

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.23

ОБРАТИМОСТЬ ЭНЕРГОЗАВИСИМОГО НАКОПЛЕНИЯ КАЛЬЦИЯ В МИТОХОНДРИЯХ

О. В. АКОПОВА

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

Изучено накопление Ca^{2+} в энергизованных митохондриях печени крыс в условиях блокирования митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) ингибитором, циклоспорином А. Показано, что транспорт Ca^{2+} сопряжен с противоположно направленным транспортом протонов: из матрикса в среду в условиях энергозависимой аккумуляции катиона и из среды в матрикс в условиях митохондриальной деполяризации. В стандартной среде инкубации, содержащей ионы K^+ и Cl^- , субстрат окисления (глутамат) и неорганический фосфат ($H_2PO_4^-$), наблюдаемая стехиометрия обмена составляет $1Ca^{2+}:1H^+$. Соответственно такие характеристики транспорта Ca^{2+} , как порядок реакции, константа скорости и время половинного превращения, соответствуют тем же характеристикам транспорта ионов H^+ .

Изучены условия, обеспечивающие высвобождение Ca^{2+} из дезэнергизованных митохондрий. Показано, что кальций-протонный обмен, необходимый для выхода Ca^{2+} из митохондрий в условиях деполяризации мембраны и подавления МРТР циклоспорином А, происходит путем реверсии унипортера вследствие пермеабиллизации мембраны протонофором (СССР). Показано, что оба одновременно протекающих транспортных процесса — выход Ca^{2+} и сопряженный с ним вход протонов в матрикс в присутствии СССР — подавляются ингибитором Ca^{2+} -унипортера рутениевым красным. Сделан вывод, что кальций-протонный обмен необходим для реверсии Ca^{2+} -унипортера и обратимости энергозависимого накопления Ca^{2+} в митохондриях.

Ключевые слова: митохондрии, Ca^{2+} -унипортер, Ca^{2+} -, H^+ -транспорт, протонофор.

Митохондриальный транспорт Ca^{2+} участвует в регуляции жизненно важных клеточных функций, таких как передача кальциевых сигналов [1–4], потребление кислорода, синтез АТФ [4,5] и многообразный спектр процессов клеточного метаболизма. Накопление ионов Са в митохондриальном матриксе также является непосредственным регуляторным механизмом открывания митохондриальной поры — ключевого звена в запуске программы клеточного апоптоза [6,7].

Митохондрии в клетке распределяются неравномерно; большая часть их локализована непосредственно вблизи плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума. В настоящее время установлено, что белки митохондриальной мембраны, принимающие участие в Ca^{2+} -обмене с соседними клеточными структурами, находятся непосредственно вблизи контактных сайтов между митохондриями и плазматической мембраной либо ретикуломом [8]. Роль отдельных компонентов

Ca^{2+} -транспортной системы митохондрий как структурных элементов контактных сайтов, обеспечивающих быструю передачу Ca^{2+} -сигналов, в настоящее время интенсивно исследуется [9,10]. Таким образом, роль митохондрий в регуляции уровня цитозольного Ca^{2+} обусловлена, в частности, особенностями их пространственной локализации в клетке, тесной структурной и функциональной сопряженностью с Ca^{2+} -транспортирующими системами плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума [1,2,8–10].

Обмен ионами Са между митохондриями и их ближайшим клеточным окружением, необходимый для выполнения программ, обеспечивающих как жизнедеятельность, так и гибель клетки [2,6,7], осуществляется митохондриальной системой транспорта Ca^{2+} .

В физиологических условиях кальций попадает в матрикс энергизованных митохондрий через потенциалзависимый канал — Ca^{2+} -унипортер, а также путем «быстрого входа

Ca^{2+} » (rapid uptake mode), механизм которого еще недостаточно изучен [5]. Выход Ca^{2+} может осуществляться различными путями: через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - и $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен [5], через митохондриальную пору – неселективный канал во внутренней мембране митохондрий, открывание которого происходит при Ca^{2+} -перегрузке органелл [11,12], а также путем реверсии Ca^{2+} -унипортера в условиях деполяризации митохондриальной мембраны [13]. Согласованное функционирование механизмов, обеспечивающих вход Ca^{2+} и его выход из органелл, позволяет поддерживать определенное равновесное распределение ионов Ca и их обмен между матриксом и внутриклеточной средой.

Известно, что физиологически активные агенты (глутамат в нейронах мозга [14], оксид азота [15] и кальций [2,3]) способны вызывать быструю мембранную деполяризацию и выход Ca^{2+} из митохондрий. Однако роль отдельных элементов Ca^{2+} -транспортной системы митохондрий, обеспечивающей обратимость транспорта Ca^{2+} в процессах транслокации этого катиона через мембрану, изучена далеко недостаточно.

Предполагают, что необходимые для трансмембранного обмена вход и выход Ca^{2+} происходят различными путями: накопление – через потенциалзависимый Ca^{2+} -канал (унипортер), тогда как выход – через пору (неселективный Ca^{2+} -индуцируемый мегаканал, в сборке которого участвуют белки наружной и внутренней мембран [11]), либо через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - и $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменники [5].

В ранних работах по изучению транспорта Ca^{2+} в митохондриях предполагалось, что высвобождение катиона из деполяризованных митохондрий происходит вследствие реверсии Ca^{2+} -унипортера [12]. Подобное предположение неоднократно подвергалось критике уже в ранних исследованиях [16,17] ввиду недостаточной чувствительности данного механизма к специфическому ингибитору унипортера – рутениевому красному. Предположение о реверсии унипортера как механизме выхода Ca^{2+} из митохондрий некоторыми авторами ставится под сомнение и в настоящее время: на основании исследований с использованием метода пэтч-клэмп, в которых не удалось обнаружить реверсию митохондриального Ca^{2+} -унипортера ни в изолированных митопластах, ни встроенного в липидную мембрану [5]. Таким образом, необходимость более глубокого понимания закономерностей функционирования Ca^{2+} -транспортной системы митохондрий очевидна и требует дальнейшего изучения механизмов,

обеспечивающих обратимость трансмембранного обмена кальция в этих органеллах.

Ранее [18] нами был сделан вывод, что протонная проводимость мембраны необходима для высвобождения Ca^{2+} из митохондрий в условиях мембранной деполяризации. Известны также данные литературы, показывающие, что транспорт ионов Ca, в частности в деэнергизованных митохондриях, сопряжен с переносом протонов через митохондриальную мембрану [17,19]. Однако в ряде исследований, посвященных изучению трансмембранного обмена кальция в митохондриях [16,17,19], не учитывалась возможность открывания митохондриальной поры, что во многих случаях затрудняло интерпретацию экспериментальных данных [16,17]. Поэтому в настоящей работе поставлена задача, на основании наших прежних исследований [18], продолжить изучение механизма, обеспечивающего обратимость Ca^{2+} -аккумулирующей системы митохондрий в условиях блокирования митохондриальной поры, а также выяснить некоторые кинетические характеристики транспорта протонов, сопряженности которого с транслокацией ионов кальция через митохондриальную мембрану необходима для высвобождения Ca^{2+} из митохондрий в условиях коллапса мембранного потенциала.

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс с массой тела 200–250 г. Печень промывали охлажденным 0,9%-м раствором KCl (4 °C), измельчали и гомогенизировали в 5-кратном объеме среды (в мМ): 250 сахарозы, 20 трис-HCl-буфера и 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.

Изменение концентрации добавленного Ca^{2+} в среде регистрировали в присутствии 70 мкМ арсеназо-III с помощью оптоволоконного спектрофотометра USB-2000 (Ocean Optics, США), используя двухволновую методику регистрации светопоглощения при 654 и 690 нм.

Концентрацию ионов водорода в среде инкубации измеряли с помощью стеклянного электрода ЭСКЛ-08 М.1. Общее количество ионов кальция и водорода определяли с помощью калибровочных кривых путем титрования суспензии растворами CaCl_2 и HCl. Количест-

во Ca^{2+} и H^+ выражали в наномолях на 1 мг белка, начальную скорость транспорта – в наномолях ионов/мин на 1 мг белка.

Регистрацию транспорта ионов проводили в среде следующего состава (мМ): 120 КСl, 1 KH_2PO_4 , 5 Na-глутамат, содержащей заданные концентрации CaCl_2 (рН доводили до 7,5 с помощью КОН). С целью блокирования митохондриальной поры в среду вносили циклоспорин А (10^{-6} М). Другие реагенты вносили в следующих количествах: ротенон – 10 нмоль/мг белка, протонофор (карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон, СССР) – $2 \cdot 10^{-6}$ М, рутениевый красный – $2 \cdot 10^{-5}$ М.

В работе использовали арсеназо-III, (Aldrich, США), Na-глутамат, трис (основание), СССР (Sigma, США), рутениевый красный, циклоспорин А (Fluka, Швейцария), ротенон (ISN) и другие реактивы квалификации 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

Известно, что накопление Ca^{2+} в митохондриях сопровождается выходом протонов из матрикса за счет работы дыхательной цепи либо митохондриальной АТФ-азы [20]. Этот механизм позволяет поддерживать определенный уровень мембранного потенциала $\Delta\Psi_m$, необходимый для окислительного фосфорилирования и транспорта катионов. Как уже отмечалось выше, ранее нами были получены результаты, косвенно указывающие, что транспорт протонов в обмен на ионы Са необходим не только для энергозависимого транспорта кальция в матрикс, но также и для высвобождения кальция из деэнергизованных митохондрий. Поэтому целью данной работы является изучение основных закономерностей транспорта протонов в условиях потенциалзависимой аккумуляции Ca^{2+} , а также и пассивного высвобождения Ca^{2+} из митохондрий после сброса мембранного потенциала.

К настоящему времени известно (как из данных литературы [3–5], так и результатов наших собственных исследований [21]), что митохондриальная пора участвует в высвобождении кальция из деполяризованных митохондрий. Поэтому в данной работе для исключения участия поры в транспорте Ca^{2+} все опыты проводили в присутствии циклоспорина А – ингибитора митохондриальной поры.

На рис. 1 приведена зависимость суммарного количества ионов водорода, высвобожда-

ющихся в ответ на внесение Ca^{2+} в суспензию энергизованных митохондрий печени. Параллельно было определено количество кальция, накапливаемого митохондриями (рис. 1, Б). С повышением концентрации Ca^{2+} в среде возрастает как количество накопленного в матриксе Ca^{2+} , так и выход H^+ в среду инкубации (рис. 1, А). Результаты эксперимента показывают, что при блокировании поры циклоспорином А накопление кальция в митохондриях прямо пропорционально количеству катиона, добавленного в среду инкубации (рис. 1, Б). Следует отметить, что подавление митохондриальной поры позволяет получить более однозначные результаты, характеризующие накопление Ca^{2+} , поскольку полностью исключает высвобождение катиона из митохондрий в условиях эксперимента. В присутствии циклоспорина А накопление Ca^{2+} , как показали наблюдения, ограничено только сравнительно медленным и нечувствительным к циклоспоринолу и ингибитору унипортера, рутениевому красному, высвобождением Ca^{2+} из митохондрий в области высоких концентраций катиона.

Прямо пропорциональная зависимость между выходом H^+ и количеством добавленного Ca^{2+} (при которой на 1 ион Са приходится 1 ион Н) полностью соответствует линейной зависимости между количеством добавленного и поглощенного митохондриями кальция (рис. 1, Б). Таким образом, в стандартных условиях эксперимента в среде, содержащей ионы К, Сl, субстрат окисления (глутамат) и неорганический фосфат (H_2PO_4^-), наблюдаемое соотношение между количеством поглощенных митохондриями ионов Са и выходом ионов Н составляет 1 : 1.

Полученные данные свидетельствуют, что для функционирования Ca^{2+} -аккумулирующей системы митохондрий необходим обмен кальция из среды инкубации на ионы водорода, выходящие из митохондриального матрикса в среду. Если бы обмен протонов на ионы Са отсутствовал в митохондриях, потенциалзависимый вход Ca^{2+} в матрикс через Ca^{2+} -унипортер неизбежно приводил бы к необратимому сбросу $\Delta\Psi_m$. Поэтому для поддержания определенной величины трансмембранного потенциала в митохондриях необходимо, чтобы выполнялось соотношение, обеспечивающее электронейтральность ионного обмена: $[\text{Ca}^{2+}]_i + 2[\text{H}^+]_o \rightleftharpoons [\text{Ca}^{2+}]_o + 2[\text{H}^+]_i$ (1). Для выяснения некоторых кинетических характеристик данного ионообменного процесса (таких, как порядок реакции и константа скорости)

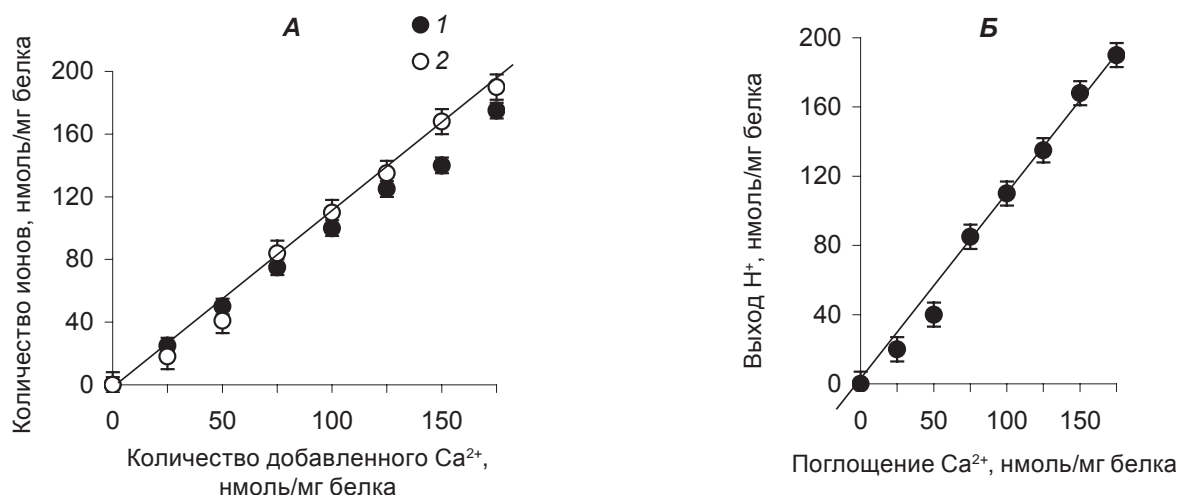


Рис. 1. Поглощение ионов Ca энергизованными митохондриями печени крыс (А, Б; кривая 1) и высвобождение протонов (А, кривая 2) в среду инкубации. По оси абсцисс указаны: А — количество добавленного Ca^{2+} ; Б — накопление Ca^{2+} в митохондриях. По оси ординат указаны: количество поглощенного кальция (А, кривая 1) и выход протонов (А, Б; кривая 2) ($M \pm m$, $n = 6$; $P < 0,05$). Среда инкубации здесь и на рис. 2, 3 (в мМ): 120 KCl , 1 KH_2PO_4 , 5 Na -глутамат; 2 трис- HCl -буфер (рН 7,5). Циклоспорин А вносили в концентрации 10^{-6} М

проводилась непрерывная параллельная регистрация высвобождения протонов в среду инкубации и накопления кальция в митохондриях (рис. 2).

Как показывают полученные результаты (рис. 2, А, кривая 1), кинетическая кривая $C(t) = C_{\infty}(1 - \exp(-kt))$, отражающая повышение концентрации ионов водорода в среде инкубации, достаточно хорошо соответствует временным характеристикам (рис. 2, А, кривая 2) накопления Ca^{2+} в митохондриях: $C(t) = C_0(\exp(-kt))$. Кинетические зависимости линеаризуются в полулогарифмических координатах $\ln C - t$ для накопления Ca^{2+} и удаления протонов из среды (рис. 2, Б, кривая 1; 2, Б, кривая 2) и $\ln(C_{\infty} - C) - t$ для накопления H^+ в среде и выхода Ca^{2+} из митохондрий (рис. 2, Б, кривая 2; 2, Б, кривая 1), что позволяет сделать вывод о соответствии транспорта протонов, как и транспорта Ca^{2+} , кинетике реакций первого порядка [22].

Ранее нами было показано [18], что деполяризация митохондриальной мембраны сама по себе недостаточна для высвобождения двухвалентных катионов после их накопления митохондриями. Результаты настоящего исследования еще раз показали, что сброс мембранного потенциала деполяризующими агентами, не обладающими протонофорными свойствами (ротеноном, азидом Na , валиномицином),

не приводит к быстрому высвобождению Ca^{2+} из митохондрий: выход катиона в среду, как и ранее [18], наблюдается только после внесения протонофора СССР (рис. 3, кривые 1, 2). Одновременное изучение транспорта протонов показывает, что выход ионов Ca в среду (рис. 3, Б) сопровождается входом ионов водорода из среды в матрикс митохондрий (рис. 3, А; кривые 1, 2). В этом случае так же, как и при регистрации транспорта катионов, одной лишь деполяризации мембраны внесением ротенона в суспензию недостаточно для поглощения протонов митохондриями. Вход протонов в матрикс, как и выход Ca^{2+} , происходит только после внесения СССР (рис. 3, А, Б; кривая 2). При этом транспорт протонов, сопряженный с транспортом двухвалентных катионов [18], полностью обратим: ионы H , высвободившиеся из митохондрий в ходе энергозависимой аккумуляции Ca^{2+} , полностью поглощаются в процессе пассивного выхода Ca^{2+} из органелл (рис. 2, А).

Проведенный эксперимент показал, что в условиях блокирования поры для электронейтрального выхода Ca^{2+} из митохондрий ($\Delta\Psi_m = 0$) необходим пассивный вход протонов в матрикс из среды инкубации, обеспечиваемый присутствием протонофора, что полностью соответствует высказанным нами ранее предположениям [18]. Движущей силой этого

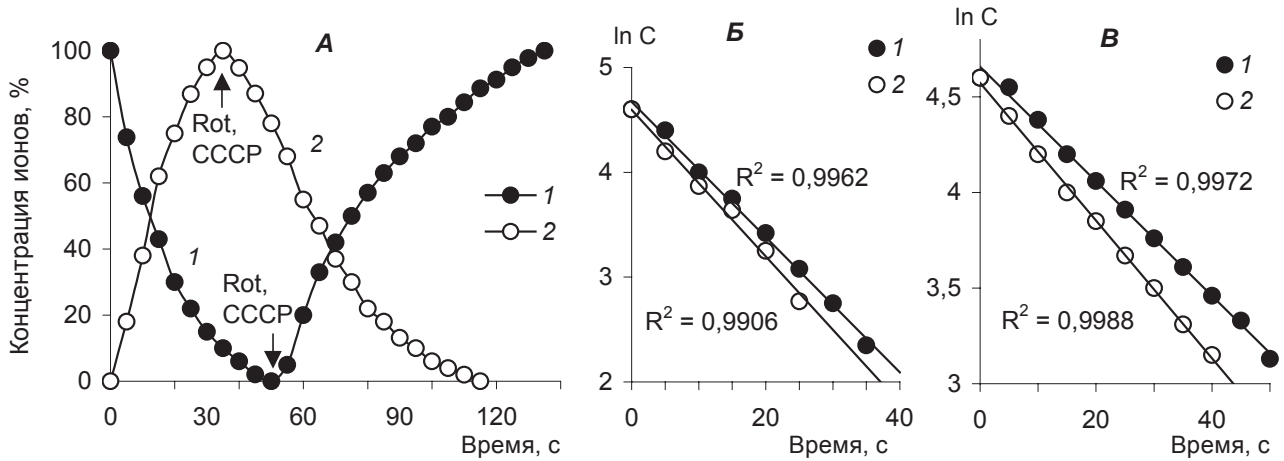


Рис. 2. Изменение концентрации ионов Ca^{2+} (кривая 1) и H^+ (кривая 2) в среде инкубации в ходе энергезависимого накопления Ca^{2+} и его высвобождения после деполяризации мембраны митохондрий (А). Данные приведены в % от общего количества добавленного Ca^{2+} ($n = 6$; $P < 0,05$). Данные накопления Ca^{2+} и выхода протонов (Б, кривые 1, 2), а также высвобождения Ca^{2+} и входа протонов в матрикс деэнергизованных митохондрий (В, кривые 1, 2) линейаризованы в полулогарифмических координатах: $\ln C - t$ (Б, кривая 1; В, кривая 2) и $\ln (C_{\infty} - C) - t$ (Б, кривая 2; В, кривая 1). $C_{\infty} = 100\%$; $\Delta\Psi_m$ сбрасывали ротеноном (10 нмоль/мг белка); протонофор, СССР вносили в концентрации 1 нмоль/мг белка. Коэффициенты корреляции для линейных зависимостей (Б,В) указаны на рисунке

ионообменного механизма является трансмембранный градиент H^+ , созданный в ходе накопления Ca^{2+} энергизованными митохондриями.

Следует отметить, что регистрируемое количественное соотношение между Ca^{2+} и H^+ , равное примерно 1 (рис. 1), не соответствует стехиометрическим коэффициентам уравнения ионного обмена (кривая 1): $1Ca^{2+} : 1H^+$.

Отсутствие полного количественного соответствия обмена ионов Ca на H^+ наблюдалось и ранее многими авторами [16,19,23–25], но все же не получило однозначного объяснения. Согласно данным литературы это расхождение может объясняться рядом причин, таких как котранспорт проникающих анионов, в данном случае фосфата, и связывание Ca^{2+} с фосфатом

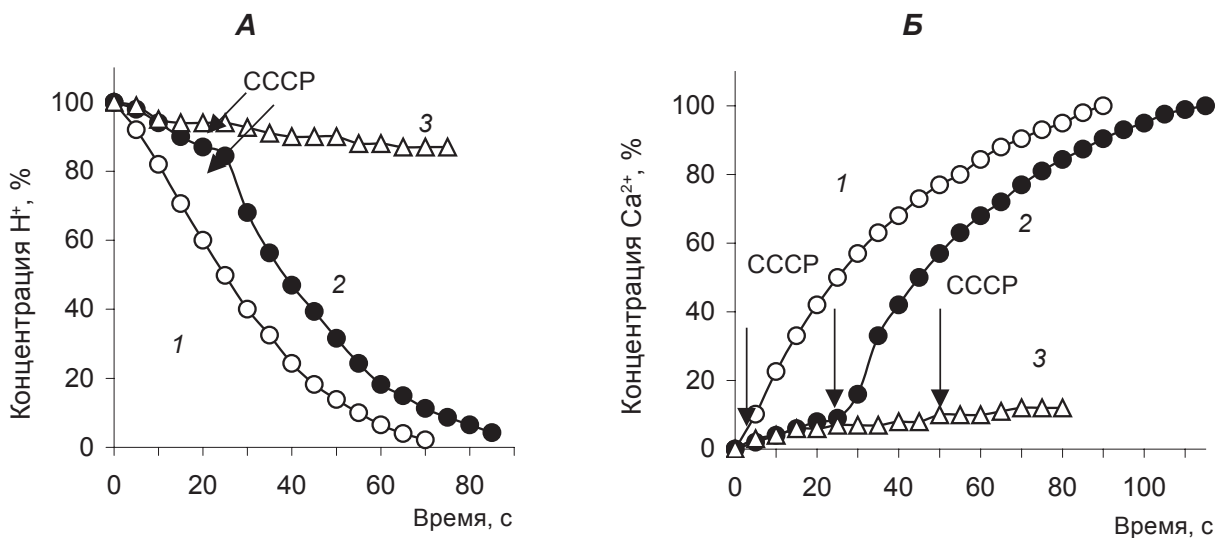


Рис. 3. Изменение концентрации H^+ (А) и кальция (Б) в среде инкубации (в % общего количества ионов) после деполяризации мембраны ротеноном (10 нмоль/мг) и внесения СССР (1 нмоль/мг белка); кривая 3 (А,Б) – те же условия в присутствии рутениевого красного – $2 \cdot 10^{-5}$ М. Добавление СССР указано стрелкой: одновременно с ротеноном (кривая 1), после деполяризации (кривая 2) в присутствии рутениевого красного (кривая 3). Приведены результаты типичных опытов

в матриксе [16,18,22,24], а также с белками матрикса и внутренней мембраны митохондрий.

Из литературы известно, что фосфат транспортируется в матрикс в виде H_2PO_4^- [23]. В свою очередь, для транспорта аниона H_2PO_4^- необходим его симпорт с ионами водорода, что соответствует суммарному переносу фосфорной кислоты [23,24]. Таким образом, количество протонов, высвобождающихся в среду инкубации при транспорте Ca^{2+} , снижается в два раза, что соответствует, как показывает эксперимент, высвобождению 1 иона H на 1 поглощенный ион Ca. Можно предположить, что именно этот механизм, а вовсе не связывание Ca^{2+} с фосфатом в матриксе [19,25], является наиболее вероятным объяснением стехиометрии $\text{Ca}^{2+}-\text{H}^+$ обмена, а именно: $1\text{Ca}^{2+}: 1\text{H}^+$, в отличие от теоретического $- 1\text{Ca}^{2+}: 2\text{H}^+$. Подтверждением этому, по нашему мнению, является и наблюдаемый порядок реакции для протонов — первый, а не второй, который скорее отвечал бы формальному уравнению скорости реакции для процесса накопления Ca^{2+} : $v = k[\text{Ca}^{2+}]_o^1[\text{H}^+]_i^2$. Оценка таких кинетических параметров протонного транспорта как константа скорости (k) и время половинного превращения ($t_{1/2}$) показывает, что оба сопряженных транспортных процесса — аккумуляция Ca^{2+} и выход H^+ (рис. 2, Б), а также вызванные деполяризацией мембраны выход Ca^{2+} и вход протонов в матрикс (рис. 2, В) — протекают в одних и тех же временных рамках и характеризуются близкими по величине константами скорости. Так, для накопления Ca^{2+} и выхода H^+ значения k и $t_{1/2}$, составляют соответственно, $(5,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}/\text{с}^{-1}$, $t_{1/2} = 11,9 \pm 0,6$ с, и $(7,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}/\text{с}^{-1}$, $t_{1/2} = 9,8 \pm 0,3$ с ($P < 0,05$).

Полученные результаты подтверждают высказанное нами ранее предположение о том, что трансмембранный перенос Ca^{2+} в митохондриях сопровождается одновременным противоположно направленным транспортом протонов, и пермеабилзация мембраны для протонов является необходимым условием реверсии их Ca^{2+} -аккумулирующей системы в условиях блокирования МРТР.

Тожественность системы накопления Ca^{2+} в энергизованных митохондриях и выхода катиона после их деэнергизации, требующая одновременного транспорта H^+ в обмен на Ca^{2+} , однозначно подтверждается чувствительностью обоих транспортных процессов к рутениевому красному, ингибитора Ca-унипортера. Так, в присутствии циклоспорина А рутениевый красный полностью блокирует не только выход Ca^{2+} из митохондрий, деполяри-

зованных протонофором СССР, но и вход протонов в митохондриальный матрикс (рис. 3, А, Б; кривая 3). Таким образом, транспорт протонов в условиях мембранной деполяризации митохондрий происходит в обмен на выход соответствующего количества ионов Ca. Сопряженность этих транспортных процессов проявляется и в том, что само по себе внесение протонофора после накопления Ca^{2+} при условии блокирования Ca^{2+} -унипортера и переноса Ca^{2+} с помощью рутениевого красного (рис. 3, А, 3) не способно обеспечить вход протонов в матрикс, несмотря на то, что протонный градиент направлен в матрикс из немитохондриальной среды ($\text{pH}_i > \text{pH}_o$). Приведенные данные свидетельствуют, что транспорт ионов водорода в матрикс в условиях сброса $\Delta\Psi_m$ оказывается чувствительным к ингибитору унипортера, рутениевому красному, и происходит в обмен на транслокацию ионов Ca через мембрану митохондрий.

Результаты проведенного исследования позволяют внести большую определенность в существующие представления об основных закономерностях функционирования Ca^{2+} -аккумулирующей системы митохондрий и сделать следующие выводы. В условиях подавления МРТР для обратимости накопления Ca^{2+} необходима сопряженность противоположно направленных процессов транспорта протонов в обмен на ионы Ca. Эта сопряженность обеспечивается либо работой дыхательной цепи в ходе энергозависимого накопления Ca^{2+} , либо присутствием экзогенного переносчика протонов в условиях пассивного электронейтрального высвобождения катиона через одну и ту же Ca^{2+} -транспортную систему, чувствительную к ингибитору Ca^{2+} -унипортера рутениевого красного. В физиологических условиях роль таких протонофоров могут выполнять жирные кислоты, а также разобщающие белки (uncoupling proteins), семейство которых насчитывает несколько известных к настоящему времени изоформ. Естественно предположить, что повышение протонной проводимости мембраны за счет жирных кислот либо УСП-белков должно создавать альтернативную возможность быстрой обратимости трансмембранного обмена Ca^{2+} в митохондриях, даже при полном блокировании митохондриальной поры.

Установленные в данной работе факты являются убедительным подтверждением высказанного нами ранее предположения, что необходимым условием «реверсии» унипортера является пермеабилзация мембраны для протонов, и позволяют сделать заключение,

что кальций-протонный обмен является основным механизмом, обеспечивающим обратимость энергозависимого накопления Ca^{2+} в митохондриях.

Автор выражает глубокую признательность ведущему научному сотруднику Института биокolloидной химии им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины канд. биол. наук Т. Г. Грузиной за методическую помощь и ценные советы при изучении транспорта протонов в митохондриях.

ОБОРОТНІСТЬ ЕНЕРГОЗАЛЕЖНОГО НАКОПИЧЕННЯ Ca^{2+} В МІТОХОНДРІЯХ

О. В. Акопова

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

Досліджено накопичення Ca^{2+} в енергізованих митохондриях печінки шурів за умов блокування митохондріальної пори (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) інгібітором циклоспорином А. Виявлено, що транспортування Ca^{2+} супроводжується протилежно спрямованим транспортуванням протонів: із матриксу до середовища інкубації в разі енергозалежної акумуляції катіона та із середовища до матриксу — у стані митохондріальної деполяризації. У стандартному середовищі інкубації, що містить K^+ , Cl^- , субстрат дихання (глутамат) та неорганічний фосфат (H_2PO_4^-), стехіометрія обміну становить 1 Ca^{2+} : 1 H^+ . Відповідно, такі характеристики транспортування Ca^{2+} , як порядок реакції, константа швидкості та час половинного перетворення відповідають тим самим характеристикам транспортування H^+ .

Досліджено умови, що забезпечують вивільнення Ca^{2+} з деенергізованих митохондрий. Встановлено, що кальцій-протонний обмін, необхідний для виходу Ca^{2+} з митохондрий під час деполяризації мембрани і пригнічення МРТР циклоспорином А, відбувається шляхом реверсії уніпортера внаслідок пермеабілізації мембрани протонофором СССР. Показано, що обидва транспортних процеси, які відбуваються одночасно, а саме — вихід Ca^{2+} та сполучений з ним вхід протонів до матриксу у присутності СССР — пригнічуються інгібітором Ca^{2+} -уніпортера — рутенієвим червоним. Одержані результати свідчать, що кальцій-протонний обмін є необхідною умовою реверсії Ca^{2+} -уніпортера та оборотності енергозалежного накопичення Ca^{2+} в митохондриях.

Ключові слова: митохондрії, Ca^{2+} -уніпортер, Ca^{2+} -, H^+ -транспортування, протонофор.

REVERSIBILITY OF ENERGY- DEPENDENT Ca^{2+} ACCUMULATION IN MITOCHONDRIA

O. V. Akopova

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

Summary

Ca^{2+} accumulation in energized rat liver mitochondria has been studied after the blockage of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) by cyclosporin A. It is shown that Ca^{2+} transport is coupled to the countertransport of protons: from the matrix of mitochondria in the medium in the course of Ca^{2+} accumulation, and, on the contrary, from the medium to mitochondrial matrix after membrane depolarization. In standard incubation medium containing K^+ , Cl^- , oxidation substrate (glutamate) and inorganic phosphate (H_2PO_4^-) the observed stoichiometry of the exchange is 1 Ca^{2+} : 1 H^+ . In accordance with this exchange ratio, proton, as well as cation, transport follows the same first-order kinetics, which is characterized in both cases by very close values of reaction half-times and rate constants.

It is shown that reversion of Ca^{2+} -uniporter, sensitive to ruthenium red, is necessary for Ca^{2+} -efflux from the matrix of deenergized mitochondria when MPTP is blocked by cyclosporin A. It is also shown that Ca^{2+} -uniporter reversion takes place only after membrane depolarization and permeabilization by protonophore CCCP. Calcium release from mitochondria in the presence of CCCP is accompanied by proton flow into the matrix. Both calcium and proton fluxes are sensitive to Ca^{2+} -uniporter blocker, ruthenium red, which gives the evidence of the identity of Ca^{2+} -efflux and influx pathways. The data obtained lead to the conclusion that calcium-proton exchange is necessary for Ca^{2+} -uniporter reversion and the reversibility of energy-dependent Ca^{2+} -uptake in mitochondria.

Key words: mitochondria, calcium, Ca^{2+} -uniporter, proton, transport, protonophore.

1. Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. — 2000. — 1. — P. 11–21.
2. Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. А. Ионы кальция у функции мозга — від фізіології до патології. К.: Наук. думка, 2005. — 198 с.

3. Hajnoczky G., Csordas G., Madesh M., Pacher P. // *J. Physiol.* – 2000. – **529**, N 1. – P. 69–81.
4. Ichas F., Jouaville L. S., Mazat J. P. // *Cell.* – 1997. – **89**. – P. 1145–1153.
5. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K. et al. // *FEBS Lett.* – 2004. – **567**. – P. 96–102.
6. Kroemer G., Zamzami N., Susin S. A. // *Immunol. Today.* – 1997. – **18**. – P. 44–51.
7. Skulachev V. P. // *Mol. Asp. Med.* – 1999. – **20**. – P. 139–184.
8. Malli R., Frieden M., Trenker M., Graier W. F. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**. – P. 12114–12122.
9. Rizzuto R., Pinton P., Carrington W. et al. // *Science.* – 1998. – **280**. – P. 1763–1766.
10. Rapizzi E., Pinton P., Szabadkai G. et al. // *J. Cell Biol.* – 2002. – **159**. – P. 613–624.
11. Crompton M., Barksby E., Johnson N., Capano M. // *Biochimie.* – 2002. – **84**, N 2. – P. 143–152.
12. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. // *J. Physiol.* – 2000. – **529**, N 1. – P. 37–47.
13. Gunter T. E., Pfeiffer D. R. // *Am. J. Physiol.* – 1994. – **267**. – P. C313–C339.
14. Khodorov B. I. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2004. – **86**, N 2. – P. 279–351.
15. Duchen M. // *J. Physiol.* – 2000. – **529**, N 1. – P. 57–68.
16. Pozzan T., Bragadin M., Azzone G. F. // *Biochemistry.* – 1977. – **16**. – P. 5618–5625.
17. Puskas J. S., Gunter T. E., Gunter K. K., Russell Ph. R. // *Ibid.* – 1976. – **15**. – P. 3834–3842.
18. Акопова О. В., Сагач В. Ф. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 1. – С. 58–67.
19. Pozzan T., Bragadin M., Azzone G. F. // *Eur. J. Biochem.* – 1976. – **71**. – P. 93–99.
20. Mitchell P. // *Biol. Rev.* – 1966. – **41**. – P. 445–458.
21. Акопова О. В., Сагач В. Ф. // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 5. – С. 62–69.
22. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. *Кинетические методы в биохимических исследованиях.* – Изд-во МГУ. – М., 1982. – 345 с.
23. Виноградов А. Д., Лейкин Ю. Н. // *Биохимия.* – 1971. – **36**, № 5. – С. 1061–1067.
24. Mitchell P., Moyle J. // *Eur. J. Biochem.* – 1969. – **9**. – P. 149–156.
25. Chance B. // *J. Biol. Chem.* – 1965. – **240**. – P. 2729–2736.
26. Fiskum G., Lehninger A. L. // *Ibid.* – 1979. – **254**. – P. 6236–6239.

Получено 07.03.2008