

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИНДУКТОРОВ ФЕРРОПТОЗА НА МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА КРЫСЫ

© 2021 г. А.С. Фефлер*, М.В. Иванова**, К.Б. Шумаев**, ***, Э.К. Рууге*, **

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

**ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» МЗ РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

***ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2

E-mail: ruuge@mail.ru

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 30.12.2020 г.

Принята к публикации 15.01.2021 г.

С помощью оптической спектроскопии проведено исследование моделей окисления липидов мембран митохондрий сердца крысы. Эффективность окислительного действия тестируемых железосодержащих комплексов оценивали по уровню образующихся в пробах ТБК-реактивных соединений как основных вторичных продуктов перекисного окисления. За изменением структурно-конформационных характеристик липидов митохондриальных мембран под действием инициаторов окисления следили с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых меток. Для наблюдения за изменениями суспензии митохондрий некоторое время выдерживали с прооксидантами (как правило, миоглобин с гидропероксидом кумола). В качестве спиновых меток были использованы 5-доксилстеариновая и 16-доксилстеариновая кислоты, парамагнитные NO-фрагменты которых прикреплены к разным участкам углеводородной цепи. Использованные модели окисления позволили получить препараты мембран митохондрий с разной степенью окислительной модификации. Установлено, что инициаторы окисления гидропероксид кумола (или трет-бутила) с миоглобином приводили к потере парамагнетизма встроенных в мембраны спиновых меток

Ключевые слова: ферроптоз, сердце, митохондрии, окисление липидов, спиновые метки, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302921020083

Термин ферроптоз для описания нового механизма регулируемой клеточной гибели был впервые предложен в 2012 г. [1]. Ферроптоз — это процесс гибели клеток, зависящий от железа и активных форм кислорода. Среди цитологических изменений при ферроптозе отмечают уменьшение или исчезновение митохондриальных крист и разрыв внешней мембраны митохондрий [2]. Эти внутриклеточные аномалии являются результатом потери селективной проницаемости плазматической мембраны из-за интенсивного перекисного окисления липидов и развития окислительного стресса. Гибель ферроптотических клеток может быть остановлена липофильными антиоксидантами, хелаторами железа и истощением полиненасыщенных ацилов жирных

кислот фосфолипидов, которые являются основными субстратами летальных для клеток процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов [3, 4]. Ферроптоз является основным механизмом гибели клеток, связанным с повреждением органов в условиях гипоксии, включая ишемические заболевания сердца, повреждение головного мозга и почечную недостаточность [5].

Ряд исследований продемонстрировал, что митохондрии играют решающую роль в ферроптозе, вызванном истощением цистеина, но не при ингибировании GPX4 [5]. Снижение уровня цистеина приводит к повышению потенциала (гиперполяризации) митохондриальной мембраны и накоплению липидных пероксидов. Ингибирование митохондриального цикла трикарбоновых кислот или цепи переноса электронов снижает гиперполяризацию митохондриальной мембраны, накопление перекисей липидов и ферроптоз [5]. Повышение потенциала митохон-

Сокращения: CumOON — гидропероксид кумола, *t*-BuOON — трет-бутилгидропероксид, МДА — малоновый альдегид, ТБК — тиобарбитуровая кислота, 5DS — 5-доксилстеариновая кислота, 16DS — 16-доксилстеариновая кислота.

дриальной мембраны отражает увеличение активности митохондриальной цепи переноса электронов и последующее образование АФК, что объясняет его роль в ферроптозе [5].

Митохондрии являются органеллами, играющими ключевую роль в окислительном метаболизме. В связи с этим важно, что ферроптоз связан с морфологическими изменениями митохондрий и окислением основного фосфолипида этих органелл – кардиолипина [4, 6], причем мишенями действия некоторых мощных ингибиторов ферроптоза, по-видимому, являются митохондрии [4, 5].

Целью настоящей работы было выяснение механизмов воздействия железосодержащих соединений – возможных индукторов ферроптоза – на мембраны митохондрий. С использованием оптической спектроскопии были изучены несколько моделей окисления липидов мембран митохондрий сердца крысы. В качестве окислителей использовали железосодержащие белки (миоглобин, гемоглобин, ферритин) или ионы Fe^{2+} в сочетании с органическими гидропероксидами, гидропероксидом кумола или трет-бутил гидропероксидом. С помощью спектроскопии ЭПР спиновых меток было изучено взаимодействие 5-доксил- и 16-доксилпроизводных стеариновой кислоты с липидами в митохондриальных мембранах под действием инициаторов окисления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение изолированных митохондрий. Митохондрии выделяли из сердец крыс линии Wistar (масса животных 250–300 г) методом дифференциального центрифугирования. Среда выделения содержала 70 мМ сахарозы, 50 мМ HEPES, 220 мМ маннитола, 1 мМ EDTA, pH 7.4. Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре 0–4°C. После анестезии крысы внутрибрюшинным введением уретана (1.8 г/кг массы животного) сердце вырезали и помещали в стаканчик с охлажденной средой выделения. Сердце перекладывали в охлажденную чашку Петри, освобождали от предсердий и надрезали с боков четыре раза (для лучшей отмывки от крови). После этого сердце измельчали ножницами, снова промывали раствором среды выделения и пропускали через сито из нержавеющей стали с диаметром отверстий 0.8 мм. Далее измельченную ткань переносили в гомогенизатор (стекло–тефлон), добавляли 25–30 мл среды выделения до соотношения ткань/среда выделения 1:8 и гомогенизировали две-три минуты до превращения суспензии в гомогенную. Осаждение митохондрий производили в два этапа на центрифуге К-24 (ГДР). После первого центрифугирования (10 мин, 700 g), супернатант, в котором содержа-

лись митохондрии, фильтровали и снова центрифугировали в течение 10 мин при 14000 g. Осадок, суспендировали в 0,2 мл среды выделения с бычьим сывороточным альбумином (3 мг/мл), переносили в маленькую пробирку и хранили во льду. Концентрация белка в митохондриальной суспензии, определенная по методу Лоури, составляла 30–35 мг/мл.

Окисление митохондрий. Окисление митохондрий (0.4 мг белка/мл) проводили в условиях интенсивного перемешивания при комнатной температуре в стеклянных пробирках ($d = 25$ мм, $h = 80$ мм). Среда инкубирования содержала 0.15 М KCl и 50 мМ К-фосфатный буфер, pH 7.4. Конечная концентрация инициатора окисления, гидропероксида кумола (CumOON) или *трет*-бутилгидропероксида (*t*-BuOON), составляла 1.6 мМ. Для приготовления исходного водного раствора *трет*-бутилгидропероксида добавляли 30 мкл 70% *t*-BuOON в 1 мл H_2O . Для приготовления исходного спиртового раствора гидропероксида кумола растворяли 50 мкл 80% CumOON в 1 мл этанола. Для запуска окисления к препаратам митохондрий добавляли различные комплексы железа: 7 мкМ метмиоглобина, 1.9 мкМ метгемоглобина, 2.8 мкМ ферритина, 38.1 мкМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (соли Мора). Концентрацию малонового альдегида (МДА) определяли по методу, описанному в работе [8], с незначительными модификациями. Отбирали по 1 мл смеси до введения инициаторов окисления, сразу после введения гидропероксида кумола (или *трет*-бутилгидропероксида), затем через 5, 10, 20, 30 мин после начала окисления, к отобраным образцам добавляли 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТБК) и 10 мкл 5 мМ бутилгидрокситолуола. Далее образцы перемешивали на вортексе, 45 мин выдерживали в кипящей водяной бане, охлаждали и центрифугировали 5 мин при 3000 g. В надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность при $\lambda = 532$ нм (максимум поглощения триметинового комплекса ТБК-МДА). Концентрацию МДА вычисляли, используя коэффициент молярной экстинкции для комплекса ТБК-МДА $\epsilon = 1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [7]. Измерения проводили на спектрофотометре Cary 60 (Agilent, Австралия).

Спектроскопия ЭПР спиновых меток 5-доксил- и 16-доксилпроизводных стеариновой кислоты. Ферроптоз приводит к повреждению внешней и внутренней митохондриальных мембран [3]. Метод спиновых меток является одним из способов, который позволяет следить за изменением структурно-конформационных характеристик липидов митохондриальных мембран под действием инициаторов окисления. Для наблюдения за указанными изменениями суспензии митохондрий

выдерживали некоторое время с прооксидантами (как правило, миоглобин с гидропероксидом кумола).

Регистрацию и анализ спектров ЭПР проводили на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 (УП «КБСТ» БГУ, Беларусь). Реакционную смесь вводили в газопроницаемую PTFE Sub-Lite-Wall капиллярную трубку (внутренний диаметр 0.635 мм, толщина стенки 0.051 мм) фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Капиллярная трубка дважды складывали и вставляли в кварцевую трубку диаметром ~4 мм, открытую с обоих концов. Это обеспечивало доступ воздуха (содержит ~21% O₂) к образцу в резонаторе спектрометра ЭПР во время регистрации спектра.

Характерные спектры 5-доксил- (5DS) и 16-доксилпроизводных (16DS) стеариновой кислоты в биологических мембранах представлены на рис. 1. Спектры ЭПР нитроксильных радикалов чувствительны к изменениям их молекулярной подвижности и физико-химических свойств окружающей среды [9]. 5DS и 16DS характеризуются разной глубиной погружения своего парамагнитного NO-фрагмента в липидный бислой и соответственно разными скоростями вращательной диффузии. На рис. 1 показаны необходимые для анализа спектров ЭПР 5DS и 16DS параметры [8, 9]:

1) параметр порядка S , определяемый по формуле

$$S = (A'_{\parallel} - A'_{\perp}) / [A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})] \cdot a/a'$$

где $A'_{\parallel} = 1/2\Delta H_{\parallel}$ и $A'_{\perp} \approx 1/2\Delta H_{\perp}$,

$$a' = 1/3(A'_{\parallel} + 2A'_{\perp}),$$

$$a = 1/3(A_{zz} + A_{xx} + A_{yy});$$

2) время корреляции вращательной диффузии, оцениваемое по формулам

$$\tau_{+1} = 6.5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_{+1} [(I_{+1}/I_{-1})^{1/2} - 1], \text{ с},$$

$$\text{или } \tau_0 = 6.65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_0 [(I_0/I_{-1})^{1/2} - 1], \text{ с};$$

3) параметр p/h , позволяющий оценить соотношение метки, растворенной в полярной среде, к метке, встроенной в липиды биологических мембран.

В качестве объекта исследования использовали спин-меченую суспензию митохондрий сердца крысы, содержащую 100 мкМ 5DS или 100 мкМ 16DS. Запись спектров ЭПР 5-доксил- и 16-доксилпроизводных стеариновой кислоты проводили при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении. Условия записи спектров ЭПР: ослабление СВЧ-мощности 5–10 дБ, амплитуда ВЧ-модуляции 0.1–0.2 мТл, коэффициент усиления 100–1000, диапазон раз-

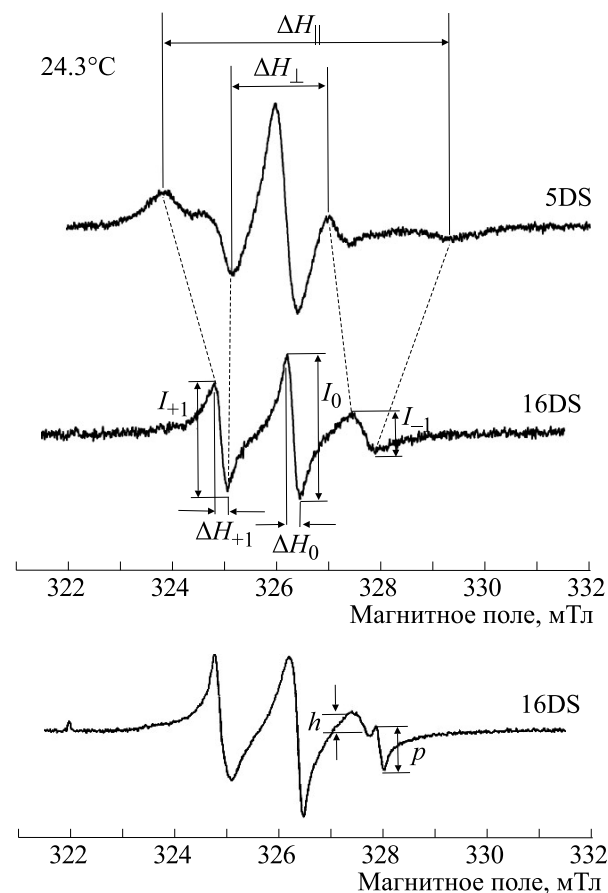


Рис. 1. Спектры ЭПР 5-доксил- и 16-доксилпроизводных стеариновой кислоты в биологических мембранах.

вертки 10 мТл. Выбор параметров определялся требованием достижения максимальной чувствительности при неискаженной форме сигнала.

Реактивы. В работе использовали реактивы фирм Sigma (США), ICN (США), Serva (ФРГ), Aldrich (США) и других.

Статистический анализ. Эксперименты с каждой концентрацией исследуемых веществ проводили в трех-пяти повторях. Для экспериментальных групп вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для сравнения средних значений использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Даннета для оценки достоверности отличий между группами, различия между группами считали значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие окислителей с изолированными митохондриями. В качестве окислителей в работе использовали белки, содержащие редокс-активное железо (миоглобин или гемоглобин) и ионы

Концентрации инициаторов окисления в среде инкубации

Миоглобин	Гемоглобин	Соль Мора	Ферритин	CumOON	<i>t</i> -BuOON
7 мкМ	1.9 мкМ	38.1 мкМ	2.84 мкМ	1.6 мМ	1.6 мМ

Fe^{2+} (соль Мора) в сочетании с органическими гидропероксидами: миоглобин + CumOON, миоглобин + *t*-BuOON, ферритин + CumOON, ферритин + *t*-BuOON, гемоглобин + CumOON, Fe^{2+} + *t*-BuOON, Fe^{2+} + CumOON. Концентрации соединений в среде инкубации митохондрий указаны в таблице.

Эффективность окислительного действия тестируемых железосодержащих комплексов оценивали по образованию ТБК-реактивных соединений (МДА и другие карбонильные вторичные продукты перекисного окисления).

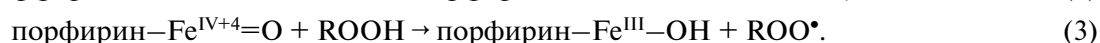
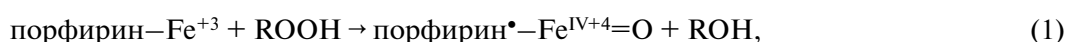
Данные о накоплении продуктов перекисного окисления мембран митохондрий в присутствии различных инициаторов окисления представлены на рис. 2. Из этого рисунка видно, что комбинация гидропероксида кумола с миоглобином и гемоглобином оказывала наибольшее влияние на мембраны митохондрий: за 30 мин окисления в суспензии митохондрий образовывался МДА в количестве 14–16 нмоль/мг белка, т. е. в три раза больше, чем при добавлении других использованных в работе прооксидантов.

Следует отметить, что CumOON более липофильное соединение, чем *t*-BuOON. Логарифмы коэффициентов распределения этих соединений в системе «1-октанол — вода» равны 2.6 для гидропероксида кумола [11] и –1.3 для *трет*-бутилгидро-

ропероксида [12]. Гидропероксид кумола находится в основном в липидной фазе, а *трет*-бутилгидропероксид — в водной фазе. Этим можно объяснить больший эффект гидропероксида кумола на окисление мембран митохондрий по сравнению с *трет*-бутилгидропероксидом.

Различие в действии гемопротеидов, использованных для инициации окисления, возможно, вызвано отличием редокс-потенциалов ионов железа в составе миоглобина и гемоглобина. Согласно литературным данным [13], E_0' , измеренные при pH 7.0 по отношению к Ag/AgCl-электроду, равны –155 мВ и –52 мВ для миоглобина и тетрамерного гемоглобина А соответственно.

Следует отметить, что в реакциях ионов Fe^{+2} с различными гидропероксидами (так называемых реакциях Фентоновского типа) образуются свободные радикалы [4, 14]. Эти реакции играют ключевую роль в цепных процессах перекисного окисления липидов, в том числе при ферроптозе [14]. Из ферритина железо также высвобождается в виде ионов двухвалентного железа [15]. Вместе с тем при взаимодействии органических гидропероксидов с метгемом (порфирина– Fe^{+3}) кроме алкоксильных ($\text{RO}^\bullet$) и алкилпероксильных радикалов ($\text{ROO}^\bullet$) формируется оксоферрильная форма гема (порфирина– $\text{Fe}^{\text{IV}+4}=\text{O}$) [16, 17]:



Известно, что оксоферрильные формы гемопротеидов являются чрезвычайно сильными окислителями, участвующими в окислительной модификации важных биомолекул [16].

Взаимодействие спин-меченых производных стеариновой кислоты с мембранами митохондрий. На рис. 3 представлены спектры ЭПР 5-доксилстеариновой кислоты и 16-доксилстеариновой кислоты в суспензии митохондрий сердца крысы, записанные при комнатной температуре (~25°C) до добавки в реакционную смесь окислителей — индукторов ферроптоза.

Приведенные на рис. 3 спектр 5DS характерен для медленной вращательной диффузии спиновой метки при наличии более быстрого анизотропного вращения вокруг длинной оси молеку-

лы стеариновой кислоты. Спектральные параметры 5DS свидетельствуют также о локализации NO-фрагмента метки вблизи поверхности липидного бислоя мембран митохондрий. Вращательную диффузию 5DS в мембране можно характеризовать расстоянием между крайними экстремумами и/или параметром порядка S (см. Материалы и методы). Эти параметры следующие:

$$\Delta H_{\parallel} = 5.31 \text{ мТл}, \Delta H_{\perp} = 1.81 \text{ мТл}, S = 0.65.$$

Вращательная диффузия 16DS в мембранах митохондрий характеризуется временами корреляции и степенью анизотропии вращательного движения:

$$\tau_0 = 1.36 \cdot 10^{-9} \text{ с}, \tau_{+1} = 1.04 \cdot 10^{-9} \text{ с}, \tau_{+1}/\tau_0 = 0.76.$$

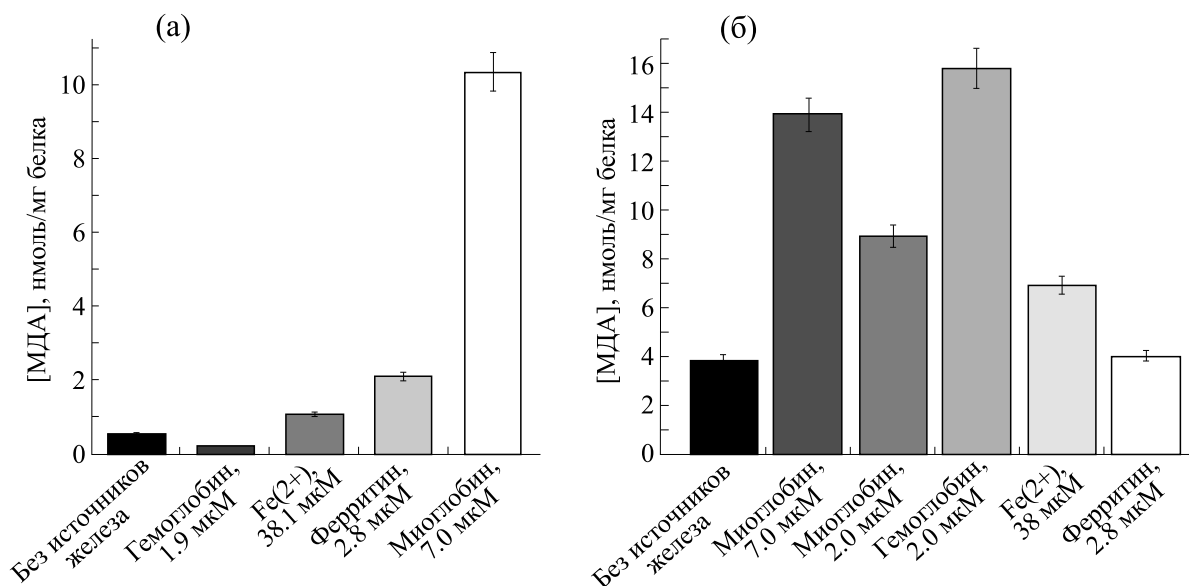


Рис. 2. Накопление МДА в суспензии митохондрий через 30 мин после добавления инициаторов окисления: (а) — соединений железа и 1,6 мМ *трет*-бутилгидропероксида; (б) — соединений железа и 1,6 мМ гидропероксида кумола.

Приведенные выше спектральные параметры являются весьма характерными для многих спин-меченых радикалами 5DS и 16DS биологических мембран.

На рис. 4а,б представлены спектры ЭПР 5DS и 16DS, записанные после добавления в инкубационную смесь возможных индукторов ферроптоза — соединений, вызывающих окисление липидов митохондриальных мембран. Добавленные инициаторы окисления (гидропероксид кумола или смесь гидропероксида кумола с миоглобином) приводили к небольшому изменению спектральных параметров использованных спиновых меток. Эти изменения свидетельствовали об уменьшении микровязкости (увеличении жидкостности) липидов митохондриальных мембран, однако выявленные экспериментальные различия оказались недостаточными для доказательства статистической достоверности.

Хорошо известно, что многие железосодержащие соединения в сочетании с органическими гидропероксидами способны восстанавливать нитрокислые радикалы, вызывая потерю их парамагнетизма. Эти соединения растворимы в полярной среде, однако способны также проникать внутрь биологических мембран. Действительно, из рис. 4а,б видно, что после введения в суспензию митохондрий компонентов использованной окислительной смеси — гидропероксида кумола и миоглобина — спектры 5DS и 16DS постепенно теряют свою интенсивность, по-видимому, в результате редокс-реакций парамагнитной $>N-O$ группы [18]. Это может быть как восстановление с образованием гидроксиламина $>N-OH$, так и

окисление, в результате чего формируется нитрон $>N=O$, причем оба продукта диамагнитны. Соответствующие кинетические кривые образования предполагаемых диамагнитных продуктов, построенные по убыли амплитуды центральной компоненты (I_0) спектров обеих спиновых меток, приведены на рис. 5а,б. Нами установлено, что скорость процесса зависела как от доступности парамагнитного фрагмента метки для окислитель-

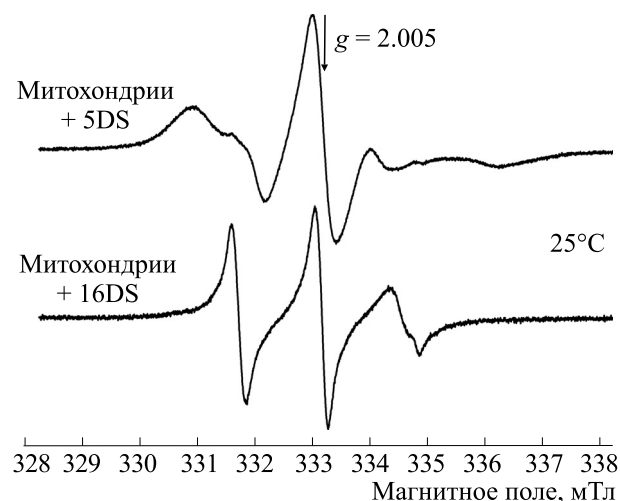


Рис. 3. Спектры ЭПР 5DS и 16DS в суспензии митохондрий сердца крысы, записанные при комнатной температуре ($\sim 25^\circ\text{C}$) до добавки в реакционную смесь окислителей (индукторов ферроптоза). Образцы находились (при pH 7.4) в газопроницаемых PTFE Sub-Lite-Wall капиллярах фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США), обдуваемых воздухом (21% O_2).

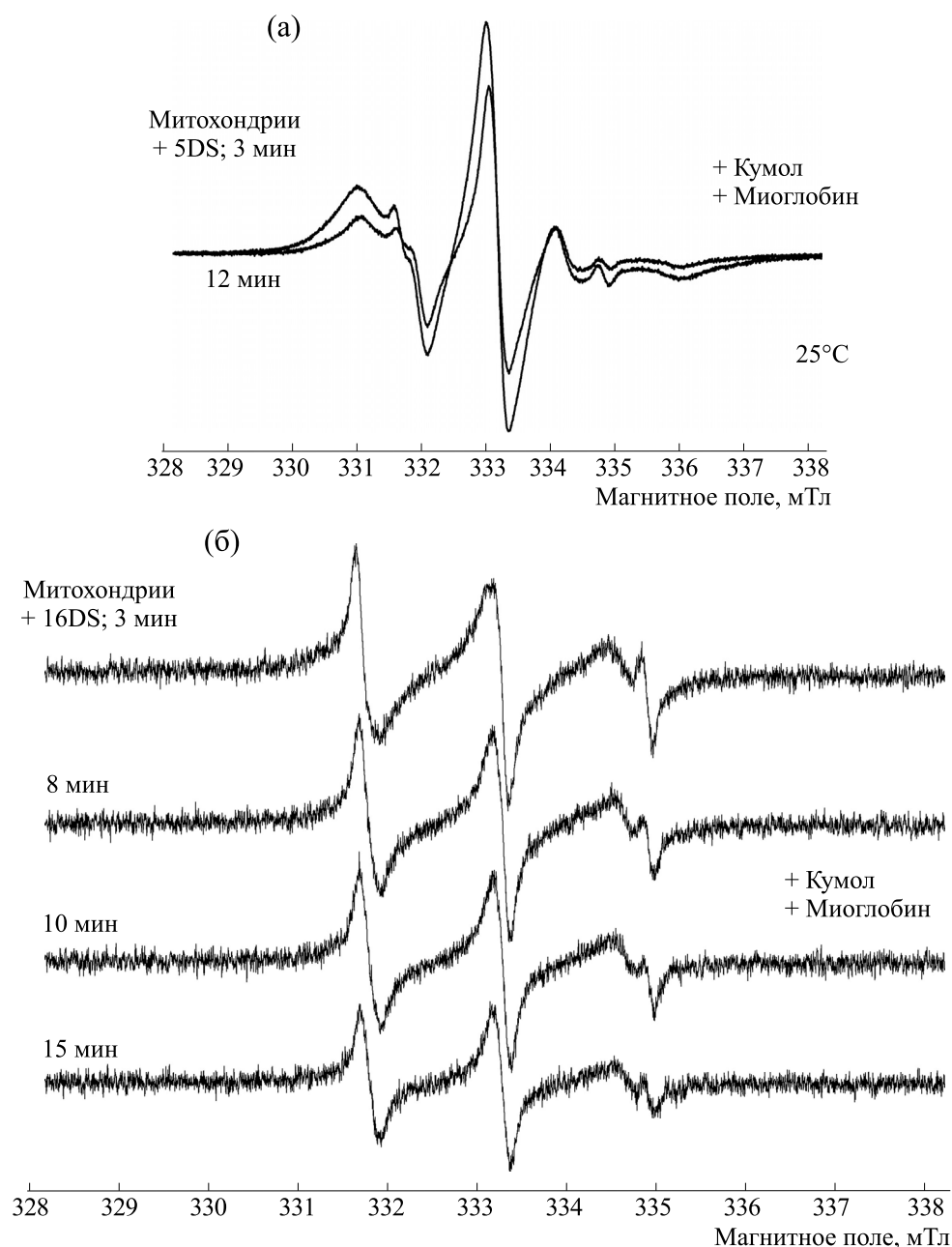


Рис. 4. Спектры ЭПР 5DS и 16DS в суспензии митохондрий сердца крысы, записанные при комнатной температуре ($\sim 25^\circ\text{C}$) до добавки в реакционную смесь окислителей (индукторов ферроптоза). Образцы находились (при pH 7.4) в газопроницаемых PTFE Sub-Lite-Wall капиллярах фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США), обдуваемых воздухом (21% O_2).

ля, так и от концентрации последнего. При добавлении 5DS или 16DS вместе с окислителем непосредственно в среду инкубации без митохондрий потеря парамагнетизма спиновых меток происходила практически мгновенно. В случае длительной инкубации митохондрий (≥ 30 мин) с окислителями перед добавлением спиновых меток 5DS или 16DS их спектральные параметры оказались стабильными. Исходя из этих данных и

реакций (1)–(3) можно предположить, что в условиях наших экспериментов в основном происходит окисление парамагнитной $>\text{N}-\text{O}$ группы спиновых зондов. Хотя нельзя исключить восстановление этой группы с участием цепи переноса электронов митохондрий.

Введение в спин-меченую радикалами 5DS или 16DS суспензию митохондрий только миоглобина не приводило к спаду интенсивности их

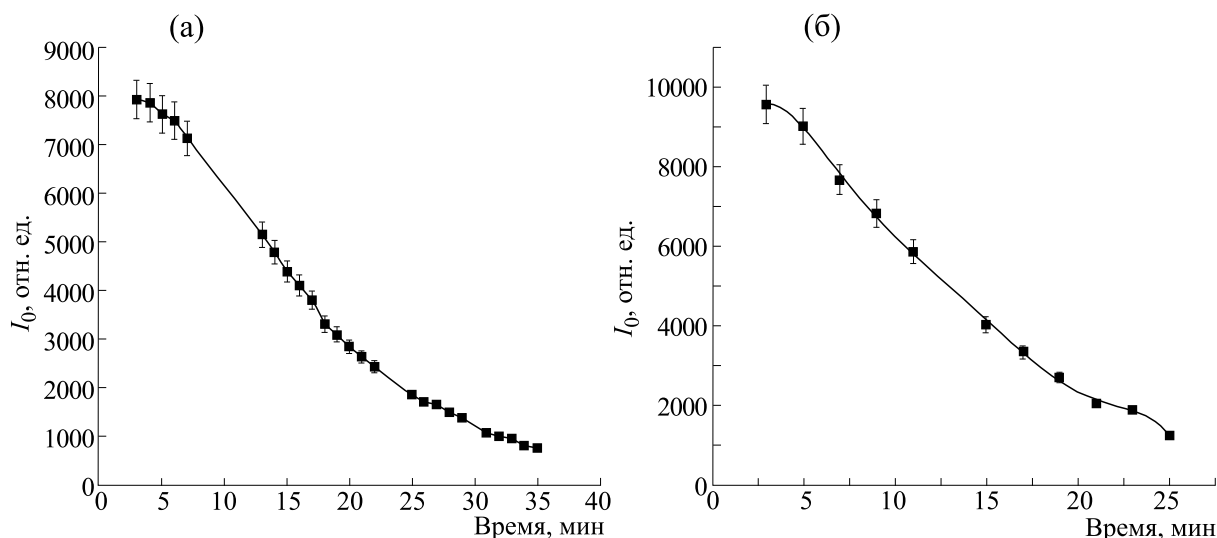


Рис. 5. Кинетические кривые образования диамагнитных производных спиновых меток в суспензии митохондрий с миоглобином и гидропероксидом кумола: (а) — для 5-DS, концентрация гидропероксида кумола 10 мМ, миоглобина 22 мкМ; (б) — для 16-DS, концентрация гидропероксида кумола 2.26 мМ, миоглобина 4.8 мкМ.

спектров ЭПР. В то же время при использовании в качестве инициатора окисления только гидропероксида кумола спектры обоих радикалов также постепенно теряли свою интенсивность. Этот факт согласуется с тем, что окисление мембран митохондрий происходит и в отсутствие внешних источников железа (рис. 2), в качестве которых могут выступать различные митохондриальные железосодержащие белки [15].

Следует отметить, что при увеличении концентрации и/или времени действия окислителей (гидропероксида кумола и миоглобина) всегда наступил момент, когда спектры ЭПР 5DS или 16DS в мембранах митохондрий больше не регистрировались. Это свидетельствовало о том, что в наших экспериментах NO-фрагменты всех молекул 5-доксилстеариновой кислоты или 16-доксилстеариновой кислоты оказались доступными для окислителей независимо от места их локализации в митохондриях. Ранее нами были проведены эксперименты с аскорбиновой кислотой — восстановителем нитроксильных радикалов. Поскольку аскорбиновая кислота не может реагировать с 5DS- и 16DS-радикалами, локализованными во внутренней мембране митохондрий, спектры ЭПР этих спиновых зондов частично сохраняют свою интенсивность. В случае действия гидропероксида кумола и миоглобина в качестве окислителей, по-видимому, происходит изменение упаковки липидов митохондрий и свободнорадикальные реакции перекисного окисления липидов распространяются и на внутреннюю мембрану, что позволяет окислителям добраться до NO-фрагмента 5DS и 16DS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было обнаружено, что ионы железа и гемовое железо приводят к усилению перекисного окисления липидов митохондрий в присутствии органических гидроперекисей. Упомянутые соединения рассматриваются в качестве индукторов ферроптоза, действие которых связано с продукцией свободных радикалов липидов и оксоферрильной формы гемовой группы.

С помощью ЭПР-спектроскопии, применяя в качестве спиновых меток 5-доксил- и 16-доксил-производных стеариновой кислоты, получены данные о воздействии на липиды мембран митохондрий сердца крысы инициаторов окисления (индукторов ферроптоза). Используемые окислители (гидропероксид кумола и трет-бутила с миоглобином) приводили к постепенной потере парамагнетизма встроенных в мембраны митохондрий спиновых меток, при этом скорость процесса зависела от доступности парамагнитного фрагмента метки и концентрации окислителя. Этот процесс, по-видимому, связан с редокс-реакциями, происходящими в мембранах митохондрий при перекисном окислении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-015-00125 и 19-015-00444).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. Zhou, J. Liu, R. Kang, et al., *Semin. Cancer Biol.* **66**, 89 (2020).
2. Y. Xie, W. Hou, X. Song, et al., *Cell Death Differ.* **23**, 369 (2016).
3. S. Doll and M. Conrad, *IUBMB Life* **69** (6), 423 (2017).
4. M. M. Gaschler, B. R. Stockwell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 419 (2017).
5. M. Gao, J. Yi, J. Zhu, et al., *Mol. Cell* **73** (2), 354 (2019).
6. S. J. Dixon, K. M. Lemberg, M. R. Lamprecht, et al., *Cell* **149** (5), 1060 (2012).
7. H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
8. R. O. Sinnhuber, T. C. Yu, *Food Technol.* **12** (1), 9 (1958).
9. M. A. Hemminga I, *Chem. Phys. Lipids* **32**, 323 (1983).
10. H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **25** (4), 709 (1956).
11. International Programme on Chemical Safety (IPCS) [Electronic resource]. URL: www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0761.htm. (Дата обращения 20.05.20)
12. International Programme on Chemical Safety (IPCS) [Electronic resource]. URL: www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0842.htm. (Дата обращения 20.05.20)
13. S. C. Dorman, C. F. Kenny, L. Miller, et al., *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **30** (1), 39 (2002).
14. R. Shah, M. S. Shchepinov, and D. A. Pratt, *ACS Cent. Sci.* **4** (3), 387 (2018).
15. K. B. Shumaev, A. L. Dudylina, M. V. Ivanova, et al., *Biofactors* **44** (3), 237 (2018).
16. К. Б. Шумаев, Н. Э. Петрова, И. В. Заббарова и др., *Биохимия* **69** (5) 699 (2004).
17. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhnikov, et al., *Nitric Oxide* **18** (1), 37 (2008).
18. G. Bačić, A. Pavičević, and F. Peyrot, *Redox Biology* **8**, 226 (2016).

Effect of Ferroptosis Inductors on Rat-Heart Mitochondrial Membranes

A.S. Fefler*, M.V. Ivanova**, K.B. Shumaev**, ***, and E.K. Ruuge*, **

*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

**National Medical Research Centre for Cardiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

***Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Moscow, Leninskiy prosp. 33/2

Using optical spectroscopy, we have studied the models of lipid oxidation in mitochondrial membranes isolated from rat heart. The oxidative efficiency of the tested iron-containing complexes was assessed by the level of TBA-reactive compounds formed in the samples as the main secondary products of peroxidation. Site-directed spin labeling in combination with EPR spectroscopy was used to trace changes in the structural and conformational characteristics of mitochondrial membrane lipids in the presence of oxidation initiators. Therefore, mitochondrial suspensions were incubated with prooxidants (it was generally a reaction mixture containing myoglobin and cumene hydroperoxide) for a while. In this study, we used the spin labeled molecules of 5-doxylstearic and 16-doxylstearic acid, whose paramagnetic NO-fragments are attached to different side chain positions of the hydrocarbon chain. With the use of oxidation models, it was possible to obtain preparations of mitochondrial membranes with different degrees of oxidative modification. It was found that combination of the initiators of the oxidation — cumene (or tert-butyl hydroperoxide) and myoglobin results in the failure of paramagnetic centers of the spin labeled membrane protein to serve as the probes of changes.

Keywords: ferroptosis, heart, mitochondria, lipid oxidation, spin labels, electron paramagnetic resonance