

Г.М. Элбакидзе¹, А.Г. Меденцев², А.Г. Элбакидзе¹

¹ Медико-биологический центр Ассоциации содействия международному центру научной культуры — «Всемирная лаборатория», Москва, Российская Федерация

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Московская область, Российская Федерация

Влияние продигиозанзависимого комутона на устойчивость митохондрий печени к повреждению протонофором

Эффектор тканевого стресса гепатоцитов — продигиозанзависимый комутон (ПЗК) — вызывает деэнергизацию митохондрий печени, предварительно нагруженных ионами Ca^{2+} . При этом наблюдается снижение мембранного потенциала (МП) и выход ионов Ca^{2+} из матрикса по циклоспорин А-чувствительному механизму мегапоры. В условиях блокирования мегапоры циклоспорином А протонофор FCCP вызывает снижение МП и выход ионов Ca^{2+} по циклоспориннечувствительному механизму. Показано, что ПЗК повышает устойчивость митохондрий к действию упомянутого протонофора, вызывая ингибирование этих эффектов. Ингибирующее действие ПЗК осуществляется по K^+ - и НАДН-зависимому механизму. Протекторное действие распространяется не на весь пул митохондрий в таких клетках, а только в отношении митохондрий, сохранивших высокую интактность, и при условии, что в них не активирован механизм мегапоры. Кроме того, представленные в настоящей статье результаты свидетельствуют о том, что в определенных условиях ПЗК может оказывать протекторное действие и посредством усиления энергопродукции в поврежденных митохондриях.

Ключевые слова: тканевый стресс, комутон, кальций, мегапора, протонофор.
(Вестник РАМН. 2014; 1–2: 75–79)

75

Введение

Ранее было показано, что активация клеток Купфера введением эндотоксина продигиозана вызывает накопление в печени эффектора тканевого стресса гепатоцитов комутона [1]. Механизм действия этого регулятора на митохондрии малоизучен. Показано, что продигиозанзависимый комутон (ПЗК), выделенный из печени крысы и охарактеризованный как термостабильное соединение с молекулярной массой 617 Да [2], оказывает тканеспе-

цифическое деэнергизирующее влияние на митохондрии из гомологичной ткани, предварительно нагруженные ионами Ca^{2+} [3]. Оно выражается как в стимуляции быстрого выброса упомянутых ионов из матрикса митохондрий, так и в ускорении их медленного выхода [4]. Нельзя исключать, что оба эффекта ПЗК реализуются по одному механизму, а именно путем активации им мегапоры (неселективной поры) во внутренней мембране митохондрий, и отличаются лишь по своей интенсивности. В связи с этим было необходимо исследовать действие

G.M. Elbakidze¹, A.G. Medentsev², A.G. Elbakidze¹

¹ Association for World Laboratory, Biomedical Centre, Moscow, Russian Federation

² G.K. Skryabin's Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Puschino, Moscow district, Russian Federation

Influence of Prodigiozan-Dependent Comuton on the Resistance of Liver Mitochondria Against Damage by Protonophor

An effector of tissue stress of hepatocytes, prodigiozan-dependent comuton (PDC), provokes deenergization of liver mitochondria, preloaded by Ca^{2+} ions. In this case a decrease of membrane potential (MP) and Ca^{2+} efflux by cyclosporine A sensitive mechanism of megapore is observed. If megapore is blocked by cyclosporin A, protonophor FCCP provoked decrease of MP and Ca^{2+} efflux by cyclosporin A-insensitive mechanism. It is shown that PDC increases resistance of mitochondria to mentioned protonophor action by inhibition of both these effects. An inhibitory action of PDC is realized by K^+ and NADH-dependent mechanism. The effector of hepatocyte tissue stress, prodigiozan-dependent comuton (PDC), evokes deenergizing liver mitochondria preloaded with Ca^{2+} , both membrane potential (MP) decrease and Ca^{2+} release in according to cyclosporine A-sensitive mechanism of megapore being observed. If megapore is blocked by cyclosporin A, protonophore FCCP reduces of MP and Ca^{2+} release in according to cyclosporin A-insensitive mechanism. PDC is shown to increase the resistance of mitochondria against protonophore action mentioned above by means of inhibition of both these effects. Inhibitory action of PDC is realized due to both K^+ and NADH-dependent mechanism. protective effect takes place only in intact mitochondria of these cells providig (on condition that) its megapore mechanism is not activated. Moreover, the results obtained are evidence of PDC can function as protector due to intensification of energy generation in damaged.

Key words: tissue stress, comuton, calcium, megapore, protonophore.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014; 1–2: 75–79)

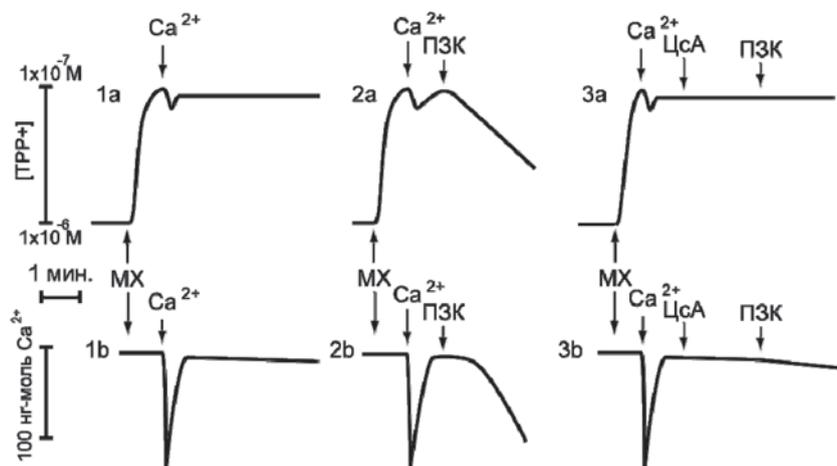


Рис. 1. Влияние циклоспорина А на МП (а) и выход ионов Ca^{2+} (б) из митохондрий печени, индуцированный добавлением ПЗК.

Примечание. Добавки в среду: МХ — митохондрии печени, 1,8 мг белка/мл, ЦсА — 5 мкМ циклоспорина А, Ca^{2+} — 130 нг-моль $\text{CaCl}_2/1$ мг белка, продигозанзависимый комутон (ПЗК) — 5,5 мкг/мг белка. МП — мембранный потенциал.

76

ПЗК на митохондрии печени в условиях блокирования мегапоры циклоспорин А с учетом того, что ПЗК обладает гепатопротекторным действием на гепатоциты [2, 5].

Цель исследования: изучить влияние комутона на устойчивость таких интегральных показателей физиологического состояния митохондрий, как метаболизм ионов Ca^{2+} и величина мембранного потенциала (МП) в условиях повреждения этих органелл протонофором FCCP.

Материалы и методы

Материал для исследования

Эксперименты проводили на самцах беспородных белых крыс массой 200–230 г. Митохондриальную фракцию из печени крысы выделяли методом Шнейдера в модификации [6].

Методы исследования

Измерение транспорта ионов Ca^{2+} и регистрацию величины МП митохондрий осуществляли синхронно, Ca^{2+} -селективным электродом фирмы «НИКО АНАЛИТ» [7] и ТФФ⁺-чувствительным электродом той же фирмы [8], соответственно. Суспензию митохондрий в процессе измерений инкубировали в открытой, термостатируемой при 28 °С, ячейке объемом 1 мл при непрерывном перемешивании. Состав среды инкубации: 250 мМ сахарозы, 30 мМ КСI, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ трис-буфера; рН 7,2. Изменения в составе среды инкубации митохондрий, равно как и добавки в эту среду, оговорены в подписях к рисункам. Величину дыхательного контроля по Чансу рассчитывали на основании измерений скоростей поглощения кислорода суспензией митохондрий печени в закрытой полярографической ячейке объемом 1 мл электродом Кларка при 28 °С. Состав среды инкубации: 280 мМ сахарозы, 3 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ трис-буфера; рН 7,5. В эту среду добавляли 2 мг белка митохондрий, затем 200 мкмоль аденозиндифосфата и проводили регистрацию поглощения кислорода вплоть до его полного исчерпания в ячейке. Концентрацию белка в митохондриальной фракции измеряли методом, описанным в [9]. В экспериментах использовали высокоочищенный ПЗК из печени крысы, гомогенный в процедурах высокоэф-

фективной жидкостной хроматографии. Использовали химические реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США).

Статистическая обработка данных

При статистической обработке результатов рассчитывали ошибку генерального среднего.

Результаты

Как видно из рис. 1а, предварительно нагруженные ионами Ca^{2+} митохондрии печени сохраняют интактность, о чем свидетельствует стабильно высокая величина МП и удержание ими ионов Ca^{2+} в матриксе в течение всего эксперимента. Между тем добавление ПЗК в среду измерения вызывает у этих митохондрий выраженное снижение МП (рис. 1 и 2а), которое сопровождается быстрым выходом ионов Ca^{2+} из матрикса митохондрий в окружающее пространство (рис. 1 и 2б). Оба этих эффекта ПЗК блокировались при добавлении в среду измерения циклоспорина А перед введением ПЗК (рис. 1, 3а и 3б). Показано, что ПЗК не влияет на величину МП митохондрий печени, предварительно нагруженных ионами Ca^{2+} в среде с циклоспорин А и рутениевым красным (РК) (рис. 1а и 2). При этом после добавления в среду измерения с циклоспорин А и ПЗК рутениевого красного наблюдается медленный выход ионов Ca^{2+} из матрикса митохондрий (рис. 2 и 1б).

Исследование влияния ПЗК на устойчивость митохондрий к повреждению проводили на суспензии этих органелл, предварительно нагруженных ионами Ca^{2+} . Как известно, под влиянием FCCP митохондрии повреждаются. При этом наряду с падением МП происходит выход ионов Ca^{2+} из матрикса в окружающее пространство по циклоспорин А-нечувствительному механизму [10]. Оба этих эффекта FCCP наблюдали и в нашем эксперименте (рис. 2а и 2б). Обнаружено, что добавление в среду измерения ПЗК в этих условиях не только полностью снимает эффект FCCP в отношении МП (рис. 2 и 3а), но также блокирует быстрый выход ионов Ca^{2+} из матрикса в окружающее пространство по циклоспорин А-нечувствительному механизму. При этом ПЗК инициирует медленный выход ионов Ca^{2+}

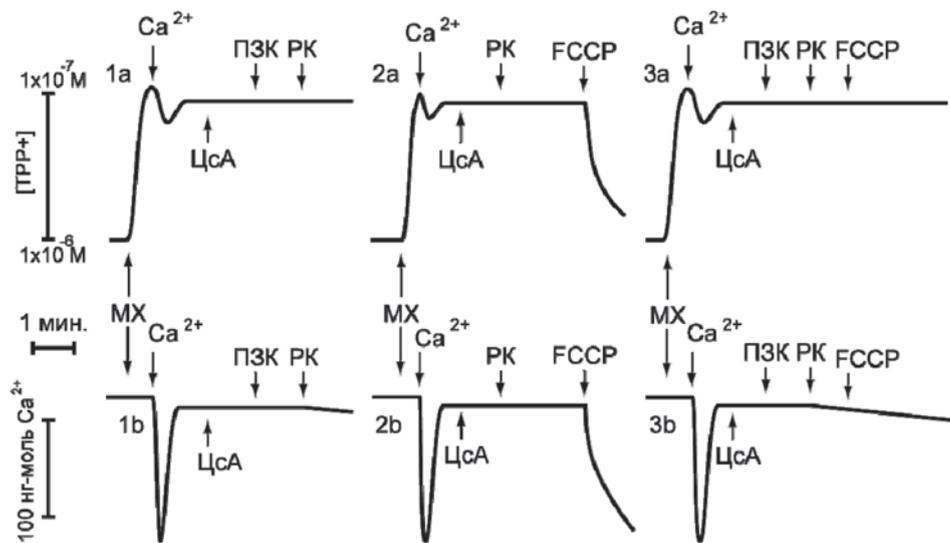


Рис. 2. Влияние ПЗК на МП (а) и выход ионов Ca^{2+} (б) из митохондрий печени после добавления 4 мкМ FCCP.

Примечание. Добавки в среду: то же, что на рис. 1, а также MX — 1,4 мг белка, ЦсА — 2,2 мкМ циклоспорина А, РК — рутениевый красный, 2,4 нг, Ca^{2+} — 130 нг-моль $\text{CaCl}_2/1$ мг белка, ПЗК — 7,0 мкг/мг белка.

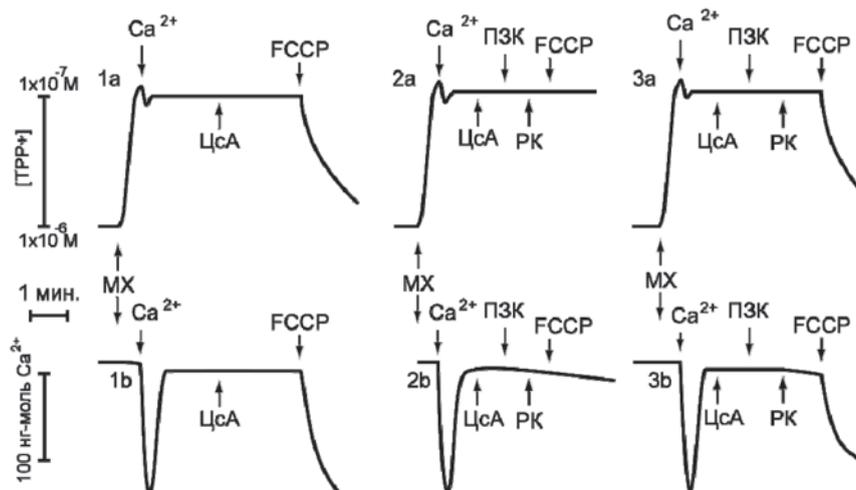


Рис. 3. Влияние ионов K^+ и Na^+ на эффект ПЗК в отношении МП и выхода ионов Ca^{2+} у митохондрий печени, поврежденных добавлением 4 мкМ FCCP: а — влияние на МП митохондрий, б — влияние на метаболизм ионов Ca^{2+} . FCCP — протонофор.

Примечание. Добавки в среду: то же, что на рис. 1 и 2, а также MX — 1,5 мг белка/1 мл митохондрий печени, ЦсА — 2,1 мкМ циклоспорина А, РК — 2,6 нг, Ca^{2+} — 140 нг-моль $\text{CaCl}_2/1$ мг белка, ПЗК — 6,8 мкг/мг белка.

из матрикса митохондрий, который сохраняется и после добавления в среду измерения FCCP (рис. 2 и 3б).

На рис. 3 представлены результаты влияния замены ионов K^+ на ионы Na^+ в среде измерения на эффекты ПЗК в отношении МП и выброса ионов Ca^{2+} у поврежденных добавлением FCCP митохондрий в присутствии циклоспорина А и РК. Как видно из рисунков, в среде измерения с ионами K^+ циклоспорином А и РК вызываемые у митохондрий добавлением FCCP быстрые процессы (снижение МП и выброс ионов Ca^{2+} из матрикса; рис. 1а, 1б и 3) блокируются добавлением ПЗК (рис. 2а, 2б и 3). Между тем замена ионов K^+ на ионы Na^+ в тех же условиях полностью снимает эти эффекты ПЗК (рис. 3а и 3б).

На рис. 4 представлены результаты экспериментов по исследованию влияния степени интактности митохондрий, поврежденных FCCP, на эффекты ПЗК в отношении МП в среде измерения с циклоспорином А и РК. Из рисунка следует, что при окислении сукцината эффект блокирования снижения МП у поврежденных FCCP митохондрий под действием ПЗК наблюдается у митохондрий с высоким дыхательным контролем (рис. 4А). У митохондрий с низким дыхательным контролем в тех же условиях ПЗК вызывает противоположный по знаку эффект, а именно: усиливает снижение МП, вызванное FCCP (рис. 4В). Замена сукцината на β -оксибутират приводит к реставрации «нормализующего» эффекта ПЗК в отношении МП

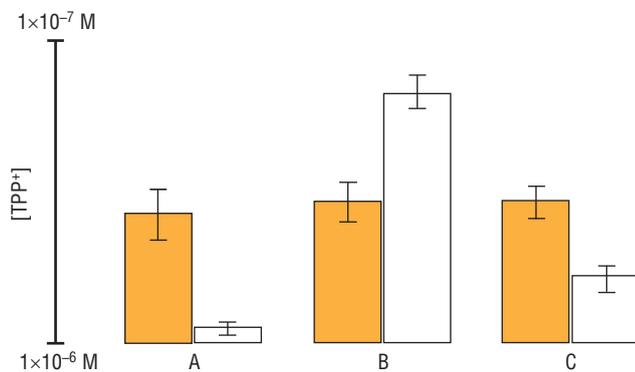


Рис. 4. Влияние степени интактности митохондрий печени и субстратов окисления на протекторный эффект ПЗК в отношении митохондрий печени при повреждении митохондрий под действием 1,6 мкМ FCCP.

Примечание. Ордината — концентрация ТФФ+ в среде инкубации (СИ). В СИ перед введением митохондрий (1,2 мг) добавлены: 1 мМ MgCl₂, 1,3 мкг/мл олигомицина, 5 мкМ циклоспорина А. После введения митохондрий в СИ добавлено 130 нг-моль CaCl₂/1 мг белка. Белые столбики — добавление ПЗК (5,2 мкг/мг) белка, заштрихованные — без ПЗК. А — митохондрии с ДК = 3,0–3,2; В и С — митохондрии с ДК = 1,5–1,3. А и В — в СИ 5 мМ сукцината, С — в СИ с 2 мМ малоната добавлено 2,5 мМ β-оксибутирата.

78

и метаболизма ионов Ca²⁺ у митохондрий с низким дыхательным контролем, поврежденных добавлением FCCP (рис. 4С).

Обсуждение

Вызываемая ПЗК стимуляция быстрого выхода ионов Ca²⁺ из предварительно нагруженных этими ионами митохондрий развивается на фоне снижения МП по циклоспорин А-чувствительному механизму (см. рис. 1). Эти данные свидетельствуют об активации мегапоры во внутренней мембране митохондрий. Чувствительность вызываемых ПЗК эффектов к циклоспорину А указывает на активацию им мегапоры. Эти результаты согласуются также с данными о способности ПЗК индуцировать такой характерный признак открытия мегапоры, как высокоамплитудное набухание митохондрий печени в присутствии ионов Ca²⁺ [4]. Вызываемый ПЗК медленный выход ионов Ca²⁺ в присутствии РК наблюдается в среде измерения с циклоспирином А. Таким образом, ПЗК обладает способностью стимулировать выход ионов Ca²⁺ из матрикса митохондрий печени не только путем индукции мегапоры, но и при посредстве Ca²⁺/H⁺-обменного механизма.

В экспериментах по повреждению митохондрий в среде измерения с РК протонофором FCCP вызывал нечувствительное к циклоспорину А быстрое снижение МП и выход ионов Ca²⁺ из матрикса митохондрий. Выход ионов Ca²⁺ в вышеописанных условиях не может быть объяснен обратимостью функционирования унипортера в результате падения МП ввиду присутствия в среде измерения РК [11]. В связи с этим можно предположить, что циклоспорин А-нечувствительная Ca²⁺-проницаемость внутренней мембраны митохондрий индуцируется здесь по иному механизму: возможно, при участии митохон-

дриальной фосфолипазы A₂ [12]. Была обнаружена способность ПЗК ингибировать оба эти эффекта FCCP.

Можно предположить, что обнаруженная способность ПЗК препятствовать снижению МП и выходу ионов Ca²⁺ из матрикса митохондрий под действием FCCP является результатом усиления энергопродукции в митохондриях этим регулятором. Такое объяснение согласуется с ранее полученными данными об усилении под действием ПЗК продукции восстановленных пиридиннуклеотидов в экспериментах с суспензией гепатоцитов [2]. Тот факт, что замена ионов K⁺ на ионы Na⁺ снимает ингибиторное действие ПЗК на снижение МП и выход ионов Ca²⁺ из матрикса митохондрий, поврежденных под действием FCCP (см. рис. 3), свидетельствует, что эти эффекты ПЗК реализуются при участии K⁺-зависимого механизма. То обстоятельство, что при замене субстрата окисления с сукцината на β-оксибутират удается получить эффект ингибирования падения МП под действием FCCP в присутствии ПЗК, может указывать на вклад никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) в его реализацию.

На основании полученных результатов можно сформулировать совокупность условий, необходимых для повышения устойчивости митохондрий к повреждению под влиянием ПЗК. К ним относятся «нагруженность» митохондрий ионами Ca²⁺, высокая интактность этих органелл, а также «закрытое» состояние их мегапоры, несмотря на повышение протонной проницаемости у внутренней мембраны, вызванное повреждающим воздействием. В связи с этим можно полагать, что протекторное действие ПЗК может осуществляться в гепатоцитах, накапливающих ионы Ca²⁺ в митохондриях в результате перегрузки физиологических функций этих клеток или вследствие их повреждения [14]. При этом протекторное действие распространяется не на весь пул митохондрий, сохранивших высокую интактность, и при условии, что в них не активирован механизм мегапоры.

Ранее было предложено объяснение механизма тканевого стресса, согласно которому протекторное действие его эффектора — комутона — осуществляется путем активации неспецифической реакции клеток на повреждение [12]. На основании данных, свидетельствующих о деэнергизирующем действии ПЗК на гомологичные митохондрии [4], предполагалось, что протекторное действие этого внутриклеточного регулятора обусловлено формированием в клетке второй фазы данной физиологической реакции [12], для которой характерно торможение клеточного метаболизма [13]. Между тем рассмотренные в настоящей статье результаты свидетельствуют о том, что в определенных условиях ПЗК может оказывать протекторное действие и посредством усиления энергопродукции в поврежденных митохондриях. Как известно, усиление метаболизма является признаком первой фазы неспецифической реакции клеток на повреждение [13], поэтому можно полагать, что протекторное действие ПЗК на гепатоциты может быть обусловлено также путем формирования этой фазы неспецифической реакции клеток на повреждение. В данных условиях можно было бы ожидать усиления в поврежденной клетке репаративных процессов механизмом тканевого стресса.

Заключение

Таким образом, эффектор тканевого стресса гепатоцитов, продигозанзависимый комутон, вызывает деэнергизацию митохондрий печени, предваритель-

но нагруженных ионами Ca^{2+} . При этом наблюдается снижение мембранного потенциала и выход ионов Ca^{2+} из матрикса по циклоспорин А-чувствительному механизму мегпоры. В условиях блокирования мегпоры циклоспорином А протонифор FCCP вызывает снижение МП и выход ионов Ca^{2+} по цикло-

спориннечувствительному механизму. Показано, что ПЗК повышает устойчивость митохондрий к действию упомянутого протонифора, вызывая ингибирование этих эффектов. Ингибирующее действие ПЗК осуществляется по K^+ - и НАДН-зависимому механизму.

ЛИТЕРАТУРА

1. Элбакидзе Г.М., Элбакидзе А.Г., Куликова Л.А. Исследование участия клеток Купфера в инициации процесса пролигиозан-зависимого накопления комутонна в печени крысы. *Докл. АН*. 2006; 407 (1): 119–123.
2. Elbakidze G.M., Elbakidze A.G. Tissue stress — the tissuespecific intratissue adaptation mechanism. VIII World Congr. of Int. Soc. for Adapt. Med., *Abstract book. Moscow*. 2006. P. 135–136.
3. Элбакидзе Г.М., Федоров В.П., Элбакидзе И.М. Индукция β - и γ -состояний комутонной регуляции дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий из печени и почки крысы ионами кальция. *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1986; 3: 400–409.
4. Элбакидзе Г.М., Элбакидзе А.Г., Меденцев А.Г. Исследование влияния пролигиозанзависимого комутонна на медленный выход ионов кальция из матрикса митохондрий различной тканевой и видовой принадлежности. *Докл. АН СССР*. 2011; 437 (6): 842–845.
5. Elbakidze G.M., Elbakidze A.G. Principles of tissue growth intratissue regulation, Collierville. *USA: InstantPublisher*. 2009. 163 p.
6. Мосолова И.М., Горская И.А., Шольц К.Ф., Котельникова А.В. В кн.: *Методы современной биохимии*. Под ред. В.Л. Кретьевича. М.: *Наука*. 1975. С. 45–47.
7. Хавш Е. Ионо- и молекулярно-селективные электроды в биологических системах. М.: *Мур*. 1988. 221 с.
8. Kamo N., Muratsugu M., Hongoh R., Kobatake Y. Membrane potential of mitochondria measured with electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* 1979; 49: 105–121.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265–275.
10. Chinopoulos C., Starkov A. A., Fiskum G.J. Cyclosporin A-insensitive permeability transition in brain mitochondria: inhibition by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Biol. Chem.* 2003; 278 (30): 27382–27389.
11. Montero M., Alonso M.T., Albillos A., Garcia-Sancho J., Alvarez J. Mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mediated by the Ca^{2+} uniporter. *Mol. Biol. of the Cell.* 2001; 12 (1): 63–71.
12. Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 2002; 84 (2–3): 153–166.
13. Элбакидзе Г.М., Элбакидзе А.Г. Механизмы гиперметаболических состояний. *Вестник РАМН*. 2011; 7: 50–54.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Элбакидзе Георгий Михайлович, доктор биологических наук, академик РАЕН, директор Медико-биологического центра Ассоциации содействия Всемирной лаборатории
Адрес: 129344, Москва, ул. Искры, д. 13, к. 1, кв. 40, **тел.:** (499) 198-72-28, **e-mail:** gmelbakidze@hotmail.com
Меденцев Александр Григорьевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией Института физиологии и биохимии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
Адрес: Московская область, Пушкино, Институтская, д. 4, **тел.:** (4967) 31-86-43, **e-mail:** Medentsev-AG@rambler.ru
Элбакидзе Андрей Георгиевич, младший научный сотрудник Медико-биологического центра Ассоциации содействия Всемирной лаборатории
Адрес: 129344, Москва, ул. Искры, д. 13, к. 1, кв. 40, **тел.:** (499) 198-72-28