

Н.А. Струтинська, Н.О. Дорофєєва, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

Підвищена чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів зі спонтанною гіпертензією

У досліджах in vitro на мітохондріях, ізольованих із тканини серця дорослих щурів зі спонтанною гіпертензією, виявлено підвищену чутливість мітохондріальної пори (МП) до дії її природного індуктора Ca^{2+} (10^{-7} – 10^{-4} моль/л) внаслідок зменшення на два порядки діючої концентрації іона, яка спричинює набухання органел. Кальційіндуковане набухання мітохондрій у щурів з нормальним артеріальним тиском (контроль) повністю попереджалося класичним інгібітором циклоспорином А у концентрації 10^{-5} моль/л, а у тварин зі спонтанною гіпертензією – лише частково – на 54 %. Це свідчить про наявність нечутливої до циклоспорино А компоненти МП. Результати наших спостережень дають підставу заключити, що гіпертензивні стани організму пов'язані з мітохондріальною дисфункцією, яка характеризується, зокрема, збільшенням чутливості МП до Ca^{2+} , що може спричиняти поширені тканинні ушкодження, якими супроводжуються хвороби серцево-судинної системи, наприклад гіпертензія.

Ключові слова: мітохондріальна пора, серце, гіпертензія, щури.

ВСТУП

Відомо про значення мітохондрій у забезпеченні клітини продукцією АТФ, і гомеостазу як на клітинному, так і на організменному рівнях, особливо у розвитку апоптозу. В останній час багато дослідників вивчають молекулярні механізми та роль мітохондріальних порушень деяких розповсюджених захворювань серцево-судинної системи, зокрема таких, як артеріальна гіпертензія [1, 3, 5, 13]. Серед найважливіших складових патогенезу первинної гіпертензії є порушення іонного гомеостазу клітини та її енергетичного стану, пов'язаного зі зниженням АТФ-синтезувальної функції мітохондрій [2]. Вважають, що вірогідна причина пригнічення мітохондріального синтезу АТФ внаслідок роз'єднання окисного фосфорилування – перевантаження органел Ca^{2+} , надлишок якого утворюється в цитозолі клітини при порушенні мембранної регуляції цього іона за умов артеріальної гіпертензії [2, 3, 6]. Відомо, що мітохондрії

відіграють важливу роль у забезпеченні внутрішньоклітинного гомеостазу Ca^{2+} . При ушкодженні клітини останні можуть бути цитотоксичними агентами через незбалансоване їх накопичення. Критеріями порушення кальцієвого гомеостазу є зміни концентрацій іонізованого кальцію в клітині і, як наслідок, процесів його внутрішньоклітинного депонування в цитозолі та модифікація мембранної проникності для цих іонів [19].

В організмі дисбаланс між продукцією вільних радикалів – активних форм кисню (АФК) та азоту (АФА) – й антиоксидантними системами захисту в клітині призводить до оксидативного стресу, який є причиною розвитку таких патологічних станів, як ішемія, гіпоксія, діабет, а також фізіологічне старіння [7, 8, 11]. Так, у серці старих тварин, на відміну від дорослих, спостерігаються більш значні ушкодження, зумовлені окисною модифікацією білків і порушенням кальцієвого гомеостазу [12, 14]. До факторів, окрім Ca^{2+} , що опосередковують розвиток системної

гіпертензії, належить також надлишкова продукція мітохондріями АФК, котрі нейтралізують вазорелаксуючий вплив оксиду азоту (NO) і прискорюють апоптоз [2, 16].

Навантаження Ca^{2+} і оксидативний стрес – відомі індуктори неселективної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП), яка є важливим регулятором функціонування мітохондрій як за фізіологічних, так і патологічних умов [15, 17]. Слід зазначити, що МП відіграє ключову роль у клітинних порушеннях, спричинених насамперед перевантаженням органел Ca^{2+} і виникненням оксидативного стресу. Процес пороутворення тісно пов'язаний зі зміною проникності мітохондріальних мембран, що характеризується різною їх чутливістю до дії індукторів. Оскільки МП – структурна організація мембран, то однією з характерних її властивостей є чутливість до індукторів її відкриття, зокрема до Ca^{2+} та окисників.

Метою нашої роботи було дослідити зміни чутливості МП до дії природного індуктора Ca^{2+} в діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-4} моль/л у серці щурів зі спонтанною гіпертензією.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, маса 220–250 г) щурах лінії Вістар. До I (контрольної) групи ввійшли щури лінії Вістар з нормальним артеріальним тиском, до II – зі спонтанною гіпертензією. Всі експериментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС). Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10 тварин.

Серця, видалені з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (4°C). Мітохондрії виділяли диференціальним центрифугуванням [4], і в суспензії органел визначали вміст білка за методом Лоурі.

Відкриття МП досліджували за до-

помогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25, KH_2PO_4 – 3; pH 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при $\lambda=520$ нм за 3 хв до і впродовж 15 хв їх набухання за наявності індуктора Ca^{2+} . Зміну рівня набухання органел визначали як різницю у відсотках між набуханням мітохондрій на 15-й хвилині відносно вихідного значення. Концентрація білка в інкубаційному середовищі становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв. Зміну чутливості МП до індуктора Ca^{2+} визначали за різницею величин набухання мітохондрій при дії індуктора в діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-4} моль/л у серці щурів зі спонтанною гіпертензією. Поріг чутливості відповідав найменшій концентрації Ca^{2+} , що спричиняла набухання мітохондрій цих щурів порівняно з контролем.

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програми Origin 7.0 («Microcall Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Характерні криві спонтанного набухання мітохондрій (контроль у безкальцієвому середовищі) та кальційіндукованого набухання органел, що відбувалося внаслідок відкриття МП, у серці дорослих щурів з нормальним тиском і щурів зі спонтанною гіпертензією показані на рис. 1. У безкальцієвому середовищі зміна величин набухання мітохондрій становила 7,28 та 10,45 % у контрольних щурів і щурів зі спонтанною гіпертензією відповідно. В умовах навантаження кальцієм (10^{-4} моль/л) мітохондрії серця щурів зі спонтанною гіпертензією суттєво набухали ($\Delta = 22,55$ %), на відміну від контрольних тва-

рин ($\Delta = 17,96\%$). Це свідчить про підвищену чутливість МП до дії кальцію у зазначеній концентрації у серці щурів зі спонтанною гіпертензією. Отже, кальційіндуковане відкривання МП, очевидно, найбільш відповідає функціональному стану клітин при патології, зокрема при первинній гіпертензії, оскільки особливістю мітохондрій за цієї патології є їх функціонування в умовах стаціонарно підвищеної концентрації цитозольного кальцію [2]. Слід відмітити, що кальційіндуковане набухання мітохондрій у серці контрольних щурів повністю попереджалася класичним інгібітором циклоспорину А у концентрації 10^{-5} моль/л, а у тварин зі спонтанною гіпертензією – лише частково (на 54 %; див. рис.1, б). Згідно з нашими попередніми да-

ними [4] і літературними відомостями [10], в мітохондріях серця, зокрема старих щурів поряд з класичною МП, частково утворюється неспецифічна нечутлива до циклоспорину А пара. Отже, можна припустити, що описана особливість дії на мітохондрії класичного інгібітора МП циклоспорину А, що спостерігається при старінні, властива також і мітохондріям серця дорослих щурів зі спонтанною гіпертензією.

У наступній серії експериментів нами отримано результати відносно чутливості МП до індуктора Ca^{2+} у серці щурів зі спонтанною гіпертензією. Так, за умов дії Ca^{2+} (10^{-7} – 10^{-4} моль/л) на мітохондрії, ізольовані з тканини серця контрольних і щурів зі спонтанною гіпертензією, спостерігали дозозалежне їх набухання (рис. 2). За відсутності в інкубаційному середовищі індуктора Ca^{2+} , мітохондрії серця щурів зі спонтанною гіпертензією мали більшу здатність до набухання. Це свідчить про те, що їм властива підвищена проникність мембран внаслідок відкривання МП. Крім того, зміна проникності мембран органел, можливо, пов'язана з підвищеною концентрацією цитозольного кальцію та посиленням оксидативних процесів як у серці, так і в цілому організмі. Більша величина набухання мітохондрій за умов дії Ca^{2+} у серці щурів II групи порівняно з контролем свідчить про підвищену чутливість МП до дії досліджуваного індуктора. Ми спостерігали зміщення дозозалежної кривої кальційіндукованого відкривання МП вліво (див. рис. 2), що є показником підвищеної чутливості МП до

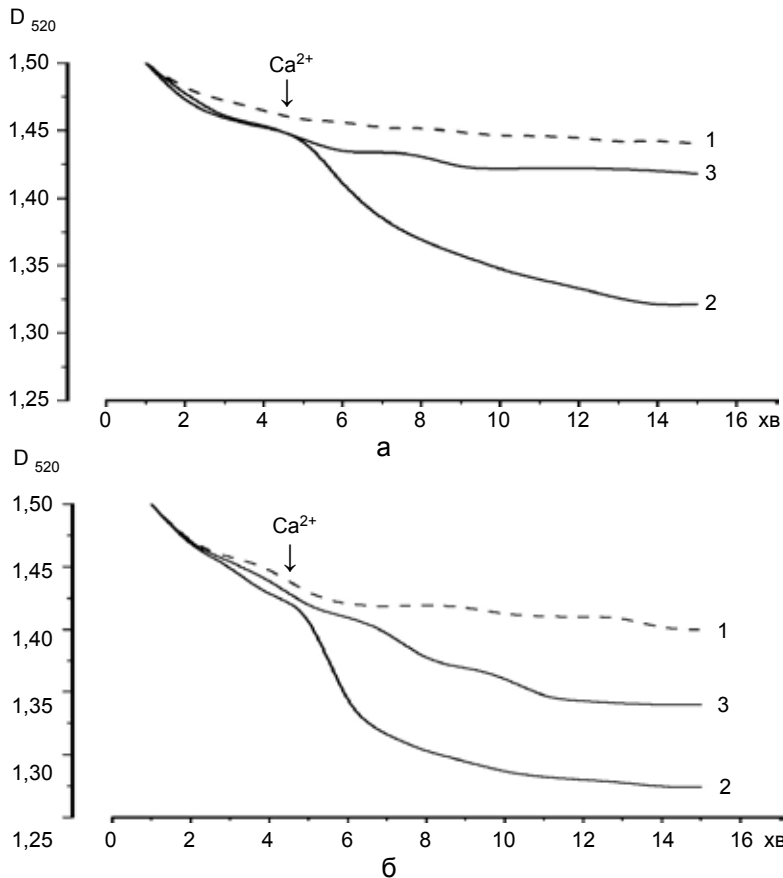


Рис. 1 Набухання мітохондрій серця контрольних (а) та щурів зі спонтанною гіпертензією (б) за умов дії індуктора мітохондріальної пори Ca^{2+} (10^{-4} моль/л): 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} ; 3 – преінкубація з циклоспорином А (10^{-5} моль/л), дія Ca^{2+}

індуктора Ca^{2+} : набухання мітохондрій серця щурів зі спонтанною гіпертензією при концентрації Ca^{2+} 10^{-7} моль/л було таким, як у контрольних при концентрації індуктора 10^{-5} моль/л. Це говорить про зменшення на два порядки порогової концентрації іона, яка спричиняє набухання органел у серці щурів зі спонтанною гіпертензією. Результати наших експериментів корелюють з даними літератури щодо зниження порога відкриття МП у серці цих щурів порівняно з контролем [20]. Так, показано, що таке зниження було пов'язане з посиленням продукуванням АФК, що призводило до збільшення площі некрозу міокарда на моделі ішемії–реперфузії у щурів зі спонтанною гіпертензією [20].

Таким чином, нами показано, що порушення функціонування МП у щурів зі спонтанною гіпертензією пов'язано з підвищеною чутливістю МП до індуктора Ca^{2+} : поря відкривалась у відповідь на найменшу концентрацію поглиненого кальцію, тобто зменшувалась порогова концентрація індуктора.

Відомо, що за фізіологічних умов МП функціонує в режимі низької провідності і характеризується циклічністю роботи, подібною за механізмом до кальційіндукованого вивільнення у цитозоль Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулула [7]. Функціонування МП у режимі високої провідності – явище незво-

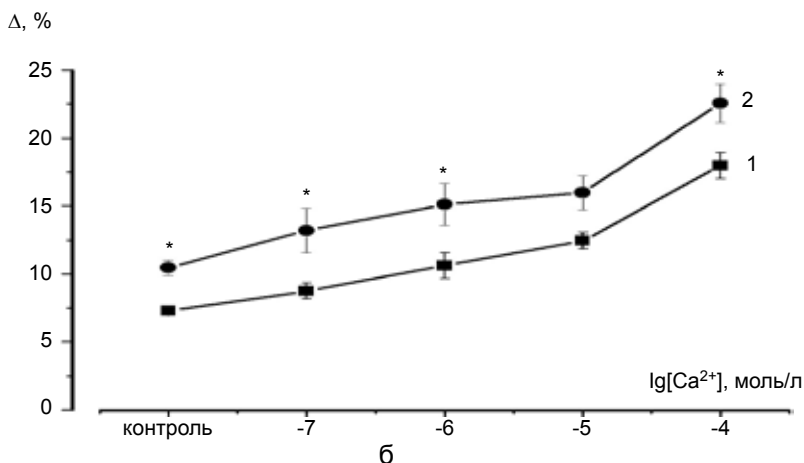


Рис. 2. Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора її відкриття – Ca^{2+} у серці контрольних щурів (1) та щурів зі спонтанною гіпертензією (2). * $P < 0,05$ відносно контролю

ротне і пов'язане з глибокими наслідками для функції та структури мітохондрій і клітини в цілому. Цей режим ініціюється, зокрема, масивним некерованим входом кальцію в клітину і призводить до осмотичних змін в органелах й утворення у них зон набухання та деструкції [2, 7]. При цьому в цитоплазму вивільнюються тригери апоптозу: фактор індукції (AIF) і цитохром С. Відомо, що частота апоптозу в клітинах різних тканин при первинній гіпертензії значно перевищує таку в контролі [9]. Постнов [2] вважає, що у щурів зі спонтанною гіпертензією змінюється співвідношення кількості каналів, що функціонують у режимі низької та високої провідності, на користь останніх. Перехід МП у режим високої провідності призводить до зниження іонних градієнтів на внутрішній мембрані мітохондрій, що негативно впливає на АТФ-синтезувальну їх здатність і, у свою чергу, спричинює розвиток енергетичного дефіциту у клітинах. Показано, що за умов гіпертензії посилюється експресія аденін-нуклеотидтранслокази, яка може покращувати перебіг серцевих захворювань і захищати серце від пошкоджень [18].

Раніше нами було показано, що мітохондрії, ізольовані із тканини серця старих щурів, мають значно більшу чутливість до індукторів відкриття МП Ca^{2+} і феніларсиноксиду порівняно з дорослими тваринами [4]. Отже, на підставі отриманих нами результатів зроблено висновок, що гіпертензивний стан організму та фізіологічне старіння, які мають спільні риси, супроводжуються мітохондріальною дисфункцією, одним із проявів якої є підвищена чутливість МП до індукторів її відкриття, на тлі посилення дисбалансу між про- і антиоксидантними складовими.

Таким чином, нами було

показано, що мітохондрії серця щурів зі спонтанною гіпертензією потребують меншого накопичення Ca^{2+} для індукції кальційзалежного набухання мітохондрій, тобто більш чутливі до іонів кальцію. Отже, мітохондрії серця щурів зі спонтанною гіпертензією, очевидно, мають підвищену проникність мембран і характеризуються зниженим порогом відкриття МП до дії індуктора Ca^{2+} , подібно до таких властивостей мітохондріальних мембран серця у старих щурів, як нами встановлено раніше [4].

ВИСНОВКИ

1. Показано підвищену чутливість МП до дії Ca^{2+} у серці щурів зі спонтанною гіпертензією внаслідок зменшення на два порядки діючої концентрації індуктора, який спричиняє набухання органелл.

2. Циклоспорин А (10^{-5} моль/л) лише частково (на 54 %) пригнічував відкриття МП у серці щурів зі спонтанною гіпертензією порівняно з контролем, що свідчить про наявність нечутливої до інгібітора компоненти пори.

3. Гіпертензивні стани організму пов'язані з мітохондріальною дисфункцією, яка характеризується, зокрема збільшенням чутливості МП до Ca^{2+} , що може спричинити поширені тканинні ушкодження при хворобах серцево-судинної системи, зокрема гіпертензії.

**Н.А. Струтинская, Н.А. Дорофеева,
Г.Л. Вавилова, В.Ф. Сагач**

ПОВЫШЕННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ К Ca^{2+} В СЕРДЦЕ КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

В опытах *in vitro* на митохондриях, изолированных из ткани сердца взрослых крыс с нормальным артериальным давлением и крыс со спонтанной гипертонией, исследовали чувствительность митохондриальной поры (МП) к действию естественного индуктора Ca^{2+} . Выявили повышенную чувствительность МП к Ca^{2+} в сердце крыс со спонтанной гипертонией за счет уменьшения на два порядка действующей концентрации иона, которая вызы-

вала набухание органелл. Показано, что классический ингибитор МП циклоспорин А (10^{-5} моль / л) частично (на 54 %) ингибировал открывание МП в сердце этих животных, что свидетельствует о наличии в нем нечувствительной компоненты к циклоспорино А МП. Результаты наших наблюдений дают основание заключить, что гипертонические состояния организма связаны с митохондриальной дисфункцией, характеризующейся, в частности, увеличением чувствительности МП к Ca^{2+} , что может вызывать распространенные тканевые повреждения, которыми сопровождаются болезни сердечно-сосудистой системы, в частности гипертония.

Ключевые слова: митохондриальная пора, сердце, гипертония, крысы.

**N.A. Strutynska, N.A. Dorofeeva, G.L. Vavilova,
V.F. Sagach**

INCREASE IN THE SENSITIVITY OF THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING TO Ca^{2+} IN HEART OF SPONTANEOUS HYPERTENSIVE RAT

In experiments *in vitro* on the mitochondria isolated from adult and spontaneous hypertensive rat hearts, we studied the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening to its natural inductor, Ca^{2+} . We observed an increase in the sensitivity of mPTP opening to Ca^{2+} in the heart of spontaneous hypertensive rats because of a decrease in the threshold concentration of this ion required for organelles swelling by two orders of magnitude. It was shown that the classical inhibitor mPTP cyclosporin A (10^{-5} mol / L) partially (54%) inhibited of mPTP opening in the heart of these animals, indicating that the presence in the heart of these animals of cyclosporin A-insensitive component of the mPTP. The results of our observations give reason to conclude that the hypertensive state of the organism is associated with mitochondrial dysfunction, which is characterized, in particular, by an increased sensitivity mPTP to Ca^{2+} , eliciting a widespread tissue damage and diseases of the cardiovascular system, especially hypertension.

Key words: mitochondrial permeability transition pore, heart, hypertension, rat.

O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Горбась І.М. Епідеміологія основних факторів ризику серцево-судинних захворювань // Артеріальна гіпертензія. – 2008. – № 2. – С. 13–18.
2. Постнов Ю.В. Недостаточность образования АТФ в связи с кальциевой перегрузкой митохондрий как источник повышения артериального давления при первичной гипертонии // Кардиология. – 2005. – №10. – С. 4–11.

3. Постнов Ю.В., Орлов С.Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. – М: Медицина. – 1987. – 192 с.
4. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів // Фізіол. журн. – 2004. – **50**, №2. – С.49–63.
5. Сіренко Ю.М. Гіпертонічна хвороба і артеріальні гіпертензії. – Донецьк: Видавець Заславський О.Ю., 2011. – 304 с.
6. Calderón-Cortés E., Cortés-Rojas C., Clemente-Guerrero M., Manzo-Ávalos S., Villalobos-Molina R., Boldogic I., Saavedra-Molina A. Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age // Mitochondrion. – 2008. – **8**, № 3. – P. 262–272.
7. Di Lisa F., Carpi A., Giorgio V., Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection // Biochim Biophys Acta. – 2011. – 1813, № 7. – P. 1316–1322.
8. Halestrap A.P., Mc Stray G.P., Clarke S.J. The permeability transition pore complex: another view // Biochemie. – 2002. – **84**. – P.153–166.
9. Hamet P., Richard L.T., Dam T.V. Apoptosis in target organs of hypertension. Hypertension. – 1995. – **26**. – P. 642–648.
10. He L., Lemasters J.J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? // FEBS Let. – 2002 – **512**. – P.1–7.
11. Javadov S., Karmazyn M., Escobales N. Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases // Pharmacol. Exp. Ther. – 2009. – **330**, №3 – P. 670–678.
12. Lesnefsky E.J., Moghaddas S., Tandler J. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and failure // J. Mol. Cardiol. – 2001. – **33**, № 6. – P.1065–1089.
13. Lopez-Campistrous A., Hao L., Xiang W., Ton D., Semchuk K., Sander J., Ellison M.J., Fernandez-Patron C. Mitochondrial dysfunction in the hypertension rat brain. Respiratory complexes exhibit assembly defects in hypertension // Hypertension. – 2008. – **51**. – P. 412–419.
14. Lucas D.T., Szweda L.I. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – **95**. – P.510–514.
15. Martel C., Huynh L. H., Garnier A., Ventura-Clapier R., Brenner C. Inhibition of the mitochondrial permeability transition for cytoprotection: direct versus indirect mechanisms // Biochem. Res. Inter. – 2012. – P.1–13.
16. Ohtsuki T., Matsumoto M., Suzuki K., Taniguchi N., Kamada T. Mitochondrial lipid peroxidation and superoxide dismutase in rat hypertensive target organs // Heart Circulat. Physiol. – 1995. – **37**. – P. H1418–H1421.
17. Rasola A., Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis // Cell Calcium. – 2011. – **50**, № 3. – P. 222–233.
18. Walther T., Tschöpe C., Sterner-Kock A., Westermann D., Heringer-Walther S., Riad A., Nikolic A., Wang Y., Ebermann L., Siems W.E., Bader M., Shakibaei M., Schultheiss H.P., Dorner A. Accelerated mitochondrial adenosine di-phosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease // Circulation. – 2007. – **23**. – P. 333–344.
19. Wei A.-C., Liu T., Winslow R.L., O'Rourke B. Dynamics of matrix-free Ca^{2+} in cardiac mitochondria: two components of Ca^{2+} uptake and role of phosphate buffering // J. Gen. Physiol. – 2012. – 139, № 6. – P. 465–478.
20. Yano T., Miki T., Tanno M., Kuno A., Itoh T., Takada A., Sato T., Kouzu H., Shimamoto K., Miura T. Hypertensive hypertrophied myocardium is vulnerable to infarction and refractory to erythropoietin-induced protection // Hypertension. – 2011. – 57, № 1. – P. 110–115.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомльця НАН України, Київ
E-mail: natalystrutynska@inbox.ru

Матеріал надійшов до
редакції 30.08.2012