

УДК 576.311

ВЛИЯНИЕ ПИНАЦИДИЛА И ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА МИТОХОНДРИИ СЕРДЦА КРЫСЫ В ПРИСУТСТВИИ СУКЦИНАТА И РОТЕНОНА**С. М. Коротков*, И. В. Брайловская, В. П. Нестеров,****член-корреспондент РАН С. И. Сороко**

Поступило 17.09.2018 г.

Изучено действие пинацидила на нагруженные кальцием митохондрии сердца крысы (МСК) в присутствии сукцината и ротенона. В опытах с пинацидилом набухание этих митохондрий усиливалось в средах с NH_4NO_3 или с К-ацетатом, а потенциал внутренней мембраны $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ и дыхание этих органелл в состоянии 3 или разобшённое 2,4-динитрофенолом, напротив, снижались из-за открытия кальций-зависимой поры во внутренней мембране. Эти эффекты ингибировались циклоспорином А и АДФ. Сделан вывод о том, что защитный эффект пинацидила при ишемии/реперфузии сердечной мышцы может быть связан со стимуляцией пинацидилом набухания митохондрий и со снижением кальциевой перегрузки МСК из-за уменьшения $\Delta\Psi_{\text{мито}}$, обусловленного мягким разобщающим эффектом пинацидила.

Ключевые слова: пинацидил, Ca^{2+} , дыхание митохондрий, набухание митохондрий, потенциал внутренней мембраны.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524874460-464>

Данная работа является развитием исследований, начатых в 2012 г. [1]. В этой работе мы изучали действие пинацидила и Ca^{2+} на функционирование комплекса I дыхательной цепи митохондрий сердца крысы в присутствии глутамата и малата. В настоящем сообщении соответственно представлены результаты исследования влияния указанных соединений на комплекс II в присутствии сукцината и ингибитора комплекса I — ротенона.

Известно, что результатом ишемии сердечной мышцы и следующей за ней реперфузии было увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцитов и кальциевая перегрузка митохондрий, которая, в свою очередь, способствует появлению в их внутренней мембране (ВММ) кальцийзависимой поры (МКЗП) [2, 3]. Ранее индуцированное кальциевой перегрузкой митохондрий открытие МКЗП в их внутренней мембране было показано в экспериментах с митохондриями и кардиомиоцитами *in vitro*, а также в опытах с изолированными сердцами крыс. При этом в опытах с изолированными митохондриями и пермебелизованными кардиомиоцитами обнаружили, что открытие этой поры сопровождалось набуханием митохондрий и снижением потенциала ВММ $\Delta\Psi_{\text{мито}}$.

Сократительные параметры изолированного сердца крысы после воздействия ишемии и последующей реперфузии заметно улучшались в опытах с модуляторами митохондриальных $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -зависимых каналов (мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$) — пинацидилом Рin и диазоксидом [4, 5]. Параллельно снижались кальциевая перегрузка митохондрий и скорость расхода АТФ кардиомиоцитами. Такой эффект этих модуляторов получил название фармакологического прекондиционирования, однако до сих пор до конца не ясен механизм этого явления [2, 4–7]. Согласно одной точке зрения, модуляция мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ запускает сложный каскадный механизм прекондиционирования с участием протеинкиназы С и активных форм кислорода; согласно другой — защитное действие этих модуляторов обусловлено их способностью умеренно разобщать дыхание митохондрий и, как следствие, снижать $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ и зависящее от него накопление ионов кальция в матриксе.

Было обнаружено, что Рin снижал $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ в опытах с изолированными митохондриями печени, мозга и сердца крысы и препятствовал вызываемому АДФ снижению потенциала ВММ митохондрий сердца крысы в присутствии сукцината и пирувата [8–10]. В присутствии Рin снижалось накопление Ca^{2+} митохондриями за счёт уменьшения транспорта Ca^{2+} в матрикс и увеличения его выхода из органелл, а также стимулировались набухание митохондрий и протонная проницаемость ВММ [4–6, 10]. Активируя дыхание в базальном или четвёртом по Чансу

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской Академии наук, Санкт-Петербург

*E-mail: korotkov@SK1645.spb.edu; sergey-korotkov@mail.ru

состояниях, Pin разобщал окислительное фосфорилирование в митохондриях сердца крысы, мышцы и морской свинки [4, 8, 10–13]. Pin слабо влиял на дыхание этих митохондрий в состоянии 3 по Чансу (АДФ в среде), а скорости синтеза АТФ в этих органеллах под действием пинацидила слабо менялись или незначительно снижались [10, 11, 13]. Pin препятствовал открытию МКЗП в кардиомиоцитах крысы [14]. По мнению ряда исследователей [2, 6], существует определённая взаимосвязь между структурными элементами, формирующим миток_{АТФ} и КЗНК. К настоящему времени практически не изучено влияние Pin на индукцию МКЗП во внутренней мембране митохондрий сердца крысы в присутствии сукцината. В связи с этим представляло интерес изучить совместное действие пинацидила и Ca^{2+} на набухание, дыхание и мембранный потенциал митохондрий сердца крысы в присутствии сукцината и ингибитора комплекса I — ротенона.

В экспериментах применялись самцы линии Вистар массой 200–250 г. Митохондрии сердца крысы (МСК) выделяли согласно описанной нами ранее методике [1]. На заключительной стадии выделения органеллы суспендировали в 3 мл среды, содержащей 300 мМ сахарозу и 10 мМ *трис*-HCl (pH 7,3). Все процедуры выделения митохондрий проводили на льду. Концентрация белка в митохондриальных препаратах определялась методом Бредфорда и была в пределах 20–30 мг/мл.

В работе использовали сахарозу, очищенную от примесей катионов на ионообменной колонке со смолой КУ-2-8. *Трис*-ОН, KCl, карбонилцианид-*p*-трифторометоксифенилгидразон (FCCP), олигомицин, АДФ, пинацидил (Pin), сукцинат, ротенон, карбоатрактилосид (CAT), MgCl_2 , циклоспорин А (CsA), 5-гидроксидеканоат (5-HD) и MOPS были получены от фирмы “Sigma”. Протонофор 2,4-динитрофенол (ДНФ) был марки ч.д.а., а остальные реактивы — NH_4NO_3 , CaCl_2 , H_3PO_4 , К-ацетат и CH_3COOH — были марки х.ч.

Набухание митохондрий оценивали по описанному нами ранее методу [1] с применением спектрофотометра СФ-46 (“ЛОМО”, Россия) при длине волны 540 нм и температуре 20 °С. Митохондрии суспендировали в средах, содержащих: 125 мМ NH_4NO_3 , 5 мМ *трис*-HCl (pH 7,3) и 1 мМ *трис*- PO_4 (рис. 1) или 25 мМ К-ацетат, 10 мМ *трис*-ацетат (pH 7,3) и 100 мМ сахарозу (рис. 2). При отсутствии дыхательных субстратов набухание митохондрий в среде с нитратом аммония, который в водном растворе диссоциирует на молекулу NH_3 и ионы NO_3^-

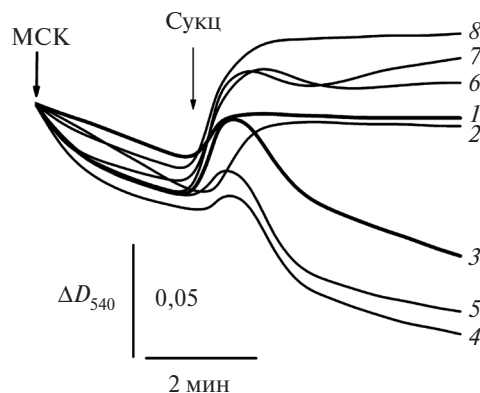


Рис. 1. Набухание митохондрий сердца крысы в среде с NH_4NO_3 . Состав среды и концентрации добавок указаны в тексте. Добавки до митохондрий: 1 — без добавок (контроль), 2 — пинацидил (Pin), 3 — Ca^{2+} , 4 — Pin + Ca^{2+} , 5 — Pin + Ca^{2+} + 5-HD, 6 — Pin + Ca^{2+} + CsA, 7 — Pin + Ca^{2+} + АДФ, 8 — Pin + Ca^{2+} + АДФ + CsA. Добавки митохондрий сердца крысы (МСК) и сукцината (Сукц) показаны стрелками.

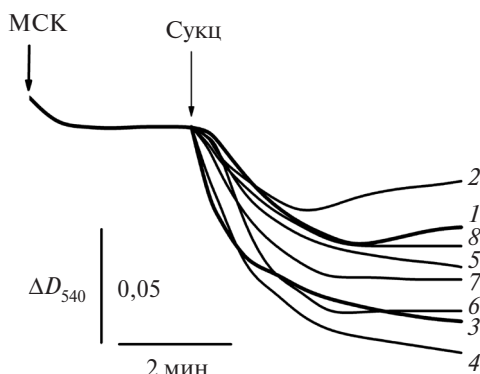


Рис. 2. Набухание митохондрий сердца крысы в среде с К-ацетатом и сахарозой. Состав среды указан в тексте. Добавки и обозначения, как на рис. 1.

и H^+ , позволяет оценить пассивную протонную проницаемость ВММ, поскольку эта мембрана свободно проницаема для NO_3^- и NH_3 . Все среды содержали 2 мкМ ротенон и 1 мкг/мл олигомицина. Там, где указано, до митохондрий вносили 100 мкМ Pin, 150 мкМ Ca^{2+} , 500 мкМ АДФ, 1 мкМ CsA и 300 мкМ 5-HD.

Скорости дыхания митохондрий (нг-атом $\text{O}/\text{мин} \cdot \text{мг}$ белка) оценивали полярографическим методом с использованием закрытого платинового электрода типа Кларка на анализаторе Эксперт-001 (НПО “Эконикс эксперт”, Россия) при 26 °С в ячейке объёмом 1,5 мл в среде, содержащей 125 мМ KCl, 20 мМ *трис*-MOPS (pH 7,3), 5 мМ сукцинат, 1 мкМ ротенон, 3 мМ *трис*- PO_4 и 0,05 мМ EGTA (рис. 3). После митохондрий (там, где показано) в среду добавляли: 150 мкМ АДФ (АДФ), 100 мкМ Pin (Pin), 2 мкМ CAT (CAT), 150 мкМ Ca^{2+} (Ca),

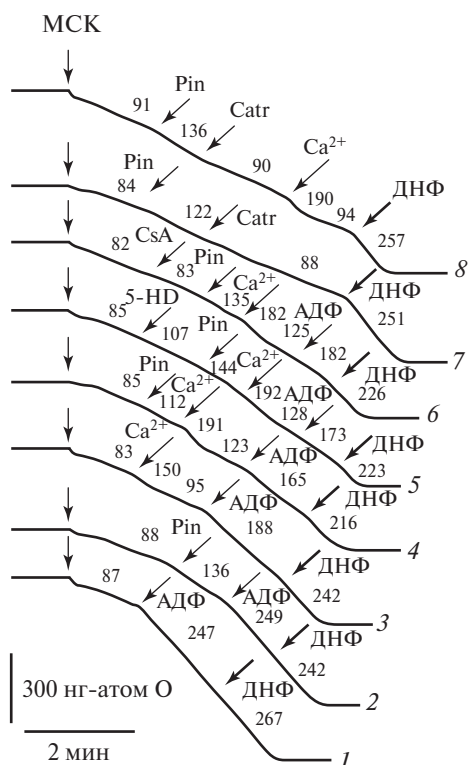


Рис. 3. Влияние пинацидила на скорости поглощения кислорода митохондриями сердца крысы в среде с сукцинатом и ротеноном. Показаны добавки: митохондрии сердца крысы МСК, АДФ, пинацидил Pin, карбонилтрифенилфосфид (КАТ), Ca^{2+} , 2,4-динитрофенол (ДНФ), 5-НД и CsA. Цифрами над кривыми обозначены скорости поглощения кислорода (нг-атом О/мин-мг белка). Состав среды и концентрации добавок указаны в тексте. Контроль — опыты без добавок.

30 мкМ ДНФ (ДНФ), 300 мкМ 5-НД (5-НД) и 1 мкМ CsA (CsA). С учётом наличия в среде EGTA концентрация свободного Ca^{2+} была около 100 мкМ. Измерения дыхания и набухания проводили при концентрации митохондриального белка 1 мг на 1 мл среды инкубации.

Потенциал внутренней мембраны МСК оценивали по стандартной методике [1] по изменению интенсивности флуоресценции сафранина (усл. ед.) при комнатной температуре (рис. 4). Митохондрии (0,5 мг белка в 1 мл) добавляли в кварцевую кювету с 3 мл среды, содержащую 300 мМ сахарозу, 10 мМ *трис*-HCl (pH 7,3), 3 мМ *трис*- PO_4 , 3 мМ MgCl_2 , 2 мкМ ротенон, 3 мкМ сафранин и 1 мкг/мл олигомицина. После митохондрий (где указано) в среду вносили: 5 мМ сукцинат (Сукс), 100 мкМ пинацидил (Pin), 150 мкМ Ca^{2+} (Ca^{2+}) и 1 мкМ FCCP (FCCP). На рисунках показаны результаты, полученные для трёх независимых экспериментов.

Пинацидил увеличивал пассивную протонную проницаемость ВММ, поскольку до внесения в среду

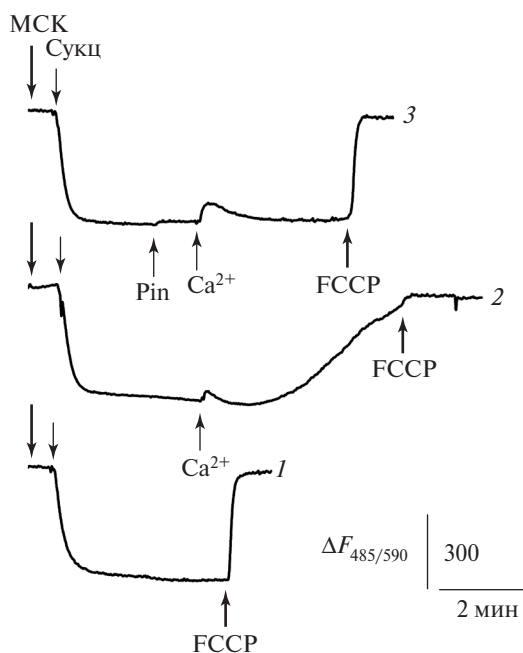


Рис. 4. Флуоресценция сафранина в суспензии митохондрий сердца крысы. Стрелками показаны добавки: митохондрии сердца крысы (МСК), сукцинат (Сукс), пинацидил (Pin), Ca^{2+} (Ca^{2+}) и FCCP (FCCP). Состав среды и концентрации добавок указаны в тексте. Контроль — опыты без добавок.

дыхательного субстрата сукцината набухание МСК в среде с NH_4NO_3 , ротеноном и олигомицином было сильнее в сравнении с контрольными опытами без пинацидила (рис. 1, кривые 1, 2). По сравнению с контролем пинацидил не влиял на индуцированное сукцинатом сжатие МСК, предварительно набухших в этой среде с NH_4NO_3 (рис. 1, кривые 1, 2). С другой стороны, набухание МСК после внесения в среду сукцината в опытах с Ca^{2+} усиливалось в присутствии Pin и не зависело от наличия 5-НД (рис. 1, кривые 3, 4). Усилившееся с Ca^{2+} и Pin набухание сменялось сжатием митохондрий (рис. 1, кривые 6–8) в присутствии ингибиторов МКЗП (АДФ и CsA). Набухание митохондрий в гипотонической среде с 25 мМ К-ацетатом, 100 мМ сахарозой и 5 мМ сукцинатом становится возможным в результате транспорта K^+ в матрикс по механизму электрофоретического унипорта и зависит от величины $\Delta\Psi_{\text{мито}}$. В этой среде набухание МСК в среде с сукцинатом снижалось в опытах с Pin по сравнению с контролем (рис. 2, кривые 1, 2). Однако при кальциевой нагрузке органелл это набухание заметно увеличивалось (кривая 3) и становилось ещё больше в опытах с Pin (кривая 4). Блокатор мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ (5-НД) слабо влиял на совместный эффект пинацидила и Ca^{2+} (рис. 2а, кривая 5). При этом уменьшение этого эффекта в среде с К-ацетатом и сахарозой достига-

лось в опытах с CsA и АДФ (рис. 2а, кривые 6, 7) и было особенно заметно при их совместном присутствии (кривая 8). Известно, что нагрузка митохондрий ионами кальция способствует открытию МКЗП в их внутренней мембране и сопровождается набуханием митохондрий из-за увеличения проницаемости ВММ для ионов и небольших молекул [2, 3]. Полученные данные позволяют предположить, что ускорение набухания МСК в этих двух средах в опытах с Pin и Ca^{2+} может быть связано со стимуляцией пинацидилом открытия МКЗП во внутренней мембране этих органелл.

В среде с дыхательным субстратом, но до внесения в неё АДФ или разобщителей базальное дыхание митохондрий в основном зависит от ионной проницаемости ВММ. По сравнению с контролем (рис. 3, кривая 1) базальное дыхание МСК было стимулировано Pin (кривая 2) и в меньшей степени Ca^{2+} (кривая 3). Такая стимуляция дыхания наблюдалась при внесении в среду Pin, а потом и Ca^{2+} (кривая 4) независимо от присутствия в ней 5-НД или CsA (кривые 5, 6). Ранее обнаружили [8, 15], что вызываемая пинацидилом активация базального дыхания МСК в среде с пируватом и малатом устранялась после инъекции в среду карбатрактилотида (САТ), фиксирующего транслокаzu адениновых нуклеотидов (ТАН) в *c*-конформации. В опытах с МСК, помещёнными в среду с сукцинатом и ротеноном, мы получили подобный результат (рис. 3, кривая 7). При этом внесение в среду Pin с последующей инъекцией САТ не повлияло на активацию этого дыхания ионами кальция (рис. 3, кривая 8). Таким образом, можно предположить, что вызываемая пинацидилом активация базального дыхания МСК независимо от наличия в среде Ca^{2+} обусловлена тем, в какой конформации находится ТАН. Скорее всего, эта активация непосредственно не связана с открытием МКЗП во внутренней мембране.

Стимулированное разобщителями (FCCP, ДНФ) дыхание митохондрий определяется активностью ферментов их дыхательной цепи, а дыхание фосфорилирующих органелл в состоянии 3 по Чансу (АДФ в среде) дополнительно регулируется ферментами, участвующими в синтезе АТФ. В среде с сукцинатом Ca^{2+} в отличие от пинацидила заметно снижал дыхание МСК в третьем или разобщённом ДНФ состояниях (рис. 3, кривые 1–3). При последовательном внесении Pin и Ca^{2+} в среду дыхание этих органелл в состоянии 3 уменьшалось независимо от наличия в среде ингибитора МКЗП — CsA или ингибитора митоK_{АТФ} — 5-НД (рис. 3, кривые 4–6).

По сравнению с контролем (рис. 3, кривая 1) разобщённое ДНФ дыхание МСК в среде с сукцинатом слабо зависело от присутствия в ней Pin, Ca^{2+} , САТ или САТ и Ca^{2+} (кривые 2, 3, 7, 8). Некоторое уменьшение этого дыхания наблюдалась в опытах, где Pin и Ca^{2+} были вместе (рис. 3, кривые 4, 5), независимо от наличия в среде CsA (кривая 6). Наши результаты опытов с МСК в среде с сукцинатом и ротеноном (рис. 3) или с глутаматом и малатом [1], а также данные других авторов [11–13] позволяют сделать вывод о том, что независимо от типа применяемого субстрата Pin в противоположность действию Ca^{2+} слабо влияет на энергетику митохондрий.

В отличие от данных [12] мы не нашли какого-либо защитного эффекта Pin на дыхание нагруженных ионами кальция МСК в третьем или разобщённом ДНФ состояниях (рис. 3, кривые 2–4). В согласии с ранее полученными данными [4, 7] мы не обнаружили заметного влияния пинацидила на величину $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ (рис. 4, кривая 3). После добавки Ca^{2+} в среду наблюдалось снижение этого потенциала (рис. 4, кривая 2), которое существенно замедлилось в опытах с внесённым до ионов кальция Pin (кривая 3). Полученные нами данные (рис. 3, 4) позволяют предположить, что снижение дыхания МСК, находящихся в состоянии 3 или разобщённых ДНФ, и $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ в опытах с Ca^{2+} скорее всего связано с открытием МКЗП во внутренней мембране, которое сопровождается набуханием этих органелл и выходом цитохрома *c* в межмембранное пространство. С другой стороны, модуляция митоK_{АТФ} пинацидилом, согласно [2, 6], напротив, препятствует открытию этой поры за счёт снижения поступления Ca^{2+} в матрикс митохондрий. Полученные данные согласуются с тем, что протекторное действие пинацидила на сократительные параметры изолированного сердца крысы скорее всего обусловлено его способностью оказывать умеренное разобщающее действие и подобно другому модулятору митоK_{АТФ} диазоксиду снижать кальциевую перегрузку митохондрий сердца в условиях воздействия ишемии/реперфузии на сердечную мышцу.

В этой работе впервые показана стимуляция пинацидилом открытия МКЗП в низкопроводящем состоянии во внутренней мембране нагруженных ионами кальция митохондрий сердца крысы в присутствии сукцината, что проявилось в ещё большем набухании этих органелл по причине ускорения транспорта ионов K^+ и H^+ в матрикс по сравнению с аналогичными опытами без пинацидила. Это хорошо согласуется со снижением набухания МСК в присутствии сукцината и ингибиторов этой поры

(CsA и АДФ). Сделано предположение, что независимо от типа применяемого субстрата стимуляция пинацидилом базального дыхания митохондрий, невзирая на присутствие кальция в среде, зависит от конформации транслоказы адениновых нуклеотидов, но не связана с открытием МКЗП во внутренней мембране.

Благодарности. Авторы благодарят С.А. Коновалову за помощь при измерении флуоресценции сафранина в опытах с изолированными митохондриями сердца крысы. Исследования по определению митохондриального потенциала проводили на базе Центра коллективного пользования в ИЭФБ РАН.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА—А18—118012290142—9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коротков С.М., Емельянова Л.В., Брайловская И.В., Нестеров В.П. // ДАН. 2012. Т. 443. № 5. С. 632–636.
2. Cheng Y., Debska-Vielhaber G., Siemen D. // FEBS Lett. 2010. V. 584. № 10. P. 2005–2012.
3. Halestrap A.P., Brenner C. // Curr. Med. Chem. 2003. V. 10. № 16. P. 1507–1525.
4. Kowaltowski A.J., Seetharaman S., Paucek P., Gardlid K.D. // Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2001. V. 280. № 2. P. H649–H657.
5. Costa A.D., Quinlan C.L., Andrukhiv A., et al. // Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2006. V. 290. № 1. P. H406–H415.
6. Ardehali H., O'Rourke B. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2005. V. 39. № 1. P. 7–16.
7. Hanley P.J., Mickel M., Löffler M., et al. // J. Physiol. 2002. V. 542. Pt 3. P. 735–741.
8. Kopustinskiene D.M., Toleikis A., Saris N.E. // J. Bioenerg. Biomembr. 2003. V. 35. № 2. P. 141–148.
9. Brustovetsky T., Shalbuyeva N., Brustovetsky N. // J. Physiol. 2005. V. 568. № 1. P. 47–59.
10. Holmuhamedov E.L., Jovanović S., Dzeja P.P., et al. // Amer. J. Physiol. 1998. V. 275. № 5. P. H1567–H1576.
11. Riess M.L., Camara A.K., Heinen A., et al. // J. Cardiovasc. Pharmacol. 2008. V. 51. № 5. P. 483–491.
12. Crestanello J.A., Doliba N.M., Babsky A.M., et al. // J. Surg. Res. 2000. V. 94. № 2. P. 116–123.
13. Lember N., Idahl L.A., Ammon H.P. // Biochem. Pharmacol. 2003. V. 65. № 11. P. 1835–1841.
14. Hausenloy D.J., Yellon D.M., Mani-Babu S., Duchon M.R. // Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2004. V. 287. № 2. P. H841–H849.
15. Kopustinskiene D.M., Jovaisiene J., Liobikas J., Toleikis A. // J. Bioenerg. Biomembr. 2002. V. 34. № 1. P. 49–53.

EFFECTS OF PINACIDIL AND CALCIUM ON SUCCINATE-ENERGIZED RAT HEART MITOCHONDRIA IN THE PRESENCE OF ROTENONE

S. M. Korotkov, I. V. Brailovskaya, V. P. Nesterov,
Corresponding Member of the RAS S. I. Soroko

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation*

Received September 17, 2018

The effect of pinacidil was studied on calcium-loaded rat heart mitochondria (RHM) in the presence of succinate and rotenone. In experiments with pinacidil, the swelling of these mitochondria increased in media with NH_4NO_3 or K-acetate, but the inner membrane potential $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ and state 3 or 2,4-dinitrophenol-uncoupled respiration of these organelles were decreased due to opening of the mitochondrial permeability transition pore in the inner membrane. These effects were inhibited by cyclosporin A and ADP. It was concluded that the protective effect of pinacidil in the cardiac muscle ischemia/reperfusion may be associated with stimulation mitochondrial swelling and a decrease in RHM calcium overload resulted in a decrease in $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ due to the soft uncoupling pinacidil effect.

Keywords: pinacidil, Ca^{2+} , mitochondrial respiration, mitochondrial swelling, the inner membrane potential.