

ИНДУЦИРУЕМЫЙ ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ ПРОЦЕСС ФОРМИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПОР ВЫСОКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ: ЭНЕРГЕТИКА, СТЕХИОМЕТРИЯ, РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Головач Н.Г.¹, Чешевик В.Т.¹, Заводник Л.Б.²,
Лапшина Е.А.¹, Лучиц Т.В.¹, Заводник И.Б.¹

¹Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
Гродно, Беларусь,

²Гродненский государственный аграрный университет, Гродно,
Беларусь

Митохондрия является динамическими автономными органеллами, которые обеспечивают энергетический метаболизм, синтез АТФ, цикл окисления трикарбоновых кислот, β - окисление жирных кислот (Duchen 2004; Patergnani et al. 2011). Митохондрии также являются главными компонентами кальциевых сигнальных систем, которые модулируют амплитуду и пространственно-временные характеристики кальциевого сигнала и представляют важнейший центр запасаения ионов Ca^{2+} в клетке (Patergnani et al. 2011). Ряд факторов обеспечивает быстрое пространственное изменение концентрации кальция в различных частях цитозоля клетки, что позволяет разным кальциевым сигналам быть пространственно разделенными внутри одной клетки. Клеточный и митохондриальный гомеостаз ионов Ca^{2+} играет существенную роль в метаболизме, пролиферации и дифференциации клеток, активации генов, в процессах выживания и смерти клеток (Patergnani et al. 2011; Rizzuto et al. 2012). Основная роль митохондриального Ca^{2+} заключается в стимуляции Oх-Phos ферментов и дегидрогеназ матрикса митохондрий (Rizzuto et al. 2012). Более того, ионы Ca^{2+} определяют скорость генерации ROS митохондриями (Armstrong et al. 2004).

Митохондрии являются основными клеточными мишенями окислительного стресса. Известно, что окислительный стресс и нарушение Ca^{2+} -гомеостаза может привести к дисфункции митохондрий посредством активации процесса формирования пор высокой проницаемости (mitochondrial inner membrane permeability transition, MPT) (Orrenius et al. 2003). MPT пора является неселективным кальций-чувствительным каналом, который делает возможной неселективную диффузию растворенных веществ (<1500 Da) и играет определяющую роль в смерти клетки (Armstrong et al. 2004; Orrenius et al. 2003; Kowaltowski et al. 2001).

Открытие этой cyclosporine A (CsA)-чувствительной и Ca^{2+} -зависимой поры высокой проводимости вызывает коллапс мембранного потенциала, набухание митохондрий, разрыв мембраны и выброс ионов Ca^{2+} , низкомолекулярных метаболитов и сигнальных молекул, включающих апоптоз (Orrenius et al. 2003).

Цель настоящей работы - выяснить эффекты ионов Ca^{2+} на функциональную активность митохондрий, оценить параметры Ca^{2+} -индуцируемого процесса формирования МРТ пор, определить влияние окислителей, терт-бутилгидропероксида (tBHP) и гипохлорной кислоты (HOCl), на Ca^{2+} -индуцированный процесс МРТ в изолированных митохондриях печени крыс.

В нашем эксперименте ионы Ca^{2+} (5-50 мкМ) в среде, не содержащей EGTA, эффективно ингибировали респираторную активность митохондрий, нарушая сопряжение реакций окисления и фосфорилирования и не изменяя коэффициента фосфорилирования АДР/О. Ионы Ca^{2+} (20-300 мкМ) стимулировали в энергизованных митохондриях процесс МРТ. Из графика Хилла зависимости скорости МРТ от концентрации Ca^{2+} мы определили порядок взаимодействия ионов Ca^{2+} с митохондриальными центрами, $n=3$, и кажущуюся константу диссоциации $K_d=60\pm 12$ мкМ. Используя график Лайнуивера-Берка мы определили кажущуюся K_m взаимодействия ионов Ca^{2+} с митохондриями, которая составила 75 ± 20 мкМ, в то время как K_m в присутствии 300 мкМ tBHP составила 120 ± 20 мкМ. График Аррениуса зависимости от температуры скорости формирования пор высокой проницаемости в митохондриях печени крыс имеет излом ($30-34^\circ\text{C}$), связанный, вероятно, с температурно-индуцируемой перестройкой митохондриальной мембраны. Энергия активации процесса МРТ равна 130 ± 20 кДж/моль при температурах ниже точки излома на графике Аррениуса, что соответствует энергии денатурации белков, и 50 ± 9 кДж/моль при более высоких температурах, что соответствует энергии фазового перехода липидного бислоя. Быстрое падение уровня митохондриального NADH и деполяризация мембраны ионами Ca^{2+} предшествовали началу Ca^{2+} -индуцируемого МРТ и ионы Mg^{2+} ингибировали диссипацию мембранного потенциала. Кажущаяся константа взаимодействия окислителя tBHP с митохондриями в реакции набухания составила 11 ± 3 мкМ. Мы продемонстрировали противоположные эффекты tBHP и HOCl на МРТ: tBHP дозозависимо повышал скорость МРТ, в то время как HOCl ингибировала МРТ. Ранее было показано, что вероятность открытия пор высокой проницаемости определяется реакцией тиол-дисульфидного обмена тиолов митохондриальной мембраны (Petronilli, 1994). Мы предполагаем, что разнонаправленные эффекты окислителей tBHP и HOCl связаны с тем, что tBHP

сдвигает редокс-состояние тиолов в сторону образования дисульфидной формы, что соответствует открытию поры, а HOCl модифицирует тиольные группы, предотвращая образование дисульфида и открытие поры.

РОЛЬ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОМ В ЗАЩИТЕ ЭРИТРОЦИТОВ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ИНИЦИИРОВАННОГО ХЛОРНОВАТИСТОЙ КИСЛОТОЙ

**Григорьева Д.В.¹, Горудко И.В.¹, Терехова М.С.¹, Шамова Е.В.¹,
Панасенко О.М.², Шумаев К.Б.³, Ванин А.Ф.⁴, Черенкевич С.Н.¹**

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

²*ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической
медицины ФМБА», Москва, Россия*

³*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

⁴*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия*

Одним из наиболее важных молекулярных предшественников свободных радикалов в организме является хлорноватистая кислота (HOCl), образующаяся в реакциях, катализируемых, главным образом, ферментом азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидазой. HOCl , являясь сильным окислителем, играет важную роль в уничтожении патогенов. Однако, благодаря повышенной реакционной способности, HOCl реагирует со многими биологически важными молекулами, оказывая цитотоксический эффект и инициируя развитие целого ряда социально-значимых заболеваний, сопряженных с окислительным/галогенирующим стрессом и воспалительной реакцией организма [1]. Эритроциты крови человека широко используются как модельная система для изучения механизмов опосредованного нейтрофилами повреждения клеток. В настоящее время хорошо изучены механизмы повреждающего действия гипогалоидных кислот на эритроциты, в результате которого изменяются свойства плазматической мембраны клеток, что ведет к ухудшению деформируемости эритроцитов и гемолизу по коллоидно-осмотическому механизму [2]. В связи с этим актуальным является поиск соединений, способных нейтрализовать цитотоксические эффекты гипогалоидных кислот. Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ) образуются в