

УДК 612.014.46:577.352.4

ІНГІБІТОРНИЙ АНАЛІЗ ВЗАЄМОДІЇ КАТІОНІВ ОДНОВАЛЕНТНИХ МЕТАЛІВ ІЗ СИСТЕМОЮ Na^+ -ЗАЛЕЖНОГО ВИХОДУ Ca^{2+} З МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ

Н. В. НАЛИВАЙКО, Л. С. ВОВКАНИЧ, Л. О. ДУБИЦЬКИЙ

Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: nataliakrivyak@mail.ru

Застосовуючи методи кінетичного аналізу, встановили, що катіони одновалентних металів інгібують Na^+ -залежний вихід Ca^{2+} з мітохондрій переважно за конкурентним типом. Відповідно до ефективності інгібування катіони металів розташовуються у такій послідовності (I_{50} , мМ): Cs^+ (137,11) < Rb^+ (122,63) < Li^+ (24,59) < Tl^+ (0,541). Дані кореляційного аналізу показують, що транслокація іонів натрію мітохондріальним обмінником та інгібування її катіонами одновалентних металів супроводжується дегідратацією іонів і визначаються ступенем спорідненості їх до кисневмісних груп лігандів. У процесі транспортувального циклу відбувається модифікація кооперативних взаємодій катіонів з іонзв'язувальними центрами обмінника, що може бути одним із механізмів пригнічення транслокації іонів цією іонтранспортувальною системою.

Ключові слова: мітохондрії, Na^+ -залежний вихід Ca^{2+} , катіони одновалентних металів.

Відомо [1–3], що в мітохондріях м'язів, серця і інших тканинах водночас із Ca^{2+} -уніпортером функціонують системи Na^+ - і H^+ -залежного виходу Ca^{2+} . Наявність таких систем в мембранах мітохондрій передбачає можливість Na^+ - і H^+ -залежної регуляції кальцієвого гомеостазу клітин та енергетики цих органел [1, 4, 5]. З іншого боку, неконтрольовані зміни концентрації Na^+ , а також стани ацидозу і алкалозу призводять до істотних порушень кальцієвого гомеостазу та енергетики клітин і, врешті-решт, до їхньої загибелі, як це показано на клітинах міокарда тварин з експериментальним цукровим діабетом [6, 7]. Подібні стани виникають також унаслідок впливу на організм негативних чинників навколишнього середовища, зокрема інтоксикації його катіонами металів. Проте властивості й механізми функціонування мітохондріальних систем за зазначених умов і досі залишаються недостатньо вивченими. Одним із перспективних підходів для з'ясування фізико-хімічних механізмів транслокації іонів кальцію Ca^{2+} -транспортувальними системами мітохондрій та інгібування її іншими металами може бути встановлення зв'язку між дією катіонів цих металів на функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем і їхніми фізико-хімічними властивостями, зокрема спорідненістю до кисневмісних лігандів, ентальпії гідратації, радіуса іона тощо. Такий аналіз був успішно реалізований нами в попередніх роботах, в яких

вивчали взаємодію між кальцієвими помпами та функціонуванням Na^+ - Ca^{2+} -обмінника плазматичних мембран секреторних клітин [8, 9]. Мета цієї роботи полягає у з'ясуванні фізико-хімічних механізмів взаємодії катіонів одновалентних металів з Na^+ - Ca^{2+} -обмінником мітохондрій печінки.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на ізольованих мітохондріях печінки білих щурів, які виділяли з гепатоцитів диференціальним центрифугуванням [9]. Для гомогенізації тканини та одержання мітохондрій використовували середовище такого складу (мМ): сахароза – 300, Tris – 10, етиленглікольтетрааміноацетат (ЕГТА) – 1 (рН 7,4). Грубодисперсні залишки клітин та ядер в гомогенаті осаджували центрифугуванням (3 і 4 хв при 150 та 330 г відповідно). Мітохондріальну фракцію одержували 10-хвилинним центрифугуванням супернатанту при 4500 g. Мітохондрії відмивали від ЕГТА, ресуспендували осад та повторно центрифугували суспензію в середовищі гомогенізації за відсутності в ньому цього кальцієвого хелатора. Всі операції, пов'язані з виділенням мітохондрій, для збереження їхньої функціональної здатності здійснювали при температурі 0 – +2 °С. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали методом J. H. Lowry et al. [10]. Вихід Ca^{2+} з органел реєстрували з використанням установки, зібраної на основі

Ca²⁺-селективного електрода фірми «Orion» (модель 9320), універсального іонміра ЭВ-74, самописця КСП-4, магнітної мішалки та скляної відкритої термостатованої комірки об'ємом 2 мл. Вплив іонів одновалентних металів на вихід Ca²⁺ з мітохондрій печінки досліджували після попередньої акумуляції ними кальцію при 26 °С у середовищі інкубації такого складу (в мМ): сахароза – 150, КСl – 50, КН₂РO₄ – 0,1, Tris – 5 (рН 7,4). До нього вносили 10,0 мкМ Ca²⁺, мітохондрії (3–4 мг білка), сукцинат (0,35 мМ) та катіони металів – Тl⁺, Li⁺, Rb⁺, Cs⁺ – в діапазоні концентрацій 0,1–40,0 мМ. Вихід Ca²⁺ з мітохондрій реєстрували відразу після внесення до суспензії блокатора Ca²⁺-уніпортера органел – 5,0 мкМ рутенія червоного [2]. Дослідження Na⁺-залежного виходу Ca²⁺ з мітохондрій здійснювали у присутності NaCl (10,0 та 50,0 мМ). Зміни вмісту Ca²⁺ в розчині обчислювали з використанням калібрувального графіка, враховуючи зв'язування катіона компонентами середовища інкубації шляхом титрування CaCl₂.

Досліди проводили на білих щурах, яких декапітували після інгаляційного наркозу діетиловим ефіром. В експериментах застосовували реактиви ЕГТА («Sigma», США), рутеній червоний («Serva», Німеччина), а також хлориди металів та нітрат талію кваліфікації х. ч. та ос. ч. («Сінбіас», Україна).

Результати та обговорення

Дані проведених досліджень показують, що катіони лужних металів Cs⁺, Rb⁺, Li⁺ (концентрація 1,0–40,0 мМ) та Тl⁺ (концентрація 0,1–1,0 мМ) дозозалежно пригнічують Na⁺-залежний вихід Ca²⁺ з мітохондрій печінки (рис. 1; А, Б). Зокрема, у присутності в суспензії органел 40,0 мМ Cs⁺, Li⁺ і Rb⁺ та 50,0 мМ Na⁺ Na⁺-залежний вихід з них Ca²⁺ зменшується відповідно на 62,2, 27,5 і на 22,6% відносно вихідного рівня. Ефективнішим інгібітором Na⁺-Ca²⁺-обмінника мітохондрій виявився Тl⁺, інгібувальний ефект якого спостерігався в діапазоні 0,1–1,0 мМ. За концентрації Тl⁺ 1,0 мМ (рис. 1, Б) Na⁺-залежний вихід Ca²⁺ з мітохондрій зменшується на 62,0% порівняно з його рівнем за відсутності цього металу у середовищі.

Тип інгібування Na⁺-залежного виходу Ca²⁺ з мітохондрій катіонами металів визначали в координатах Уебба [11]. Шляхом лінеаризації концентраційних залежностей інгібування Na⁺-залежного виходу Ca²⁺ з органел іонами лужних металів у цих координатах встановлено, що прямі лінії для обох досліджуваних концентрацій Na⁺ перетинають вісь ординат у точках, близьких до одиниці (рис. 2, А). Подібні результати одержано і в експериментах з іонами Тl (рис. 2, Б). Згідно з умовами

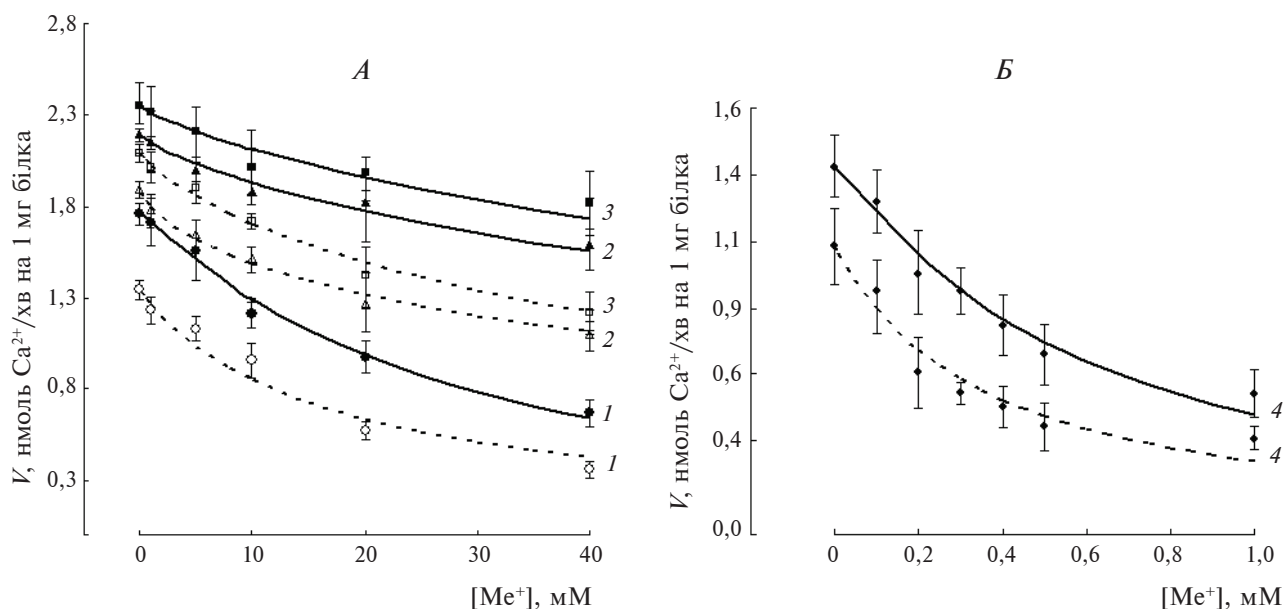


Рис. 1. Вплив катіонів одновалентних металів на швидкість Na⁺-залежного виходу Ca²⁺ з мітохондрій печінки. На осі абсцис наведено концентрацію (в мМ) іонів металів у суспензії мітохондрій; на осі ординат – швидкість (V) Na⁺-залежного виходу Ca²⁺ з мітохондрій печінки. Пунктирні і суцільні криві – концентрація Na⁺ в середовищі інкубації становить відповідно 10,0 і 50,0 мМ: криві 1–4 відображують дію Li, Rb, Cs та Tl відповідно.

кінетичного аналізу в координатах Уебба, наведені результати свідчать, що катіони одновалентних металів інгібують Na^+ -залежний вихід Ca^{2+} з мітохондрій печінки переважно за конкурентним типом і, таким чином, конкурують з Na^+ за місця зв'язування з катіонтранспортувальним центром іонтранспортувальної системи. Підтвердженням цього є дані [12], що Li^+ може заміщати Na^+ у процесі Na^+ -залежного транспортування Ca^{2+} Na^+ - Ca^{2+} -обмінником мітохондрій серця. Наведені результати передбачають безпосередню взаємодію катіонів одновалентних металів з Na^+ - Ca^{2+} -обмінником мітохондрій, що свідчить про доцільність їхнього застосування для аналізу специфічності та механізмів функціонування досліджуваної іонтранспортувальної системи.

Порівняння ефективності інгібування Na^+ -залежного виходу Ca^{2+} з мітохондрій Cs^+ , Rb^+ , Li^+ і Tl^+ проводили на основі констант напівінгібування (I_{50}), які визначали за модифікованим рівнянням Хілла в логарифмічних координатах [11, 13]. Установлено (рис. 3), що за здатністю пригнічувати Na^+ -залежний вихід Ca^{2+} з мітохондрій катіони одновалентних металів розташовуються у такій послідовності (I_{50} , мМ):

Cs^+ (137,11) < Rb^+ (122,63) < Li^+ (24,59) < Tl^+ (0,541).

Константи напівінгібування Na^+ -залежного виходу Ca^{2+} з мітохондрій печінки катіонами одновалентних металів порівнювали з фізико-хімічними параметрами останніх, які характеризують їхню здатність взаємодіяти з різними лігандами: кристалграфічним радіусом іонів, потенціалом іонізації, електронегативністю атомів і величиною ентальпії гідратації (табл. 1). Кореляційний аналіз цих даних показує, що ефективність інгібування Na^+ - Ca^{2+} -обмінника мітохондрій печінки іонами одновалентних металів (I_{50}) позитивно корелює зі спорідненістю їх до кисневмісних груп лігандів, в т. ч. до етилендіамінтетраацетату (ЕДТА), а також із величиною потенціалу іонізації та електронегативності атомів (табл. 2). Це свідчить, що транслокація іонів натрію Na^+ - Ca^{2+} -обмінником та інгібування її катіонами одновалентних металів, найвірогідніше, обумовлюються взаємодією їх із кисневмісними групами іонтранспортувальних центрів Ca^{2+} -транспортувальної системи. Встановлено також позитивну кореляцію між ефективністю інгібування (I_{50}) обмінника катіонами одновалентних металів та ентальпією їхньої гідратації і негативну — з величиною кристалграфічного радіуса атома. Ці результати свідчать, що

процеси транслокації іонів мітохондріальним Na^+ - Ca^{2+} -обмінником та його інгібування одновалентними металами супроводжуються дегідратацією — гідратацією іонів металів. Дегідратація іонів одно- і двовалентних металів супроводжує також процес транслокації їх Na^+ - Ca^{2+} -обмінником плазматичної мембрани та його інгібування, зокрема в секреторних клітинах хірономуса [16] і шлункових залоз [8, 17]. Це вказує на подібність фізико-хімічних механізмів транслокації катіонів іонними обмінниками як плазматичної мембрани, так і мембрани мітохондрій.

Проте у взаємодії іонів Na та інших одновалентних металів із мітохондріальним обмінником виявлено деякі відмінності. Так, попередніми нашими дослідженнями встановлено сигмоподібну залежність Na^+ -залежного виходу Ca^{2+} від концентрації Na^+ , що характеризується коефіцієнтом Хілла, який становить 1,95 [18]. Цей факт інтерпретовано нами як доказ кооперативної взаємодії не менше двох іонів Na з Na^+ - Ca^{2+} -обмінником мітохондрій у процесі його транспортувального циклу, а також стехіометрії обміну — не менше $2\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$. Водночас, як з'ясувалось, коефіцієнт взаємодії катіонів інших досліджуваних одновалентних металів з іонзв'язувальними центрами обмінника (n), обчислений нами за кутом нахилу прямих в логарифмічних координатах (рис. 3), є меншим порівняно з Na^+ і становить для Tl^+ , Li^+ , Rb^+ і Cs^+ відповідно 1,5, 1,3, 0,4 і 0,3. Ці результати, перш за все, свідчать про зниження ступеня кооперативності в разі взаємодії з Na^+ -зв'язувальними центрами обмінника іонів інших одновалентних металів. Проте наявність позитивної кооперативності для іонів Tl^+ і Li^+ є непрямим підтвердженням можливої транслокації їх мітохондріальним обмінником. Водночас від'ємна кооперативність для Rb^+ і Cs^+ свідчить, що за стехіометрії обміну $2\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ спостерігається пригнічення взаємодії катіона з іншим іонзв'язувальним центром обмінника у процесі його транспортувального циклу, яке також може призвести до інгібування транслокації іонів обмінником. Очевидно, що виявлені нами відмінності визначаються, передусім, особливостями фізико-хімічних взаємодій катіонів цих металів з іонзв'язувальними центрами. Потенційно вони можуть характеризувати здатність іона до транслокації обмінником або його оборотну дисоціацію з іонзв'язувальних центрів іонтранспортувальної системи.

Таким чином, проведеними дослідженнями встановлено, що катіони одновалентних

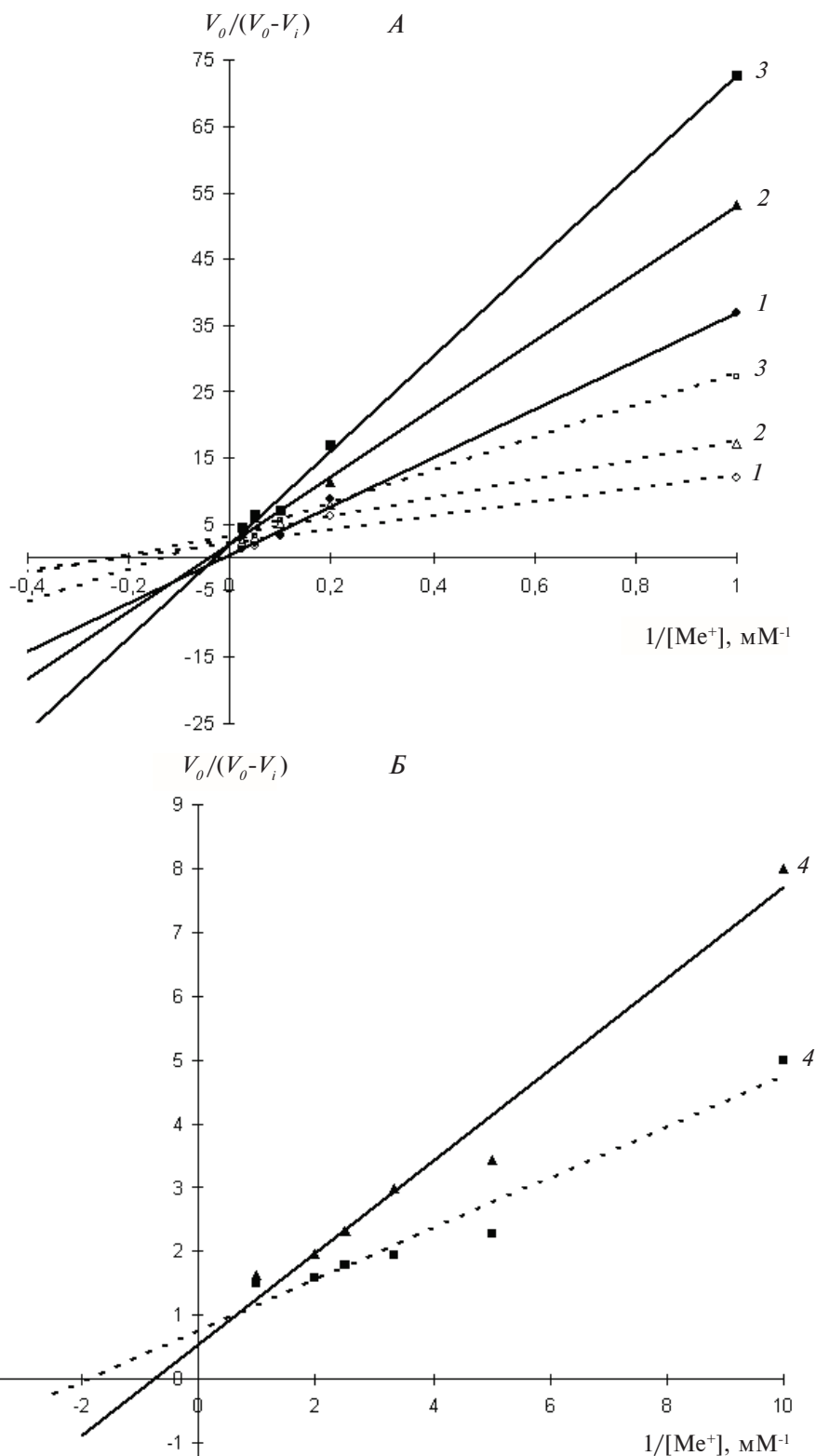


Рис. 2. Кінетичний аналіз інгібування Na^+ -залежного виходу Ca^{2+} з мітохондрій печінки катіонами одновалентних металів у системі координат Уебба. На осі абсцис наведено обернені величини концентрації металів (mM^{-1}), на осі ординат — обернені величини частки неінгібованої швидкості Na^+ -залежного виходу Ca^{2+} з мітохондрій $V_0/(V_0 - V_i)$. V_0 і V_i — відповідно початкова швидкість за відсутності і у присутності в середовищі інкубації іонів металу. Пунктирні і суцільні лінії — концентрація Na^+ в середовищі інкубації становить відповідно 10,0 і 50,0 mM ; лінії 1–3 відображують дію Li^+ , Rb^+ , Cs^+ (рис. А); лінія 4 — Tl^+ (рис. Б).

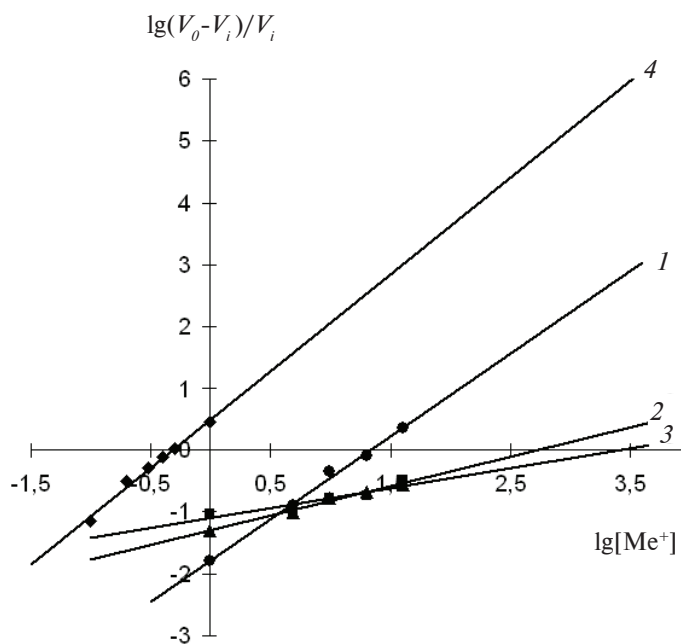


Рис. 3. Лінеаризація концентраційної залежності інгібування Na^+ -залежного виходу Ca^{2+} з мітохондрій катіонами металів у логарифмічних координатах. На осі абсцис наведено логарифм концентрації іонів одновалентних металів, на осі ординат — $\lg((V_0 - V_i)/V_i)$, де V_0 та V_i — початкові швидкості за відсутності і наявності в середовищі інкубації іонів металу відповідно. Концентрація Na^+ в середовищі інкубації становить 50,0 мМ; лінії 1– 4: Li^+ , Rb^+ , Cs^+ , Tl^+ відповідно. Прямі для катіонів окремих металів побудовано за експериментальними даними, наведеними на рис. 1.

Таблиця 1. Фізико-хімічні параметри катіонів металів та ефективність інгібування ними Na^+ -залежного виходу Ca^{2+} з мітохондрій печінки

Параметри катіонів металів	Катіони металів				
	Na^+	Tl^+	Li^+	Rb^+	Cs^+
Константа напівінгібування (I_{50}), мМ	—	0,541	24,59	122,63	337,11
Потенціал іонізації, еВ *	5,14	6,11	5,39	4,18	3,89
Радіус катіона за Полінгом, пм *	95	144	60	148	169
Електронегативність *	0,9	1,8	1,0	0,8	0,7
$\lg K_1$ (Me–ЕДТА) *	1,66	6,53	2,79	0,59	0,15
Ентальпія гідратації, кДж / М**	844,2	762,3	959,43	736,05	711,7

Примітка: * фізико-хімічні параметри катіонів металів наведено за А. Т. Пилипенком [14], ** фізико-хімічні параметри катіонів металів наведено за Г. А. Крестовим [15].

Таблиця 2. Залежність ефективності інгібування Na^+ -залежного виходу Ca^{2+} з мітохондрій печінки катіонами одновалентних металів від їхніх фізико-хімічних параметрів

Параметри інгібування	Коефіцієнт кореляції, r				
	Радіус іона за Полінгом, пм	Ентальпія гідратації, кДж/моль	Потенціал іонізації атома металу, еВ	Електро-негативність атома металу	$\lg K_1$ (Me–ЕДТА)
I_{50} , мМ	0,85 ($p = 0,91$)	-0,80 ($p = 0,88$)	-0,85 ($p = 0,91$)	-0,92 ($p = 0,95$)	-0,84 ($p = 0,90$)

Примітка: p – вірогідність коефіцієнта кореляції.

металів інгібують функціонування Na^+ - Ca^{2+} -обмінника мітохондрій печінки переважно за конкурентним типом. Транслокація Na^+ мітохондріальним обмінником та ефективність інгібування його катіонами інших одновалентних металів супроводжується процесами дегідратації іонів і визначається спорідненістю останніх до кисневмісних лігандів. Інгібування Na^+ - Ca^{2+} -обмінника мітохондрій катіонами одновалентних металів узгоджується також із модифікацією кооперативних взаємодій іонів металів з його іонзв'язувальними центрами у процесі транспортувального циклу, яке, вірогідно, є одним із механізмів пригнічення транслокації іонів цією іонтранспортувальною системою.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень (ДФФД) України. Грант № Ф7/210–2004.

**ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТИОНОВ
ОДНОВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ
С СИСТЕМОЙ Na^+ -ЗАВИСИМОГО
ВЫХОДА Ca^{2+} ИЗ МИТОХОНДРИЙ
ПЕЧЕНИ**

*Н. В. Наливайко, Л. С. Вовканыч,
Л. А. Дубицкий*

Львовский национальный университет
имени Ивана Франко, Украина;
e-mail: nataliakrivyak@mail.ru

Данные кинетического анализа показывают, что катионы одновалентных металлов ингибируют Na^+ -зависимый выход Ca^{2+} из митохондрий преимущественно по конкурентному типу. По эффективности его ингибирования катионы металлов располагаются в такой последовательности (I_{50} , мМ): Cs^+ (137,11) < Rb^+ (122,63) < Li^+ (24,59) < Tl^+ (0,541). С помощью корреляционного анализа установлено, что транслокация ионов натрия митохондриальным обменником и ингибирование последнего катионами одновалентных металлов сопровождаются процессами дегидратации ионов и определяются степенью сродства их к кислородсодержащим группам лигандов. При этом в процессе транспортного цикла происходит также модификация кооперативных взаимодействий катионов металлов с его ионсвязывающими центрами, что может быть одним из механизмов ингибирования транслокации их этой ионтранспортной системой.

Ключевые слова: митохондрии, Na^+ -зависимый выход Ca^{2+} , катионы одновалентных металлов.

**INHIBITORY ANALYSIS OF THE
MONOVALENT METALS' CATIONS
INTERACTION WITH THE SYSTEM
OF Na^+ -DEPENDENT Ca^{2+} EFFLUX
FROM LIVER MITOCHONDRIA**

*N. V. Nalyvajko, L. S. Vovkanych,
L. O. Dubitsky*

Ivan Franko Lviv National University, Ukraine;
e-mail: nataliakrivyak@mail.ru

S u m m a r y

Kinetic analysis reveals the mainly competitive inhibition of Na^+ -dependent Ca^{2+} efflux from mitochondria by cations of monovalent metals. Potency of the inhibitory effect of metals' cations on Na^+ -dependent Ca^{2+} efflux from mitochondria matrix increases in such an order (I_{50} , mM): Cs^+ (137.11) < Rb^+ (122.63) < Li^+ (24.59) < Tl^+ (0.541). The results of correlation analysis show that sodium ions translocation by mitochondrial exchanger and its inhibition by the cations of monovalent metals is determined by their affinity for the oxygen-containing ligands and are accompanied with the ions dehydration. Inhibition of the mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger by monovalent metal cations is also accompanied with the inhibition of cooperative interactions of metal ions with the ion-binding centers during transport cycle, which can be one of the mechanisms of the inhibition of ions translocation by this ion-transporting system.

Key words: mitochondria, Na^+ -dependent Ca^{2+} efflux, cations of monovalent metals.

1. Gunter T. E., Gunter K. K., Sheu S-S., Gavin C. E. // *Am. J. Physiol.* – 1994. – **67**, N 2. – P. C313–C339.
2. Bernardi P. // *Physiol. Rev.* – 1999. – **79**, N 4. – P. 1127–1155.
3. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. // *J. Physiol.* – 2000. – **529**, N 1. – P. 37–47.
4. McCormack J. G., Halestrap A. P., Denton R. M. // *Physiol. Rev.* – 1990. – **70**, N 2. – P. 391–425.
5. Babsky A., Hekmatyar S., Wehrli S. et al. // *Exp. Biol. Med.* – 2002. – **227**, N 7. – P. 520–528.
6. Doliba N., Babsky A., Wehrli S. L. et al. // *Biochemistry.* – 2000. – **65**, N 4. – P. 502–508.

7. *Vabsky A., Doliba N., Doliba N. M. et al.* // *Exp. Biol. Med.* – 2001. – **226**, N 6. – P. 543–551.
8. *Дубицький Л. О., Вовканич Л. С.* // *Укр. біохім. журн.* – 2001. – **73**, № 6. – С. 41–49.
9. *Дубицький Л., Вовканич Л.* // *Експерим. та клін. фізіол. і біохім.* – 2003. – № 1. – С. 18–23.
10. *Lowry J. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
11. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1990. – 350 с.
12. *Crompton M., Sarano M., Carafoli E.* // *Eur. J. Biochem.* – 1976. – **69**, N 2. – P. 453–462.
13. *Chou T. C.* // *J. Theor. Biol.* – 1976. – **59**, N 2. – P. 253–276.
14. *Краткий справочник по химии* / Под ред. А. Т. Пилипенко. – К.: Наук. думка, 1987. – 829 с.
15. *Крестов Г. А.* Термодинамика ионных процессов у растворах. – Л.: Химия, 1973. – 304 с.
16. *Федірко Н. В.* Характеристика струму та властивості Na–Ca обміну мембрани секреторних клітин. – Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 1999. – 16 с.
17. *Дубицький Л. О., Вовканич Л. С.* // *Біофіз. вісн.* – 2001. – Вип. 1 (8). – С. 59–66.
18. *Крив'як Н., Вовканич Л., Дубицький Л.* // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* – 2004. – Вип. 35. – С. 231–235.

Отримано 14.04.2006