**УДК 57.087.1**

# ОЦЕНКА ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ И МЕХАНИЗМА ИЗМЕНЕНИЯ РЕДОКС-БАЛАНСА В КЛЕТКАХ С ПАТОЛОГИЕЙ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

ПОГОНЯЛОВА М.Ю., ПОПОВ Д.Ю., КАЗАКОВ М.С., ШИТИКОВА Е.Ю., ВИНОКУРОВ А.Ю.

Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, г. Орёл, Россия, mpogonalova@gmail.com

Активные формы кислорода (АФК) включают свободные радикалы и нерадикальные молекулы, обладающие высокой реакционной способностью. Клетки характеризуются определенным уровнем образования АФК в свободном состоянии, а также возможностью его увеличения в ответ на внутренние и внешние стимулы. Кроме того, изменение уровня продукции АФК показано как часть многих патологических процессов. Основными источниками образования АФК являются клеточные органеллы, а также окислительно-восстановительные ферменты цитозоля и реакции, катализируемые ионами переходных металлов. Кроме того, в митохондриях АФК могут высвобождаться как в матрикс, так и в межмембранное пространство.

Для более полного анализа механизма патологии в клетках зачастую необходимо проводить оценку пространственной локализации продукции АФК. В частности, для этого широко применяются методы флуоресцентной микроскопии с применением зондов dihydroetidium и MitoTracker Red CM-H2XRos, что было использовано нами в исследовании механизма развития эндометриоза. Известно, что при эндометриозе наблюдается повышенная продукция АФК, и для нахождения потенциальных терапевтических мишеней для лечения заболевания необходимо установить локализацию этого процесса. Для оценки скорости продукции АФК в цитозоле и межмембранном пространстве митохондрий использовали ратиометрический зонд dihydroetidium (HEt) (5 мкМ) с длинами волн возбуждения для восстановленной формы 360 нм и для окисленной формы – 530 нм. Эксперимент проводили без предварительной инкубации клеток, чтобы избежать токсического эффекта продуктов окисления. Оценку образования АФК в матриксе митохондрий проводили с использованием зонда MitoTracker Red CM-H2XRos (500 нМ), который способен накапливаться в митохондриях и, в результате взаимодействия с АФК, приобретает способность к флуоресценции с максимумом поглощения на длине волны 561 нм. Перед экспериментом клетки инкубировали с зондом в течение 10 минут. Полученные результаты свидетельствуют о том, что несмотря на выявленную нами ранее митохондриальную дисфункцию, возникающую в данных клетках, основной вклад в гиперпродукцию АФК вносят не митохондрии, а цитозольный фермент НАДФН-оксидаза, высокая активность которого доказана в экспериментах с его ингибиторами – AEBSF и DPI.

Применение зондов dihydroetidium и MitoTracker Red CM-H2XRos также было использовано для выявления нарушений работы дыхательной цепи митохондрий в линиях цибридов при наличии ряда мутаций мтДНК. Экспериментально установлено, что в случае некоторых линий цибридов происходит увеличение АФК как в цитозоле клеток, так и в матриксе митохондрий; другие линии характеризуются снижением цитозольных АФК и незначительными изменениями в уровне митохондриальных АФК; в третьем случае при повышенном образовании АФК в матриксе митохондрий уровень окисления Het остается сравнимым с контролем.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации №075-15- 2022-1095.

© Погонялова М.Ю., Попов Д.Ю., Казаков М.С., Шитикова Е.Ю., Винокуров А.Ю., 2023