

ВЛИЯНИЕ Ca^{2+} -ИНДУЦИРОВАННОГО ОТКРЫВАНИЯ ЦИКЛОСПОРИНЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ПОРЫ НА ПОТРЕБЛЕНИЕ КИСЛОРОДА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

О. В. АКОПОВА, В. И. НОСАРЬ, И. Н. МАНЬКОВСКАЯ, В. Ф. САГАЧ

*Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев;
e-mail: a-dubensky@mail.ru*

Изучено влияние Ca^{2+} -индуцированного открывания циклоспоринчувствительной поры (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) на потребление кислорода и функциональное состояние митохондрий печени крыс. Показано, что в отсутствие деполяризации функциональная активность МРТР приводит к повышению стационарной скорости дыхания в условиях окисления субстрата (глютамата) вследствие активации циклоспоринчувствительного $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмена и циклического транспорта Ca^{2+} , поддерживаемого одновременной работой МРТР и Ca^{2+} -унипортера. С помощью селективных блокаторов, циклоспорина А и рутениевого красного показано, что МРТР и Ca^{2+} -унипортер вносят близкий по величине вклад в Ca^{2+} -цикл и скорость дыхания митохондрий. Показано, что биоэнергетические эффекты открывания МРТР в стационарных условиях (повышение скорости дыхания при окислении субстрата в отсутствие АДФ, снижение дыхательного контроля и энергетической эффективности синтеза АТР, Р/О) близки к функциональным изменениям вследствие повышения эндогенной протонной проводимости мембраны митохондрий. Разобщающий эффект МРТР почти не влияет на скорость фосфорилирования, относительная стабильность которой поддерживается за счет активации дыхательной цепи и повышения скорости дыхания в состоянии 3. Сделан вывод, что в нормальных физиологических условиях МРТР может функционировать как механизм «мягкого» протонорного разобщения дыхательной цепи.

Ключевые слова: Ca^{2+} , циклоспоринчувствительная пора, Ca^{2+} -цикл, потребление кислорода, функциональное состояние митохондрий, митохондрии печени.

В свете представлений современной науки функциональное состояние физиологически значимых систем организма зависит от состояния митохондрий и сопряженности окислительного метаболизма с генерацией электрохимического потенциала протонов ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$), обеспечивающего потенциалзависимые процессы, в первую очередь синтез АТР. Около 80–90% АТР, основного энергетического ресурса клетки, производится митохондриями [1,2]. Высокий мембранный потенциал митохондрий (достигающий ~ -180 мВ) также обеспечивает накопление значительного количества кальция через потенциалзависимый канал, Ca^{2+} -унипортер [3, 4]. Ca^{2+} играет исключительно важную, хотя и неоднозначную роль в регуляции митохондриальных функций [3, 5]. Наряду с активацией митохондриальных дегидрогеназ, митохондриальной NO-синтазы и других энзимов матрикса, а также системы окислительного фосфорилирования [3, 5–7], Ca^{2+} является непосредственным индуктором образования активных форм

кислорода (АФК) [7, 8]. Однако основной риск, сопряженный с митохондриальным транспортом Ca^{2+} , заключается в Ca^{2+} -индуцированном открывании циклоспоринчувствительной поры (mitochondrial permeability transition pore, МРТР), триггера клеточного апоптоза [9, 10]. МРТР представляет собой мультипротеиновый комплекс, соединяющий внутреннюю и наружную мембраны митохондрий и образующий потенциалзависимый канал; его предполагаемыми субъединицами являются потенциалзависимый анионный канал наружной мембраны (VDAC), транслоказа адениновых нуклеотидов внутренней мембраны (ANT) и протеин матрикса – циклофиллин D [11, 12].

В течение последних двух десятилетий усилия исследователей были направлены на установление взаимосвязи между открыванием МРТР и развитием широкого спектра патологических процессов и состояний организма [1, 9, 13, 14]. Митохондриальный путь индукции апоптоза, связанный с открыванием МРТР, тщательно изучен и описан в ли-

температуре. Так, известно, что фаза индукции апоптоза включает выход цитохрома *c* из межмембранного пространства и его связывание с фактором активации пептидаз (АРАФ-1) с последующим образованием гептамерного протеинового комплекса, апоптосомы, которая, в свою очередь, активирует каспазный каскад, реализующий программу клеточной смерти [9]. Установлено также, что необходимой стадией индукции апоптоза является пермеабилзация наружной мембраны путем взаимодействия проапоптозного протеина Вах с каналом индукции апоптоза (mitochondrial apoptosis induced channel, МАС) с образованием поры и высвобождением из межмембранного пространства в цитозоль ряда протеинов — цитохрома *c*, фактора индукции апоптоза, АІF, эндонуклеазы G и других, являющихся индукторами различных этапов программы клеточной гибели [9, 10, 15].

На уровне собственно митохондрий выход цитохрома *c* неизбежно приводит к блокированию транспорта электронов, прекращению синтеза АТФ, гиперпродукции АФК [16], что, в свою очередь, по механизму положительной обратной связи, называемому ROS-induced ROS release [17], приводит к дальнейшей активации МРТР и коллапсу митохондриальных функций. Большинство исследователей, соответственно, рассматривают МРТР как потенциальную молекулярную мишень в терапии патологических состояний организма [13, 14, 18]. В то же время, вопрос о молекулярной организации МРТР все еще не решен современной наукой, и попытки заблокировать пору на молекулярном уровне путем нокаута одной из предполагаемых субъединиц МРТР (VDAC, ANT либо циклофиллина D) не дали положительных результатов [10].

Биофизические свойства МРТР позволяют характеризовать ее как потенциалзависимый Ca^{2+} -канал, обладающий также и неселективной проводимостью [19, 20]. Активность канала зависит от концентрации Ca^{2+} в матриксе [20]. Открывание МРТР в состоянии высокой проводимости сопровождается описанным выше коллапсом митохондриальной энергетики, ведущим к истощению клеточных запасов АТФ. Подобный коллапс митохондриальных функций несовместим с нормальной жизнедеятельностью клетки и организма. Закономерно предположить, что функционирование МРТР в условиях физиологической нормы не сопровождается необратимой митохондриальной дисфункцией. В то же время сведения о функционировании МРТР в нор-

мальных физиологических условиях к настоящему времени крайне ограничены.

Ранее мы показали, что введение донора NO (нитроглицерина) в условиях физиологической нормы *in vivo* [21] ведет к заметному подавлению активности МРТР. Это дает основание полагать, что МРТР функционирует не только при патологии, но и в нормальных физиологических условиях. Однако представления о «нормальных» физиологических функциях МРТР еще не сложились в современной науке.

Согласно нашим данным, полученным *in vivo*, базальная функциональная активность МРТР в условиях физиологической нормы снижает уровень образования активных форм кислорода и азота в митохондриях сердца и печени крыс, а также их способность к накоплению Ca^{2+} [21]. Повышенное содержание Ca^{2+} в кардиомиоцитах и гепатоцитах в присутствии циклоспорина А было обнаружено также в работах [22, 23]. Кроме того, путем блокирования поры циклоспорином А было показано, что ее открывание повышает кислородную стоимость работы скелетной мышцы [24]. Однако в условиях эксперимента *in vivo* сложно установить взаимосвязь между открыванием МРТР и наблюдаемыми функциональными изменениями, поскольку непосредственные биоэнергетические эффекты МРТР, в первую очередь, проявляются на уровне митохондрий.

На изолированных митохондриях нами было показано, что в области небольших концентраций Ca^{2+} открывание МРТР носит обратимый характер, а блокирование МРТР после ее открывания приводит к восстановлению митохондриальных функций почти к контрольному уровню. Это позволяет провести параллель между биоэнергетическими эффектами обратимого открывания МРТР в изолированных митохондриях и функциональными эффектами открывания МРТР в условиях физиологической нормы. Целью настоящей работы было изучить влияние МРТР на потребление кислорода и функциональное состояние митохондрий печени крыс в условиях обратимого открывания поры, не сопровождаемого коллапсом митохондриальных функций и энергозависимых процессов в митохондриях.

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс линии Вистар с массой тела 200–250 г. Печень промывали охлажденным 0,9%-ым раствором KCl (4 °C), измельчали и гомогенизировали в 5-кратном объеме среды: 250 мМ са-

харозы, 20 мМ трис-НСl буфера, 1 мМ ЭДТА (рН 7,4). Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин при 700 g (4 °С); затем супернатант центрифугировали 15 мин при 11 000 g (4 °С). Осадок суспендировали в небольшом объеме среды без добавления ЭДТА и хранили на льду при 4 °С. Содержание протеина определяли методом Лоури.

Светопоглощение регистрировали при 520 нм, начиная с внесения митохондрий в среду инкубации: 120 мМ КСl, 5 мМ глутамата Na, 1 мМ KH_2PO_4 ; конечная концентрация протеина 0,3 мг/мл; рН среды довели до 7,5 с помощью КОН. Изменение концентрации добавленного Ca^{2+} в среде регистрировали в присутствии 70 мкМ Ca^{2+} -индикатора, арсеназо-III, с помощью спектрофотометра USB-2000 (Ocean Optics, США), используя стандартную двухволновую методику регистрации при 654 и 690 нм. CaCl_2 вносили в среду в заданных концентрациях; количество Ca^{2+} выражали в нмоль Ca^{2+} на 1 мг протеина. Мембранный потенциал регистрировали спектрофотометрически в двухволновом режиме при 510 и 525 нм в присутствии 10 мкМ сафранина в среде инкубации. Концентрацию ионов водорода в среде инкубации определяли с помощью стеклянного электрода ЭСКЛ-08 М.1. Количество ионов водорода находили с помощью калибровочных кривых путем титрования суспензии растворами НСl в присутствии ротенона и СССР и выражали в нмоль ионов H^+ на 1 мг протеина. Потребление кислорода изучали в стандартных условиях полярографическим методом в закрытой ячейке с платиновым электродом при 26° в той же среде (конечная концентрация протеина 1,5–2 мг/мл). Энергетическую эффективность синтеза АТФ (P/O) находили как отношение количества добавленного ADP к количеству кислорода, восстановленного за время фосфорилирования; скорость фосфорилирования (J_{ADP}) находили по скорости превращения ADP, которую рассчитывали по времени превращения добавленного ADP и выражали в нмоль ADP/мин на 1 мг протеина [25].

В зависимости от условий эксперимента в среду вносили (конечные концентрации): 1 мкМ циклоспорина А, 10^{-5} М рутениевого красного (RR), 200 мкМ ADP, 10^{-6} М СССР, $5 \cdot 10^{-6}$ М ротенона.

В работе использовали Na-глутамат, трис (основание), циклоспорин А, рутениевый красный (Fluka, Швейцария), арсеназо-III, СССР (Sigma, США) и другие реактивы марки осч и чда. Растворы готовили на бидистилляте. До-

стоверность результатов оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента. $P < 0,05$ считали статистически значимой величиной.

Результаты и обсуждение

Известно, что после накопления Ca^{2+} из среды в митохондриях устанавливается состояние стационарного равновесия, соответствующее установлению постоянной (контролируемой) скорости дыхания в условиях окисления субстрата в отсутствие ADP, а также – постоянной скорости циклического транспорта Ca^{2+} , поддерживаемого работой Ca^{2+} -унипортера и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмена [26, 27]. Поскольку между скоростью энергозависимого транспорта катионов в матрикс и скоростью дыхания существует прямо пропорциональная зависимость, повышение скорости входа катионов в матрикс приводит к повышению скорости дыхания митохондрий [26–28].

Согласно данным литературы, эндогенная протонная проводимость мембраны может повышаться вследствие энзиматической активности митохондриальной фосфолипазы A_2 , образования жирных кислот [29], энзиматических и неэнзиматических редокс-реакций в матриксе с образованием АФК [7] и повышения активности митохондриальных разобщающих протеинов [30]. Повышение H^+ -проводимости мембраны с повышением продолжительности инкубации препаратов митохондрий приводит к ослаблению энергетического сопряжения [31], снижению дыхательного контроля (ДК), а также к ускорению трансмембранного обмена Ca^{2+} , в частности, рутенийнечувствительного выхода Ca^{2+} [29, 32], и, как показано нами [33], высвобождения Ca^{2+} в условиях мембранной деполяризации. БСА устраняет указанные эффекты, что позволяет связать их с повышением содержания жирных кислот в митохондриях [32, 33]. Встраиваясь в мембрану, эндогенно образующиеся Ca^{2+} -связывающие жирные кислоты могут играть роль Ca^{2+} -ионофоров и ускорять трансмембранный обмен Ca^{2+} по механизму $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмена [26, 29]. Нами было высказано предположение, что открывание МРТР, ведущее к циклоспоринчувствительному обмену Ca^{2+} на ионы H^+ [34], также может играть роль эндогенного разобщающего механизма в митохондриях. Поэтому в данной работе была поставлена задача сопоставить функциональные эффекты открывания МРТР и неспецифического повышения эндогенной H^+ -проводимости мембраны этих органелл. Для этого изучали влияние Ca^{2+} на скорость

дыхания и показатели функционального состояния митохондрий в отсутствие и в присутствии циклоспорина А как в прочно сопряженных препаратах (ДК 5–6, контроль), так и при снижении ДК до 2–3 вследствие повышения времени инкубации.

Согласно полученным данным, повышение концентрации Ca^{2+} в среде приводит к повышению накопления Ca^{2+} в митохондриях печени в пределах Ca^{2+} -емкости, которая при заблокированном состоянии МРТР достигает ~ 400 нмоль Ca^{2+} /мг протеина (рис. 1, а, столбцы 1). Повышение входа Ca^{2+} сопровождается повышением скорости дыхания в отсутствие ADP (рис. 1, б). Накопление Ca^{2+} в матриксе прямо пропорционально количеству добавленного Ca^{2+} (рис. 1, а, столбцы 1), и в широком диапазоне концентраций Ca^{2+} (до ~ 100 нмоль/мг) происходит без заметной мембранной деполаризации (данные не приведены). В то же время, результаты эксперимента показывают, что влияние Ca^{2+} на скорость дыхания зависит от ДК (рис. 1, б). Так, в прочно сопряженных препаратах (ДК 5–6) повышение входа Ca^{2+} в матрикс приводит к повышению скорости дыхания митохондрий лишь в области небольших добавок Ca^{2+} (рис. 1, б, кривая 1). По мере ослабления энергетического сопряжения и снижения ДК, влияние добавленного Ca^{2+} на скорость дыхания становится более заметным (рис. 1, б, кривые 3–5), и в препаратах с низким ДК имеет место прямо пропорциональная зависимость между количеством добавленного Ca^{2+} , входом Ca^{2+} в матрикс (рис. 1, а) и стационарной скоростью дыхания (рис. 1, б, кривая 5), соответствующая представлениям об активации Ca^{2+} -цикла митохондрий [26, 27].

Влияние H^+ -проводимости мембраны на циклический транспорт Ca^{2+} в митохондриях требует более тщательного изучения. В качестве наиболее вероятного объяснения наблюдаемой закономерности можно предположить, что повышение эндогенной протонной проводимости мембраны вследствие повышения содержания жирных кислот [29, 32], которое сопровождается снижением ДК, является необходимым условием активации Ca^{2+} -цикла митохондрий. Выше мы уже отмечали, что эндогенно образующиеся жирные кислоты могут играть роль Ca^{2+} -ионофоров и активировать неспецифический $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмен [26, 29]. Зависимость ДК от скорости дыхания митохондрий, окисляющих субстрат (глутамат) показывает, что активация циклического транспорта Ca^{2+} с повышением концентрации добавленного Ca^{2+} , и собственно H^+ в услови-

ях повышения протонной проводимости мембраны [35], приводит к Ca^{2+} -индуцированному ускорению дыхания (рис. 1, б, кривые 3–5) и разобщению дыхательной цепи, что отражается в снижении ДК по мере повышения скорости дыхания (рис. 1, в).

Сделанные нами выводы о влиянии H^+ -проводимости мембраны на скорость циклического транспорта Ca^{2+} подтверждаются данными литературы. Так, в работе Николса [36] Ca^{2+} -индуцированное ускорение дыхания составляет лишь ~ 1% от скорости дыхания в состоянии 3, что, очевидно, не может приводить к разобщению дыхательной цепи. В то же время в условиях максимальной активации Ca^{2+} -цикла с помощью Ca^{2+} -ионофора А23187 [27] максимальный прирост скорости дыхания, соответствующий V_{max} Ca^{2+} -унипортера, составляет 40–50 нг-ат О·мин⁻¹·мг⁻¹ при использовании субстрата I комплекса β-гидроксибутирата. Подобное различие результатов, приводимых в литературе, объясняется максимальной активацией $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмена в присутствии А-23187, обменивающего Ca^{2+} на ионы H^+ [26], что ведет к максимальному ускорению Ca^{2+} -цикла, поддерживаемого одновременной работой А-23187 и Ca^{2+} -унипортера, при котором скорость дыхания зависит от скорости потенциалзависимого входа Ca^{2+} через Ca^{2+} -унипортер митохондрий.

Согласно нашим данным (рис. 1, а, столбцы 2), открывание МРТР приводит к снижению накопления Ca^{2+} , Ca^{2+} -емкости, до ~ 80–100 нмоль Ca^{2+} /мг вследствие циклоспорин А-чувствительного выхода Ca^{2+} из матрикса после накопления катиона (рис. 2, а). Ранее нами было показано [34], что МРТР обладает протонной проводимостью и осуществляет циклоспорин А-чувствительный электронейтральный обмен Ca^{2+} на ионы H^+ . В присутствии фосфата соотношение $\text{Ca}^{2+} : \text{H}^+$ равно 1 : 1 (рис. 3, а), что можно объяснить работой электронейтрального фосфатного переносчика, H^+ - P_i -котранспорта, который осуществляет трансмембранный перенос фосфорной кислоты по градиенту концентраций H^+ . При этом кинетические характеристики выхода Ca^{2+} через пору (константа скорости и время полупревращения) при допущении, что транспортный процесс можно представить как последовательные реакции первого порядка, близки к тем же характеристикам сопряженного с транспортом Ca^{2+} циклоспоринчувствительного входа H^+ в матрикс митохондрий (рис. 3, б). Повышение входа Ca^{2+} с повышением количества добавленного Ca^{2+} приводит к активации

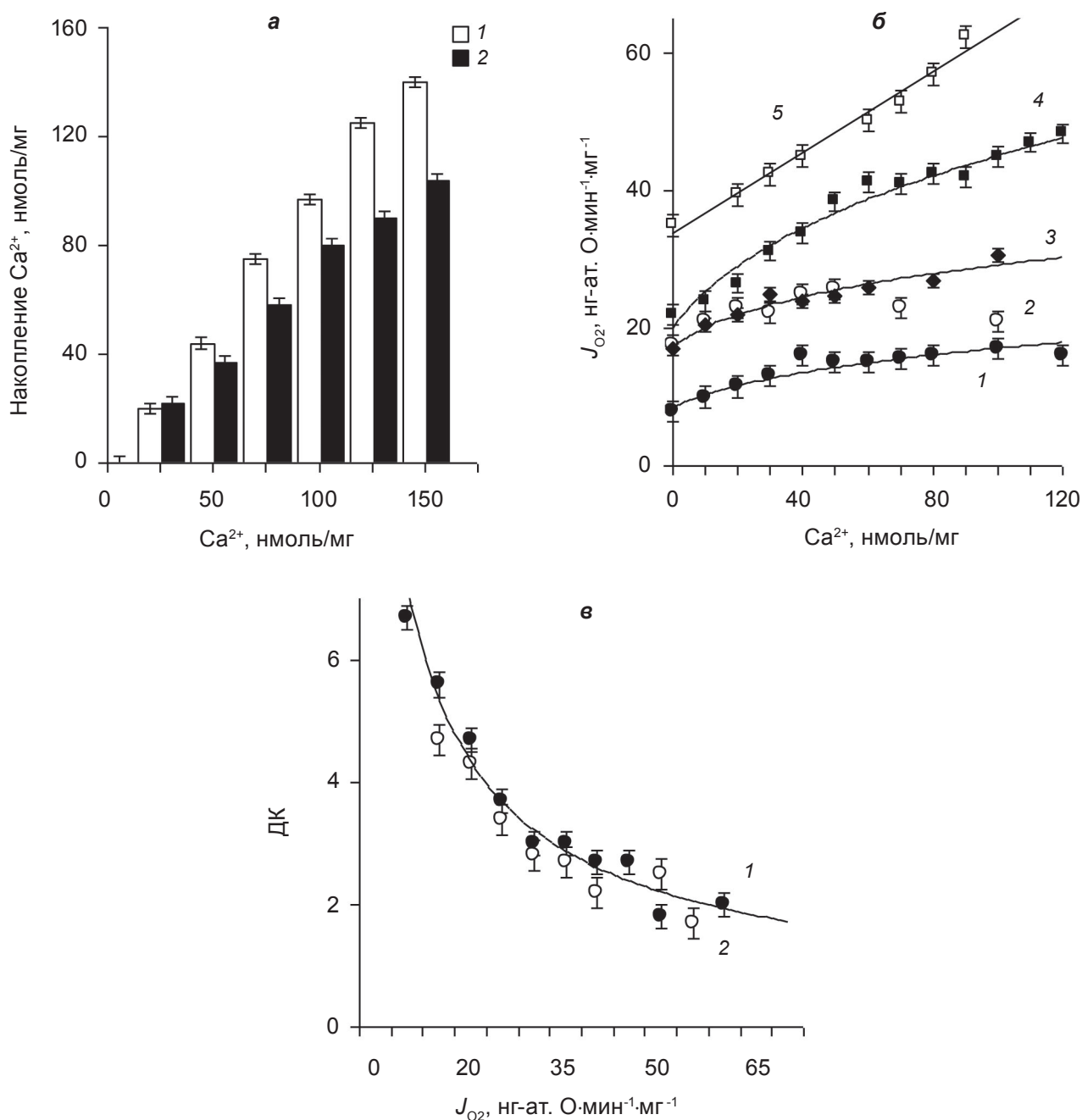


Рис. 1. Накопление Ca^{2+} в митохондриях печени крыс (а) и его влияние на скорость дыхания (б) в условиях блокирования (1) и открывания (2) МРТР; в – зависимость дыхательного контроля (ДК) от скорости Ca^{2+} -стимулированного дыхания в присутствии (черные точки) и в отсутствие (белые точки) циклоспорина А. Ca^{2+} вносили в среду инкубации в количествах, указанных на оси абсцисс, циклоспорин А – в концентрации 1 мкМ (а, 1; б, 1,3–5; в, черные точки). ДК в препаратах митохондрий в отсутствие добавленного Ca^{2+} (в): 5–6 (1), 4,5 (2), 4 (3), 3,5 (4), 2,5 (5). $M \pm m$, $n = 6$

МРТР, что соответствует повышению не только количества ионов Ca^{2+} и H^+ , транспортируемых через пору, но и константы скорости этих транспортных процессов (рис. 3, а, б).

На основании спектрофотометрической регистрации изменений митохондриального

объема и транспорта Ca^{2+} ранее нами было показано, что открывание поры, сопровождаемое набуханием и выходом Ca^{2+} (рис. 2, а), приводит к установлению стационарного распределения Ca^{2+} между матриксом и средой, которое соответствует установле-

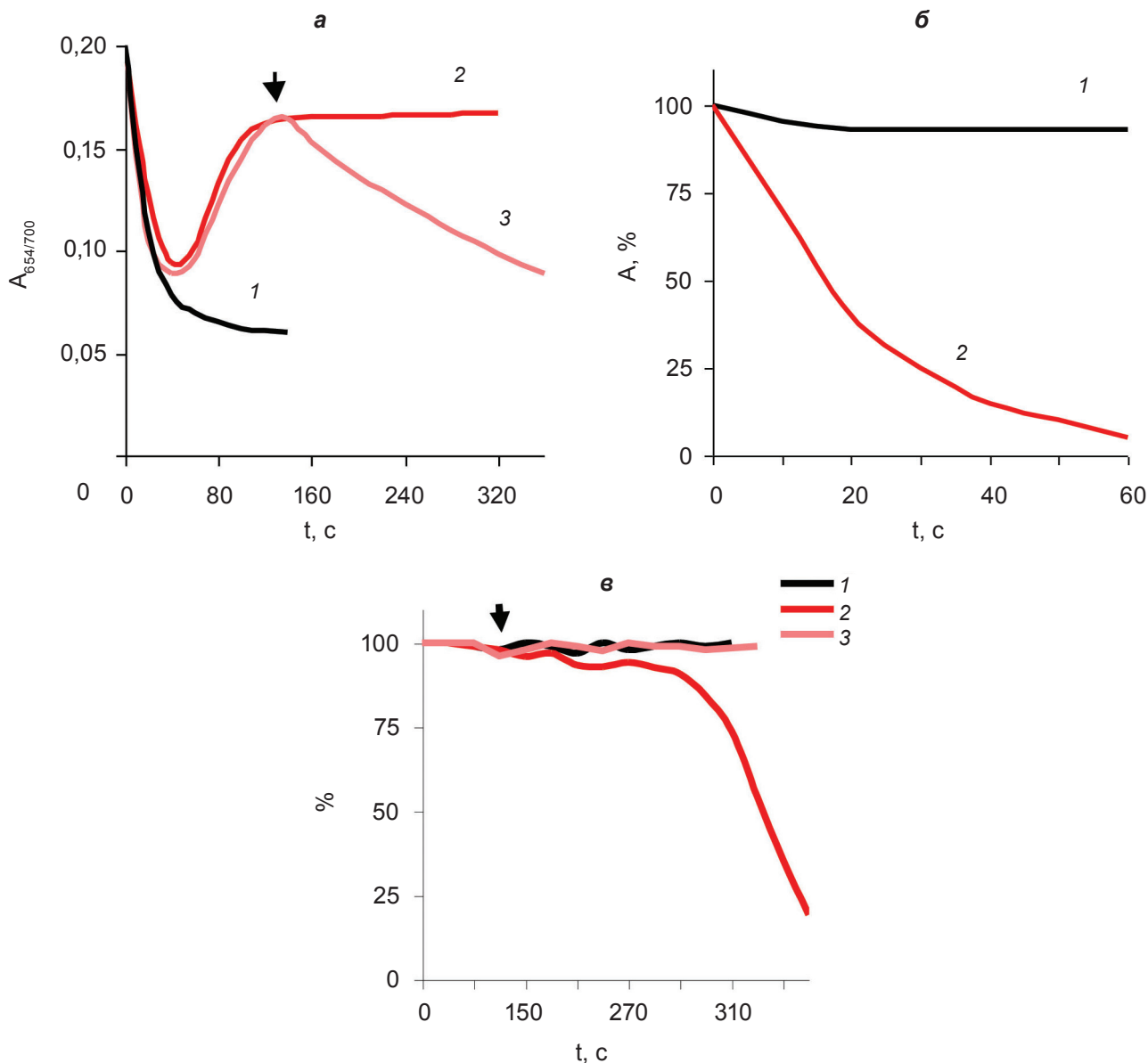


Рис. 2. Влияние МРТР на накопление Ca^{2+} (а), светопоглощение суспензии (б) и мембранный потенциал (в), типичные временные зависимости. Ca^{2+} вносили в среду инкубации в количестве 30 нмоль/мл, циклоспорин А в концентрации 1 мкМ (кривые 1). По оси абсцисс: время, с; по оси ординат – светопоглощение при 654/700 нм (а), изменение светопоглощения в % от исходной величины (б, в). Циклоспорин А вносили также после завершения набухания и выхода Ca^{2+} (а, в, кривые 3), как показано стрелкой

нию и поддержанию равновесия между потенциалзависимым входом Ca^{2+} через Ca^{2+} -унипортер и выходом катиона через пору в среду [37]. Циклоспорин А-чувствительное набухание само по себе не сопровождается деполяризацией (рис. 2, б, в), и высокий мембранный потенциал поддерживает Ca^{2+} -унипортер в активном, открытом состоянии. В то же время, одновременная работа

МРТР и Ca^{2+} -унипортера приводит к активации циклического транспорта Ca^{2+} , в котором МРТР функционирует как циклоспорин А-чувствительный Ca^{2+}/H^+ -обмен (рис. 3, а, б). Повышение скорости дыхания вследствие активации Ca^{2+} -цикла с повышением концентрации Ca^{2+} (рис. 1, б, кривая 2; рис. 3, а) усиливает Ca^{2+} -индуцированное разобщение дыхательной цепи, близкое к эффекту Ca^{2+} в

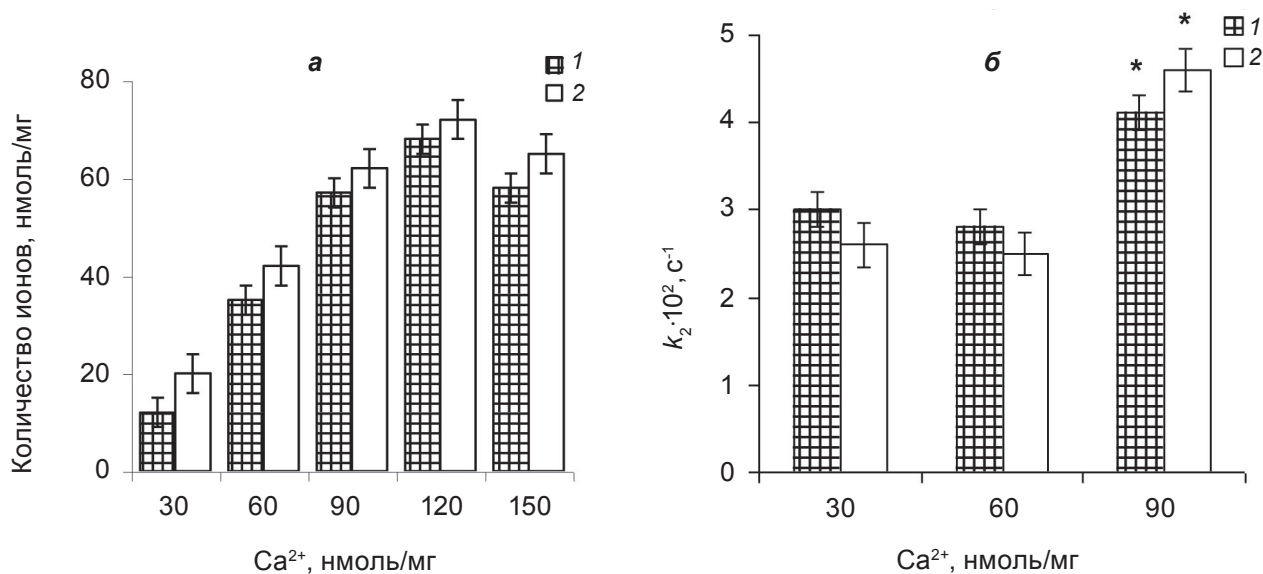


Рис. 3. Влияние Ca^{2+} на циклоспоринчувствительный выход Ca^{2+} (1) и вход протонов в матрикс (2) в присутствии RR. Регистрацию проводили после завершения накопления Ca^{2+} и внесения RR в среду инкубации. $M \pm m$, $n = 6$. Ca^{2+} вносили в количествах, указанных на оси абсцисс; RR вносили в концентрации 10^{-5} M. По оси ординат: количество ионов Ca^{2+} и H^+ , в нмоль/мг протеина (а); константа скорости циклоспоринчувствительного транспорта ионов (б). * Достоверно относительно 30 нмоль/мг Ca^{2+} , $P < 0,05$ (б)

слабо сопряженных препаратах митохондрий в присутствии циклоспорина А, и приводит к снижению ДК (рис. 1, в, белые и черные точки).

Поскольку в области низких концентраций Ca^{2+} мембранный потенциал и скорость дыхания поддерживаются на постоянном уровне в течение длительного времени (рис. 2, в), можно сделать вывод, что открывание МРТР в условиях эксперимента приводит только к ускорению дыхания, но не нарушает стационарных условий окисления субстрата и транспорта электронов, устанавливаемых после накопления Ca^{2+} . Поэтому, чтобы убедиться в справедливости выводов об одновременном функционировании МРТР и Ca^{2+} -унипортера в условиях Ca^{2+} -цикла, сделанных нами ранее на основании спектрофотометрических данных [37], в настоящей работе была поставлена задача оценить вклад МРТР и Ca^{2+} -унипортера в скорость дыхания митохондрий, окисляющих субстрат (глутамат) в отсутствие ADP. Для этого Ca^{2+} -унипортер блокировали специфическим ингибитором, рутениевым красным (RR) после накопления Ca^{2+} и установления стационарной скорости дыхания. Вклад Ca^{2+} -унипортера в Ca^{2+} -цикл определяли как разность между скоростью дыхания в отсутствие и в присутствии RR. Вклад МРТР в Ca^{2+} -цикл устанавливали по разности скорости дыхания, регистрируемой в присутствии и в отсутствие

циклоспорина А при равных количествах добавленного Ca^{2+} .

Как показывают результаты эксперимента (рис. 4, столбцы 1), активация МРТР с повышением концентрации Ca^{2+} и его входа в матрикс (рис. 1, а, рис. 3) приводит к достоверному повышению вклада МРТР в скорость дыхания (рис. 4, столбцы 1). Максимальный вклад МРТР в скорость дыхания наблюдается при 20–40 нмоль Ca^{2+} /мг, что соответствует области концентраций Ca^{2+} меньших, чем эмпирические значения кажущейся константы активации МРТР $K_{0,5}$, установленные нами ранее по набуханию митохондрий (~ 40–50 мкМ Ca^{2+} , тогда как V_{\max} набухания регистрировалась при концентрациях Ca^{2+} ~ 200 мкМ [38]). Дальнейшая активация МРТР с повышением концентрации Ca^{2+} в среде приводит к повышению набухания и выхода цитохрома с, вследствие чего положительный вклад МРТР в скорость дыхания снижается (рис. 4, столбцы 1). В то же время, в условиях блокирования МРТР вклад Ca^{2+} -унипортера в скорость дыхания поддерживается на постоянном уровне (рис. 4, столбцы 2), что согласуется с данными об отсутствии заметной деполяризации под действием Ca^{2+} в широком диапазоне концентраций Ca^{2+} (≤ 100 нмоль Ca^{2+} /мг) и свидетельствует об активном состоянии Ca^{2+} -унипортера. Обращает на себя внимание тот

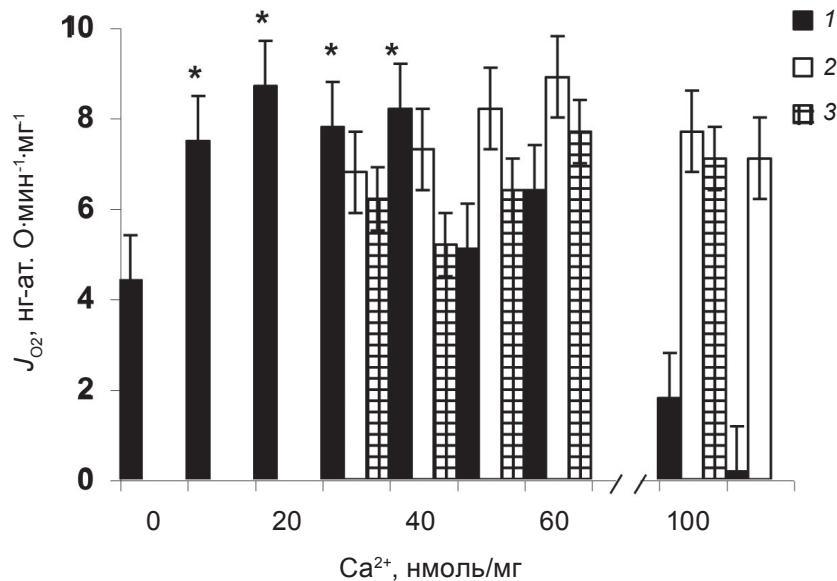


Рис. 4. Оценка вклада МРТР и Ca²⁺-унипортера в скорость дыхания митохондрий в состоянии 4. Активность МРТР оценивали по разности скоростей дыхания в отсутствие и в присутствии 1 мкМ циклоспорина А (1). Активность Ca²⁺-унипортера оценивали по разности скорости дыхания в отсутствие и в присутствии 10⁻⁵ М RR в условиях блокирования (2) и открывания (3) МРТР. М ± т, n = 6. * Достоверно относительно контроля (P < 0,05). Ca²⁺ вносили в среду инкубации в количествах, указанных на оси абсцисс. По оси ординат: циклоспоринчувствительная (1) и RR-чувствительная (2, 3) разность скоростей дыхания при окислении субстрата в отсутствие ADP, ΔJ_{O₂}, нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹

факт, что в условиях максимальной активации дыхания при открывании МРТР обнаруживается близкий по величине вклад МРТР и Ca²⁺-унипортера в скорость дыхания (рис. 4, столбцы 1, 3). Таким образом, приведенные результаты подтверждают предположение о том, что в условиях открывания МРТР при низких концентрациях Ca²⁺ (<K_{0,5} активации МРТР) Ca²⁺-унипортер остается в активном состоянии, и Ca²⁺-цикл, который вносит существенный вклад в скорость дыхания и приводит к разобщению дыхательной цепи (рис. 1, в), поддерживается одновременной работой МРТР и Ca²⁺-унипортера, в соответствии с нашими прежними выводами [37].

Известно, что функционирование МРТР в состоянии высокой проводимости сопровождается выходом цитохрома c, блокированием транспорта электронов, коллапсом мембранного потенциала и прекращением синтеза АТФ. Для оценки роли МРТР в регуляции энергетического метаболизма митохондрий в условиях, когда ее открывание не приводит к необратимым функциональным нарушениям в митохондриях (рис. 2, а, в, кривые 3), нами была поставлена задача изучить влияние циклоспоринчувствительной активации Ca²⁺-цикла на основные показатели функциональ-

ного состояния митохондрий, определяющие их способность синтезировать АТФ — энергетическую эффективность синтеза АТФ (P/O) и скорость фосфорилирования (J_{ADP}).

Как показано выше, повышение протонной проводимости мембраны, сопровождаемое снижением ДК (рис. 1, б), усиливает Ca²⁺-зависимую стимуляцию дыхания. Ускорение Ca²⁺-цикла в условиях повышения H⁺-проводимости мембраны (рис. 1, б, кривые 1–4) приводит к повышению потребления кислорода, пропорционально скорости циклического транспорта Ca²⁺ и H⁺ [27]. Зависимость, приведенная на рис. 1, в, показывает углубление разобщения и снижение ДК по мере повышения скорости транспорта и скорости дыхания в состоянии 4. Величина ДК в прочно сопряженных препаратах митохондрий составляла 6, 5 ± 0,2. Согласно оценке максимального вклада МРТР в скорость дыхания 8,7 ± 1,2 нг-ат О·мин⁻¹·мг⁻¹ (рис. 4, столбцы 1), Ca²⁺-индуцированное открывание поры должно приводить к снижению ДК на ~ 1,5 единицы. Этот вывод подтверждается экспериментальными данными, показывающими, что открывание МРТР сопровождается снижением ДК (рис. 1, в, белые точки). Энергетические затраты дыхательной цепи зависят от скорости

дыхания и транспорта ионов а также комплекса, на котором происходит окисление, но не от природы транспортного процесса (транспорт H^+ через H^+ -проводящие структуры мембраны, Ca^{2+} через Ca^{2+} -унипортер, либо открывание МРТР). Это согласуется с существованием стехиометрических соотношений между потреблением кислорода и потенциалзависимым транспортом катионов, которые не зависят от конкретного механизма транспорта. Соответственно, снижение ДК с повышением скорости дыхания в состоянии 4, как в присутствии циклоспорина А, так и при открывании МРТР (рис. 1, в, черные и белые точки), представляет собой одну зависимость, характеризующую разобщение дыхательной цепи вследствие повышения расхода энергии на транспорт ионов, сопровождаемый повышением потребления кислорода в митохондриях. Таким образом, разобщающий эффект МРТР в стационарных условиях (рис. 1, в) не отличается от эффекта «мягкого» протонофорного разобщения дыхательной цепи в условиях блокирования МРТР циклоспорином А.

Повышение скорости дыхания и энергетических затрат при активации циклического транспорта, как показывают данные, приводит также и к снижению энергетической эффективности синтеза АТФ (рис. 5, а). Как и в случае ДК (рис. 1, в), эффект МРТР (рис. 5, а, белые точки) не отличается от эффекта Ca^{2+} -индуцированного разобщения при повышении H^+ -проводимости мембраны в присутствии циклоспорина А (рис. 5, а, черные точки).

Известно, что показатель Р/О в «идеальных» условиях, при отсутствии разобщения и допущении, что вся свободная энергия, высвобождаемая в ходе окисления, расходуется на синтез АТФ ($\Delta G_{ox} \rightarrow \Delta \mu_{H^+} \rightarrow \Delta G_p$) характеризует стехиометрические соотношения между собственно синтезом АТФ и расходом кислорода в сопряженных реакциях окисления и фосфорилирования. Основанное на допущении отсутствия разобщения, теоретическое значение Р/О с учетом стехиометрических соотношений между переносом протона и потреблением кислорода для NADH-зависимых субстратов I комплекса, а также между транспортом протона и синтезом АТФ ($H^+/O = 10$ и $H^+/ATP = 4$), составляет 2,5 [39, 40].

Транспортные процессы, проходящие параллельно с синтезом АТФ (активация H^+ - и Ca^{2+} -циклов), могут приводить к дополнительным энергетическим затратам, увеличивающим потребление кислорода в ходе синтеза, что в свою очередь приводит к отклонению

экспериментальных значений Р/О от расчетной величины. Поэтому снижение экспериментального Р/О по сравнению с теоретическим значением (рис. 5, а), характеризует ослабление энергетического сопряжения как при открывании МРТР, так и при повышении эндогенной H^+ -проводимости мембраны митохондрий [39, 40].

В то же время, как показывают наши данные, скорость фосфорилирования, определяемая по скорости превращения ADP (J_{ADP}) меняется сравнительно мало с повышением скорости дыхания в состоянии 4 (рис. 5, б). Ее снижение наблюдается только при сильном разобщении и ускорении дыхания, соответствующем падению ДК ниже 3. Согласно полученным данным, усиление разобщения сопровождается повышением скорости дыхания в состоянии 3, V_3 (рис. 5, в). Как и в прежних случаях (ДК и Р/О), эффект открывания МРТР (рис. 5, в, белые точки) не отличается от эффекта протонофорного разобщения, усиливаемого активацией Ca^{2+} -цикла в присутствии циклоспорина А (рис. 5, в, черные точки). С учетом того, что скорость фосфорилирования (J_{ADP}) связана с величиной Р/О и скоростью дыхания в состоянии 3 соотношением: $J_{ADP} = V_3 \cdot P/O$, очевидно, что ее относительная стабильность при активации циклического транспорта Ca^{2+} и H^+ (рис. 5, б), несмотря на разобщение и снижение Р/О (рис. 5, а), достигается путем активации транспорта электронов и повышением скорости дыхания как в состоянии 4, так и в состоянии 3 (рис. 5, в).

Известно, что скорость ADP-стимулированного дыхания лимитируется не скоростью транспорта электронов, а скоростью синтеза АТФ F_0F_1 -АТФ-синтазой, тогда как скорость транспорта катионов и протонов лимитирована скоростью окисления и переноса электронов в дыхательной цепи [26]. Полагают, что лимитирующей стадией, ограничивающей максимальную скорость транспорта ионов в матрикс, является перенос протона комплексами дыхательной цепи [41]. Поэтому скорость дыхания в состоянии 3, V_3 , как правило, ниже скорости разобщенного дыхания, J_U . При активации Ca^{2+} -цикла, как и других транспортных процессов, V_3 может возрасти за счет ускорения транспорта электронов, пропорционально скорости потенциалзависимого входа Ca^{2+} . Максимальная скорость транспорта и разобщенного дыхания (J_U) соответствует максимальной скорости окисления субстрата и состоянию нулевого потенциала ($\Delta \mu_{H^+} = 0$), когда практически вся энергия, высвобождаемая при

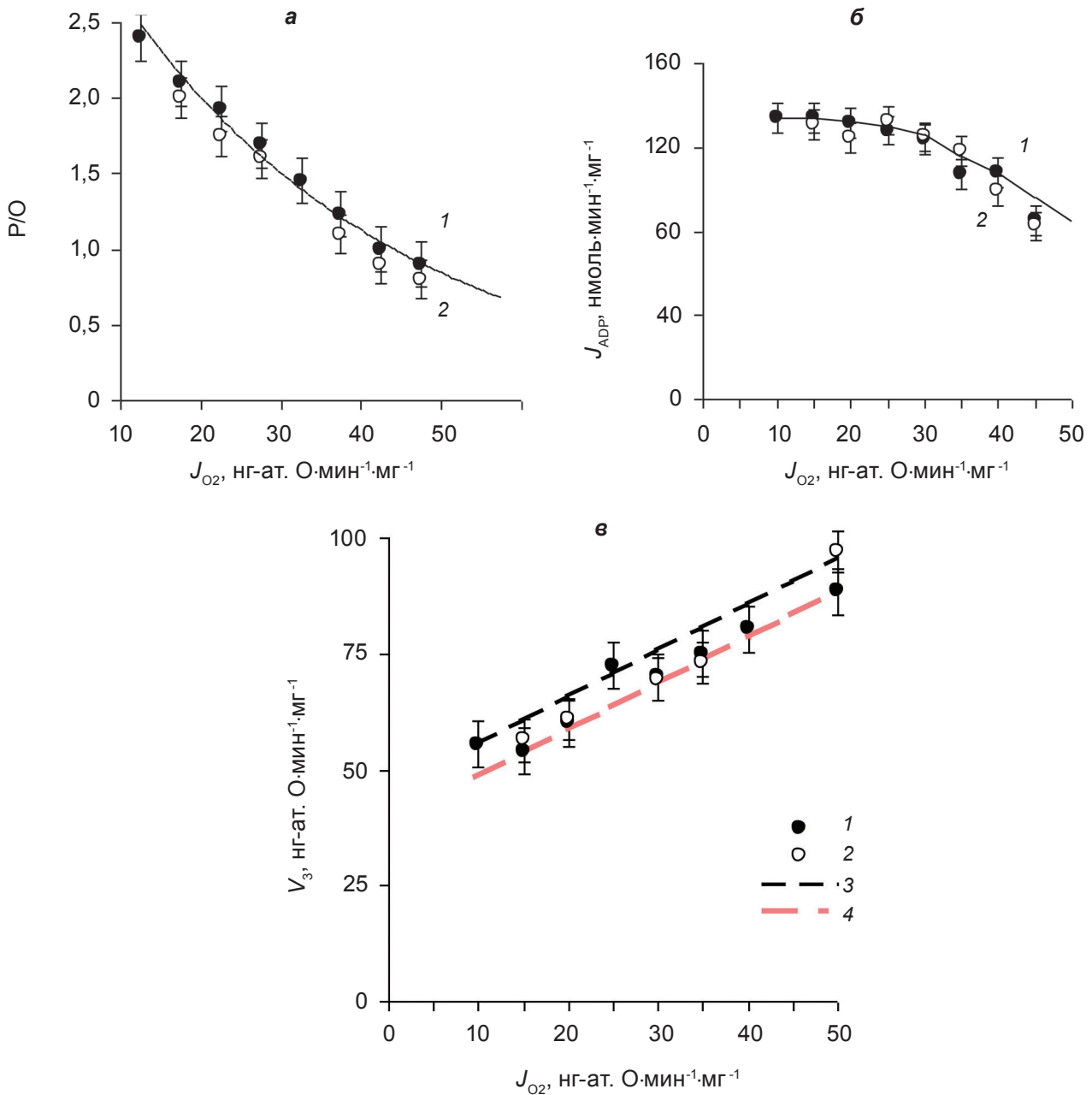


Рис. 5. Влияние скорости Ca^{2+} -стимулированного дыхания (состояние 4) на показатели функционального состояния митохондрий. Эффективность фосфорилирования, P/O (а), скорость фосфорилирования, J_{ADP} , нмоль ADP ·мин⁻¹·мг⁻¹ (б), а также скорость дыхания в состоянии 3, V_3 , нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹ (в) регистрировали в присутствии (черные точки) и в отсутствие (белые точки) циклоспорина А. Пунктиром (в, 3, 4) показан результат суммирования скорости ADP -стимулированного дыхания в контроле и прироста скорости дыхания в состоянии 4 относительно контроля в присутствии и в отсутствие циклоспорина А (пояснения в тексте)

окисления, расходуется на транспортный процесс. Скорость ADP -стимулированного дыхания в контроле (при минимальных значениях скорости дыхания в состоянии 4 в присутствии циклоспорина А) составляла $55,5 \pm 3,0$ нг-ат О·мин⁻¹·мг⁻¹ и при полном разобщении (СССР)

достигала $110,6 \pm 4,5$ нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹. Если принять, что скорость потребления кислорода характеризует энергетические затраты дыхательной цепи на энергозависимые процессы, то очевидно, что синтез АТФ только частично использует энергию, высвобождаемую при

окислении субстрата митохондриями. Поскольку J_U лимитируется скоростью редокс-реакции, отношение J_U/V_3 может служить мерой «энергетической емкости» дыхательной цепи и возможности активации транспорта электронов до граничной величины, соответствующей скорости разобщенного дыхания [42]. Очевидно, что соотношение J_U/V_3 должно быть ≥ 1 . Это условие соблюдается при открывании МРТР и активации циклического транспорта Ca^{2+} . Так, по нашим данным повышение расхода энергии при активации Ca^{2+} -цикла приводит к одновременному повышению скорости дыхания как в состоянии 4, так и в состоянии 3. При повышении эндогенной H^+ -проводимости мембраны (рис. 5, в, черные точки и пунктир 3), экспериментальные значения V_3 близки к результатам суммирования скорости АDP-стимулированного дыхания в контроле и прироста скорости дыхания в состоянии 4 вследствие ускорения циклического транспорта ионов. То же происходит и при открывании МРТР (рис. 5, в, белые точки и пунктир 4). Таким образом, в случае Ca^{2+} -индуцированного разобщения в условиях повышения H^+ -проводимости мембраны, как в присутствии циклоспорина А, так и при открывании МРТР, «энергетическая емкость» системы допускает одновременное протекание двух процессов — синтеза АТР и циклического транспорта ионов без конкуренции за «энергетический ресурс», $\Delta\mu_{H^+}$. Это позволяет поддерживать относительно стабильную скорость фосфорилирования в достаточно широком интервале скоростей Ca^{2+} -стимулированного дыхания, при одновременном снижении Р/О.

Результаты проведенных экспериментов позволяют сделать ряд выводов.

1. В стационарных условиях (постоянные значения мембранного потенциала и постоянная скорость дыхания) открывание МРТР приводит к активации Ca^{2+} -цикла вследствие повышения H^+ -проводимости мембраны митохондрий.

2. В условиях открывания МРТР активация Ca^{2+} -цикла поддерживается одновременной работой МРТР и Ca^{2+} -унипортера, которые вносят примерно равный вклад в циклический транспорт Ca^{2+} и скорость дыхания митохондрий.

3. Разобщающий эффект МРТР по функциональным показателям (ДК, Р/О и J_{ADP}) не отличается от эффекта «мягкого» протонофорного разобщения дыхательной цепи.

4. Оценка доли МРТР в Ca^{2+} -цикле в условиях его максимальной активации показывает,

что вклад МРТР, составляющий $8,7 \pm 1,2$ нг-ат. О-мин $^{-1}$ -мг $^{-1}$, приводит к небольшому разобщающему эффекту (снижение ДК и Р/О). При этом открывание МРТР не влияет на скорость фосфорилирования.

Таким образом, приведенные результаты выявляют некоторые малоизученные аспекты функционирования МРТР, позволяющие характеризовать ее как эндогенный механизм «мягкого» протонофорного разобщения дыхательной цепи. Возможность функционирования МРТР в системе трансмембранного ионного обмена митохондрий как циклоспорин А-чувствительного Ca^{2+}/H^+ -обмена в условиях нормальной физиологии требует всестороннего освещения в будущих исследованиях.

ВПЛИВ Ca^{2+} -ИНДУКОВАНОГО ВІДКРИВАННЯ ЦИКЛОСПОРИНЧУТЛИВОЇ ПОРИ НА СПОЖИВАННЯ КИСНЮ І ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

О. В. Акопова, В. И. Носарь,
И. Н. Маньковська, В. Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ;
e-mail: a-dubensky@mail.ru

Досліджено вплив Ca^{2+} -індукованого відкривання циклоспоринчутливої пори (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) на споживання кисню і функціональний стан митохондрий печінки щурів. Показано, що за відсутності деполяризації функціональна активність МРТР призводить до підвищення стаціонарної швидкості дихання за окиснення субстрату (глутамату) внаслідок активації циклоспоринчутливого Ca^{2+}/H^+ -обміну і циклічного транспорту Ca^{2+} , який підтримується одночасною роботою МРТР і Ca^{2+} -унипортера. За допомогою селективних блокаторів, циклоспорину А і рутенієвого червоного показано, що МРТР і Ca^{2+} -унипортер роблять близький за величиною внесок в Ca^{2+} -цикл і швидкість дихання митохондрий. Встановлено, що біоенергетичні ефекти відкривання МРТР в стаціонарних умовах (підвищення швидкості дихання у разі окиснення субстрату за відсутності АDP, зниження дихального контролю та енергетичної ефективності синтезу АТР, Р/О) близькі до функціональних змін внаслідок підвищення ендогенної протонної провідності мембрани митохондрий. Роз'єднуючий ефект МРТР май-

же не впливає на швидкість фосфорилування, відносна стабільність якої підтримується за рахунок активації дихального ланцюга і підвищення швидкості дихання в стані 3. Зроблено висновок, що за нормальних фізіологічних умов МРПТ може функціонувати як ендogenous механізм «м'якого» протонного роз'єднання дихального ланцюга.

Ключові слова: Ca^{2+} , циклоспорин-чутлива пора, Ca^{2+} -цикл, споживання кисню, функціональний стан мітохондрій, мітохондрії печінки.

THE EFFECT OF Ca^{2+} -INDUCED OPENING OF CYCLOSPORINE-SENSITIVE PORE ON THE OXYGEN CONSUMPTION AND FUNCTIONAL STATE OF RAT LIVER MITOCHONDRIA

*O. V. Akopova, V. I. Nosar,
I. N. Mankovska, V. F. Sagach*

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: a-dubensky@mail.ru

The effect of Ca^{2+} -induced opening of cyclosporine-sensitive pore (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) on the oxygen consumption and mitochondrial functional state was studied in the rat liver mitochondria. It was shown that, with the use of glutamate as oxidation substrate, in the absence of depolarization MPTP opening results in the increase of steady state respiration rate because of the activation of cyclosporine-sensitive $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -exchange and Ca^{2+} cycling, which was supported by the simultaneous work of MPTP and Ca^{2+} -uniporter. With the aid of selective blockers, cyclosporine A and ruthenium red, it was shown that MPTP and Ca^{2+} -uniporter contribute equally to the Ca^{2+} -cycling and mitochondrial respiration. It was shown that bioenergetic effects of MPTP opening under steady state conditions (increase in the oxygen consumption rate under substrate oxidation without ADP, decrease in respiratory control ratio as well as the effectiveness of ATP synthesis, P/O) are close to the functional alterations, which result from the increase of endogenous proton conductance of mitochondrial membrane. Uncoupling effect of MPTP opening, by itself, had no effect on phosphorylation rate, which remains relatively stable because the fall of P/O is compensated by the activation of respiratory chain and the increase in the rate of state 3 respiration.

It was concluded that under physiologically normal conditions MPTP might function as the endogenous mechanism of mild uncoupling of respiratory chain.

Key words: Ca^{2+} , cyclosporine-sensitive pore, Ca^{2+} -cycling, oxygen consumption, mitochondrial functional state, rat liver mitochondria.

1. Skulachev V. P. // Mol. Aspects Med. – 1999. – **20**. – P. 139–184.
2. Acuna-Castroviejo D., Martin M., Macias M. et al. // J. Pineal Res. – 2001. – **30**. – P. 65–74.
3. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K. et al. // FEBS Lett. – 2004. – **567**. – P. 96–102.
4. Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D. E. // Nature. – 2004. – **427**. – P. 360–64.
5. Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. L. et al. // Am. J. Physiol. – 2004. – **287**. – P. C817–C833.
6. Brown G. C. // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – **1411**. – P. 351–369.
7. Feissner R. F., Skalska J., Gaum W. E., Sheu Sh.-Sh. // Front. Biosci. – 2009. – **14**. – P. 1197–1218.
8. Grijalba M. T., Vercesi A. E., Schreier S. // Biochemistry. – 1999. – **38**. – P. 13279–13287.
9. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. // Physiol. Rev. – 2007. – **87**. – P. 90–163.
10. Kinnaly K. W., Peixoto P. M., Ryu Sh.-Y., Dejean L. M. // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – **1813**. – P. 616–622.
11. Beutner G., Ruck A., Riede B., Brdiczka D. // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – **1368**. – P. 7–18.
12. Crompton M., Barksby E., Johnson N., Capano M. // Biochimie. – 2002. – **84**. – P. 143–152.
13. Duchon M. R. // J. Physiol. – 2000. – **529**. – P. 57–68.
14. Weiss J. N., Korge P., Honda H. M., Ping P. // Circ. Res. – 2003. – **93**. – P. 292–301.
15. Gulbins E., Dreschers S., Bock J. // Exper. Physiol. – 2003. – **88**. – P. 85–90.
16. Cai J., Jones D. P. // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**. – P. 11401–11404.
17. Zorov D. B., Juhaszova M., Sollott S. // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – **1757**. – P. 509–517.
18. Busija D. W., Lacza Zs., Rajapakse N. et al. // Brain Res. Rev. – 2004. – **46**. – P. 282–294.
19. Szabo I., De Pinto V., Zoratti M. // FEBS Lett. – 1993. – **330**. – P. 206–210.
20. Cheng Y., Debska-Vielhaber G., Siemen D. // FEBS Lett. – 2010. – **584**. – P. 2005–2012.

21. Аконова О. В., Коркач Ю. П., Коцюруба А. В. и др. // Физиол. журн. – 2012. – **58**, № 2. – С. 3–15.
22. Altschuld R. A., Hohl C. M., Castillo L. C. et al. // Am. J. Physiol. – 1992. – **262**. – P. H1699–H1704.
23. Kass G. E. N., Juedes M. J., Orrenius S. // Biochem. Pharmacol. – 1992. – **44**. – P. 1995–2003.
24. Сагач В. Ф., Богуславський А. Ю., Дмитрієва А. В., Надточій С. М. // Физиол. журн. – 2004. – **50**. – С. 19–26.
25. Estabrook R. // Methods Enzymol. – 1967. – **10**. – P. 41–47.
26. Mitchell P. // Biol. Rev. – 1966. – **41**. – P. 445–456.
27. Hutson S. M., Pfeiffer D. R., Lardy H. A. // J. Biol. Chem. – 1976. – **251**. – P. 5251–5258.
28. Hutson S. M. // J. Biol. Chem. – 1977. – **252**. – P. 4539–4545.
29. Broekemeier K. M., Schmid P. C., Schmid H. H. O., Pfeiffer D. R. // J. Biol. Chem. – 1985. – **260**. – P. 105–113.
30. Brand M. D., Affourtit Ch., Esteves T. C. et al. // Free Rad. Biol. Med. – 2004. – **37**, N 6. – P. 755–767.
31. Petronilli V., Cola C., Massari S. et al. // J. Biol. Chem. – 1993. – **268**. – P. 21939–21945.
32. Pozzan T., Bragadin M., Azzone G. F. // Biochemistry. – 1977. – **16**. – P. 5618–5625.
33. Аконова О. В., Сагач В. Ф. // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 1. – С. 58–67.
34. Аконова О. В. // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 3. – С.40–47.
35. Liu Sh. // J. Bioenerg. Biomembr. – 1999. – **31**. – P. 367–376.
36. Nicholls D., Akerman K. // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – **683**. – P. 57–88.
37. Аконова О. В. // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 3. – С.46–55.
38. Аконова О. В., Сагач В. Ф. // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 5. – С. 61–65.
39. Hinkle P. C. // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – **1706**. – P. 1–11.
40. Beavis A. D., Lehninger A. L. // Eur. J. Biochem. – 1986. – **158**. – P.315–322.
41. Heaton G. M., Nicholls D. G. // Biochem. J. – 1976. – **56**. – P. 635–646.
42. Hutter E., Renner K., Pfister G. et al. // Biochem. J. – 2004. – **380**. – P. 919–928.

Получено 21.03.2013