

ТРАНСПОРТ ПРОТОНА НЕОБХОДИМ ДЛЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ КАТИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ ИЗ ДЕЭНЕРГИЗОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ

О. В. АКОПОВА, В. Ф. САГАЧ

Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев;
e-mail: circul@biph.kiev.ua

*Изучали высвобождение катионов двухвалентных металлов (Ca^{2+} и Sr^{2+}) из митохондрий печени крыс после деполяризации митохондриальной мембраны протонофором карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразоном (СССР), азидом *Na* и K^+ -ионофором валиномицином.*

*Показано, что снятие мембранного потенциала в условиях блокирования митохондриальной поры само по себе недостаточно для высвобождения катионов из органелл. Выход Ca^{2+} и Sr^{2+} наблюдается только после внесения протонофора СССР в суспензию митохондрий как энергизованных, так и деэнергизованных азидом *Na*. Установлено, что повышение K^+ -проводимости мембраны с помощью валиномицина, в отличие от протонной проводимости, не обеспечивает полного высвобождения катионов из митохондрий в условиях коллапса мембранного потенциала. Показано, что в условиях эксперимента, в количественном отношении, доля Me^{2+} , высвобождающихся из деэнергизованных митохондрий (включая и пермеабелизованные для ионов K^+), определяется мерой проводимости мембраны для H^+ , но не для K^+ , и пропорциональна концентрации протонофора, внесенного в среду инкубации.*

В результате проведенного эксперимента сделан вывод, что обеспечение протонной проводимости мембраны является условием, необходимым для полного высвобождения аккумулированных в матриксе Ca^{2+} и Sr^{2+} после снятия мембранного потенциала. Исходя из полученных данных, обсуждается возможный механизм высвобождения катионов двухвалентных металлов из митохондрий в условиях мембранной деполяризации.

Ключевые слова: митохондрии, двухвалентные металлы, кальций, стронций, Ca^{2+} -унипортер, транспорт, мембранная деполяризация.

В течение последнего десятилетия сформировалось и стало общепринятым представление о том, что поддержание Ca^{2+} -гомеостаза клеток является динамическим процессом, в основе которого лежит постоянный обмен ионами *Ca* между плазматической мембраной, эндоплазматическим ретикулумом и митохондриями, способными в определенных условиях играть роль Ca^{2+} -депо и обмениваться кальциевыми сигналами с ближайшим окружением в клетке [1–4]. Повреждение какого-либо звена в системе механизмов передачи Ca^{2+} -сигналов ведет к нарушению Ca^{2+} -гомеостаза и развитию широкого спектра патологических состояний [1].

Известно, что одной из причин повышения цитозольной концентрации Ca^{2+} под действием физиологически активных агентов является деполяризация митохондриальной мембраны и быстрое высвобождение катиона, накопленного в митохондриальном матриксе. Подобный механизм, например, лежит в основе цитотоксического действия глутамата в

нейронах головного мозга [2]. В то же время механизм быстрого выхода кальция из митохондрий при митохондриальной деполяризации под действием физиологических стимулов (производные инозитолтрифосфата, NO , Ca^{2+} и др.) [2–4] изучен далеко не в полной мере. Известно, что деполяризация мембраны митохондрий приводит к открыванию митохондриальной поры (permeability transition pore, РТР [5,6]) – неселективного канала, соединяющего внутреннюю и наружную мембраны митохондрий. В фолдинге этого трансмембранного белкового комплекса участвуют белки наружной и внутренней мембран (потенциалзависимый анионный канал и АТР/АДР-антипортер) [5,6].

Мембранная деполяризация является пусковым механизмом открывания канала РТР, индуцируемого также ионами *Ca* с матриксной стороны митохондриальной мембраны, через который происходит высвобождение этих катионов из митохондрий [6]. Кальций в условиях мембранной деполяризации высвобож-

дается через пору [6,7], и, предположительно, путем реверсии Ca^{2+} -унипортера, чувствительного к блокатору рутениевому красному (RR) [8]. Как показано, в частности в наших работах [9,10], высвобождение Ca^{2+} из дезэнергизованных митохондрий чувствительно как к циклоспирину А – ингибитору РТР, так и к RR – блокатору Ca^{2+} -унипортера. Нами показано [10], что эти механизмы не только не являются аддитивными, но, возможно, представляют собой альтернативные пути высвобождения кальция из митохондрий в условиях коллапса мембранного потенциала. В пользу подобного предположения свидетельствуют также результаты исследований, указывающие на различия в механизмах регуляции RR-чувствительного и циклоспоринчувствительного путей высвобождения Ca^{2+} из митохондрий. Так, согласно данным литературы [6,11], РТР блокируется ионами Mg и другими двухвалентными катионами (включая Ca^{2+}) с наружной стороны митохондриальной мембраны [5,6,11], а также блокируется протонами и активируется гидроксиланионами [6]. Унипортер, напротив, активен только при условии заполнения Ca^{2+} -связывающих сайтов на наружной мембране митохондрий ($[\text{Ca}^{2+}]_o > 0$) [5,11,12]. Реверсия Ca^{2+} -унипортера, которая предположительно происходит в условиях деполяризации митохондриальной мембраны, блокируется Mg^{2+} и адениннуклеотидами [11], активируется двухвалентными катионами (в т.ч. Ca^{2+} , но не Mg^{2+}) и подавляется при их удалении из среды [11,12].

Следует отметить, что природа RR-чувствительного механизма высвобождения кальция (и других двухвалентных катионов, транспортируемых Ca^{2+} -унипортером) не вполне понятна. В течение длительного времени в литературе преобладала точка зрения, согласно которой RR-чувствительный механизм выхода Ca^{2+} обусловлен реверсией унипортера, вызываемой сбросом мембранного потенциала [8]. Однако в настоящее время представления о реверсии унипортера подвергаются критике [7], главным образом на основании данных patch-clamp-экспериментов, свидетельствующих об отсутствии обратного тока ионов через унипортер при деполяризации мембраны.

Таким образом, природа “RR-чувствительного” выхода кальция из митохондрий в условиях коллапса $\Delta\Psi_m$ и механизмы его регуляции к настоящему времени все еще не имеют удовлетворительного объяснения в литературе. Изучение механизмов транспорта Ca^{2+} через митохондриальную мембрану, способных

обеспечить быстрый его обмен между митохондриями и внутриклеточной средой в условиях митохондриальной деполяризации, остается актуальным в современных исследованиях. Поэтому для выяснения механизма транслокации Ca^{2+} и других двухвалентных катионов через деполяризованную мембрану митохондрий нами была поставлена задача изучить высвобождение Ca^{2+} и Sr^{2+} из этих органелл под действием деполяризующих агентов в условиях блокирования неспецифической проницаемости митохондрий (митохондриальной поры).

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс с массой тела 200–250 г. Промытую охлажденным 0,9%-м раствором KCl (4 °C) печень измельчали и гомогенизировали в 5-кратном объеме среды (в mM): 250 сахарозы, 20 трис-HCl-буфера, 1 ЭДТА (pH 7,4). Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин при 700 g (4 °C), затем супернатант центрифугировали 15 мин при 11 000 g (4 °C). Осадок суспендировали в небольшом объеме среды без добавления ЭДТА и хранили на льду при 4 °C.

Для регистрации транспорта Ca^{2+} и Sr^{2+} митохондрии (конечное содержание белка 0,5 мг/мл) вносили в среду следующего состава (в mM): 120 KCl, 1 KH_2PO_4 , 1 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 1 MgCl_2 , 0,06 CaCl_2 либо 0,07 SrCl_2 , 20 Tris-HCl-буфера (pH 7,4). В экспериментах с Ca^{2+} в среду вносили 1 мкМ циклоспорина А. Изменение концентрации Ca^{2+} и Sr^{2+} в среде регистрировали спектрофотометрически при длине волны 654 нм как описано нами ранее [9] в присутствии металлохромного индикатора арсеназо-III (конечная концентрация 70 мкМ). Условия эксперимента подбирали таким образом, чтобы добавленные катионы полностью поглощались митохондриями. Удаление катионов из среды регистрировали по исчезновению характерного для них максимума поглощения. Деполяризацию митохондриальной мембраны вызывали внесением в инкубационную среду протонофора карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона (CCCP) до конечной концентрации 10^{-6} М, азида Na (конечная концентрация 1 mM) и K^+ -ионофора валиномицина (конечная концентрация 10^{-7} М). Деполяризующие агенты добавляли в среду после полного поглощения катионов митохондриями.

Количество внесенного Ca^{2+} и Sr^{2+} принимали за 100%. Изменение содержания катионов в митохондриях ($[\text{Me}^{2+}]_m$, %) находили как разность между общим количеством

добавленных Me^{2+} (100%) и содержанием их в среде. Таким образом, изменение содержания кальция и стронция в митохондриях находили из соотношений: $[\text{Ca}^{2+}_m] = 100\% - [\text{Ca}^{2+}_o]$ и $[\text{Sr}^{2+}_m] = 100\% - [\text{Sr}^{2+}_o]$.

В работе использовали арсеназо-III («Aldrich», США), Na_2 -АТР, Tris (основание), рутениевый красный, циклоспорин А («Fluka»), СССР, валиномицин («Sigma», США) и другие реактивы марки осч и чда. Растворы готовили на бидистилляте. Достоверность результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Величину $P < 0,05$ считали статистически значимой.

Результаты и обсуждение

Высвобождение катионов двухвалентных металлов (Ca^{2+} и Sr^{2+}) из митохондрий изучали после предварительного энергозависимого накопления их в матриксе. Для исследования транспорта двухвалентных катионов использовали Sr^{2+} , не вызывающий открывания поры в митохондриях [6], в частности в условиях коллапса мембранного потенциала [9]. Поглощение и высвобождение ионов Са определяли в присутствии циклоспорина А, блокирующего РТР. Полное поглощение митохондриями добавленных в среду катионов регистрировали спектрофотометрически.

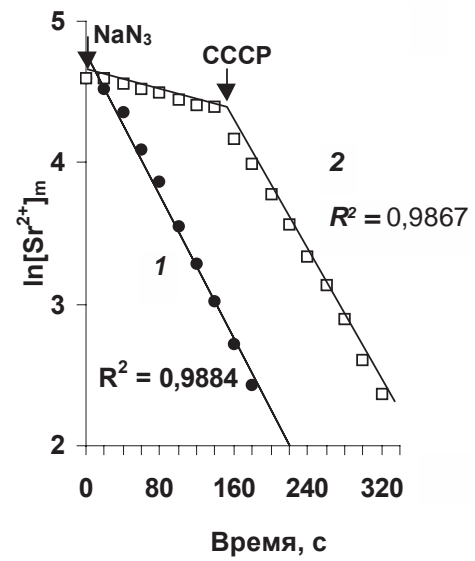
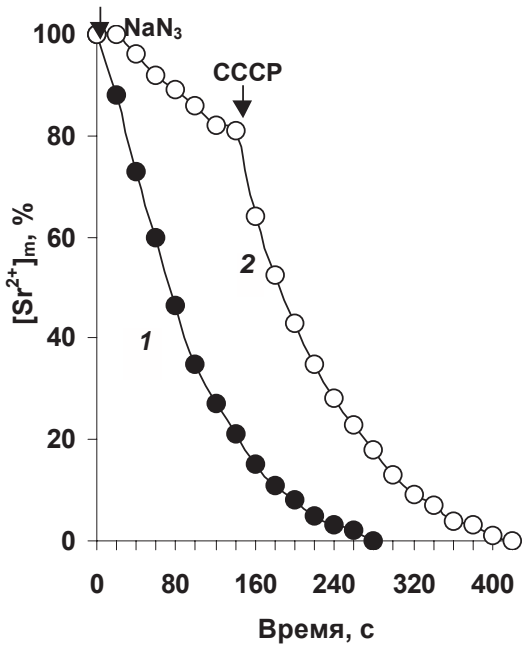
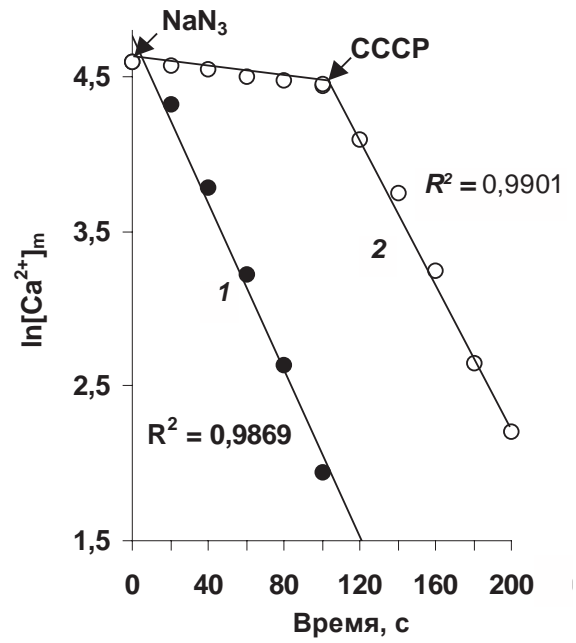
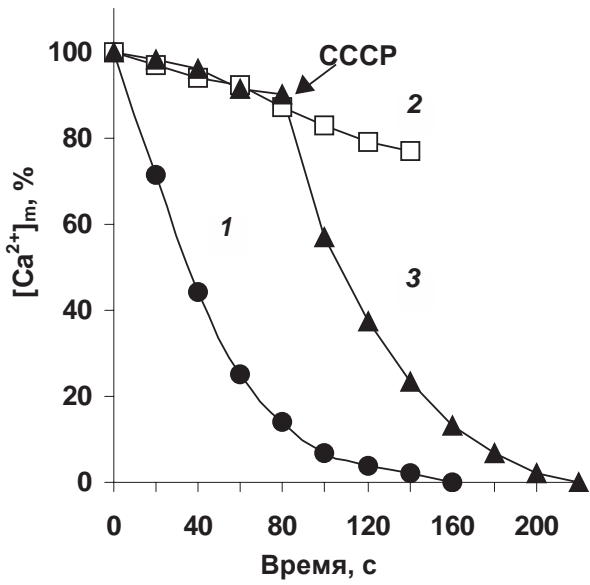
Результаты экспериментов показывают, что при использовании СССР в качестве деполяризующего агента происходит полное высвобождение из органелл предварительно накопленных Ca^{2+} и Sr^{2+} (рис. 1, А, Б; кривая 1). Высвобождение катионов соответствует кинетике реакций первого порядка. Константы скорости, определенные путем линеаризации кинетических кривых выхода катионов в полулогарифмических координатах ($\ln C - t$) составляют $(2,50 \pm 0,18) \cdot 10^{-2} \text{ c}^{-1}$ для Ca^{2+} и $(1,20 \pm 0,20) \cdot 10^{-2} \text{ c}^{-1}$ — для Sr^{2+} ($P < 0,05$).

В то же время, деполяризация мембраны азидом Na, в отличие от СССР, не вызывает (за исключением отдельно рассмотренных случаев) высвобождения катионов (рис. 1, А, Б; кривая 2). Однако внесение СССР, как и ранее (рис. 1, А, Б; кривая 1), приводит к быстрому выходу катионов из митохондрий. При этом следует отметить, что начальная скорость высвобождения их (V_0) под действием СССР не зависит от наличия мембранного потенциала: константы скорости выхода Ca^{2+} и Sr^{2+} из митохондрий, предварительно деэнергизованных NaN_3 , сохраняют прежние значения: $k_{\text{Ca}} = (2,50 \pm 0,18) \cdot 10^{-2} \text{ c}^{-1}$ и $k_{\text{Sr}} = (1,20 \pm 0,20) \cdot 10^{-2} \text{ c}^{-1}$ ($P < 0,05$).

Приведенные результаты показывают, что деполяризация мембраны сама по себе еще недостаточна для выхода катионов из матрикса. Ионы Са и Sr высвобождаются только после внесения в среду инкубации протонофора СССР. Поскольку действие его как деполяризующего агента обусловлено повышением проводимости мембраны для ионов водорода, можно предположить, что пермеабиллизация мембраны для протонов является необходимым условием высвобождения катионов, накопленных в митохондриях.

В отличие от СССР, при использовании в качестве деполяризующего агента K^+ -ионофора валиномицина (деполяризующего мембрану вследствие повышения ее проводимости для ионов калия) высвобождения катионов практически не происходит, несмотря на то, что валиномицин в используемых концентрациях снижает до нуля потенциал на внутренней мембране митохондрий (рис. 1, В, Г; кривая 1). Внесение валиномицина после деполяризации митохондрий азидом Na также не приводит к выходу катионов в среду инкубации и не увеличивает наблюдаемой в эксперименте базальной скорости выхода катионов из деэнергизованных митохондрий (рис. 1, В, Г; кривая 2). Таким образом, независимо от того, используется валиномицин как деполяризующий агент или только как ионофор для пермеабиллизации мембраны деэнергизованных митохондрий относительно ионов К, результаты эксперимента показывают, что K^+ -пермеабиллизация мембраны так же, как и деполяризация митохондрий, не обеспечивают полного выхода катионов из органелл, хотя концентрационный градиент Ca^{2+} и Sr^{2+} направлен из матрикса наружу. Аналогично деэнергизации митохондрий азидом Na (рис. 1, А, Б) полный и быстрый выход катионов наблюдается лишь после введения в раствор протонофора СССР (рис. 1, В, Г).

Как показано на примере кальция, количество двухвалентных катионов, высвобождающихся из митохондрий, деэнергизованных азидом натрия, а также деэнергизованных и пермеабиллизованных для ионов К, пропорционально концентрации вносимого в среду протонофора (рис. 2). Следовательно, повышение протонной проводимости мембраны дозозависимо повышает количество кальция, вышедшего из органелл после сброса $\Delta\Psi_m$. Поскольку количество катионов, высвобождающихся из матрикса, определяется мерой проницаемости мембраны для протонов (независимо от способа ее деполяризации — валиномицином либо азидом Na) и коррелирует с концентрацией



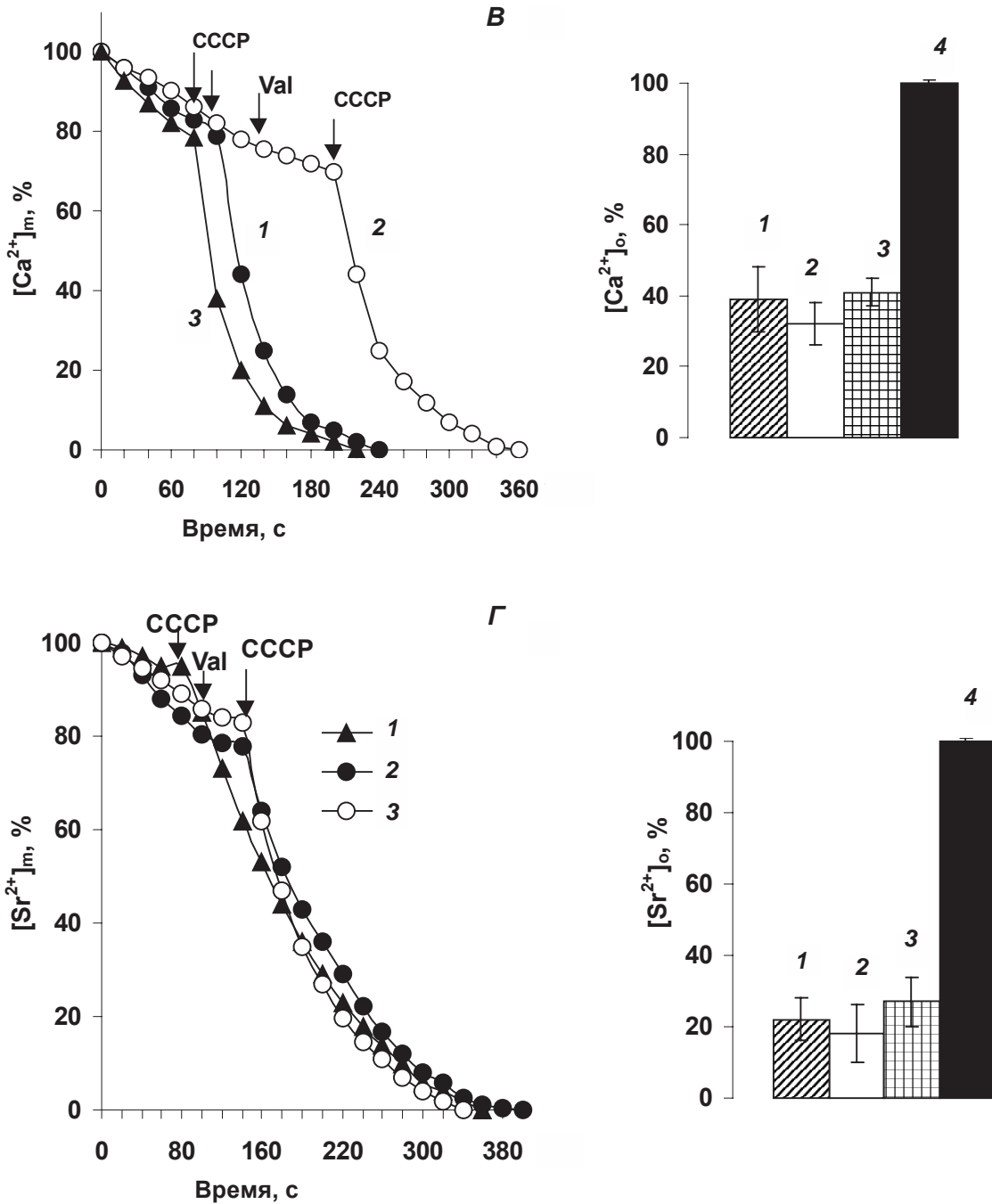


Рис. 1. Высвобождение кальция (А, В) и стронция (Б, Г) из митохондрий после деполяризации митохондриальной мембраны.

Последовательность внесения реагентов: А – CCCP (1), NaN_3 (2), NaN_3 , CCCP (3);

Б – CCCP (1), NaN_3 , CCCP (2);

В – валиномицин, CCCP (1); NaN_3 , валиномицин, CCCP (2); NaN_3 + валиномицин, CCCP (3);

Г – валиномицин, CCCP (1); NaN_3 , валиномицин, CCCP (2); NaN_3 , валиномицин, CCCP (3).

Вставки А и Б: по оси ординат – логарифм концентрации $[\text{Me}^{2+}]$, выраженной в %; коэффициент корреляции линейной зависимости (R^2) приведен на графике. В, Г: выход катионов из деполяризованных митохондрий, в % от внесенной добавки Me^{2+} . Последовательность внесения реагентов: NaN_3 (1), валиномицин (2), NaN_3 + валиномицин (3), CCCP (4).

Приведены типичные результаты опытов ($M \pm m$, $n = 9$). Среда инкубации (здесь и ниже): 120 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ Na_2ATP , 1 мМ KH_2PO_4 , 0,06 мМ CaCl_2 (А,В), 0,07 мМ SrCl_2 (Б,Г). Транспорт Ca^{2+} регистрировали в присутствии циклоспорина А (конечная концентрация 1 мкМ).

переносчика протонов, связанного с митохондриальной мембраной (СССР), закономерно предположить, что для быстрого высвобождения двухвалентных катионов в условиях мембранной деполяризации необходима сопряженность транспорта катионов с одновременным противоположно направленным транспортом протонов, направление которого обусловлено трансмембранным градиентом концентраций H^+ ($pH_i > pH_o$ [13,14]). В этом случае выход определенного количества катионов из матрикса компенсируется входом соответствующего количества протонов, а высвобождение двухвалентных катионов, исходя из необходимости соблюдения условия электронейтральности ($\Delta\Psi_m=0$), должно происходить как электронейтральный $Me^{2+}/2H^+$ -обмен.

Можно предположить, что в определенном смысле происходит “реверсия” системы энергозависимого накопления двухвалентных катионов, в которой транспорт Ca^{2+} сопряжен с транспортом H^+ . Однако следует отметить, что если в энергизованных митохондриях RR-чувствительный вход Ca^{2+} компенсируется выходом H^+ вследствие функционирования дыхательной цепи и митохондриальной АТФ-азы, обеспечивающих в целом электронейтральный $Ca^{2+}/2H^+$ -обмен с сохранением $\Delta\Psi_m$, то в деэнергизованных митохондриях механизм соответствующего входа протонов в обмен на выход Me^{2+} отсутствует, что, в свою очередь,

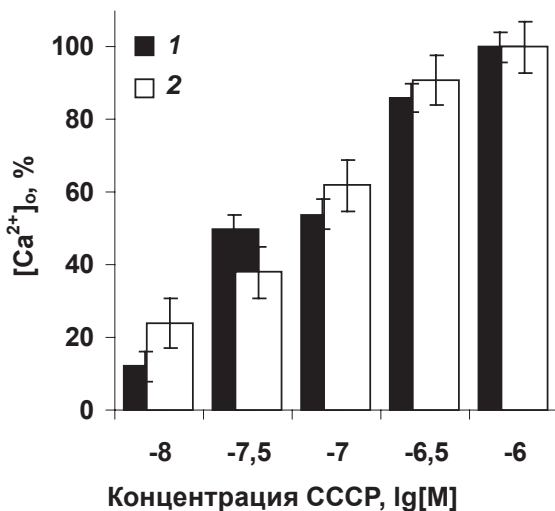


Рис. 2. Влияние СССР на высвобождение кальция из митохондрий после деполяризации мембраны азидом Na (1) и валиномицином (2). По оси абсцисс — логарифм концентрации СССР, [M]; по оси ординат — количество Ca^{2+} , высвобождающегося в среду инкубации, %. ($M \pm m$, $n = 4$), $P < 0,05$.

делает невозможным RR-чувствительный выход катионов, несопряженный с одновременным входом протонов в матрикс. Последнее условие обеспечивается только внесением экзогенного переносчика протонов СССР. Таким образом, обеспечение протонной проводимости мембраны является необходимым условием для высвобождения катионов двухвалентных металлов из деэнергизованных митохондрий.

Следует отметить, что после деполяризации мембраны, как правило, наблюдается сравнительно медленный базальный уровень утечки катионов из матрикса (рис. 1), которая зависит от концентрации ионов водорода в среде: подавляется гидроксиланионами и усиливается при снижении pH (рис. 3). В настоящее время затруднительно ответить на вопрос о природе базального выхода Me^{2+} из органелл, усиливающегося при длительной инкубации суспензии митохондрий. Можно предположить, что утечка катионов обусловлена неспецифической протонной проводимостью мембраны, так называемой “утечкой протонов”, которая в условиях эксперимента направлена в митохондриальный матрикс из окружающей среды. С подобным предположением согласуется наблюдаемая зависимость данного механизма от pH: снижение pH (до 6,5) усиливает утечку катионов вследствие большего поступления протонов в матрикс. В то же время блокирование базальной утечки Me^{2+} происходит при тех же значениях pH ($pH \geq 7,7$), что и блокирование эндогенной утечки протонов при $pH \sim 8,0$ [15]. Линеаризация данных pH-зависимости для утечки катионов в координатах Хилла ($\lg[(V_o - V)/V]$ [16]) показывает, что коэффициент кооперативности по ионам H^+ (n) близок к двум ($n = 1,7$). Это дает основания предположить, что утечка катионов из матрикса происходит по механизму электронейтрального неспецифического $Ca^{2+}/2H^+$ -обмена, который, в отличие от Ca^{2+}/nH^+ -обмена митохондрий, чувствителен к блокатору Ca^{2+} -унипортера RR. Сделанное нами наблюдение согласуется с приведенными выше результатами, показывающими, что RR-чувствительный выход катионов из деэнергизованных митохондрий зависит от меры протонной проводимости митохондриальной мембраны, а кинетические характеристики RR-чувствительного транспорта Me^{2+} обусловлены либо протонофорными характеристиками переносчика протонов, либо кинетикой механизма транслокации H^+ через митохондриальную мембрану.

Таким образом, нами показано, что пермеабиллизация мембраны для протонов являет-

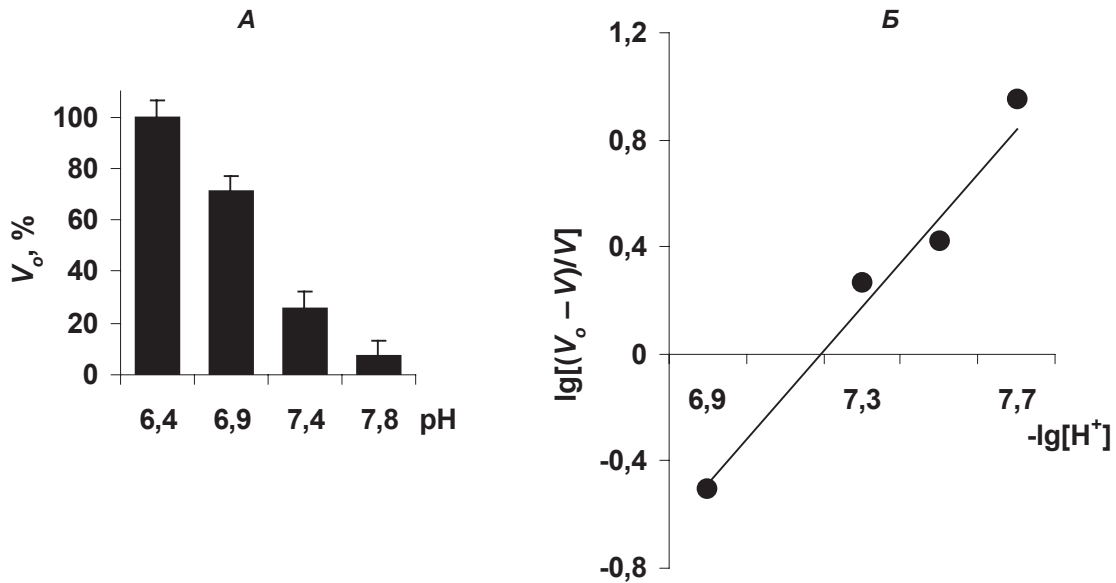


Рис. 3. Влияние pH на базальный уровень выхода ионов Ca из митохондрий, деполяризованных азидом Na (А,Б). По оси абсцисс – отрицательный логарифм концентрации ионов водорода; по оси ординат – начальная скорость выхода Ca^{2+} при разных pH (V_o), в % от V_o при pH 6,4 (А). Б – линеаризация данных в координатах Хилла: $\lg[(V_o - V)/V] - pH$, $n = 6$, $P < 0,05$.

ся единственным условием, обеспечивающим полное высвобождение захваченных митохондриями двухвалентных катионов. В то же время, K^+ -пермеабилитация митохондрий, как уже отмечалось, не в состоянии обеспечить выход Ca^{2+} и Sr^{2+} из органелл. Наблюдаемые закономерности, очевидно, объясняются экспериментальными условиями, при которых регистрируется транспорт катионов.

Поскольку в количественном отношении высвобождение Ca^{2+} с учетом электронейтральности механизма должно компенсироваться соответствующим входом в митохондрии положительно заряженных частиц, в частности ионов водорода, то электронейтральный ионный обмен, при котором сохраняется равенство химических потенциалов Ca^{2+} и H^+ ($\Delta\mu_{Ca^{2+}} = 2\Delta\mu_{H^+}$), можно представить в виде уравнения ионного обмена:



где константа равновесия ионного обмена K_p равна:

$$K_p = ([Ca^{2+}]_o \cdot [H^+]_i^2) / ([Ca^{2+}]_i \cdot [H^+]_o^2).$$

Так как изменение свободной энергии в ходе обменного процесса связано с константой равновесия ($\Delta G = -RT \ln K_p$), условие равновесного распределения двухвалентных катионов через митохондриальную мембрану ($\Delta G = 0$) должно удовлетворять соотношению:

$[Ca^{2+}]_o \cdot [H^+]_i^2 / ([Ca^{2+}]_i \cdot [H^+]_o^2) = 1$, откуда $[Ca^{2+}]_o / [Ca^{2+}]_i = [H^+]_o^2 / [H^+]_i^2$. Таким образом, соотношение $[Ca^{2+}]_o / [Ca^{2+}]_i = 10^{2\Delta pH}$ (где $\Delta pH = pH_i - pH_o$) является условием равновесного трансмембранного распределения ионов Ca, соответствующего электронейтральному $Ca^{2+}/2H^+$ -обмену. Исходя из этого, можно сделать вывод, что в условиях электронейтрального выхода Ca^{2+} и других двухвалентных катионов из митохондрий их распределение по обе стороны митохондриальной мембраны должно соответствовать соотношению: $[Me^{2+}]_o / [Me^{2+}]_i = 10^{2\Delta pH}$. Следовательно, разность внутри- и внемитохондриального pH (порядка 0,35–0,50 ед.) способна обеспечить 5–10-кратный градиент концентраций Ca^{2+} через мембрану деэнергизованных митохондрий. Учитывая, что величина внутримитохондриального pH энергизованных митохондрий по данным литературы составляет около 8,0 ед. pH [14], а ΔpH по разным оценкам – 0,6–0,9 ед. pH [13,14], условия эксперимента позволяют создать более, чем 20-кратный градиент концентраций кальция ($[Ca^{2+}]_o / [Ca^{2+}]_i = 10^{2\Delta pH}$) за счет трансмембранного градиента концентраций ионов водорода. Это обеспечивает наблюдаемое полное высвобождение добавленного кальция из органелл при деполяризации мембраны с помощью протонофора ($15,8 < 10^{2\Delta pH} < 63,1$). Согласно нашим оценкам, концентрационный градиент протонов полностью обеспечивает условия,

необходимые для выхода кальция и стронция из деполяризованных митохондрий.

Соответственно, для обеспечения высвобождения Ca^{2+} и Sr^{2+} из органелл при K^+ -пермеабилитации мембраны необходимо, чтобы в соответствии с уравнением ионного обмена $[\text{Ca}^{2+}]_i + 2[\text{K}^+]_o \rightleftharpoons [\text{Ca}^{2+}]_o + 2[\text{K}^+]_i$ выполнялось соотношение: $[\text{Ca}^{2+}]_o/[\text{Ca}^{2+}]_i = [\text{K}^+]_o^2/[\text{K}^+]_i^2$. По данным литературы известно, что концентрация ионов K^+ в матриксе составляет $120 \div 150 \text{ мМ}$ K^+ . Таким образом, в условиях эксперимента ($[\text{K}^+]_o = 120 \text{ мМ}$) $[\text{K}^+]_o/[\text{K}^+]_i \sim 1$. Поэтому для обеспечения, например, 5-кратного градиента концентраций кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_o/[\text{Ca}^{2+}]_i = 5$), необходимо, чтобы соотношение $[\text{K}^+]_o/[\text{K}^+]_i$ удовлетворяло условию $[\text{K}^+]_o^2/[\text{K}^+]_i^2 > 5$. Для этого концентрация калия во внешней среде должна составлять около 300 мМ , что намного превышает уровень концентраций KCl , используемые в эксперименте (120 мМ KCl).

Отсутствие выхода Ca^{2+} в обмен на индуцируемый валиномицином вход K^+ в условиях блокирования митохондриальной поры отмечено ранее и другими авторами [17], однако данное наблюдение не получило удовлетворительного объяснения в известной нам литературе. По нашему мнению, приведенные выше соображения отчасти позволяют объяснить этот экспериментальный факт, свидетельствующий, что K^+ -пермеабилитация мембраны валиномицином не в состоянии в условиях блокирования митохондриальной поры обеспечить полное высвобождение катионов двухвалентных металлов, накопленных митохондриями. Следует отметить, что к настоящему времени отсутствует надежная оценка содержания свободного Ca^{2+} (и тем более Sr^{2+}) в матриксе митохондрий в условиях высоких нагрузок органелл этими катионами, что затрудняет, в свою очередь, оценку соотношения $[\text{Me}^{2+}]_o/[\text{Me}^{2+}]_i$. Регистрация содержания Ca^{2+} и Sr^{2+} в среде показывает, что деполяризация мембраны и ее пермеабилитация для протонов обеспечивают полное высвобождение катионов, предварительно аккумулированных митохондриями ($[\text{Ca}^{2+}]_o = 60 \div 150 \text{ мкМ}$; $[\text{Sr}^{2+}]_o = 70 \text{ мкМ}$). Количество свободного Ca^{2+} в матриксе интактных митохондрий составляет от 1 до 10 мкМ [13]. В качестве предположения можно принять, что содержание кальция в матриксе деэнергизованных митохондрий после его высвобождения в среду находится примерно в том же диапазоне концентраций. Как показано нами выше, условия эксперимента допускают создание более чем 10-кратного градиента концентраций двухвалентных катионов ($[\text{Me}^{2+}]_o/[\text{Me}^{2+}]_i \geq 10$) и

их полное высвобождение в среду инкубации после деполяризации мембраны.

Закономерности, установленные в ходе проведенного эксперимента, позволяют высказать предположение о возможной организации системы энергозависимого накопления двухвалентных катионов в митохондриях и ее реверсии в условиях митохондриальной деполяризации. Так, в энергизованных митохондриях (при наличии электрического поля, $\Delta\psi_m > 0$) Ca^{2+} -унипортер приобретает конформацию, разрешающую транспорт Ca^{2+} (и других Me^{2+}) в митохондриальный матрикс, сопровождающийся одновременным выходом из него протонов вследствие работы дыхательной цепи и АТФ-азы органелл. Это обеспечивает определенное постоянство мембранного потенциала и электронейтральность механизма транспорта, в целом представляющего электронейтральный $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ -обмен. Деполяризация мембраны (сама по себе не влияющая на высвобождение катионов, а только блокирующая их накопление в митохондриях) приводит к переходу унипортера в иное конформационное состояние, при котором, однако, сохраняется возможность пассивной диффузии Me^{2+} по градиенту концентраций из матрикса органелл наружу. О том, что Ca^{2+} -унипортер сохраняет проводимость для двухвалентных катионов, свидетельствует тот факт, что одного лишь внесения протонофора (СССР), не являющегося переносчиком Me^{2+} , достаточно для полного выхода Ca^{2+} и Sr^{2+} из митохондрий. Однако несмотря на то, что система "свободно" пропускает эти катионы, высвобождения их при деполяризации мембраны не происходит вследствие отсутствия механизма, обеспечивающего одновременный противоток протонов (либо других положительно заряженных частиц) в матрикс митохондрий. Поэтому, как показывают наши данные, одного лишь внесения экзогенного переносчика протонов СССР достаточно для полного выхода катионов из органелл.

Следует отметить, что к настоящему времени остается неизвестным, какие именно молекулярные структуры осуществляют пассивный транспорт Ca^{2+} (и других Me^{2+}) из митохондрий, и принимает ли Ca^{2+} -унипортер непосредственное участие в этом механизме. О том, что высвобождение ионов Ca и Sr при деполяризации мембраны происходит не через пору, свидетельствуют результаты проведенных нами опытов, в которых в суспензию митохондрий, деполяризованных азидом Na , вносили атрактилозид, открывающий митохондриальную пору за счет стабилизации АТФ/

ADP-антипортера в *c*-конформації [5]. Внесення 2 мкМ атрактилозида викликає швидкий і нечувствительний к RR (а також к присутньому в середі циклоспорину А) виход катионів з мітохондрій, по-видимому через АТР/ADP-антипортер, що володіє Ca^{2+} -проникністю і являється однією з структурних суб'єдинець каналу РТР [5,6].

Таким чином, незважаючи на те, що ряд висказаних в даній роботі положень потребує в подальшій експериментальній перевірці, можна зробити висновок, що результати проведених експериментів узгоджуються з представленнями про "реверсії" системи енергозалежного накоплення двовалентних катионів в мітохондріях, необхідним умовою якої є пермеабілізація мітохондріальної мембрани для протонів. Особливості функціонування цього транспортного механізму будуть повністю розкриті нами в ході подальших досліджень.

ТРАНСПОРТУВАННЯ ПРОТОНА НЕОБХІДНЕ ДЛЯ ВИВІЛЬНЕННЯ ДОВОАЛЕНТНИХ МЕТАЛІВ ІЗ ДЕЕНЕРГІЗОВАНИХ МІТОХОНДРІЙ

О. В. Аконова, В. Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ;
e-mail: circul@serv.biph.kiev.ua

Досліджували вивільнення катионів двовалентних металів Ca^{2+} і Sr^{2+} з мітохондріальної мембрани протонофором карбонільцианід-*m*-хлорфенілгідрозом (СССР), азидом Na та K^+ -іонофором – валіноміцином.

Показано, що зняття мембранного потенціалу є недостатнім чинником для вивільнення катионів з органел у разі блокування мітохондріальної пори. Вихід Ca^{2+} та Sr^{2+} спостерігається тільки після внесення протонофору СССР до суспензії енергізованих і деенергізованих азидом Na мітохондрій. Установлено, що підвищення K^+ -провідності мембрани за допомогою валіноміцину, на відміну від H^+ -провідності, не забезпечує повного вивільнення катионів з органел під час колапсу мембранного потенціалу. Виявлено, що за умов експерименту частка Me^{2+} , що вивільнюється з деенергізованих мітохондрій (включаючи і пермеабілізовані для іонів K^+ мітохондрії) в кількісному відношенні, визначається мірою провідності мембрани для іонів водню, але не

для K^+ , і є пропорційною до концентрації протонофору, внесеного в середовище інкубації.

Аналізуючи дані проведеного експерименту, дійшли висновку, що забезпечення протонної провідності мембрани є необхідною умовою для повного вивільнення акумульованих у матриці Ca^{2+} та Sr^{2+} після зняття мембранного потенціалу. На підставі аналізу одержаних результатів обговорюється можливий механізм вивільнення катионів двовалентних металів із мітохондрій в умовах мембранної деполаризації.

Ключові слова: мітохондрії, двовалентні метали, кальцій, стронцій, Ca^{2+} -уніпортер, транспорт, мембранна деполаризація.

PROTON TRANSPORT IS NECESSARY FOR DIVALENT METAL CATIONS RELEASE FROM DEENERGIZED MITOCHONDRIA

O. V. Akopova, V. F. Sagach

Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: circul@serv.biph.kiev.ua

Summary

The release of divalent cations (Ca^{2+} and Sr^{2+}) from rat liver mitochondria after membrane depolarization with protonophore (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone, СССР), sodium azide and K^+ -ionophore (valinomycin) was studied.

It is stated that membrane depolarization itself is not sufficient for cations release from mitochondrial matrix (provided that mitochondrial permeability transition pore is blocked by cyclosporin A). Complete delivering of divalent cations is observed only after protonophore (СССР) addition to suspension of deenergized mitochondria. The data show that membrane permeabilisation to hydrogen ions (H^+) is necessary for complete cation release from the mitochondrial matrix.

The enhancement in K^+ -conductivity of mitochondrial membrane (by valinomycin), on the contrary, is not able to provide complete delivering of cations from mitochondria.

It is shown that quantity of divalent metal cation released from mitochondria (depolarized and permeabilized for K^+ as well) is proportional to the concentration of protonophore (but not K^+ -ionophore) introduced in the incubation medium.

The data obtained lead to the conclusion that H^+ -permeabilization of the mitochondrial membrane is necessary for the complete release of Ca^{2+} and Sr^{2+} from mitochondria after membrane de-

polarization. The possible mechanism of divalent metal cations release from deenergized mitochondria is discussed.

Key words: mitochondria, divalent metals, calcium, strontium, Ca^{2+} -uniporter, transport, membrane depolarization.

1. Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. А. Іони кальцію у функції мозку — від фізіології до патології. — К.: Наук. думка, 2005. — 198 с.
2. Khodorov B. I. // Prog. Biophys. Mol. Biol. — 2004. — **86**, N 2. — P. 279–351.
3. Hajnoczky G., Csordas G., Madesh M., Pacher P. // J. Physiol. — 2000. — **529**, N 1. — P. 69–81.
4. Duchon M. // J. Physiol. — 2000. — **529**, N 1. — P. 57–68.
5. Crompton M., Barksby E., Johnson N., Capano M. // Biochimie. — 2002. — **84**, N 2. — P. 143–152.
6. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. // J. Physiol. — 2000. — **529**, N 1. — P. 37–47.
7. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K. et al. // FEBS Lett. — 2004. — **567**. — P. 96–102.
8. Bernardi P., Paradisi V., Pozzan T., Azzone G. F. // Biochemistry. — 1984. — **23**. — P. 1645–1651.
9. Акопова О. В., Сагач В. Ф. // Укр. біохім. журн. — 2005. — **77**, № 3. — С. 68–75.
10. Акопова О. В., Сагач В. Ф. // Там само. — № 5. — С. 62–69.
11. Litsky M. L., Pfeiffer D. R. // Biochemistry. — 1997. — **36**, N 23. — P. 7071–7080.
12. Лейкин Ю. Н., Гонсальвес М. П. П. // Докл. АН СССР. — 1986. — **290**, № 4. — С. 1011–1014.
13. Coll K. E., Joseph S. K., Corkey B. E., Williamson J. R. // J. Biol. Chem. — 1982. — **257**, N 15. — P. 8696–8704.
14. Brierley G. P., Davis M. H., Cragoe E. J. Jr., Jung D. W. // Biochemistry. — 1989. — **28**. — P. 4347–4354.
15. Зиновьева М. В., Лейкин Ю. Н., Петушкова Н. А. // Биохимия. — 1981. — **46**, № 10. — С. 1896–1903.
16. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. / Кинетические методы в биохимических исследованиях. — М.: Изд. МГУ, 1982. — 345 с.
17. Holmuchaev E. L., Wang L., Terzic A. // J. Physiol. — 1999. — **519**, N 2. — P. 347–360.

Получено 10.11.2006