

РОЛЬ КАРБОКСИЛЬНИХ ГРУП У РЕГУЛЮВАННІ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ ПРОНИКНОСТІ МЕМБРАН МІТОХОНДРІЙ

Надійшла 26.01.10

Іонізовані СООН-групи присутні в молекулярних структурах, задіяних у процес формування мітохондріальних пор перехідної проникності (МРТР) – АДФ/АТФ-антипортера та/або потенціалзалежних аніонних каналів. В експериментах на препаратах ізольованих мітохондрій гепатоцитів щура ми виявили, що в разі індукції неспецифічної проникності мембран мітохондрій під дією Ca^{2+} у відносно низькій концентрації (15 мкМ) модуляція активності СООН-груп за допомогою 2-етокси-1-етоксикарбоніл-1,2-дигідрохіноліну (1 мМ) призводила до односпрямованих ефектів – прискорення процесів формування МРТР і транспортування інкубаційного розчину та Ca^{2+} крізь ці мегаканали, пролонгування відкритого стану останніх, зростання кінцевого об'єму (набрякання) мітохондрій і збільшення кількості Ca^{2+} , вивільненого з них. При застосуванні кальцію у високій концентрації (100 мкМ), навпаки, спостерігалися різноспрямовані процеси – сповільнення потоку інкубаційного розчину крізь МРТР та процесу їх формування; у той же час вихід Ca^{2+} із мітохондрій прискорювався. Кінцевий об'єм мітохондрій та кількість Ca^{2+} , що вивільнився з них, все ж таки зростали. Відмінності між результатами впливу використаного модулятора активності СООН-груп на неспецифічну проникність мітохондрій, індуковану кальцієм у низьких та високих концентраціях, імовірно, вказують на наступне. Процес набрякання мітохондрій є насичуваним, а вихід Ca^{2+} з цих органел носить нелімітований характер. Процес вивільнення Ca^{2+} із мітохондрій, вірогідно, зазнає ініційованої кальцієм інактивації. Механізми індукції неспецифічної проникності мембран мітохондрій під впливом кальцію в низьких та високих концентраціях є відмінними. Кальцієвий уніпортер мітохондрій є чутливим до модулятора активності СООН-груп. Певний внесок у досліджувані процеси забезпечує дифузія води крізь внутрішню мембрану мітохондрій та/або інші системи; це може призводити до змін у процесі транспортування рідин у даних органелах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мітохондрії, неспецифічна проникність мітохондрій, карбоксильні групи, 2-етокси-1-етоксикарбоніл-1,2-дигідрохінолін.

ВСТУП

Відомо, що розвиток неспецифічної проникності мембран мітохондрій базується на відкриванні пор перехідної проникності даних органел (mitochondrial permeability transition pores – МРТР, мегаканалів). Це призводить до надходження води та цитозольних розчинів всередину мітохондрій, їх набрякання та деенергізації, пригнічення процесів окислювального фосфорилування в таких органе-

лах, швидкого виходу Ca^{2+} з мітохондрій тощо [1, 2]. Вищезгадані процеси в разі їх високої інтенсивності можуть передувати загибелі клітини [3–5]. У фізіологічних же умовах розвиток неспецифічної проникності мітохондрій, імовірно, забезпечує звільнення матриксу цих органел від деградованих зайвих продуктів метаболізму. На розвитку пор перехідної проникності значною мірою базуються процеси позбавлення клітин від самих зруйнованих мітохондрій та/або індукція апоптозу даних клітин [6]. Крім того, показано значну роль згаданого явища в розвитку багатьох патологічних станів організму, зокрема захворювань нервової системи. Так, сучасні клінічні та експериментальні дані

¹Львівський національний університет ім. Івана Франка (Україна).

Ел. пошта: zgenjak@ukr.net (С. В. Кравенська);
kramar.solomija@gmail.com (С. Б. Крамар);
n_fedirko@yahoo.co.uk (Н. В. Федірко).

вказують на те, що інтенсивне відкривання МРТР задіяне в процеси ішемічного та травматичного пошкодження мозку, розвиток хвороб Альцгеймера, Паркінсона та Хантінгтона тощо [4]. Проте слід визнати, що, незважаючи на активні дослідження неспецифічної проникності мітохондрій та широкий набір використаних методів, конкретні внутрішньоклітинні механізми, задіяні в ініціацію та модулювання цього феномена, залишаються майже невивченими.

Згідно з наявними даними, регуляція функціонування кальційтранспортних систем у мембранах як збудливих, так і незбудливих клітин опосередковується іонізованими групами бічних радикалів амінокислотних залишків у складі функціональних доменів молекул транспортних білків [7, 8]. Одними з найбільш відповідальних ділянок кальційтранспортуючих молекул мембран є сульфогідрильні та карбоксильні (SH- та COOH-) групи. Зокрема, відомо, що активні („відкриті”) SH- та COOH-групи розташовані в каталітичних та регуляторних центрах Ca²⁺-АТФаз [9–13] та натрій-кальцієвого обмінника [14, 15]. Крім того, такі активні групи виявлені в складі молекул потенціалзалежних, ріанодинчувливих та інозитолтрифосфатчувливих кальцієвих каналів [16, 17]. При цьому доведено, що зміни рівня іонізації цих груп можуть ефективно модулювати роботу транспортних систем [18, 19]. Наявність активних SH- та COOH-груп продемонстрована також у складі каналних молекул МРТР. Доведено, що SH-групи значною мірою відповідальні за регуляцію роботи вказаної кальційтранспортної системи [2, 19–24]. У той же час дані щодо ролі COOH-груп у функціонуванні мітохондріальних мегаканалів є обмеженими [25–32]. Відомо, проте, що мітохондріальні мембрани збагачені негативно зарядженими радикалами аспарагінової та глутамінової амінокислот [33]. Такі радикали задіяні в регулювання здатності мітохондріального білка порину формувати потенціалзалежні іонні канали, активність яких безпосередньо пов'язана з рівнем іонізації COOH-груп у мітохондріальній мембрані [19]. Таким чином, з одного боку, є непрямі вказівки на можливу роль COOH-груп у регулюванні неспецифічної проникності мітохондрій, а з іншого – конкретні дані щодо феноменології та механізмів відповідних процесів практично відсутні. Це й зумовило мету даної роботи.

Модельним об'єктом дослідження були обрані ізольовані мітохондрії тканини печінки щурів. Зрозуміло, що гепатоцити не можна віднести до елек-

тробудливих клітин у прямому розумінні цього слова (хоча розвиток неспецифічної проникності мітохондрій і пов'язаний з рядом електричних феноменів). Проте даний об'єкт є досить зручним та адекватним для експериментів, спрямованих на з'ясування загальних закономірностей функціонування мітохондрій. Мітохондрії печінки демонструють високий рівень виживання *in vitro*, що дозволяє проводити довготривалі експерименти з використанням суспензії цих органел. Порівняно з іншими типами клітин саме гепатоцити є найбільш багатими на мітохондрії, а основні властивості останніх не відрізняються від таких, описаних для клітин інших типів і, зокрема, для нейронів різних відділів центральної та периферичної нервових систем [34]. Отже, узагальнення експериментальних фактів, отриманих на мітохондріях гепатоцитів, щодо мітохондрій інших клітин, у тому числі й нервових, очевидно, є достатньо коректним.

МЕТОДИКА

Ізолювання мітохондрій. Дослідження були проведені на препаратах ізольованих мітохондрій з тканини печінки 11 білих безпородних чотири-п'ятимісячних щурів масою 180–350 г. Мітохондріальну фракцію виділяли за допомогою диференційного центрифугування [35]. Після наркотизації дієтиловим ефіром тварин декапітували, печінку швидко виділяли та вміщували на 10 хв у середовище для гомогенізації, охоложене до –2 °С (до появи плаваючих кристалів льоду). Охоложену тканину подрібнювали, пропускаючи через прес, і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера–Ельвенгейма (з розрахунку 1 г тканини на 8 мл середовища для гомогенізації); швидкість обертання складала 300 хв⁻¹ при трьох вертикальних ходах поршня. Склад середовища для гомогенізації мітохондрій був таким (у мілімолях на 1 л): сахароза – 300, триоксиметиламінометан (TRIS) – 10, етиленгліколь діаміноетилтетраацетат (ЕГТА) – 2; додавався 1 % бичачого сироваткового альбуміну (рН 7.4). Отриманий 12 %-вий гомогенат центрифугували в декілька етапів. На першому етапі осаджували малодисперсні частки (залишки тканини та фракцію ядер); гомогенат центрифугували протягом 3 хв при 150g і 4 хв при 330g без зупинки ротора. Мітохондріальну фракцію отримували за допомогою центрифугування супернатанта протягом 10 хв при 4500g. Отриманий осад мітохондрій ресуспендували в середовищі

гомогенізації, що не вміщувало ЕГТА, і повторно центрифугували протягом 10 хв при 4500g. Осад мітохондріальної фракції суспендували в середовищі гомогенізації без ЕГТА для отримання фінальної суспензії мітохондрій з кінцевою концентрацією 70–80 мг мітохондріального білка в 1 мл. Розчини, посуд та інструменти, які використовували під час виділення мітохондрій, попередньо охолоджували; усі операції, пов'язані з отриманням цих органел, проводили при температурі 0 – +2 °С. Отриману суспензію мітохондрій для використання у подальших дослідженнях зберігали на льоду. Вміст білка в суспензії ізольованих мітохондрій визначали за методом Лоурі [36]. Функціональну цілісність цих органел оцінювали з використанням полярографії [37].

Реєстрація процесу набрякання мітохондрій. Перехід мітохондрій у стан підвищеної неспецифічної проникності оцінювали за їх набряканням, реєструючи інтенсивність світлопоглинання суспензією даних органел. Набрякання мітохондрій визначали при довжині хвилі 540 нм із застосуванням установки, котра включала в себе термостатовану камеру, ультратермостат, спектрофотометр, програмно-цифровий модуль та персональний

комп'ютер [38]. У перебігу досліджень суспензію мітохондрій щохвилини перемішували вручну. Середовище інкубації мітохондрій вміщувало (у мілімолях на 1 л): сахарозу – 180, TRIS – 5, KCl – 50, $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ – 2 (рН 7.4, температура 26 °С). Як субстрат окиснення використовували сукцинат у кінцевій концентрації 2 мМ. Реєстрацію набрякання мітохондрій розпочинали в момент внесення цих органел (0.5–1.0 мг/мл) у середовище інкубації, що вміщувало сукцинат (експериментальні реалізації) або сукцинат та ЕГТА в кінцевій концентрації 0.1 мМ (контрольні реалізації). Через 1 хв при експериментальних реалізаціях у середовище інкубації додавали CaCl_2 у кінцевій концентрації 15 або 100 мкМ. З метою дослідження ролі COOH-груп у розвитку процесу набрякання мітохондрій використовували специфічний модулятор активності цих груп 2-етокси-1-етоксикарбоніл-1,2-дигідрохінолін (ЕЕДХ, 1 мМ) [39]. Дану сполуку вносили в середовище інкубації за 1 хв до моменту додавання CaCl_2 . Процес набрякання мітохондрій оцінювали за трьома параметрами – латентним періодом, амплітудою та швидкістю (рис. 1).

Реєстрація виходу Ca^{2+} з мітохондрій. Розвиток неспецифічної проникності мітохондрій оцінювали

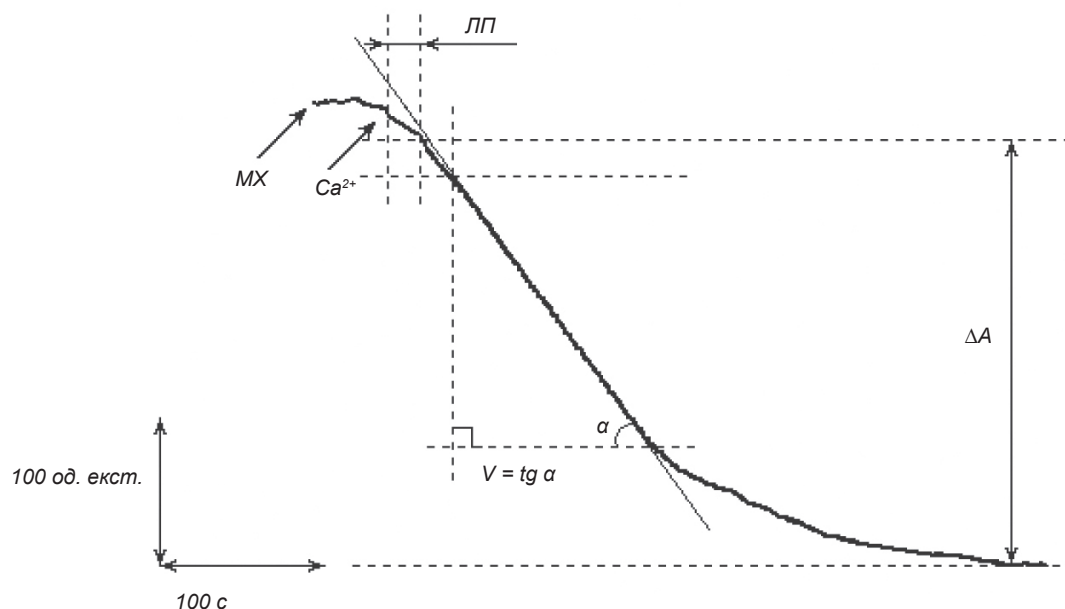
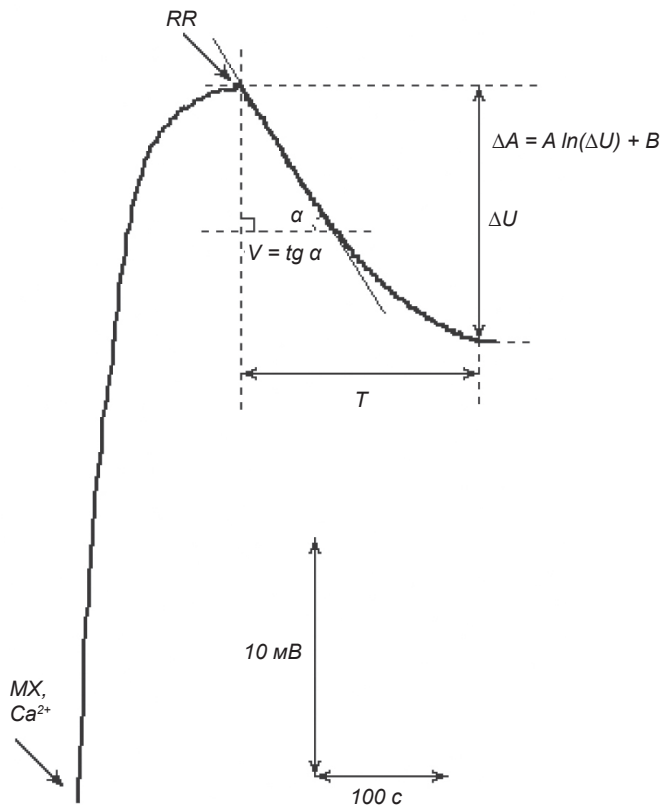


Рис. 1. Приклад реєстрації процесу кальційіндукованого набрякання мітохондрій (типовий запис).

По осі абсцис – час реєстрації, с; по осі ординат – зміни інтенсивності світлопоглинання суспензією мітохондрій, одиниці екстинції (од. екст.). Довжина хвилі $\lambda = 540$ нм. Стрілками вказані моменти внесення в середовище інкубації суспензії мітохондрій (MX) та іонів Ca^{2+} . Проілюстровано також принцип вимірювання параметрів набрякання – швидкості (V), латентного періоду (ЛП) та амплітуди (ΔA).



Р и с. 2. Приклад реєстрації процесу кальційіндукованого виходу Ca^{2+} з мітохондрій (типовий запис).

По осі абсцис – час реєстрації, с; по осі ординат – зміни потенціалу в суспензії мітохондрій, мВ. Стрілками вказані моменти внесення в середовище інкубації суспензії мітохондрій (MX), Ca^{2+} та рутенію червоного (RR). Проілюстровано також принцип вимірювання та розрахунку параметрів виходу Ca^{2+} з мітохондрій – швидкості (V), тривалості (T) та амплітуди (ΔA). ΔU – зміна різниці потенціалів у суспензії мітохондрій, A і B – змінні величини.

за виходом Ca^{2+} із цих органел. Такий вихід реєстрували із застосуванням установки, котра включала в себе відкриту термостатовану комірку об'ємом 2 мл, ультратермостат, магнітну мішалку, кальційселективний електрод (модель 93-20; „Orion” США), універсальний іоновимірювач, програмно-цифровий модуль та персональний комп'ютер. Зміни вмісту Ca^{2+} у середовищі інкубації розраховували за калібрувальною кривою, враховуючи зв'язування Ca^{2+} компонентами середовища за

допомогою титрування останнього розчином CaCl_2 . Середовище інкубації мітохондрій вмішувало (у мілімолях на 1 л): сахарозу – 180, TRIS – 5, KCl – 50, KH_2PO_4 – 2 (рН 7.4, температура 26 °C). Як субстрат окиснення при даних вимірах також використовували сукцинат у кінцевій концентрації 2 мМ. Мітохондрії (1.5–2.5 мг/мл) вносили в середовище інкубації, що вмішувало сукцинат, специфічний інгібітор натрій-кальцієвого обмінника мітохондрій CGP-37157 у кінцевій концентрації 1 мкМ [40] та специфічний блокатор відкривання МРТР циклоспорин А у кінцевій концентрації 10 мкМ [41, 42] (у контрольних реалізаціях) або сукцинат, CGP-37157 у кінцевій концентрації 1 мкМ та CaCl_2 у кінцевій концентрації 15 або 100 мкМ (в експериментальних реалізаціях). Реєстрацію виходу Ca^{2+} з мітохондрій розпочинали після внесення в середовище інкубації блокатора функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій рутенію червоного у кінцевій концентрації 25 мкМ [43]. Цю сполуку додавали через 1 хв після внесення в середовище інкубації мітохондрій (у контрольних реалізаціях) або через 1 хв після завершення акумуляції Ca^{2+} даними органелами. З метою модуляції процесу виходу Ca^{2+} з мітохондрій під впливом ЕЕДХ (1 мМ) вказану сполуку вносили в середовище інкубації після завершення акумуляції Ca^{2+} мітохондріями, але за 1 хв до моменту додавання рутенію червоного. Вихід Ca^{2+} з мітохондрій оцінювали за трьома параметрами – швидкістю, тривалістю та амплітудою процесу (кількістю Ca^{2+} , що вивільнився крізь МРТР) (рис. 2).

У дослідах використовували ЕГТА, циклоспорин А, сукцинат, рутеній червоний та АДФ (“Sigma-Aldrich”, США), CGP-37157 (“Toocris Bioscience”, США), ЕЕДХ (“Fluka”, Швейцарія); інші реактиви кваліфікації х. ч. та ос. ч. були виробництва “Сфера Сім”, “Сінбіас” та “Сімко” (Україна).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що катіони Ca^{2+} демонструють високу здатність до індукції відкривання МРТР. Внесення Ca^{2+} у певних кількостях у середовище інкубації мітохондрій супроводжується набряканням цих органел та ініціацією швидкого виходу з них Ca^{2+} [2]. Раніше ми показали, що під впливом Ca^{2+} у концентраціях від 5 до 100 мкМ ізольовані мітохондрії набрякають; було встановлено основні кінетичні характеристики даного процесу та з'ясовано внесок

вільних SH-груп на внутрішній мітохондріальній мембрані в процес кальційіндукованого набрякання мітохондрій [38].

При дослідженні ролі активних карбоксильних груп на мембранах мітохондрій у процесі їх набрякання ми виявили, що після інкубації препаратів цих органел протягом 1 хв у присутності 1 мМ ЕЕДХ

відбувалося вірогідне зростання швидкості та амплітуди згаданого процесу, індукованого аплікацією Ca^{2+} у концентрації 15 мкМ (рис. 3; 4; табл. 1). Так, нормована швидкість зростала в середньому до $148 \pm 13 \%$ ($P \leq 0.05$; $n = 5$), а амплітуда – до $137 \pm 8 \%$ ($P \leq 0.001$; $n = 5$) порівняно з контрольними значеннями. Латентний період набрякання міто-

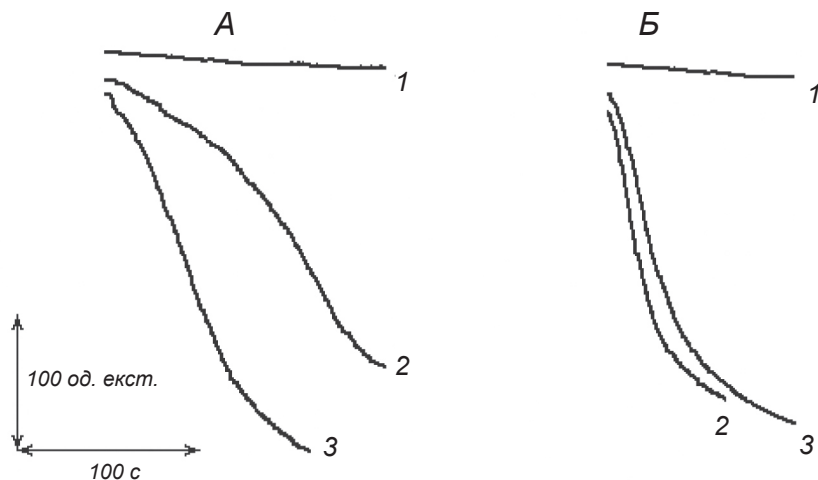


Рис. 3. Залежність інтенсивності кальційіндукованого набрякання мітохондрій від концентрації Ca^{2+} та дії ЕЕДХ (типові записи).

По осі абсцис – час реєстрації, с; по осі ординат – зміни інтенсивності світлопоглинання суспензією мітохондрій, одиниці екстинкції (од. екст.). Довжина хвилі $\lambda = 540$ нм. Концентрація доданого Ca^{2+} становила 15 (А) або 100 (Б) мкМ. 1 – при додаванні 0.1 мМ ЕГТА (контроль), 2 – при додаванні Ca^{2+} , 3 – при додаванні Ca^{2+} та 1 мМ ЕЕДХ. Початок записів 2 і 3 відповідає моменту внесення Ca^{2+} у середовище інкубації.

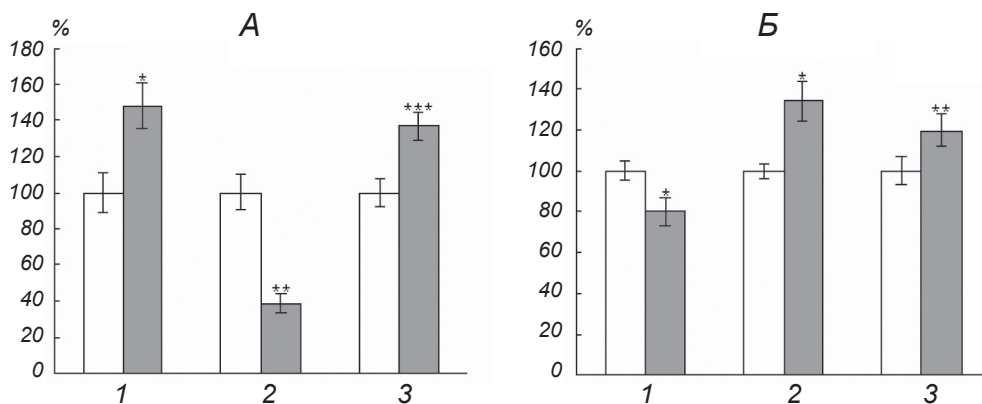


Рис. 4. Залежність інтенсивності кальційіндукованого набрякання мітохондрій від концентрації Ca^{2+} та дії ЕЕДХ.

По вертикалі – нормована інтенсивність кальційіндукованого набрякання мітохондрій, %. Концентрація доданого Ca^{2+} становила 15 (А) або 100 (Б) мкМ. 1 – швидкість, 2 – латентний період, 3 – амплітуда набрякання. Білі та сірі стовпчики відповідають середнім значенням, виміряним при ізольованому додаванні Ca^{2+} (контроль) і при додаванні Ca^{2+} та 1 мМ ЕЕДХ відповідно. Однею, двома та трьома зірочками позначені випадки вірогідної відмінності ($P < 0.05$, < 0.01 та < 0.001 відповідно) між вказаними значеннями.

Таблиця 1. Залежність інтенсивності кальційіндукованого набрякання мітохондрій від концентрації Ca^{2+} та дії ЕЕДХ

Агенти, додані до середовища інкубації		Параметри кальційіндукованого набрякання мітохондрій		
Ca^{2+} , мкМ	ЕЕДХ, мМ	швидкість, од. екст./мг білка · хв	латентний період, с	амплітуда, од. екст./мг білка
15	0	0.192 ± 0.022	65.1 ± 6.8	0.308 ± 0.023
15	1	0.272 ± 0.024	24.2 ± 3.2	0.420 ± 0.025
100	0	0.627 ± 0.030	8.9 ± 0.3	0.324 ± 0.023
100	1	0.497 ± 0.046	11.9 ± 0.9	0.388 ± 0.027

хондрій істотно зменшувався та становив лише $39 \pm 5 \%$ ($P \leq 0.01$; $n = 5$) щодо контролю. Швидкість набрякання мітохондрій, індукованого Ca^{2+} у концентрації 100 мкМ, у присутності ЕЕДХ вірогідно зменшувалась (відносне значення складало $80 \pm 7 \%$ контрольного; $P \leq 0.05$; $n = 5$), а латентний період зростав до $134 \pm 10 \%$ ($P \leq 0.05$; $n = 5$) (рис. 3; 4; табл. 1). Підвищення концентрації індуктора процесу – іонів кальцію – від 15 до 100 мкМ супроводжувалося збільшенням абсолютної ампліту-

ди набрякання мітохондрій, яка складала $120 \pm 8 \%$ контрольної ($P \leq 0.01$; $n = 5$). Таким чином, одержані нами результати свідчать про те, що модифікація вільних карбоксильних груп мітохондріальних мембран під дією ЕЕДХ призводить до швидшого формування структур МРТР та інтенсифікує проходження інкубаційного розчину крізь такі пори в умовах стимуляції досліджуваного процесу Ca^{2+} у низьких концентраціях. Натомість, у разі високих концентрацій цих іонів спостерігається протилеж-

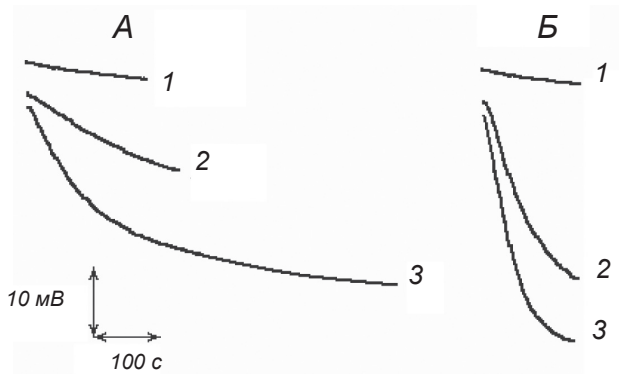


Рис. 5. Залежність інтенсивності кальційіндукованого виходу Ca^{2+} з мітохондрій від концентрації Ca^{2+} та дії ЕЕДХ (типові записи). По осі абсцис – час реєстрації, с; по осі ординат – зміни потенціалу в суспензії мітохондрій, мВ. Початок записів відповідає моменту внесення рутенію червоного у середовище інкубації. 1 – при додаванні 10 мМ циклоспорину А (контроль). Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 3.

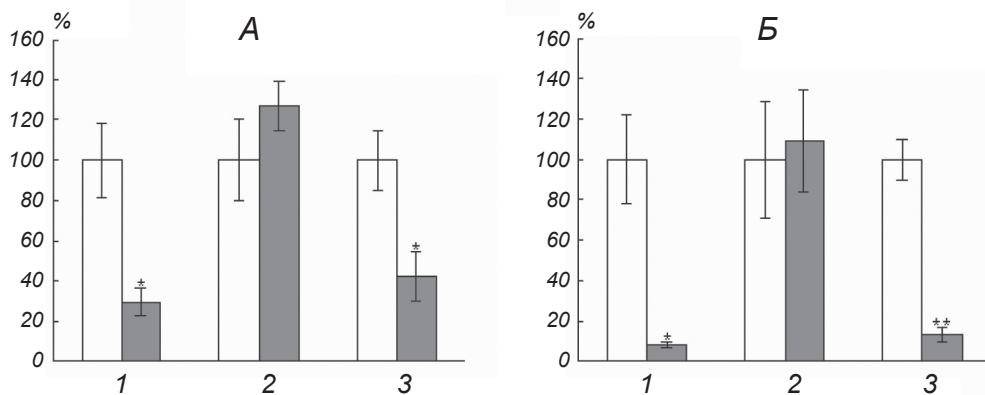


Рис. 6. Залежність інтенсивності кальційіндукованого виходу Ca^{2+} з мітохондрій від концентрації Ca^{2+} та дії ЕЕДХ. По вертикалі – нормована інтенсивність кальційіндукованого виходу Ca^{2+} з мітохондрій, 2 – тривалість, 3 – амплітуда цього процесу (%). Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 4.

Таблиця 2. Залежність інтенсивності кальційіндукованого виходу Ca^{2+} з мітохондрій від концентрації Ca^{2+} та дії ЕЕДХ

Агенти, додані до середовища інкубації		Параметри кальційіндукованого виходу Ca^{2+} з мітохондрій		
Ca^{2+} , мкМ	ЕЕДХ, мМ	швидкість, мкМ Ca^{2+} /мг білка · хв	тривалість, с	амплітуда, мкМ Ca^{2+} /мг білка
15	0	2.90 ± 0.37	202.8 ± 32.4	8.19 ± 1.26
15	1	5.73 ± 1.34	541.3 ± 160.3	27.59 ± 5.95
100	0	15.07 ± 2.46	180.9 ± 24.1	25.08 ± 2.83
100	1	32.520 ± 7.89	132.4 ± 14.4	32.58 ± 3.13

ний ефект ЕЕДХ. Втім, в обох випадках нами було виявлено зростання кінцевого об'єму мітохондрій (тобто їх значне набрякання).

У перебігу подальшого дослідження ми вивчали вплив ЕЕДХ на процес МРТР-опосередкованого вивільнення кальцію з мітохондрій. Інкубація цих органел протягом 1 хв у розчині, що вміщував 1 мМ ЕЕДХ, призводила до вірогідного зростання більшості параметрів, котрі характеризували вихід Ca^{2+} , індукованого впливом даних катіонів як у низьких (15 мкМ), так і у високих концентраціях (100 мкМ) (рис. 5; 6; табл. 2). Зокрема, швидкість виходу Ca^{2+} , індукованого дією вказаних іонів у низькій та високій концентраціях, становила $191 \pm 45 \%$ ($P \leq 0.05$; $n = 6$) та $217 \pm 53 \%$ ($P \leq 0.05$; $n = 5$) відповідно щодо контролю. Тривалість зазначеного процесу складала $246 \pm 73 \%$ ($P \leq 0.05$; $n = 6$) та $78 \pm 8 \%$ ($P > 0.05$; $n = 5$), а кількість Ca^{2+} , що вивільнився крізь МРТР, – $328 \pm 71 \%$ ($P \leq 0.01$; $n = 6$) та $134 \pm 13 \%$ ($P \leq 0.05$; $n = 5$) відповідно (рис. 5; 6; табл. 2). Отже, ці результати слугують свідченням того, що модифікація вільних карбоксигруп у мітохондріальних мембранах призводить до потенціювання виходу Ca^{2+} крізь МРТР, збільшення швидкості вказаного процесу та, відповідно, зростання кількості катіонів даного металу, вивільнених з мітохондрій. До того ж, у випадку індукції досліджуваного процесу Ca^{2+} у низьких концентраціях відкритий стан МРТР пролонгується.

Таким чином, ми вперше використали ЕЕДХ для дослідження механізмів регулювання неспецифічної проникності мітохондрій. Згідно з одержаними даними, дія ЕЕДХ призводить до вірогідних змін досліджуваного процесу. Перш за все, такі результати слід розглядати як пряме підтвердження того, що іонізовані СООН-групи наявні в складі молекул, безпосередньо задіяних у процес формування МРТР. Це молекули АДФ/АТФ-антипортера (вірогідно, з цитозольного боку мембран) [21, 22] та/або потенціалзалежних аніонних каналів (найбільш імовірно, згадані групи є бічними радикалами залишків аспарагінової та глутамінової амінокислот) [19, 24, 33]. До того ж, наші дані свідчать на користь істотного задіяння згаданих функціональних груп у регуляцію двох протилежно спрямованих транспортних потоків крізь МРТР (вхідний потік інкубаційного розчину та вихідний потік іонів Ca^{2+}). Так, аналіз значень досліджуваних параметрів виявив, що зміни, зумовлені впливом ЕЕДХ на процес індукції неспецифічної проникності мітохондрій під дією Ca^{2+} у низьких концентраціях (15 мкМ), були

односпрямованими. За таких умов модуляція активності СООН-груп призводила до вираженого прискорення процесів формування МРТР, посилення транспорту крізь вказані структури інкубаційного розчину та Ca^{2+} , істотного пролонгування відкритого стану таких мегаканалів (про це свідчить збільшення тривалості процесу виходу Ca^{2+} у 2.5 разу). Наслідком таких змін є значне зростання кінцевого об'єму мітохондрій та кількості Ca^{2+} , що вивільнився крізь МРТР (рис. 3–6; табл. 1; 2). Вірогідно, СООН-групи формують частину фіксованого заряду в складі мегаканалів; тому модифікація активності цих груп призводить до посилення відкриття МРТР вже в умовах низьких концентрацій Ca^{2+} , котрий слугував індуктором даного процесу. Механізм, за яким відбувається посилення активації МРТР при модуляції СООН-груп, імовірно, включає в себе конформаційні зміни білків у складі мегаканалів. На користь останнього свідчать літературні дані про конденсування під дією ЕЕДХ СООН-груп за рахунок конформаційних змін білкових молекул, до складу яких входять ці групи [44].

Як відомо, мембранні канали всіх типів складаються з молекул білків, котрі можуть знаходитися в декількох альтернативних конформаціях. Кожна з останніх стабільна тільки при дії незначних електричних сил, і вона буде змінюватись іншою конформацією, якщо білкова молекула зазнаватиме дії потужного електричного впливу [45, 46]. Враховуючи, що періоду відкриття МРТР передують потужна кальційіндукована деполяризація мітохондріальної мембрани [47], виглядає імовірно, що даний фактор є адитивним та сприяє конформаційним переходам білків мегаканалів. Крім того, відомо, що відкриття мегаканалів відбувається за умов накопичення Ca^{2+} у мітохондріях; це стимулює синтез АТФ і, відповідно, активність F_1F_0 -АТФ-синтази [48, 49]. Тому при активації МРТР та потужному виході Ca^{2+} з мітохондрій активність F_1F_0 -АТФ-синтази буде знижуватися; було показано, що це призводить до підвищення лужності внутрішньомітохондріального матриксу [50]. Таке залуження, у свою чергу, буде зумовлювати зниження рівня іонізації СООН-груп [8] та посилення функціонування МРТР.

Слід наголосити, що в разі індукції неспецифічної проникності мембран мітохондрій під дією Ca^{2+} у високих концентраціях (порядку 100 мкМ на відміну від дії цих іонів у низьких концентраціях – порядку 15 мкМ) модифікація карбоксигруп у

мембранах даних органел призводила до різноспрямованих подій. Потік інкубаційного розчину крізь МРТР та процеси їх формування сповільнювалися, але в той же час вихід Ca^{2+} з мітохондрій прискорювався (рис. 3–6; табл. 1; 2). Тим не менш, остаточним результатом вказаних процесів було незначне, але помітне зростання кінцевого об'єму згаданих органел, а також кількості Ca^{2+} , що вивільнився з них (рис. 3–6; табл. 1; 2). Ми припускаємо, що в даному випадку спостерігається ініційований дією зовнішньомітохондріальних іонів кальцію початок розвитку інактивації процесу вивільнення Ca^{2+} із цих органел. Крім того, зареєстрована нами різниця в результатах впливу ЕЕДХ на неспецифічну проникність мембран мітохондрій, індуковану кальцієм у низьких та високих концентраціях, вказує на деяку відмінність інтенсивностей потоків інкубаційного розчину всередину мітохондрій та Ca^{2+} – назовні з цих органел у процесі відкривання МРТР. Перший із цих процесів виявляє таку властивість, як насичуваність, тоді як інтенсивність другого є практично нелімітованою. Дані спостереження також можуть слугувати додатковим доказом на користь гіпотези деяких авторів [51] про наявність двох різних механізмів індукції відкривання МРТР під впливом іонів кальцію в низьких ($\sim 10^{-5}$ М) та високих ($>10^{-4}$ М) концентраціях. Зокрема, було показано, що утворення МРТР у клітинах міокарда щурів при низьких концентраціях Ca^{2+} відбувається тільки за умови ефективного функціонування дихального ланцюга, незалежно від субстрату окиснення (глутамату або сукцинату). У разі ж дії кальцію у високих концентраціях після його швидкого поглинання спостерігається вивільнення цього катіона через кальцієвий уніпортер внаслідок деполаризації мембран і наступного інтенсивного набрякання мітохондрій. Індукція утворення МРТР у даному випадку не залежить від присутності субстратів клітинного дихання та АТФ. Крім того, у серії досліджень МРТР-опосередкованого виходу Ca^{2+} з мітохондрій ми блокували роботу кальцієвого уніпортера цих органел. Враховуючи вказаний факт, ми припускаємо, що різноспрямованість змін, зумовлених впливом ЕЕДХ на індукцію неспецифічної проникності мітохондрій під дією кальцію у низьких (15 мкМ) та високих (100 мкМ) концентраціях, можна пояснити також значною прямою чутливістю кальцієвого уніпортера мітохондрій до згаданої сполуки. Окрім кальцієвого уніпортера мітохондрій, певний внесок у досліджувані процеси, імовірно, забезпечує і дифузія води крізь ліпід-

ний бішар внутрішньої мітохондріальної мембрани та/або інші молекулярні структури, зміни функціонування яких здатні призводити до модуляції процесів транспортування рідин у мітохондріях. До згаданих структур можуть відноситися, наприклад, циклоспорин А-нечутливі пори перехідної проникності, калій-водневі обмінники, аквапорини, АТФ-чутливі калієві канали [52–54] тощо. Це може бути причиною спостережуваних відмінностей між патернами ЕЕДХ-опосередкованого розвитку неспецифічної проникності мембран мітохондрій у разі індукції такого розвитку дією кальцію в різних концентраціях (15 та 100 мкМ).

Отже, ми вважаємо, що отримані дані доводять істотну задіяність вільних СООН-груп у мітохондріальних мембранах у процес розвитку кальцій-індукованої неспецифічної проникності у вказаних органелах. Спостережувані закономірності, очевидно, є досить загальними і можуть бути перенесені на процеси індукції неспецифічної проникності в мітохондріях клітин різних тканин, у тому числі й нервової.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. T. E. Gunter and D. R. Pfeiffer, "Mechanisms by which mitochondria transport calcium," *Am. J. Physiol.*, **258**, C755-C786 (1990).
2. M. Zoratti and I. Szabo, "The mitochondrial permeability transition," *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, No. 2, 139-176 (1995).
3. M. Crompton, "Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death," *J. Physiol.*, **529**, 11-21 (2000).
4. G. Kroemer, L. Galluzzi, and C. Brenner, "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death," *Physiol. Rev.*, **87**, 99-163 (2007).
5. A. Rasola and P. Bernardi, "The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis," *Apoptosis*, **12**, No. 5, 815-833 (2007).
6. T. E. Gunter, D. I. Yule, K. K. Gunter, et al., "Calcium and mitochondria," *FEBS Lett.*, **567**, 96-102 (2004).
7. М. Диксон, Э. Уэбб, *Ферменты*, Изд-во иностр. лит., Москва (1961).
8. Н. В. Федірко, *Механізми підтримання кальцієвого гомеостазу в ацинарних клітинах підчелюсної слинної залози*, Автореф. дис. ... д-ра біол. наук, Київ (2006).
9. О. Д. Лопина, А. М. Рубцов, А. А. Болдырев, "Исследование SH-групп саркоплазматического ретикулума", *Биохимия*, **44**, № 2, 306-317 (1979).
10. D. Di Monte, G. Bellomo, H. Thor, et al., "Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca^{2+} homeostasis," *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, No. 2, 343-350 (1984).
11. A. S. Gukovskaya, S. M. Kotelevskaya, E. S. Trepakova, and V. P. Zinchenko, "Effect of SH-reagent thimerosal on Ca^{2+}

- homeostasis in thymocytes,” *Biol. Membrane*, **9**, 158-165 (1992).
12. Ю. А. Вац, Н. В. Федирко, М. Ю. Клевец, Н. В. Войтенко, “Роль SH-груп в функціонуванні кальційтранспортних АТФаз, регулюючих кальцевий гомеостаз і экзоцитоз”, *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **34**, № 1, 7-16 (2002).
 13. M. Brini and E. Carafoli, “Calcium pumps in health and disease,” *Physiol. Rev.*, **89**, 1341-1378 (2009).
 14. N. V. Fedirko, M. Yu. Klevets, and V. V. Manko, “Modulation influence of p-chloromercuribenzoate on plasma membrane Na⁺-Ca²⁺ exchanger of the secretory cells of chironomus larvae salivary gland,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, **500**, 467-470 (2001).
 15. D. A. Nicoll, S. Longoni, and K. D. Philipson, “Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger,” *Science*, **250**, 562-565 (1990).
 16. М. Ю. Клевець, *Електричні властивості секреторних клітин травних залоз і механізми активації екструзії їх ферментів*, Автореф. дис. ... д-ра біол. наук, Київ (1993).
 17. H. E. D. J. ter Keurs and P. A. Boyden, “Calcium and arrhythmogenesis,” *Physiol. Rev.*, **87**, 457-506 (2007).
 18. Ю. М. Торчинский, *Сера в белках*, Наука, Москва (1977).
 19. T. A. Mirzabekov and L. N. Ermishkin, “The gate of mitochondrial porin channel is controlled by a number of negative and positive charges,” *FEBS Lett.*, **249**, No. 2, 375-378 (1989).
 20. I. W. Warhurst, A. P. Dawson, and M. J. Selwyn, “Inhibition of electrogenic anion entry into rat liver mitochondria by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide,” *FEBS Lett.*, **149**, No. 2, 249-252 (1982).
 21. G. Brandolin, F. Boulay, P. Dalbon, and P. V. Vignais, “Orientation of the N-terminal region of the membrane-bound ADP/ATP carrier protein explored by antipeptide antibodies and an arginine-specific endoprotease. Evidence that the accessibility of the N-terminal residues depends on the conformational state of the carrier,” *Biochemistry*, **28**, No. 3, 1093-1100 (1989).
 22. V. Trezeguet, A. Le Saux, C. David, et al., “A covalent tandem dimer of the mitochondrial ADP/ATP carrier is functional *in vivo*,” *Biochim. Biophys. Acta*, **1457**, Nos. 1/2, 81-93 (2000).
 23. P. C. Waldmeier, K. Zimmermann, T. Qian, et al., “Cyclophilin D as a drug target,” *Current Med. Chem.*, **10**, No. 16, 1485-1506 (2003).
 24. M. J. Young, D. C. Bay, G. Hausner, and D. A. Court, “The evolutionary history of mitochondrial porins,” *BMC Evol. Biol.*, **7**, No. 31 (2007).
 25. D. W. Jung, G. Y. Shi, and G. P. Brierley, “N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide inhibits monovalent cation influx but not cation/proton exchange in heart mitochondria,” *J. Biol. Chem.*, **255**, 408-412 (1980).
 26. L. Clejan, C. G. Bosch, and D. S. Beattie, “Inhibition by dicyclohexylcarbodiimide of proton ejection but not electron transfer in rat liver mitochondria,” *J. Biol. Chem.*, **259**, 13017-13020 (1984).
 27. S. A. Novgorodov, E. V. Kultayeva, L. S. Yaguzhinsky, and V. V. Lemeshko, “Ion permeability induction by the SH cross-linking reagents in rat liver mitochondria is inhibited by the free radical scavenger, butylhydroxytoluene,” *J. Bioenerg. Biomembranes*, **19**, No. 3, 191-202 (1987).
 28. A. D. Beavis and K. D. Garlid, “Inhibition of the mitochondrial inner membrane anion channel by dicyclohexylcarbodiimide. Evidence for a specific transport pathway,” *J. Biol. Chem.*, **263**, 7574-7580 (1988).
 29. E. Chavez, C. Zazueta, and E. Diaz, “Dicyclohexylcarbodiimide as inducer of mitochondrial Ca²⁺ release,” *J. Bioenerg. Biomembranes*, **22**, No. 5, 679-689 (1990).
 30. S. A. Novgorodov, Z. M. Szulc, Ch. Luberto, et al., “Positively charged ceramide is a potent inducer of mitochondrial permeabilization,” *J. Biol. Chem.*, **280**, 16096-16105 (2005).
 31. T. Yamamoto, S. Terauchi, A. Tachikawa, et al., “Two critical factors affecting the release of mitochondrial cytochrome C as revealed by studies using N,N'-dicyclohexylcarbodiimide as an atypical inducer of permeability transition,” *J. Bioenerg. Biomembranes*, **37**, No. 5, 299-306 (2005).
 32. N. Shalbuyeva, T. Brustovetsky, A. Bolshakov, and N. Brustovetsky, “Calcium-dependent spontaneously reversible remodeling of brain mitochondria,” *J. Biol. Chem.*, **281**, 37547-37558 (2006).
 33. M. Linden, P. Gellerfors, and B. D. Nelson, “Purification of a protein having pore forming activity from the rat liver mitochondrial outer membrane,” *Biochem. J.*, **208**, No. 1, 77-82 (1982).
 34. S. Chalmers and D. G. Nicholls, “The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria,” *J. Biol. Chem.*, **278**, 19062-19070 (2003).
 35. W. C. Schneider and G. H. Hogeboom, “Intracellular distribution of enzymes. Further studies of the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates,” *J. Biol. Chem.*, **183**, 123-128 (1950).
 36. J. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, et al., “Protein measurements with Folin protein reagent,” *J. Biol. Chem.*, **193**, No. 1, 265-275 (1951).
 37. B. Chance and G. Williams, “Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. Kinetics of oxygen utilization,” *J. Biol. Chem.*, **217**, 383-393 (1955).
 38. Є. В. Кравенська, Н. В. Наливайко, Н. В. Федірко, Л. О. Дубицький, “Кінетичний аналіз кальцій- та кадмійіндукованого розвитку неспецифічної проникності внутрішньої мембрани мітохондрій”, *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **40**, № 4, 303-311 (2008).
 39. P. V. Sundaram, “A new method of coupling proteins to insoluble polymers,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, No. 2, 717-722 (1974).
 40. M. Chiesi, R. Schwaller, and K. Eichenberger, “Structural dependency of the inhibitory action of benzodiazepines and related compounds on the mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger,” *Biochem. Pharmacol.*, **37**, No. 22, 4399-4403 (1988).
 41. N. Fournier, G. Ducet, and A. Crevat, “Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes,” *J. Bioenerg. Biomembranes*, **19**, No. 3, 297-303 (1987).
 42. M. Crompton, H. Ellinger, and A. Costi, “Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress,” *Biochem. J.*, **255**, No. 1, 357-360 (1988).
 43. F. D. Vasington, P. Gazzotti, R. Tiozzo, and E. Carafoli, “The effect of ruthenium red on Ca²⁺ transport and respiration in rat liver mitochondria,” *Biochim. Biophys. Acta*, **256**, No. 1, 43-54 (1972).
 44. Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт, *Аминокислоты, пептиды, белки*, Мир, Москва (1985).
 45. С. Г. Кошелев, А. И. Соболевский, Б. И. Ходоров, “Исследование структуры и воротных механизмов НМДА-канала с помощью быстрых блокаторов”, в кн.: *Тезисы докладов II съезда биофизиков России (Москва, 23-27*

- августа 1999 г.), **2**, Изд-во Ин-та биофизики клетки, 522-523.
46. A. I. Sobolevsky, "Two-component blocking kinetics of open NMDA channels by organic cations," *Biochim. Biophys. Acta*, **1416**, Nos. 1/2, 69-91 (1999).
47. T. E. Gunter, K. K. Gunter, S. S. Sheu, and C. E. Gavin, "Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance," *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **267**, C313-C339 (1994).
48. L. S. Jouaville, P. Pinton, C. Bastianutto, et al., "Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming," *PNAS*, **96**, 13807-13812 (1999).
49. J. G. McCormack, A. P. Halestrap, and R. M. Denton, "Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism," *Physiol. Rev.*, **70**, 391-425 (1990).
50. B. Moreau and A. V. Parekh, "Ca²⁺-dependent inactivation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter involves proton flux through the ATP synthase," *Current Biol.*, **18**, No. 11, 855-859 (2008).
51. О. В. Аكوпова, В. Ф. Сагач, "Индукция открытия митохондриальной поры под действием Ca²⁺ в миокарде крыс", *Укр. біохім. журн.*, **76**, № 1, 48-55 (2004).
52. P. Gena, E. Fanelli, C. Brenner, et al., "News and views on mitochondrial water transport," *Front. Biosci.*, **14**, 4189-4198 (2009).
53. A. Kaasik, Dzh. Safiulina, A. Zharkovsky, and V. Veksler, "Regulation of mitochondrial matrix volume," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **292**, C157-C163 (2007).
54. W.-K. Lee and F. Thévenod, "A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions?" *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, C195-C202 (2006).