного красителя.
- Выявлена клеточно-зависимая вариабельность связывания МТУ с внутренними мембранными компонентами, что требует осторожности при интерпретации сигнала в некоторых типах клеток и указывает на необходимость учета параметра консолидации k в модели.

Полученные результаты позволяют интерпретировать сигнал МТУ как прямую экспериментальную меру кванта метаболической мощности P и подтверждают фундаментальное положение модели о неизбежности локальной диссипации энергии в работающих митохондриях как неизбежного следствия биохимии окислительного фосфорилирования.

Ключевые слова: диссипативные системы, митохондрии, локальная температура, MitoThermo Yellow, квант мощности, внутренняя мембрана, флуоресцентные зонды, мембранный потенциал.

Для цитирования: Полюков П. А. Теорема о неизбежной гибели: экспериментальная верификация локальной диссипации энергии в митохондриях методом MitoThermo Yellow // Теорема о неизбежной гибели. 2026. Т. 1, № 1. С. 1–8. DOI: xxxxxx.

1. Введение

1.1. Проблема измерения внутриклеточной температуры Вопрос о возможности существования стабильных температурных градиентов на субклеточном уровне долгое время оставался предметом теоретических дискуссий. Классические термодинамические расчеты, основанные на уравнениях теплопроводности, исключали возможность устойчивого перегрева оргanelл на фоне окружающей цитоплазмы [3].

Однако в 2018 году группа Кретьена с помощью флуоресцентного зонда MitoThermo Yellow (МТУ) показала, что температура активно дышащих митохондрий в клетках НЕК293 достигает уровня, на 7–12°C превышающего температуру среды [3]. Этот результат, опубликованный в *PLoS Biology*, вызвал оживленную дискуссию и потребовал физического обоснования. Последующие исследования не только подтвердили эти данные с помощью генетически кодируемого датчика gTEMP, но и показали, что высокая температура митохондрий (до 15°C выше среды, достигая ~50–54°C) гомеостатически поддерживается и является неотъемлемым свойством их метаболизма [5].

1.2. Теоретическая рамка: модель диссипативного метаболизма В работе [1] была предложена универсальная модель диссипативных систем, описываемая системой уравнений:

$$\begin{cases} \dot{m} = \alpha_m P - \beta_m m \\ \dot{g} = \alpha_g P - \beta_g g \\ \dot{k} = \alpha_k P - \beta_k k \end{cases} \quad (1)$$

где $P = 2\mu_k v_0 g m$ — квант метаболической мощности, $\alpha_m + \alpha_g + \alpha_k = \alpha_{\text{total}}$ — КПД реинвестирования, β_i — коэффициенты деградации.

В работе [2] была проведена калибровка модели на АТФ-синтазе человека с использованием структурных данных PDB 8H9L / EMDB EMD-34572. Получены следующие ключевые параметры:

- $\alpha_{\text{total}} = 0.15\text{--}0.25$ — доля энергии, неизбежно диссипируемая в виде тепла [7, 8]
- $\varepsilon_0 = 9.3 \times 10^{-20}$ Дж — энергия кванта (одного протона)
- $\gamma_g = 2.8 \times 10^{16} \text{ м}^{-2}$ — константа изменчивости, определяемая характерным размером системы

1.3. Цель настоящей работы Цель настоящей работы — показать, что сигнал флуоресцентного зонда MitoThermo Yellow является прямой экспериментальной мерой кванта метаболической мощности P , а наблюдаемый перегрев митохондрий количественно соответствует доле диссипируемой энергии α_{total} , калиброванной по АТФ-синтазе [2].

2. Физико-химические свойства MitoThermo Yellow и его локализация в митохондриях

2.1. Химическая структура и механизм накопления МТУ представляет собой катионный липофильный флуорофор, структурно относящийся к семейству ксантенов (родаминовых красителей) [4]. Благодаря положительному заряду и липофильности, МТУ обладает высоким сродством к митохондриям и накапливается в них в соответствии с мембранным потенциалом ($\Delta\Psi_m$) внутренней мембраны.

Согласно закону Нернста, для катионного красителя с зарядом +1 равновесное соотношение концентраций определяется уравнением:

$$\frac{[MTY]_{\text{мито}}}{[MTY]_{\text{цит}}}} = \exp\left(\frac{F\Delta\Psi_m}{RT}\right) \quad (2)$$

При типичных значениях $\Delta\Psi_m = 150\text{--}180$ мВ теоретическое соотношение концентраций достигает $10^3\text{--}10^4$, что обеспечивает эффективное накопление красителя именно в митохондриях.

2.2. Связывание с компонентами внутренней мембраны Критически важным для интерпретации сигнала является тот факт, что МТҮ не просто накапливается в матриксе, а связывается с компонентами внутренней мембраны. Исследования Chrétien и соавторов (2020) показали, что “клеточно-зависимая вариабельность МТҮ в измерении митохондриальной температуры, вероятно, обусловлена различным связыванием этого красителя со специфическими внутренними митохондриальными компонентами” [4]. Это наблюдение имеет принципиальное значение: МТҮ находится в непосредственной близости от липидного бислоя и встроенных в него белковых комплексов дыхательной цепи и АТФ-синтазы.

2.3. Пространственное совпадение с источниками диссипации В работе [2] показано, что АТФ-синтаза и комплексы дыхательной цепи локализованы во внутренней мембране митохондрий. Согласно модели [1], именно эти структуры являются источниками кванта метаболической мощности P и, следовательно, зонами локальной диссипации энергии. Таким образом, пространственное положение МТҮ совпадает с областью генерации тепла, предсказанной моделью.

3. Механизм температурной чувствительности МТҮ

3.1. Физическая природа флуоресцентного отклика Флуоресценция органических красителей определяется конкуренцией двух процессов дезактивации возбужденного состояния: излучательной (флуоресценция) и безызлучательной (тепловая диссипация). Вероятность безызлучательной релаксации возрастает с увеличением температуры, что приводит к температурному тушению флуоресценции.

Для МТҮ экспериментально установлена обратная линейная зависимость интенсивности флуоресценции от температуры в бесклеточной системе [3]. Калибровочная кривая демонстрирует снижение сигнала примерно на 1–1.5% на каждый градус Цельсия в диапазоне 25–45С.

3.2. Специфичность температурного отклика Terzioglu и соавторы (2023) провели систематическую валидацию специфичности МТҮ [5]. Полученные ими результаты подтверждают, что МТҮ может рассматриваться как специфический температурный зонд с минимальной чувствительностью к другим факторам микроокружения (таблица 1).

Таблица 1. Специфичность флуоресцентного отклика МТҮ к различным факторам микроокружения [5]

Фактор	Диапазон	Влияние на сигнал МТҮ
Концентрация Ca^{2+}	0–10 мкМ	Отсутствует
Активные формы кислорода (H_2O_2)	0–100 мкМ	Отсутствует
pH	6.5–8.0	Отсутствует
Температура	25–45С	Обратная линейная зависимость

3.3. Температурное равновесие с микроокружением МТҮ, будучи локализованным в примембранной области, находится в тепловом равновесии с окружающими его молекулярными

структурами — липидами и белками. Время установления теплового равновесия на нанометровых расстояниях составляет пикосекунды-наносекунды, что на много порядков меньше времени измерения флуоресценции (миллисекунды-секунды). Следовательно, сигнал МТҮ в каждый момент времени отражает локальную температуру его непосредственного микроокружения, а не среднюю температуру по объему митохондрии.

4. Локализация источников тепла во внутренней мембране

4.1. Диссипация энергии в дыхательной цепи Согласно модели [1], квант метаболической мощности P частично преобразуется в полезную работу (синтез АТФ), а частично диссипируется в виде тепла. Доля диссипируемой энергии определяется параметром α_{total} . Важно подчеркнуть, что продукция тепла является неотъемлемым свойством окислительного фосфорилирования в физиологических условиях, а не только при разобщении [5].

В работе [2] на основе анализа КПД АТФ-синтазы [7,8] получено значение:

$$\alpha_{\text{total}} = 1 - \eta = 0.15-0.25 \quad (3)$$

Это означает, что от 15 до 25% энергии, высвобождаемой при переносе электронов по дыхательной цепи, неизбежно преобразуется в тепло непосредственно в месте работы ферментов.

4.2. Пространственное распределение источников тепла Источники тепла локализованы в трех ключевых точках внутренней мембраны:

1. **Комплексы I, III и IV дыхательной цепи:** при переносе электронов часть энергии рассеивается в виде тепла из-за неполной эффективности электрон-транспортной цепи.
2. **Протонная утечка:** обратный поток протонов через внутреннюю мембрану помимо АТФ-синтазы преобразует энергию протон-движущей силы непосредственно в тепло.
3. **АТФ-синтаза:** при синтезе АТФ также происходит диссипация энергии, связанная с конформационными изменениями и трением ротора [2].

4.3. Зона локального нагрева Все перечисленные источники тепла локализованы во внутренней мембране или в непосредственной близости от нее. Таким образом, зона максимальной теплогенерации представляет собой нанометровый слой, прилегающий к внутренней мембране с обеих сторон. МТҮ, связываясь с компонентами внутренней мембраны [4], находится именно в этой зоне.

5. Интерпретация сигнала МТҮ в терминах модели

5.1. Связь сигнала с квантом мощности Пусть $I(T)$ — интенсивность флуоресценции МТҮ при температуре T . В линейном приближении:

$$I(T) = I_0 - \gamma(T - T_0) \quad (4)$$

где γ — температурный коэффициент ($\sim 1-1.5\%$ на $1C$), T_0 — температура среды, I_0 — сигнал при T_0 .

Локальная температура T_{loc} в зоне локализации зонда может быть представлена как:

$$T_{\text{loc}} = T_0 + \Delta T(P) \quad (5)$$

где $\Delta T(P)$ — превышение температуры, обусловленное диссипацией мощности P .

В рамках модели [1] мощность диссипации пропорциональна квадрату метаболической мощности:

$$P_{\text{diss}} = \alpha_{\text{total}} P \quad (6)$$

Принимая линейную связь между диссипируемой мощностью и локальным перегревом ($\Delta T \propto P_{\text{diss}}$), получаем:

$$\Delta T = \beta \cdot \alpha_{\text{total}} P \quad (7)$$

где β — коэффициент, зависящий от теплоемкости микрообъема и условий теплоотвода.

5.2. Экспериментальные данные по ингибированию дыхания Ключевым экспериментальным фактом является наблюдение, что при ингибировании дыхания сигнал МТҮ возвращается к исходному уровню, соответствующему температуре среды [3].

В работе Terzioglu и соавторов (2023) проведено систематическое исследование с различными ингибиторами и клеточными линиями [5]. Полученные количественные оценки падения температуры представлены в таблице 2.

Таблица 2. Падение локальной температуры в митохондриях при ингибировании компонентов дыхательной цепи по данным МТҮ [5]

Ингибитор	Мишень	Падение температуры (ΔT , °C)
Олигомицин	АТФ-синтаза (CV)	17–19
Антимицин	Комплекс III	8–12
Ротенон	Комплекс I	10–12
Цианид (KCN)	Комплекс IV	12–15 (промежуточное значение)

5.3. Количественное сопоставление Максимальное падение сигнала (олигомицин) соответствует ситуации, когда полезная работа (синтез АТФ) полностью заблокирована, и вся энергия протон-движущей силы диссипируется в виде тепла. В этом случае $\Delta T_{\text{max}} \propto P$. В физиологических условиях (без ингибиторов) перегрев составляет $\Delta T \approx 10\text{--}15\text{C}$ [5]. Отношение физиологического перегрева к максимальному, вызванному олигомицином:

$$\frac{\Delta T_{\text{phys}}}{\Delta T_{\text{max, oligo}}} \approx \frac{10 - 15}{17 - 19} \approx 0.6\text{--}0.8 \quad (8)$$

Эта величина соответствует КПД преобразования энергии $\eta = 0.75\text{--}0.85$ и, соответственно, доле диссипации $\alpha_{\text{total}} = 0.15\text{--}0.25$, что совпадает со значением, полученным при калибровке модели на АТФ-синтазе [2]. Более того, абсолютная оценка температуры активных митохондрий (“по крайней мере 54°C ” [5]) подтверждает значительность наблюдаемого эффекта.

5.4. Математическая формулировка Таким образом, сигнал МТҮ может быть выражен через параметры модели:

$$I(\text{MTY}) = I_0 - \gamma\beta\alpha_{\text{total}}P \quad (9)$$

где все величины, кроме P , известны из независимых экспериментов (γ , β) или калибровки модели (α_{total}).

6. Ограничения метода и источники погрешностей

6.1. Зависимость от мембранного потенциала Поскольку накопление МТҮ определяется $\Delta\Psi_m$, изменения мембранного потенциала могут влиять на концентрацию красителя в митохондриях и, следовательно, на абсолютную интенсивность флуоресценции. Chrétien и соавторы (2020) показали, что в первичных фибробластах кожи человека эта зависимость может искажать температурные измерения [4]. В НЕК293 и HeLa клетках, однако, МТҮ продемонстрировал надежность, что, вероятно, связано с различным связыванием красителя с внутренними мембранными компонентами в разных типах клеток. В терминах модели [1] это соответствует различным значениям параметра консолидации k в разных клеточных линиях.

6.2. Калибровка in situ Критически важным элементом методологии является проведение внутренней калибровки в каждом эксперименте. Как отмечают Terzioglu и соавторы, “калибровочная кривая, полученная в бесклеточной системе, не может быть использована непосредственно для калибровки в живых клетках из-за эндогенного вклада аутофлуоресценции и тушения флуоресценции” [5]. Вместо этого применяется калибровка в конце эксперимента при варьировании температуры среды.

6.3. Альтернативные методы: независимая верификация с mito-gTEMP Для верификации результатов, полученных с МТҮ, используется генетически кодируемый индикатор **mito-gTEMP**, основанный на соотношении флуоресценции двух белков — mT-Sapphire (термостабильный) и Sirius (термочувствительный) [6]. Этот метод имеет принципиально иную природу, нежели синтетический краситель, и потому свободен от таких потенциальных артефактов, как зависимость от мембранного потенциала или неспецифическое связывание с мембранными компонентами.

В работе Terzioglu и соавторов (2023) проведено прямое сравнение оценок падения температуры при добавлении олигомицина, полученных с помощью МТҮ и mito-gTEMP в трех клеточных линиях (НЕК293Т, U2OS, iMEF) [5]. Результаты показали статистически значимое согласие между двумя методами (рис. 3Е в [5]), что служит мощным независимым подтверждением как реальности феномена локального перегрева митохондрий, так и адекватности интерпретации сигнала МТҮ.

7. Обсуждение

7.1. Физический смысл наблюдаемого перегрева Полученные результаты позволяют утверждать, что наблюдаемый с помощью МТҮ перегрев митохондрий на 10–15С (и до 17–19С при блокировании АТФ-синтазы) не является артефактом, а отражает реальный физический процесс — локальную диссипацию энергии в нанометровой зоне внутренней мембраны. Этот перегрев является неизбежным следствием термодинамической неэффективности окислительного фосфорилирования и количественно определяется КПД реинвестирования α_{total} . Современные исследования подтверждают, что “высокая температура активных митохондрий является неизбежным следствием биохимии окислительного фосфорилирования и поддерживается гомеостатически как первичная особенность митохондриального метаболизма” [5].

7.2. Универсальность параметров модели Совпадение оценок α_{total} , полученных из:

- термодинамического КПД АТФ-синтазы [2] ($\alpha_{\text{total}} = 0.15\text{--}0.25$),
- отношения сигналов МТҮ при ингибировании дыхания ($\Delta T_{\text{phys}}/\Delta T_{\text{max,oligo}} \approx 0.6\text{--}0.8 \rightarrow \alpha_{\text{total}} = 0.15\text{--}0.25$) [5],

указывает на универсальность параметров модели и их независимость от конкретного объекта исследования.

7.3. Перспективы метода Разработка протоколов использования МТУ для измерения митохондриального термогенеза в различных модельных организмах, включая *Drosophila melanogaster* [9], открывает новые перспективы для изучения роли локальной диссипации энергии в физиологии и патологии. Сочетание МТУ с генетически кодируемыми датчиками температуры [5] создает методологическую основу для надежного и воспроизводимого измерения этого фундаментального параметра.

Заключение

1. **МТУ является катионным липофильным флуорофором** из семейства ксантенов, который накапливается в митохондриях благодаря мембранному потенциалу и связывается с компонентами внутренней мембраны [4]. Пространственная локализация зонда совпадает с областью генерации кванта метаболической мощности P , предсказанной моделью [1].
2. **Температурная чувствительность МТУ** обусловлена увеличением скорости безызлучательной релаксации флуорофора при повышении температуры микроокружения; сигнал специфичен к температуре и нечувствителен к изменениям рН, Ca^{2+} и активных форм кислорода [5].
3. **При ингибировании дыхательной цепи** наблюдается падение сигнала МТУ. Наибольший эффект вызывает олигомицин (17–19С), что соответствует ситуации полного преобразования энергии протон-движущей силы в тепло [5]. Относительная величина физиологического перегрева (10–15С) количественно согласуется с долей диссипируемой энергии $\alpha_{\text{total}} = 0.15\text{--}0.25$, полученной при калибровке модели на АТФ-синтазе [2].
4. **Установлена связь между сигналом МТУ и параметрами модели** (формула 9), позволяющая интерпретировать флуоресцентный сигнал как прямую меру кванта метаболической мощности.
5. **Независимым подтверждением** реальности наблюдаемого феномена и адекватности интерпретации сигнала МТУ служат данные, полученные с генетически кодируемым индикатором mito-gTEMP, которые количественно согласуются с измерениями МТУ в нескольких клеточных линиях [5].
6. **Выявлена клеточно-зависимая вариабельность** связывания МТУ, что в терминах модели соответствует различным значениям параметра консолидации k в разных клеточных линиях и требует осторожности при интерпретации данных [4].
7. **Полученные результаты подтверждают** фундаментальное положение модели [1] о неизбежности локальной диссипации энергии в работающих митохондриях как неизбежного следствия биохимии окислительного фосфорилирования [5] и открывают возможность использования МТУ для количественного мониторинга метаболической активности в реальном времени.

Список литературы

1. Полюков П.А. Теорема о неизбежной гибели: диссипативный цикл, реинвестирование и критерий выживания сложных систем. PREPRINTS.RU. 2026. <https://doi.org/10.24108/preprints-3114519>
2. Полюков П.А. Теорема о неизбежной гибели: приложения. PREPRINTS.RU. 2026. <https://doi.org/10.24108/preprints-3114620>
3. Chrétien D., Bénit P., Ha H.H. et al. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C. *PLoS Biology*. 2018. Vol. 16, no. 1. e2003992.
4. Chrétien D., Bénit P., Leroy C. et al. Pitfalls in Monitoring Mitochondrial Temperature Using Charged Thermosensitive Fluorophores. *Chemosensors*. 2020. Vol. 8, no. 4. 124.
5. Terzioglu M., Veeroja K., Montonen T. et al. Mitochondrial temperature homeostasis resists external metabolic stresses. *eLife*. 2023. Vol. 12. RP89232.
6. Nakano M., Arai Y., Kotera I. et al. Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. *PLoS One*. 2017. Vol. 12, no. 2. e0172344.
7. Fahimi P., Matta C.F. Rotational dynamics of ATP synthase: mechanical constraints and energy dissipative channels. *Pure and Applied Chemistry*. 2025. Vol. 97, no. 10. Pp. 1-14.
8. Mezzacappo N.F. et al. Uncovering the time-temperature thresholds of in vitro mitochondrial bioenergetics dysfunction under hyperthermic stress. *International Journal of Hyperthermia*. 2025. Vol. 42, no. 1. Article 2560017.
9. Shafqat B. The role of mitochondrial dysfunction in immune response and mitochondrial thermogenesis. Master's thesis, Tampere University. 2025.

Полюков Павел Александрович — автор теоремы о неизбежной гибели и диссипативной модели метаболизма. Область научных интересов: теоретическая биология, математическое моделирование сложных систем, термодинамика живых систем.

E-mail: polyukov.pavel@yandex.ru

ORCID: 0009-0003-3370-1348