образования H2O2 в митохондриях. Подавление вышеописанных осцилляций ингибиторами фосфолипазы А2 мы связываем с отсутствием в матриксе свободных жирных кислот и невозможностью в этих условиях открытия липидной поры. В результате блокируется как выход ионов К+ и Са2+ из митохондрий, так и вход в них Н+ по концентрационному градиенту, тогда как индукция образования поры уравновешивает ионные градиенты через митохондриальную мембрану. Следовательно, открытие липидной поры обеспечивает К+/Н+ и Са2+/Н+ обмен в митохондриях. Участие Са2+-зависимой фосфолипазы А2 в этом процессе подтверждается тем, что ингибитор Са2+-независимой фосфолипазы А2 не влиял на описанные выше осцилляции. Этот путь, вероятно, играет защитную роль против токсичности Са2+ и АФК.

Открытие липидной поры, по полученным нами данным, снижает вероятность появления в митохондриях белковой поры, которая, как известно, ответственна за гибель клетки. Одной из особенностей липидной поры является её способность индуцироваться относительно небольшими количествами Са2+ т.е., эти поры появляются в митохондриальной мембране до того, как органеллы будут перегружены Са2+ до степени, запускающей открытие МРТ поры. Это предположение было подтверждено сравнительными исследованиями параметров образования липидной поры и МРТ поры в митохондриях разных тканей крыс с генетически измененной устойчивостью к гипоксии. Эксперименты показали, что митохондрии устойчивых к гипоксии животных более восприимчивы к открытию липидной поры и более устойчивы к открытию МРТ поры, по сравнению с органеллами чувствительных к гипоксии крыс. Результаты, полученные в этих экспериментах, нашли дальнейшее подтверждение при исследованиях на двух линиях крыс (Август и Вистар) с разным уровнем окислительного фосфорилирования (ОКСФОС). При этом крысы линии Август имели более высокую скорость дыхания и эффективность ОКСФОС, а также более высокие скорости транспорта калия и набухания митохондрий и более низкие скорости продукции H2O2. Они же были менее чувствительны к гипоксии и стрессу. При этом, липидные поры легче формировались в митохондриях резистентных к гипоксии крыс. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают предположение о том, что чем эффективнее работает липидная пора, тем труднее открывается белковая пора. Важно подчеркнуть, что образование липидных пор не разобщает ОКСФОС в митохондриях, позволяя органеллам поддерживать снабжение клеток энергией во время стресса. Следовательно, липидная пора может обеспечивать защиту от перегрузки митохондрий ионами Са2+. Это предположение также может объяснить эффекты ингибиторов фосфолипазы А2 на открытие МРТ поры, задокументированное группой Pfeiffer в 2006 г.

Работа поддержана грантом РНФ №23-25-00441.

**********

## Кальций-зависимая активация продукции митохондриальных АФК в клетках первичной культуры головного мозга

Стельмащук О.А.[1]*, Винокуров А.Ю.[1]
[1]*ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»;*
o.stelmashchuk@oreluniver.ru

Митохондрии представляют собой органеллы, участвующие в различных важных процессах в клетке. Помимо своей основной функции по выработке АТФ, митохондрии играют ключевую роль в регуляции передачи сигналов кальция, генерации активных форм кислорода и гибели клеток. Хотя все эти процессы подробно описаны, их взаимодействие при внутриклеточном распространении сигнала остается неясным. При этом для ряда заболеваний показана связь с перегрузкой митохондрий Са2+, что в сочетании с другими триггерами приводит к открытию митохондриальной поры (mPTP) и впоследствии запускает запрограммированную гибель клеток.

Взаимодействие АФК и митохондриального поглощения кальция исследовали в клетках первичной совместной культуры нейронов и астроцитов с помощью зондов MitoTracker Red CM-H2XRos (индикатор продукции АФК в митохондриальном матриксе), Fluo-4AM (флуоресцентный индикатор кальция в цитозоле) и X-Rhod-1, AM (флуоресцентный индикатор кальция в митохондриях).

Было обнаружено, что добавление АТФ или L-глутамата, запускающих передачу сигналов кальция в астроцитах и нейронах и инициирующих поглощение кальция митохондриями, приводит к стимулированию повышения уровня митохондриальных АФК в нейронах ($p = 0,035$) и астроцитах ($p < 0,01$). Ионофор Са2+ иономицин также активирует образование АФК в митохондриях. Са2+-индуцированное увеличение продукции АФК зависело от присутствия разобщителя FCCP ($p < 0,05$ от базового уровня в нейронах), а также ингибитора митохондриального комплекса I ротенона ($p < 0,05$ от базового уровня в астроцитах). Когда комплекс I ингибировался ротеноном, наблюдаемая продукция АФК значительно увеличивалась ($p < 0,001$) в условиях увеличения внутриклеточного Са2+, индуцированного иономицином. Возможно, увеличение АФК под влиянием

ономицина может быть связано с активностью комплекса II дыхательной цепи электронов и реверсным транспортом электронов с комплекса II на комплекс I.

Таким образом, поглощение кальция митохондриями нейронов и астроцитов в ответ на физиологически значимые стимулы приводит к генерации митохондриальных АФК, что может играть важную роль в развитии физиологии и заболеваний.

**********

## Кинетика и механизмы оксидативного гемолиза под действием азо- и пероксидного инициатора

Соколова Е.М.[1]*, Дубенская Н.А.[2], Психа Б.Л.[1], Нешев Н.И.[1]

[1]*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия;*

[2]*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*

sem89@icp.ac.ru

При нарушении работы антиоксидантной системы в клетках возрастает количество активных метаболитов кислорода, которые вызывают разнообразные оксидативные повреждения, приводящие клетку к окислительному стрессу [1]. Наиболее опасным проявлением окислительного стресса является пероксидное окисление липидов мембран (ПОЛ). В таком состоянии клетка перестает выполнять важные физиологические функции, что приводит к развитию ряда патологических состояний организма, среди которых сердечно сосудистые заболевания, сахарный диабет, различные формы нейродегенеративных заболеваний. Поэтому на сегодняшний день одним из базовых направлений химической биологии и медицинской химии остается поиск и исследование веществ, обладающих антиоксидантными свойствами и последующая разработка на их основе фармакологических препаратов. Это обуславливает актуальность и практическую значимость разработки биологических моделей, на которых осуществляется эффективное тестирование данных соединений на антиоксидантную активность. Эффективность разрабатываемой модели в первую очередь определяется качеством инициирования ПОЛ в биологическом субстрате, в качестве которого в нашей работе используются эритроциты и наличием надежного количественного критерия, что позволит эффективно дифференцировать про- и антиоксидантную составляющую в действии химических соединений на биологический объект.

Важным этапом в разработке такой модели, является подбор и исследование возможных химических инициатор пероксидного окисления липидов в мембране клетки, относящихся к разным классам химических соединений.

Данная работа посвящена исследованию пероксидного гемолиза эритроцитов под действием двух инициаторов пероксидного окисления липидов, 2,2'-Азобис (2-амидинопропан) дигидрохлорид (ААРН), относящийся к классу диазосоединений, и трет-бутилгидропероксид (t-BuOOH), из класса органических пероксидов.

ААРН в водной среде подвергается мономолекулярному терморазложению, с образованием двух алкильных радикалов и выделением молекулярного азота. Процесс протекает с достаточной эффективность уже при 35-40 ○С. В кислородной среде алкильные радикалы вступают в быструю реакцию с кислородом с образованием пероксильных радикалов, которые снаружи атакуют двойные связи мембранных липидов, инициируя ПОЛ в мембране.

Трет-бутилгидропероксид (t-BuOOH), в отличие от ААРН, не способен самопроизвольно распадаться на радикалы при физиологических температурах. Легко проникая через плазматическую мембрану клетки благодаря высоколипофильному третбутильному фрагменту, t-BuOOH запускает каскад сложных, до конца не изученных, реакций с участием гемоглобина, в ходе которых образуются радикальные продукты, инициирующие процесс ПОЛ в мембране.

Нами установлено, что под действием исследуемых инициаторов в мембране эритроцитов накапливаются соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты), главным из которых является малоновый диальдегид и наблюдается гемолиз эритроцитов, что согласуется с имеющимися литературными данными. В то же время кинетические закономерности гемолиза под действием данных соединений существенно различались.

В широком диапазоне концентраций была исследована кинетика гемолиза 0,2%-ной суспензии эритроцитов мыши под действием ААРН и t-BuOOH. Экспериментальные значения, характеризующие изменение степени гемолиза во времени, аппроксимировали в программе Origin сигмоидальной функцией Больцмана.Оба соединения вызывали концентрационнозависимый гемолитический эффект.

Гемолитическую активность ААРН и t-BuOOH характеризовали величиной периода индукции гемолиза, которую определяли графически по времени достижения 10% гемолиза. В случае ААРН период индукции гемолиза зависел от начальной концентрации инициатора линейно, тогда как аналогичная зависимость для t-