

ЛИТЕРАТУРА

1. Бокерия Л.А., Парцхалаишвили З.К., Сигаев И.Ю. и др. Современные подходы к диагностике и хирургическому лечению брахиоцефальных артерий у больных ишемической болезнью сердца // Вестник РАМН. – 2012. – № 10. – С. 4–11.
2. Карпенко А.А., Кужугет Р.А., Каменская О.В. и др. Прогностическое значение церебральной оксигенации и ретроградного давления при каротидной эндартерэктомии // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2016. – Т. 20, № 3. – С. 95–103.
3. Jeevarethinam A. Usefulness of carotid plaques as redpictors of obstructive coronary artery disease and cardiovascular events in asymptomatic individuals with diabetes mellitus // Am. J. Cardiol. – 2018. – Vol. 121, № 8. – P. 910–916.
4. Hametner C., Stanarcevic P., Stampfl S. et al. Noninvasive cerebral oximetry during endovascular therapy for acute ischemic stroke: an observational study // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2015. – Vol. 35, № 11. – P. 1722–1728.

## РЕГУЛЯЦИЯ ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ И ФЛАВОНОИДАМИ РЕСПИРАТОРНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ

Заводник И. Б., Коваленя Т. А., Лапшина Е. А., Ильич Т. В.,  
Чёрная М. Н.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

**Введение.** Митохондрии, динамичные и пластичные клеточные органеллы, биохимически обеспечивающие энергосистему клетки [3]. Адаптивные функциональные перестройки митохондрий обеспечивают клеточный гомеостаз и сопряжены с изменениями митохондриального метаболизма, морфологии, подвижности, локализации в цитоплазме. Ансамбль митохондрий (митохондриом) в клетке функционирует как интегрированная сеть, митохондрии перемещаются вдоль микротрубочек внутри клеток и изменяет свою морфологию путем слияния и деления, эти процессы регулируются митохондриальным  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) [2]. Митохондрии выполняют функцию основного сенсора, регулятора и депо ионов кальция, интегратора и декодера кальциевого сигнала [1, 4]. Специфичность клеточных кальциевых сигналов контролируется многочисленными ионными каналами, насосами и обменниками, регулируемыми потоки ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке, центральную роль в гомеостазе клеточного  $\text{Ca}^{2+}$  играют две депонирующие органеллы: эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Нарушения  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостаза и митохондриальной  $\text{Ca}^{2+}$  сигнализации имеют определяющее значение в развитии нарушений митохондриальной активности и морфологии, играют важную роль в патобиохимических механизмах онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний [5]. Известен фундаментальный молекулярный механизм, обеспечивающий перенос ионов кальция через внутреннюю митохондриальную мембрану, который включает низкоаффинный электрогенный митохондриальный кальциевый унипортер (mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -

uniporter, MCU или трансмембранный белок CCDC109A), антипортеры  $\text{Ca}^{2+}/n\text{Na}^+$  (NCLX) – и  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (LETM1), катализирующие экспорт ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , а также митохондриальный рианодиновый рецептор и образование пор высокой проницаемости (MPTP, mitochondrial permeability transition pore) [4].

**Цель.** Выяснить механизмы регуляции ионами кальция структуры и функциональной активности изолированных митохондрий печени крыс и проапоптотического процесса формирования MPTP. Мы морфометрически оценили ультраструктурные нарушения митохондрий индуцируемые ионами кальция и сопоставили эти нарушения с процессом формирования MPTP, изменением респираторной активности митохондрий. Мы также изучили возможность модулировать  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые эффекты в митохондриях флавоноидами, которые принадлежат к различным классам (флаванон нарингенин, его гликозид нарингин, водорастворимый флаванол (флаван-3-ол) катехин).

**Методы исследования.** В работе использовали: сахарозу, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис-НCl), нарингенин, нарингин, катехин, этиленгликоль-бис (2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N', N'-тетрауксусная кислота (ЭГТА), аденозиндифосфат (АДФ), кальция хлорид, Рутений красный, производства Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США или Steinheim, Германия) или АО Реахим (Россия). Митохондрии изолировали методом дифференциального центрифугирования [6]. Печень крыс-самцов линии Wistar (120-140 г) быстро извлекали на холоду ( $4^{\circ}\text{C}$ ), осушали, взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе (тефлон-стекло) (600 об/мин, 1 мин) в охлажденной среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,02 М Трис-НCl и 0,001 М ЭДТА, pH 7,2, при  $4^{\circ}\text{C}$ . Для осаждения митохондрий полученный супернатант центрифугировали (8500 g, 10 мин,  $4^{\circ}\text{C}$ ), митохондриальный осадок ресуспендировали в среде, не содержащей ЭДТА (0,15 М KCl, 0,02 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4). Все манипуляции с животными, выполняемые в эксперименте, были одобрены Этическим комитетом Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. Респираторную активность изолированных митохондрий (0,5 мг белка/мл) регистрировали, используя электрод Кларка (Hansatech Instruments Limited, Великобритания) при постоянном легком перемешивании в среде 0.125 М KCl, 0.05 М сахарозы, 0.01 М Tris-НCl, 0.0025 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.005 М  $\text{MgSO}_4$ , pH 7,2,  $25^{\circ}\text{C}$ .  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемое набухание митохондрий печени крыс регистрировали как изменение величины оптической плотности суспензии митохондрий (0,5 мг белка/мл) на длине волны 520 нм. Результаты экспериментов выражали как среднее значение  $S \pm \text{SEM}$ . Различия между значениями параметров, измеренных в группах, анализировали с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистический анализ проводили с использованием прикладных программ STATISTICA 6.0. Уровень значимости был установлен на уровне  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Митохондрии обладали типичной ортодоксальной структурой с выраженной внутренней мембраной и кристами. В присутствии экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  (20-60 мкМ) выражено возрастала гетерогенность митохондрий по размерам и электронной плотности,

большинство органелл характеризовались набухшим электронно-светлым матриксом, удлинёнными кристами и уменьшенным их числом, были значительно крупнее основной популяции контрольных митохондрий и лишены нативной структуры внутренней мембраны, вплоть до ее отслоения, часть митохондрий отличалась несколько более электронно-плотным матриксом (конденсированные митохондрии). Индуцируемые ионами экзогенного кальция ультраструктурные нарушения коррелировали с эффективным ингибированием респираторной активности митохондрий печени крыс и формированием пор высокой проницаемости (МРТР).

Митохондриальный  $\text{Ca}^{2+}$  является ключевым регулятором клеточного энергетического метаболизма благодаря  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции митохондриальных ферментов. В среде, не содержащей ЭГТА, ионы экзогенного кальция (10-50 мкМ) эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс: скорость АДФ-стимулируемого потребления кислорода  $V_3$  значительно уменьшалась, скорость субстрат-зависимого потребления  $V_2$  возрастала, коэффициент дыхательного контроля  $V_3/V_2$  уменьшался до 1, коэффициент фосфорилирования АДФ/О уменьшался до 0, свидетельствуя о полном нарушении сопряжения окисления и фосфорилирования, что подтверждают наши предыдущие наблюдения в случае глутамат-энергизованных митохондрий. Параллельно, используемые концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  индуцировали выраженное набухание митохондрий, регистрируемое как изменение светорассеяния митохондриальной суспензии в результате формирования пор высокой проницаемости.

Флавоноиды катехин (10-25 мкМ), нарингенин, но не гликозид нарингин, ингибировали респираторную активность митохондрий *in vitro*, уменьшая скорость потребления кислорода  $V_3$ , коэффициенты акцепторного контроля ( $V_3/V_2$ ) и фосфорилирования (АДФ/О). Подобным образом, предварительное внесение флавоноидов (10-25 мкМ), нарингенина, нарингина, катехина, в митохондриальную суспензию дозозависимо стимулировало процесс МРТ в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Рутений красный ингибирует формирование пор высокой проницаемости. Мы предполагаем, что эффект флавоноидов опосредован стимулированием  $\text{Ca}^{2+}$  унипортера.

**Выводы.** Таким образом, митохондриальный захват (и выброс) ионов  $\text{Ca}^{2+}$  выполняют несколько функций: регуляция локального уровня ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме, регуляция скорости дыхания и продукции АТФ, проапоптотическое формирование МРТР,  $\text{Ca}^{2+}$  – зависимая секреция. Индуцируемые ионами экзогенного кальция ультраструктурные нарушения коррелировали с эффективным ингибированием респираторной активности митохондрий печени крыс и формированием пор высокой проницаемости.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Заводник И.Б. Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, № 3. – С. 311–317.
2. Fatiga F.F., Wang L.-J., Hsu T. et. al. Miro1 functions as an inhibitory regulator of MFN at elevated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  levels // Journal of Cellular Biochemistry. – 2021. – Vol. 122, № 12. – P. 1848–1862.

3. Folmes C.D.L., Dzeja P.P., Nelson T.J. et. al. Mitochondria in control of cell fate // *Circulation Research*. – 2012. – Vol. 110, № 4. – P. 526–529.
4. Garbincius J. F., Elrod J.W. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease // *Physiological Reviews*. – 2021. – Vol. 102, № 2. – P. 893–992.
5. Gilbert G., Demydenko K., Dries E. et. al. Calcium Signaling in Cardiomyocyte Function // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2020. – Vol. 12, № 3. – P. 1–29.
6. Johnson D., Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria // *Methods in Enzymology*. – 1967. – Vol. 10. – P. 94–101.
7. Lagoa R., Graziani I., López-Sánchez C. et. al. Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – Vol. 1807, № 12. – P. 1562–1572.

## ВЛИЯНИЕ КОРВИТИНА НА ГАЗОТРАНСМИТТЕРЫ КРОВИ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Засимович В. Н.<sup>1</sup>, Иоскевич Н. Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Брестская областная клиническая больница, Брест, Беларусь

<sup>2</sup>Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

**Введение.** Одной из основных причин недостаточной эффективности реконструктивно-восстановительных сосудистых вмешательств при облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей является развитие реперфузионно-реоксигенационного синдрома (РРС) [1]. РРС пролонгирует и усугубляет ишемию ревазуляризированных тканей вплоть до необходимости ампутации нижней конечности, не смотря на технический успех операции [2]. Одним из важных звеньев развития ишемии-реперфузии являются нарушения системы газотрансмиттеров (ГТ) и их влияние на кислородтранспортную функцию (КТФ) и прооксидантно-антиоксидантное состояние (ПАС) крови [3]. В последние годы появились сообщения об использовании биофлавоноида корвитин для метаболической защиты головного мозга и миокарда от реперфузионных повреждений [4].

**Цель.** Изучить влияние лекарственного средства корвитин на содержание ГТ монооксида азота (NO) и сероводорода (H<sub>2</sub>S) в венозной крови предплечья после ревазуляризации нижней конечности при хронической атеросклеротической окклюзии поверхностной бедренной артерии (ПБА).

**Методы исследования.** В исследование включены 118 пациентов-мужчин. Из них 15 без проявлений атеросклероза составили контрольную группу, 103 – имели хроническую атеросклеротическую окклюзию ПБА. Средний возраст здоровых лиц 61,08±1,14 года, пациентов с атеросклерозом – 60,64±1,12 года. По классификации хронической артериальной недостаточности нижних конечностей (ХАННК) Fontaine-Покровского наблюдения разделились: ПБ стадия диагностирована в 31 случае с лодыжечно-плечевым индексом (ЛПИ) 0,55±0,03; III стадия – в 44 (ЛПИ 0,44±0,03); IV – в