

В. Ф. Сагач, Г. Л. Вавілова, Н. А. Струтинська, О. В. Рудик

Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів

*В опытах in vitro на митохондриях, изолированных из ткани сердца взрослых и старых крыс исследовали чувствительность митохондриальной поры (МП) к индукторам – ионам кальция (Ca^{2+}) и фениларсиноксиду (ФАО) по двум показателям – снижению оптической плотности в результате набухания митохондрий, регистрируемого спектрофотометрически ($\lambda=520$ нм), а также по высвобождению неидентифицированных веществ митохондриального происхождения (митохондриального фактора), регистрируемых спектрофотометрически в диапазоне длин волн 230–260 нм. Установлен дозозависимый эффект действия Ca^{2+} (10^7 – 10^4 моль/л) и ФАО (10^8 – 10^4 моль/л) на набухание митохондрий как у взрослых, так и старых крыс. Величина набухания митохондрий сердца старых крыс при действии исследуемых индукторов превышала таковую у взрослых животных. Установлен дозозависимый эффект Ca^{2+} в диапазоне исследуемых концентраций (10^7 – 10^3 моль/л) на высвобождение митохондриального фактора в сердце взрослых и старых крыс. Показано, что митохондрии сердца старых крыс способны в определенной мере высвободить фактор в отсутствие индуктора МП ФАО. При действии ФАО в диапазоне концентраций (10^9 – 10^4 моль/л) на изолированных митохондриях сердца старых крыс зарегистрировано высвобождение неидентифицированных веществ с максимумами поглощения при двух длинах волн: 230 нм (I пик) и 240–245 нм (II пик); I пик – циклоспорин А-нечувствительный, II – практически полностью ингибируется циклоспорином А. Так, концентрации исследуемых растворов $CaCl_2$ (10^7 моль/л) и ФАО (10^9 моль/л), при которых наблюдали высвобождение фактора из митохондрий сердца старых крыс, значительно (на два порядка) ниже таковых у взрослых животных. На основании экспериментальных данных сделан вывод о том, что митохондрии, изолированные из ткани сердца старых крыс, обладают значительно большей чувствительностью к действию индукторов открытия МП – Ca^{2+} и ФАО по сравнению со взрослыми животными. Повышенная чувствительность МП в сердце старых крыс сопровождалась увеличением базального уровня экспрессии м-РНК гена *bax* по сравнению со взрослыми животными и отсутствием существенных отличий в экспрессии гена *bcl-2* у исследуемых возрастных групп животных. Сделано предположение о причастности проапоптотического агента – белка *Bax* – к повышенной чувствительности МП, в частности, процессам порообразования при старении. Антиоксиданты мелатонин и тролокс (витамин Е) в концентрации 10^5 моль/л предупреждали в определенной мере открытие МП при действии ФАО (10^5 моль/л) у взрослых и старых крыс. Результаты этих экспериментов могут быть использованы для коррекции повышенной чувствительности МП к действию различных индукторов у старых животных. Делается заключение о том, что процессы физиологического старения сопровождаются митохондриальной дисфункцией, одной из проявлений которой является способность митохондрий ткани сердца старых крыс, как в присутствии, так и отсутствии индукторов МП, высвободить фактор, по-видимому, вследствие повышенной чувствительности к индукторам открытия МП.*

ВСТУП

Відомо, що мітохондріальна поря (МП) відіграє ключову роль у клітинних порушен-

нях за умов оксидативного стресу, який є причиною розвитку таких патологічних станів, як ішемія – реперфузія, гіпоксія, діабет тощо. Дисбаланс між продукцією

© В. Ф. Сагач, Г. Л. Вавілова, Н. А. Струтинська, О. В. Рудик

вільних радикалів – активних форм кисню (АФК) та азоту (АФА) – й антиоксидантними системами захисту в клітині призводить до оксидативного стресу в організмі [19, 22, 26, 29, 38].

Згідно з основними положеннями теорії старіння Д. Хармана, головним патологічним явищем при старінні організму та пов'язаних з ним таких хвороб, як атеросклероз, цукровий діабет 2-го типу, хвороба Альцгеймера, канцерогенез тощо, є генерація мітохондріями АФК [23]. У разі збільшення кількості утилізованого O_2 та порушеннях у дихальному ланцюгу вміст вільних радикалів у клітині підвищується. Таким чином, мітохондрії – одне з важливих джерел цих радикалів і, одночасно, найбільш вразлива мішень їх дії. Порушення функціонування дихального ланцюга мітохондрій, внаслідок якого відбувається інтенсивне утворення АФК, призводить до зміни проникності мітохондріальних мембран при формуванні МП – динамічного мультипротеїнового комплексу чи мегаканалу між внутрішньою та зовнішньою їх мембранами [12]. За патологічних умов утворення МП-комплексів пов'язано зі збільшенням плинності мітохондріальних мембран і призводить до колапсування трансмембранного мітохондріального потенціалу, пригнічення процесів окисного фосфорилювання та синтезу АТФ, вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій у цитозоль і речовин, молекулярна маса яких менша від 1500 Да, а також цитохрому *c* та інших апоптотичних білків, відповідальних за реакції, що викликають загибель клітин [19, 27].

Серед речовин, що ініціюють посилене проходження згаданих процесів, розрізняють білки сімейства Bcl-2, принциповим сайтом дії яких є мітохондрії. Співвідношення таких білків сімейства Bcl-2, як Bax до Bcl-2 (Bax/Bcl-2) являє собою внутрішньоклітинний механізм, який має пряме відношення до регуляції апоптозу з прогностичними наслідками [15]. Так,

гомодимери білка Bax/Bax, які формуються внаслідок посиленої його експресії, стимулюють, а гетеродимери білка Bax/Bcl-2 інгібують апоптоз. Експресія апоптотичних білків Bcl-2 знаходиться в прямій залежності від вікових змін організму і є одним із факторів, що сприяють активації МП, і, відповідно, розгортанню програми загибелі клітини [43].

Вивчення хвороб м'язових і нервових тканин, викликаних старінням організму, дають підставу вважати, що дисфункція мітохондрій пов'язана, зокрема, з підвищеною чутливістю до відкриття МП і відіграє значну роль у дегенерації тканин з віком. Показано, що найбільш чутливими до активації МП в результаті посиленого оксидативного стресу є клітини імунокомпетентних органів, наприклад таких, як лімфоцити селезінки старих мишей [33, 40]. Нині мало відомостей щодо чутливості відкриття МП тканини серця при старінні. Саме серед старих людей спостерігається збільшена смертність від ускладненого перебігу хвороб серцево-судинної системи, зокрема інфаркту міокарда [5, 45].

У досліджах *in vitro* на ізольованих мітохондріях тканини серця морської свинки та щурів за умов моделювання оксидативного стресу (аноксія–реоксигенація) нами було виявлено вивільнення з мітохондрій неідентифікованих речовин, що реєструються спектрофотометрично в діапазоні довжин хвиль 230–260 нм. Дійшли висновку, що вивільнення з мітохондрій неідентифікованих речовин (мітохондріального фактора) індуковане феніларсиноксидом (ФАО) та чутливе до циклоспорину А [6, 7].

Нами встановлено зв'язок між вивільненням фактора з мітохондрій (внаслідок дії на них ФАО та навантаження їх кальцієм) і величиною набухання мітохондрій, що є ознакою відкриття МП [8]. Цей факт може бути використано при визначенні чутливості МП до дії індукторів у різних тканинах як при фізіологічних, так і патологічних станах

організму, а також, при старінні.

Процеси фізіологічного старіння, як відомо, супроводжуються дисфункцією мітохондрій і посиленням дисбалансу між про- і антиоксидантними їх складовими [28, 29, 43]. Для профілактики передчасного старіння, підвищення резистентності організму та вікових патологічних станів людини перспективним вважають використання таких антиоксидантів, як мелатонін, епіталамін, карнозин, вітамін Е, тіолові препарати тощо, які пригнічують вільнорадикальні процеси в організмі. [2, 5, 9, 41].

Відомо, що в серці старих тварин, на відміну від дорослих, спостерігаються більш значні ушкодження, зумовлені окисною модифікацією білків, а також порушенням кальцієвого гомеостазу [28, 32]. Оскільки Ca^{2+} та оксидативний стрес можуть бути, в свою чергу, і індукторами МП, наші дослідження були спрямовані на вивчення чутливості відкриття МП і вивільнення фактора з мітохондрій у тканині серця щурів при старінні. Літературні дані висвітлюють це питання недостатньо. При старінні спостерігається збільшення чутливості відкриття МП у лімфоцитах селезінки, мозку та печінки мишей [33, 40].

Мета нашої роботи – визначити чутливість відкриття МП і вивільнення фактора з мітохондрій при дії індукторів МП – Ca^{2+} і модифікатора SH-груп ФАО, а також порівняти базальні рівні експресії м-РНК генів *vax* і *vcl-2* у тканині серця дорослих і старих щурів.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, маса 200–250 г) і старих (24 міс, 300–350 г) щурах. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. У кожному досліді використано не менше ніж 6 тварин.

Виділення мітохондрій з тканин серця. Серця, видалені з декапітованих тварин, ретельно промивали охолодженим 0,9%-м

розчином KCl (2°C), подрібнювали та гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс- HCl буфер – 20, ЕДТА – 1; рН 7,4. Мітохондрії виділяли за описаним нами методом [7]. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Lowry [30].

Дослідження відкриття мітохондріальної пори за допомогою реєстрації набухання мітохондрій та МП-залежного вивільнення мітохондріального фактора. Відкриття МП реєстрували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 520 нм [8] за зниженням оптичної густини (D) ізольованих мітохондрій за 5 хв до і через 15 хв після їх набухання за умов дії індуктора в інкубаційному середовищі (3 мл) наступного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс- HCl – 25, KH_2PO_4 – 3, сукцинат натрію – 5; рН 7,4. Концентрація білка становила 0,8 мг/мл. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індукторів з реєстрацією оптичної густини при $\lambda=520$ нм протягом 20 хв. Зміни оптичної густини мітохондрій на 20-й хвилині за умов дії на них індукторів МП виражали у відсотках відносно контролю. Відкриття МП індукували розчинами CaCl_2 і модифікатором сульфгідрильних груп ФАО. Для підтвердження того, що зниження оптичної густини відбувається через відкриття МП, мітохондрії перед додаванням індуктора додатково інкубували з класичним інгібітором МП – циклоспорином А (10^{-5} моль/л) протягом 5 хв. При дослідженні МП-залежного вивільнення фактора мітохондрії інкубували в 4 мл середовища наступного складу (ммоль/л): тріс- HCl (рН 7,2 при 23°C) – 50, MgCl_2 – 1, KCl – 125, $\text{Na}_2\text{-ATP}$ – 3, сукцинат натрію – 3, CaCl_2 – 0,01, фосфатний буфер – KH_2PO_4 (рН 7,2) – 2. Концентрація білка становила 0,25–0,3 мг/мл. Для визначення вивільнення фактора з мітохондрій в інкубаційне середовище вводили розчини CaCl_2 і ФАО, дія яких тривала 10 хв.

У досліджах з вивчення захисної дії циклоспорину А та антиоксидантів (мелатоніну та тролоксу) перед обробкою ФАО мітохондрії інкубували протягом 10 хв при 20 °С. Після цього мітохондрії, як оброблені, так і нативні, відразу центрифугували при 13000 хв⁻¹ протягом 20 хв. Надосадову рідину використовували для виміру оптичної густини в діапазоні довжин хвиль 230–260 нм проти дистильованої води.

Екстракція РНК. Тотальну РНК виділяли з тканини серця щурів методом кислородно-фенольної екстракції за допомогою комерційної тест-системи “РИБО-золь” (Центральний науково-дослідний інститут епідеміології РФ).

Зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Синтез кДНК проводили, використовуючи M-MLV-ревертазу та випадкові гексануклеотиди з набору реагентів “РЕВЕРТА-R-100” (Центр наук.-досл. ін-т епідеміології РФ). Ампліфікацію кДНК проводили за допомогою комерційної тест-систем “АмпліСенс-200-1 на приладі “АМПЛИКОН-24” (Україна) з використанням олігонуклеотидних праймерів (SYN-TOL, Росія) (30 пкмоль/мл), комплементарних до відповідних ділянок генів *вах* (смысловий праймер 5' – GTT TCA TCC AGG ATC GAG CAG – 3' і антисмысловий 5' – CAT CTT CTT CCA GAT GGT GA – 3'), *vcl-2* (смысловий праймер 5' – CCT GTG GAT GAC TGA GTA CC – 3' і антисмысловий 5' – GAG ACA GCC AGG AGA AAT CA – 3') і *gapdh* як контроль (смысловий праймер 5' – TGC ATC CTG CAC CAC CAA CT – 3' і антисмысловий 5' – TGC CTG CTT CAC CAC CTT C – 3') за описаною методикою [36]. Умови проведення ПЛР: денатурація протягом 2 хв при 95°С, 30 циклів, синтез 72°С – 1,5 хв; денатурація протягом 45 с при 94°С; відпалювання при 53°С – 45 с. Елект-

рофореz продуктів ПЛР проводили у 1,5%-му агарозному гелі. Рівень експресії визначали за інтенсивністю смуг на електрофореграмах. Спостереження проводили за допомогою ультрафіолетової лампи “Phillips”, фотографування та обробку зображення – за допомогою цифрової фотокамери “Nicon E 4500”.

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програми Origin 6.0 фірми Microcall Inc. (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Характерні криві реєстрації відкриття МП внаслідок набухання мітохондрій, ізольованих із тканин серця дорослих і старих щурів в безкальцієвому середовищі (контроль) та за умов дії Ca²⁺ в концентрації 10⁻⁴ моль/л, як найбільш ефективною щодо набухання мітохондрій [8], представлені на рис. 1.

Той факт, що величина набухання мітохондрій серця дорослих щурів у разі дії CaCl₂ в концентрації 10⁻⁷ моль/л практично не відрізнялася від такої в суспензії мітохондрій, що інкубували в безкальцієвому

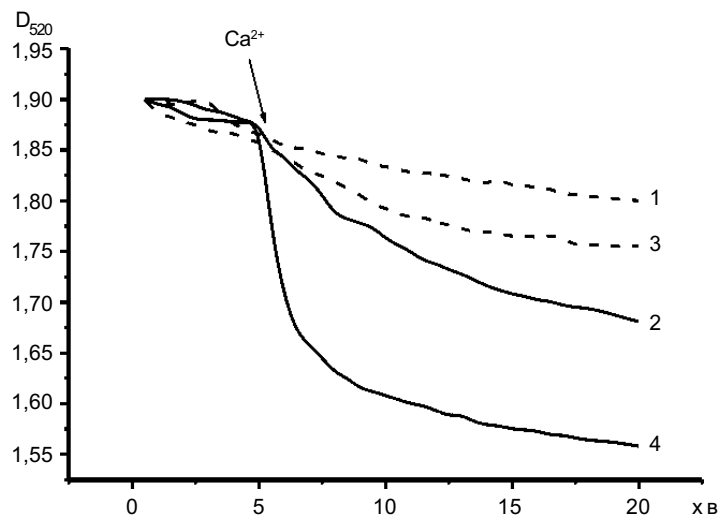


Рис. 1. Характерні криві набухання мітохондрій тканин серця дорослих (1, 2) і старих (3, 4) щурів за умов навантаження кальцієм: 1, 3 – контроль; 2, 4 – дія Ca²⁺ (10⁻⁴ моль/л)

середовищі, можна пояснити фізіологічною дією іонів кальцію, яка відповідає внутрішньоклітинній концентрації у стані спокою. Подальше підвищення концентрації Ca^{2+} від 10^{-6} до 10^{-4} моль/л в інкубаційному середовищі призводило до більш значного набухання мітохондрій. Максимальна різниця між набуханням мітохондрій ($\Delta\%$) при дії Ca^{2+} в концентрації 10^{-4} моль/л порівняно з контролем (безкальцієве середовище) становила 14%. Таким чином, отримані результати

вказують на те, що при дії на ізольовані мітохондрії Ca^{2+} в діапазоні концентрацій 10^{-6} – 10^{-4} моль/л відбувається відкриття МП.

Інша картина спостерігається при дослідженні відкриття МП у старих щурів. Так, уже за умов дії Ca^{2+} в концентрації 10^{-7} моль/л (фізіологічна концентрація) спостерігалось набухання мітохондрій: різниця між набуханням мітохондрій серця старих щурів порівняно з таким дорослих тварин становила 5 % (див.рис. 1). Збільшення концентрації кальцію в інкубаційному середовищі до 10^{-4} моль/л (навантаження кальцієм) призводило до суттєвого набухання мітохондрій серця старих щурів ($\Delta=18\%$), що значно відрізнялося від такого у дорослих тварин ($\Delta=12\%$). Отримані результати, ймовірно, можуть вказувати на підвищену чутливість відкриття МП у серці старих щурів, оскільки за умов дії Ca^{2+} у фізіологічній концентрації (10^{-7} моль/л) уже спостерігалось суттєве набухання мітохондрій. Отже, є підстави зробити висновок, що описані зміни щодо відкриття МП пов'язані з тими особливостями кальцієвого гомеостазу, що спостерігаються при старінні.

Попередня інкубація мітохондрій з циклоспорином А за умов дії іонів кальцію в концентрації 10^{-4} моль/л (максимальне набухання) практично повністю перешкождала їх набухання, що є прямим доказом причетності цього процесу до відкриття МП. Однак набухання мітохондрій, ізольованих з серця дорослих щурів, інгібувалося циклоспорином А повністю, а старих щурів – лише частково (рис. 2).

Для порівняння дії навантаження Ca^{2+} на вивільнення мітохондріального фактора з тканин серця дорос-

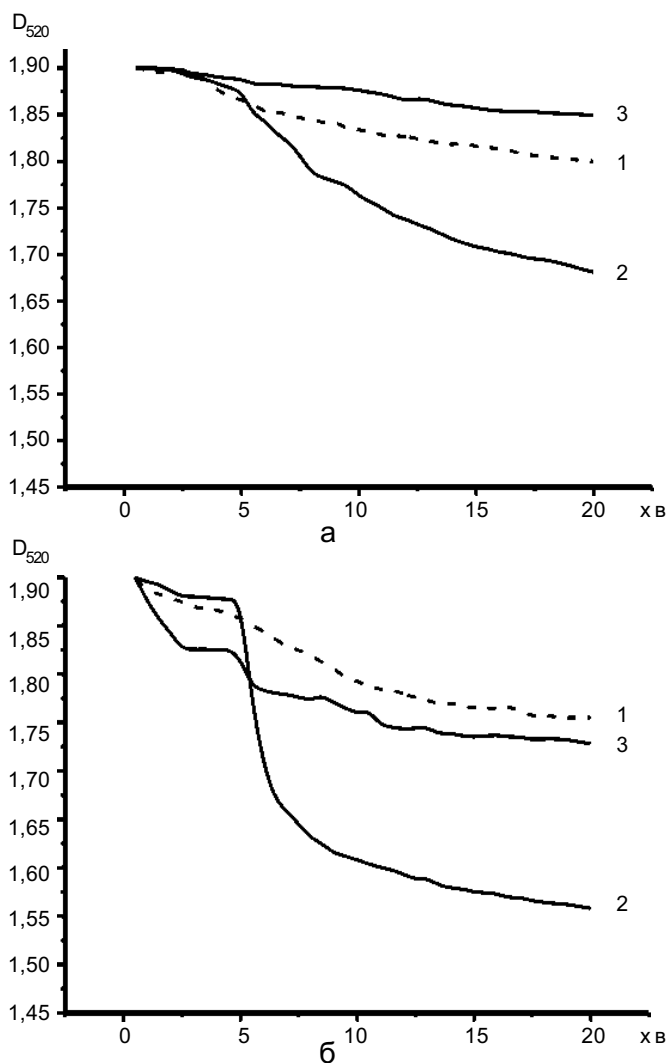


Рис. 2. Вплив циклоспорино А на набухання мітохондрій тканин серця дорослих (а) і старих (б) щурів за умов навантаження кальцієм: 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – преінкубація з циклоспорином А (10^{-5} моль/л) дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л)

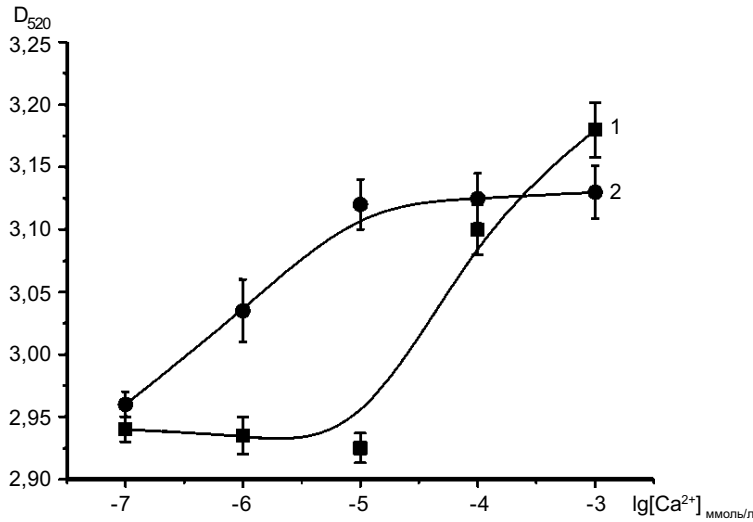


Рис.3. Концентраційна залежність впливу іонів кальцію на вивільнення неідентифікованих речовин з мітохондрій тканини серця дорослих (1) і старих (2) щурів

лих і старих щурів з набуханням мітохондрій досліджували дію Ca²⁺ в діапазоні концентрацій 10⁻⁷–10⁻³ моль/л (рис. 3). Різниця концентрації, за якої відбувалося вивільнення фактора з мітохондрій тканини серця старих щурів, була на два порядки меншою порівняно з дорослими тваринами. Необхідно відмітити, що за наявності в середовищі інкубації Ca²⁺ (10⁻⁵ моль/л) із

мають підвищену проникність мембран, у результаті чого набувають здатності до вивільнення речовин, що є показником відкриття МП, на відміну від мітохондрій дорослих щурів.

Відомо, що мітохондрії відіграють важливу роль у забезпеченні внутрішньоклітинного гомеостазу кальцію. При ушкодженні клітини іони кальцію можуть відігра-

мітохондрій тканини серця старих щурів уже відбувалося вивільнення неідентифікованих речовин (фактора), на відміну від дорослих щурів (рис. 4). Цей факт можна пояснити посиленням окисних процесів у мітохондріях старіючих тканин [28, 29, 33, 40].

Таким чином, мітохондрії тканини серця старих щурів потребують меншого навантаження Ca²⁺ для індукції кальційопосередкованого вивільнення фактора і є більш чутливими до відкриття МП при навантаженні цими іонами. Таким чином, мітохондрії тканини серця старих щурів, очевидно,

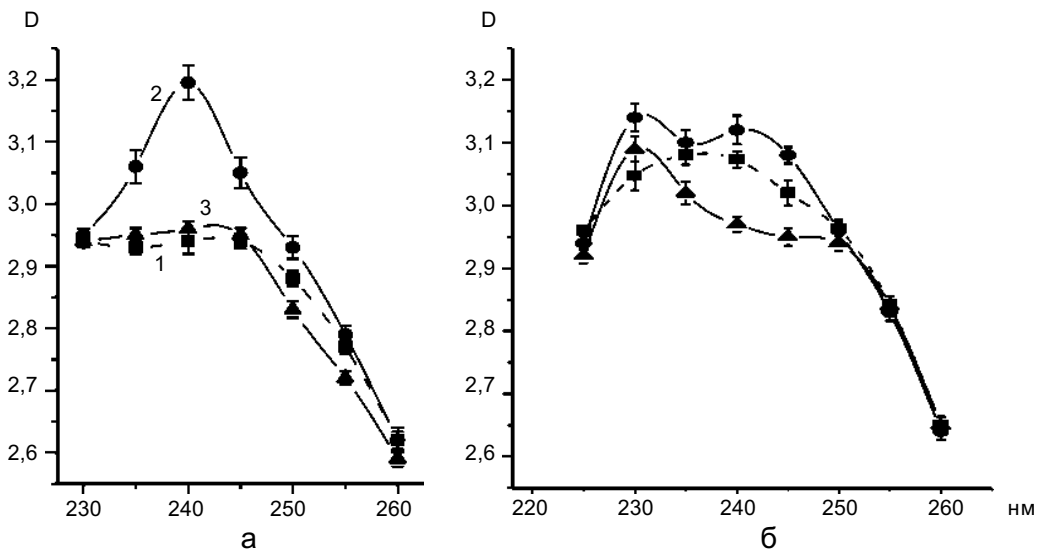


Рис.4. Спектри поглинання неідентифікованих речовин мітохондрій серця дорослих (а) та старих (б) щурів: 1 – мітохондрії за наявності Ca²⁺ (10⁻⁵ моль/л); 2 – дія феніларсиноксиду (10⁻⁵ моль/л); 3 – преінкубація з циклоспорином А (10⁻⁵ моль/л), дія феніларсиноксиду (10⁻⁵ моль/л)

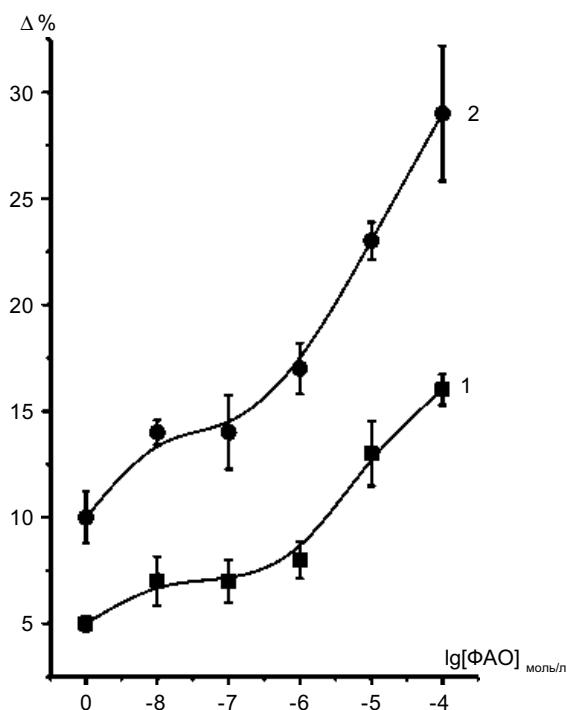


Рис. 5. Дозозалежний вплив феноларсиноксиду на набухання мітохондрій тканин серця дорослих (1) і старих (2) щурів. За віссю ординат – різниця між зміною оптичної густини мітохондрій на 20 хвилин за умов дії на них індукторів МП відносно контролю; за віссю абсцис – lg концентрації феноларсиноксиду

вати роль цитотоксичного агента через незбалансоване внутрішньоклітинне їх накопичення. Критеріями порушення кальцієвого гомеостазу є зміна концентрації іонізованого кальцію, процесів його внутрішньоклітинного депонування в цитозолі та модифікація мембранної проникності для цих іонів [4, 11, 18]. Навантаження Ca^{2+} і оксидативний стрес є відомими індукторами МП, які ініціюють розвиток патологічних станів, що супроводжуються некротичними й апоптотичними процесами [14]. Таким чином, кальційіндуковане відкриття МП, очевидно, найбільш відповідає функціональному стану клітин при патології [10, 13, 37].

Існує декілька пояснень відносно механізмів активації МП навантаженням Ca^{2+} . Так, деякі автори [16, 20] припускають, що внаслідок пригнічення окисного фосфори-

лювання при кальцієвому навантаженні посилюється генерація мітохондріями вільних радикалів, які, як відомо, активують МП. За іншими даними Ca^{2+} може змінювати реактивність тіолових груп мітохондріальних мембранних білків чи прямо регулювати ймовірність відкриття МП [13, 14]. В оточенні мітохондріальних мегаканалів, а також у складі білків, що їх утворюють, розміщуються сульфгідрильні групи, модифікація яких є одним із механізмів впливу модифікаторів SH-груп на проникність і стабільність мембран мітохондрій. У мітохондріях тканин за фізіологічного старіння спостерігається підвищення оксидативного стресу [25].

У наступних серіях експериментів за умов дії індуктора МП ФАО в діапазоні концентрацій 10^{-9} – 10^{-4} моль/л нами отримано результати відносно індукції МП і вивільнення неідентифікованого фактора з мітохондрій тканини серця дорослих і старих щурів.

В експериментах за умов дії ФАО в діапазоні концентрацій 10^{-8} – 10^{-4} моль/л на мітохондрії, ізольовані з тканини серця дорослих і старих щурів, спостерігали дозозалежне їх набухання (рис. 5). Відмінність полягала в різниці величин набухання мітохондрій тканини серця старих щурів порівняно з такими дорослих тварин. На рис. 6 наведені характерні криві реєстрації відкриття МП як за відсутності ФАО (контроль), так і за умов його дії в концентрації 10^{-5} моль/л. Так, видно, що без наявності в інкубаційному середовищі індукторів МП – мітохондрії тканини серця старих щурів мають більшу здатність до набухання: різниця величини набухання становила 5%. Цей факт свідчить про те, що в тканині серця старих щурів МП частково знаходиться у відкритому стані внаслідок, очевидно, посилення оксидативних процесів у старіючому організмі. Більша величина набухання мітохондрій серця старих щурів порівняно з дорослими за умов дії ФАО

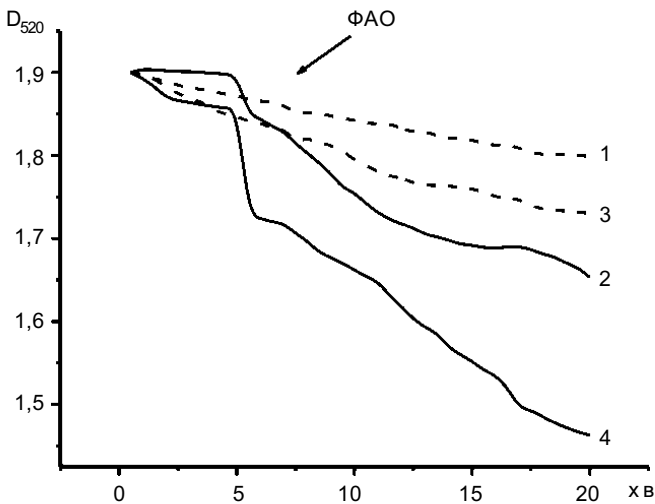


Рис. 6. Характерні криві набухання мітохондрій тканин серця дорослих (1, 2) і старих (3, 4) щурів за умов дії феноларсиноксиду: 1, 3 – контроль; 2, 4 – дія феноларсиноксиду (10^{-5} моль/л)

свідчить про підвищену чутливість МП до дії досліджуваного індуктора.

Відомо, що індукція МП за допомогою ФАО стимулюється наявністю цитозольного Ca^{2+} і не потребує його в мітохондріальному матриксі. Позамітохондріальний Ca^{2+} знижує концентрацію ФАО, необхідну для індукції МП, за допомогою збільшення спорідненості його зв'язування з тіоловими групами мітохондріальних мембранних білків чи збільшення ймовірності відкриття МП [25].

У наступній серії експериментів було досліджено оптимальні умови вивільнення фактора з мітохондрій серця дорослих щурів за умов дії ФАО в діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-4} моль/л (рис. 7). Максимальне МП-залежне вивільнення фактора із мітохондрій серця дорослих щурів відбувалося при дії ФАО в концентрації 10^{-5} моль/л. На фоні ФАО в його оптимальній концентрації (10^{-5} моль/л) було встановлено дозоза-

лежний ефект специфічного інгібітора МП циклоспорину А в діапазоні концентрацій 10^{-9} – 10^{-4} моль/л, який у розчині 10^{-5} моль/л ефективно попереджував ФАО-індуковане вивільнення мітохондріального фактора.

Показано, що за умов моделювання *in vitro* оксидативного стресу за допомогою дії на суспензію мітохондрій серця як дорослих, так і старих щурів індуктора МП ФАО за наявності Ca^{2+} в інкубаційному середовищі (10^{-5} моль/л) вивільнюється фактор, який реєструється спектрофотометрично в діапазоні довжин хвиль 225–260 нм (див. рис. 4, а, б). Так, встановлено, що вивільнення неідентифікованих речовин із тканини серця старих щурів при дії індуктора МП ФАО в діапазоні досліджуваних концентрацій (10^{-9} – 10^{-4} моль/л) при наявності в середовищі інкубації Ca^{2+} (10^{-5} моль/л)

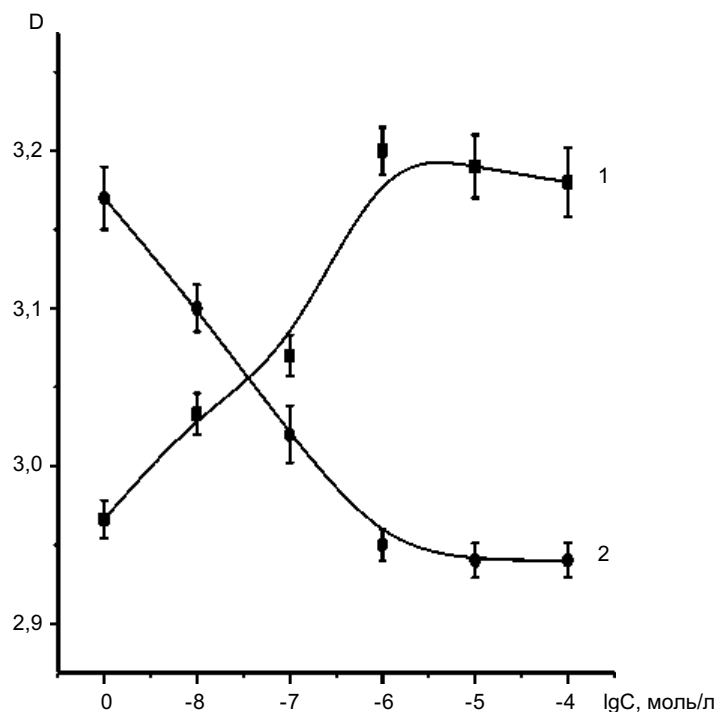


Рис. 7. Залежність вивільнення неідентифікованих речовин з мітохондрій тканини серця дорослих щурів від концентрації феноларсиноксиду (1) та циклоспорину А (2)

характеризувалося максимумами поглинання при двох довжинах хвиль: 230 нм (I пік) та 240–245 нм (II пік) на фоні вже існуючого піка при наявності Ca^{2+} . З одного боку, ефект ФАО спостерігався вже при концентрації 10^{-9} моль/л, що може говорити про підвищення чутливості МП до дії індуктора ФАО в серці старих щурів. З іншого боку, відсутність дозозалежного впливу ФАО на вивільнення речовин з мітохондрій серця старих щурів також може свідчити про порушення бар'єрних властивостей мітохондріальних мембран при старінні, зокрема про відкриття МП, що призводить до постійного вивільнення із матрикса мітохондрій низькомолекулярних речовин з молекулярною масою меншою від 1500 Да. Відомо, що мітохондрії, отримані з серця старіючих тварин, порівняно з дорослими характеризуються інтенсивнішою продукцією кисневих радикалів. Наприклад, кількість утвореного перекису водню в мітохондріях серця 24-місячних щурів підвищується на 25 % [35]. У них спостерігаються більш значні, ніж в серці дорослих тварин, окисні ушкодження, включаючи окисну модифікацію білків, а також ушкодження, які опосередковуються Ca^{2+} . Окисні ушкодження мітохондрій, додатково до вже існуючих дефектів, пов'язаних зі старінням, є можливим механізмом прискореного розвитку дегенеративних процесів у серці [44]. Результати проведених нами експериментів опосередковано свідчать про посилення окисних процесів в організмі, які викликають ушкодження мітохондрій серця у старих тварин.

Дія класичного інгібітора МП циклоспорину А в концентрації 10^{-5} моль/л на вивільнення неідентифікованих речовин із мітохондрій тканини серця старих щурів (див.рис. 4,б) відрізнялася від такої у дорослих щурів (див.рис. 4,а), оскільки циклоспорин А практично повністю попереджав вивільнення другої компоненти (II

пік, $\lambda_{\text{max}} = 240\text{--}245$ нм) ФАО-індукованого вивільнення фактора із мітохондрій серця старих щурів, але не першої компоненти (I пік, $\lambda_{\text{max}} = 230$ нм). Ці результати узгоджуються з даними про часткове інгібування циклоспорином А відкриття МП за умов дії Ca^{2+} і ФАО у тканині серця старих щурів. За даними деяких авторів [1] імуносупресорний циклічний ендекапептид циклоспорин А специфічно блокує МП, що проявляється в попередженні виходу кальцію із мітохондрій. Механізм блокади МП циклоспорином А ще не повністю з'ясовано, але припускають зв'язування його з білком мітохондріального матриксу циклофіліном D, що має ферментативну активність пептидилпроліліс-транс-ізомерази [1, 10, 17]. Отримані дані свідчать про те, що в мітохондріях тканини серця старих тварин поряд з утворенням класичної МП, має місце утворення неспецифічної циклоспорин А-нечутливої пори [24].

Таким чином, результати досліджень відкриття МП за допомогою індукторів Ca^{2+} та ФАО узгоджуються з даними про вивільнення за умов дії досліджуваних індукторів мітохондріального фактора. Аналіз отриманих даних дає можливість зробити висновок про підвищену чутливість пороутворення в мітохондріях тканини серця старих щурів до дії індукторів МП – іонів Ca^{2+} і ФАО. Зважаючи на те, що при старінні підвищується чутливість відкриття МП у тканинах мозку та печінки [21,33], а також серця, як підтверджують наші результати, можна зробити висновок, що ця властивість має загальнофізіологічне значення при вікових ушкодженнях різних тканин організму.

Виходячи з того, що однією з ключових ланок процесів старіння організму є накопичення та тривала токсична дія вільних радикалів, які є індукторами МП, викликає інтерес дослідження впливу антиоксидантів на відкриття МП і вивільнення мітохондріального фактора за умов дії ФАО у старих

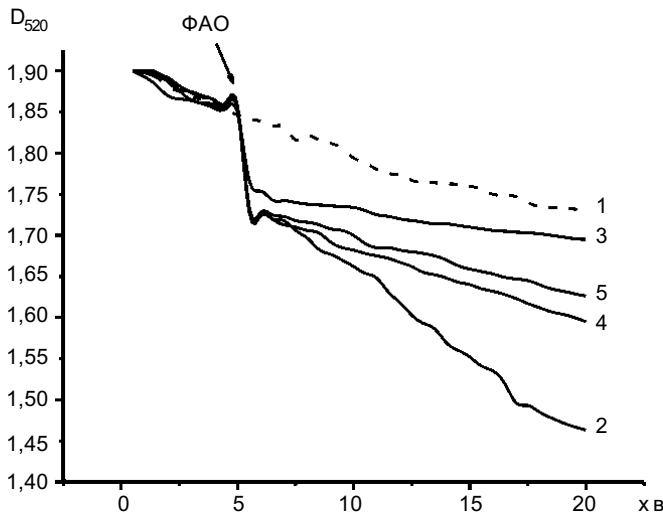


Рис. 8. Вплив мелатоніну, тролоксу та циклоспорину А на набухання мітохондрій тканини серця старих шурів: 1 – контроль; 2 – дія феніларсиноксиду (10^{-5} моль/л); 3 – преінкубація з циклоспорином А (10^{-5} моль/л); 4 – преінкубація з тролоксом (10^{-5} моль/л); 5 – преінкубація з мелатоніном (10^{-5} моль/л)

шурів. У зв'язку з цим ми вивчали за умов *in vitro* можливу протекторну дію антиоксидантів мелатоніну та тролоксу (водорозчинний вітамін Е) щодо набухання мітохондрій при дії ФАО, а також на вивільнення з них фактора. Встановлено, що попередня інкубація мітохондрій з розчинами антиоксидантів мелатоніну та тролоксу значною мірою сприяли захисту мітохондрій. Зокрема, ФАО-індуковане набухання мітохондрій серця старих шурів за умов попередньої обробки суспензії мітохондрій розчинами мелатоніну (10^{-5} моль/л) та тролоксу (10^{-5} моль/л) зменшувалося на 60 та 47 % відповідно порівняно з рівнем набухання мітохондрій при дії ФАО в концентрації 10^{-5} моль/л (рис. 8), а вивільнення неідентифікованих речовин з мітохондрій серця старих шурів – на 59 і 41 % відповідно порівняно з контролем (рис. 9). Очевидно, що застосування цих речовин може бути ефективним засобом у попередженні розвитку мітохондріальної дисфункції внаслідок різних захворювань і патологічних станів

організму. Антиоксиданти, напевно, можуть здійснювати коригуючу функцію відносно відкриття МП за умов природного фізіологічного процесу – старіння.

Відомо, що одне із центральних місць в антиоксидантному захисті організму займає глутатіон. Доведено, що антиоксидант мелатонін, який синтезується в організмі людини, проявляє суттєвий активуючий вплив на ферменти перетворення глутатіону, що пояснює його антиоксидантний ефект [3, 9]. Біологічна роль іншого антиоксиданту – тролоксу – полягає в попередженні окиснення ліпідів біологічних мембран і зменшенні активності глутатіонпероксидази, необхідної для руйнування перекисів, які утворюються в клітині [41]. Таким чином, протекторний ефект антиоксидантів щодо відкриття МП пояснюється, насамперед, стабілізацією мембран і збереженням спряження окисного фосфорилування і, як наслідок, достатньої продукції АТФ.

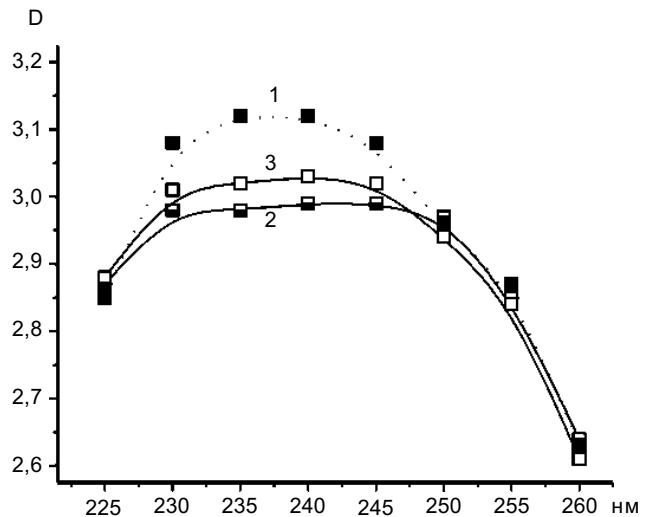


Рис. 9. Вплив антиоксидантів мелатоніну та тролоксу на вивільнення неідентифікованих речовин з мітохондрій тканини серця старих шурів: 1 – контроль (мітохондрії при наявності кальцію 10^{-5} моль/л); 2 – преінкубація з мелатоніном (10^{-5} моль/л); 3 – преінкубація з тролоксом (10^{-5} моль/л)

Старіння – складний, генералізований процес, у результаті якого відбувається прогресуюча втрата фізіологічних функцій в організмі та підвищується ризик смерті, пов'язаний, у першу чергу, з хворобами серцево-судинної системи. Вільнорадикальна теорія старіння наводить на думку, що цей процес є наслідком розладу різних захисних механізмів, які протидіють АФК-індукованому ушкодженню клітин. Збільшення кількості ушкоджених мітохондрій є рушійною силою процесу старіння [34]. Старіння супроводжується структурними змінами в мітохондріях і зниженням активності комплексів С-IV і С-V дихального ланцюга, що завершуються біоенергетичним кризом, який призводить до апоптозу клітини [43]. Оксидативний стрес є одним із компонентів тригерного механізму МП-індукованого апоптотичного каскаду [31]. Згідно з нашими результатами про захисну дію мелатоніну та тролоксу відносно попередження відкриття МП у серці старих щурів, а також з даними інших авторів стосовно протекторної дії антиоксидантів [5, 7, 41], доцільним є корекція та захист організму при старінні за допомогою антиоксидантного контролю [42].

Виявлене нами існування підвищеної чутливості мітохондрій до індукторів МП у серці старих щурів наштовхнуло нас на з'ясування причетності молекулярно-генетичних механізмів до відкриття МП, до здатності за допомогою цих механізмів здійснювати взагалі контроль за пригніченням чи підвищенням процесу пороутворення в мітохондріях. З літератури відомо, що білки сімейства Bcl-2, зокрема Bax, можуть прискорювати цей процес за допомогою прямої його взаємодії з компонентами МП або через формування окремих каналів-пор у мітохондріальній мембрані [12, 15, 36, 43].

Ми досліджували рівні експресії мРНК генів *bax* і *bcl-2* методом полімеразної ланцюгової реакції у варіанті зворотної

транскрипції. Для цього виділяли тотальну РНК тканини серця, транскрибували її в комплементарну ДНК, яка була матрицею для ампліфікації з використанням олігонуклеотидних праймерів, специфічних до певних ланок генів *bax*, *bcl-2* і *gapdh* які були контролем. Аналіз отриманих даних показав, що рівень експресії гена *bax* неоднаковий у дорослих і старих щурів. А саме експресія гена *bax* у тканині серця старих щурів значно посилюється порівняно з дорослими щурами (рис. 10). Рівень експресії гена *bcl-2* у старих і дорослих щурів практично не змінювався.

Таким чином, посилена експресія мРНК гена *bax* у тканині серця старих щурів асоціюється з підвищеною чутливістю МП до дії індукторів ФАО та навантаження мітохондрій Ca^{2+} .

Функція всіх білків родини Bcl-2 (їх не менше ніж 15) повністю не з'ясована, однак встановлено, що білки Bcl-2, Bcl-xL і Bax можуть формувати іонно-протонні пори в ліпідному бішарі, діючи як димери/олігомери. Завдяки тому, що Bcl-2 і Bcl-xL переважно локалізовані у зовнішній мітохондріальній мембрані, а активований білок Bax транспортується в мітохондрії, ці білки можуть здійснювати функції регуляторів іонних насосів у клітині [15]. Альтернативно, вони можуть безпосередньо здійснювати свій вплив регуляцією механізму

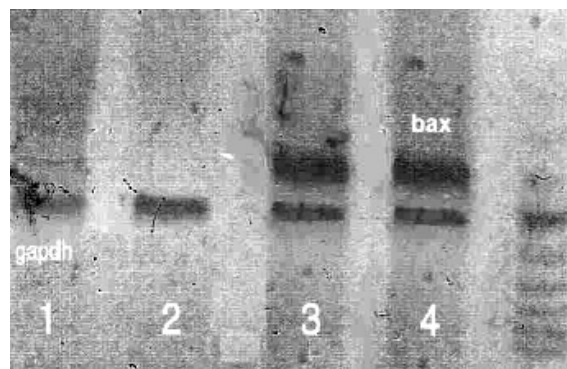


Рис. 10. Експресія мРНК генів *bax* і *gapdh* у серці дорослих (1, 2) і старих (3, 4) щурів

активації каспаз. Активність Bcl-2-білків регулюється на субклітинному рівні залежно від їх цитозольної чи мітохондріальної локалізації та від їх димеризації (димерно/олігомерного стану). Саме димеризація білка Вах є тригером його транслокації в мітохондрії, що може спричиняти апоптоз клітини. Активність білка Bcl-2 залежить також від прямої дії на нього протеолітичних ферментів з наступним їх розщепленням і фосфорилуванням [15, 27].

Вільні радикали, які акумулюються в організмі при старінні, викликають набухання мітохондрій, вивільнення цитохрому *c* у цитозоль і, в результаті, призводять до апоптозу клітин внаслідок утворення МП.

Критичною подією під час апоптозу клітини є вихід із мітохондрій цитохрому *c*, який в цитозолі взаємодіє з фактором Араф-1 (апоптотичний фактор-1, що активує каспази) і прокаспазою-9, формуючи комплекс апоптосоми. Одним із механізмів, який пояснює вихід цитохрому *c* з мітохондрій, є формування МП. Кальційзалежне відкриття цієї пори призводить до суттєвого зниження мембранного потенціалу мітохондрій, розмежування окисного фосфорилування й ушкодження зовнішньої мітохондріальної мембрани. Альтернативним є кальційнезалежний механізм, за допомогою якого можна пояснити вивільнення цитохрому *c* через пермеабілізацію зовнішньої мітохондріальної мембрани, яка регулюється проапоптотичними членами сімейства білків Bcl-2. Robertson [39] показав, що цитохром *c* вивільнюється через специфічні пори у зовнішній мембрані мітохондрій, які можуть утворюватись *de novo* білками Вах чи Bid. Варіацію цього механізму запропонував Shimizu [36], який на ліпосомах продемонстрував можливість рекомбінантних білків Вах і Вах безпосередньо активувати один із білків, який утворює МП – потенціалзалежний аніонний канал (VDAC). Навпаки, білок Bcl-2 здатний його інактивувати.

Таким чином, чутливість ФАО-індукованого вивільнення речовин із мітохондрій тканини серця дорослих щурів до дії специфічного інгібітора МП циклоспорину А дає підставу зробити висновок, що вивільнення мітохондріальних речовин (фактора) відбувається в результаті відкриття МП і, в свою чергу, вивільнення неідентифікованих речовин може бути ознакою її відкриття. Однак циклоспорин А – нечутлива компонента набухання мітохондрій і вивільнення неідентифікованих речовин із мітохондрій старих щурів свідчать про існування нечутливої до циклоспорину А МП. Було зроблено висновок, що мітохондрії серця старих щурів, напевно, мають підвищену проникність мембран порівняно з мітохондріями серця дорослих щурів, і є більш чутливими до дії індукторів МП – навантаження Ca^{2+} та дії ФАО.

Наші спостереження відносно того, що мітохондрії тканини серця старих щурів є більш чутливими до Ca^{2+} та ФАО-індукованого вивільнення мітохондріальних неідентифікованих речовин внаслідок відкриття МП, дозволяють припустити, що старіння збільшує чутливість мітохондрій серця старих щурів до індукторів відкриття МП – Ca^{2+} та ФАО, що може призводити до поширених тканинних ушкоджень, пов'язаних зі старінням і, насамперед, хворобами серцево-судинної системи.

Отже, результати наших досліджень дають підставу стверджувати, що процеси фізіологічного старіння супроводжуються мітохондріальною дисфункцією, одним із проявів якої є здатність мітохондрій тканини серця старих щурів, як при наявності, так і без індукторів МП, вивільнювати фактор, імовірно, внаслідок підвищення чутливості відкриття МП. Збільшення експресії м-РНК *вах* у серці старих щурів, очевидно, свідчить про дію проапоптотичного білка Вах, яка сприяє відкриттю МП при старінні.

V. F. Sagach, G. L. Vavilova, N. A. Strutyns'ka,
O. V. Rudyk

THE AGING INCREASE IN THE SENSITIVITY OF THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING TO INDUCTORS IN RAT HEART

An age-related increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) to inductors of its opening, Ca^{2+} ions and phenylarsineoxide (PAO) was studied in experiments *in vitro* on isolated heart mitochondria of adult and old rats. Two indices were measured spectrophotometrically ($\lambda=520$ nm) by a decrease in an optical density (OD), resulting from mitochondrial swelling and a release of mitochondrial unidentified substances (mitochondrial factor, MF) registered also spectrophotometrically in a range of waves $\lambda=230$ -260 nm. Dose-dependent effect of Ca^{2+} (10^{-7} - 10^{-4} mol/l) and PAO (10^{-8} - 10^{-4} mol/l) on swelling of the mitochondria were observed in samples from both adult and old rats. Swelling of the mitochondria from the heart of old rats induced by application of the above inductors was more intensive than the respective effect in samples from adult rats. In samples from the heart of both adult and old rats Ca^{2+} ions within the tested concentration range (10^{-7} - 10^{-4} mol/l) evoked the release of MF in a dose-dependent manner. Mitochondria from the heart of old rats were found to be capable of releasing some amounts of MF in the absence of the MPTP inductors PAO. When this inductor was applied in a 10^{-9} to 10^{-4} mol/l concentration range, isolated mitochondria from the heart of old rats released unidentified substances with the absorption peaks at two wavelength, $\lambda=230$ nm and $\lambda=240$ -245 nm. The former peak was found to be Cyclosporin A-insensitive, while the latter peak could be practically completely inhibited by this antibiotic. The concentrations of tested solutions (10^{-7} mol/l CaCl_2 and 10^{-9} mol/l PAO), at which the release of the factor from the mitochondria of the old rat heart was observed, were significantly lower than those in adult rats. Our experimental data show that mitochondria isolated from the heart tissue of old rats demonstrate significantly higher sensitivity to inductors of MPTP-opening, Ca^{2+} -overload and PAO as compared to that typical of adult animals. A higher sensitivity of MPTP-opening in the heart of old rats was accompanied by a higher basal level of expression of mRNA of the *bax* gene, as compared to that found in adult animals. The expression of the *bcl-2* gene showed no age group-related differences. It can be supposed that a proapoptotic agent, the Bax protein, is related to an increase in the sensitivity of the MPTP (in particular to that manifested in the processes of pore formation) in the course of aging. Antioxidants, melatonin and trolox, when applied in 10^{-5} mol/l concentration, prevented to a certain extent opening of the MPTP-induced by 10^{-5} mol/l PAO in samples from adult and old rats. These findings can be used for correction of increased sensitivity of the MPTP to different inductors, which is typ-

ical of old rats. We conclude that physiological aging is accompanied by the mitochondrial dysfunction. The MF-released capability of the mitochondria from heart tissue of old rats observed both in the presence and absence of MPTP-opening inductors (probably related to a higher sensitivity of MPTP-opening) is one of the manifestation of such dysfunction.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Владимиров Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембраны митохондрий, некроз и апоптоз // Биол. мембраны. – 2002. – **19**, №5. – С. 356–377.
2. Загоскин П.П., Хватова Е.М. Митохондриальные болезни – новая отрасль современной медицины // Вопр. мед. химии. – 2002. – **48**. – С. 321–336.
3. Заморський І.І., Мещиш І.Ф., Пішак В.П. Фотоперіодичні зміни системи глутатіону мозку за гострої гіпоксії // Укр. біохім. журн. – 1998. – **70**, № 6. – С. 69–75.
4. Егорова А.Б., Успенская Ю.А., Михуткина С.В., Ставицкая Е.Ю. Повреждение цитоскелета и клеточных мембран при апоптозе // Успехи совр. биологии. – 2001. – **121**, № 5. – С. 502–510.
5. Коркушко О.В., Шатило В.Б., Писарук и др. Влияние физиологической дозы мелатонина на стрессовую реакцию сердечно-сосудистой системы у людей пожилого и старческого возраста // Журн. АМН Украины. – 2002. – **8**, № 3 – С. 599–607.
6. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, №4. – С. 7–13.
7. Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Струтинська Н.А., Акопова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення неідентифікованого мітохондріального фактора // Там само. – 2003. – **49**, №1. – С. 3–12.
8. Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Рудик О.В., Струтинська Н.А. Вивільнення неідентифікованих речовин мітохондріального походження – показник відкриття мітохондріальної пори серця щурів // Там само. – 2003. – **49**, №5. – С. 3–12.
9. Acuna-Castroviejo D., Martyn M., Masyas M. et. al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics // J. Pineal Res. – 2001. – **30**. – P. 65–74.
10. Al-Nasser I.A. Salicylate-induced kidney mitochondrial permeability transition is prevented by cyclosporin A // Toxicol. Let. – 1999. – **105**. – P. 1–8.
11. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – **99**, № 3. – P. 1115–1122.

12. Crompton M., Barksly E., Jonson N., Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death // *Biochemie.* – 2002. – **84**. – P. 143–152.
13. Bernardes C.F., Fagian M.M., Meyer-Fernandes J.R. et al. Suramin inhibits respiration and induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria // *Toxicology.* – 2001. – **169**. – P.17–23.
14. Bernardi P. The permeability transition pore: control points of a cyclosporine A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 1996. – **1275**. – P. 5–9.
15. Borner C. The Bcl-2 family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions // *Mol.Immunol.* – 2003. – **39**. – P. 615–647.
16. Chernyak B.V., Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – **238**, № 3. – P. 623–630.
17. Friberg H. Ferrand-Drake M., Bengtsson F. et al. Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death // *J. Neuroscience.* – 1998. – **18**, №14. – P.5151–5159.
18. Ganitkevich V.Y. The role of mitochondria in cytoplasmic Ca²⁺ cycling // *Exp. Physiol.* – 2003. – **88**, № 1. – P.91–97.
19. Gublines E., Dreschers S., Bock J. Role of mitochondria in apoptosis // *Experimental Physiology.* – 2003. – **88**, № 1. – P. 85–90.
20. Grijalba M.T., Vercesi A.E., Schreier S. Ca²⁺ induced increased lipid packing and domain formation in sub-mitochondrial particles. Possible step in the mechanism of Ca²⁺ stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain // *Biochem.* – 1999. – **38**. – P.13279–13287.
21. Hagen M.T., Yowe D.L., Bartholomew J.C. et. al. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential decline, heterogeneity and oxidants increase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1997. – 94. – P. 3064–3069.
22. Halestrap A.P., Mc Stray G.P., Clarke S.J. The permeability transition pore complex: another view // *Biochemie.* – 2002. – **84**. – P.153–166.
23. Harman D. The aging process: major risk factor for disease and death // *Proc. Acad. Sci. USA.* – 1991. – **88**, № 12. – P.5360–5367.
24. He L., Lemasters J.J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? // *FEBS Let.* – 2002. – **512**. – P.1–7.
25. Kowaltowski A.J., Castilho R.F. Ca²⁺ acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1997. – **1322**, № 2–3. – P. 221–229.
26. Kroemer G., Zamzami N., Susin S.A. Mitochondrial control of apoptosis // *Immunol. Today.* – 1997. – **18**. – P. 44–51.
27. Kumar D., Jugdutt B.I. Apoptosis and oxidants in heart // *J.lab. Clin. Med.* – 2003. – **142**. – P.288–297.
28. Lesnefsky E.J., Moghaddas S., Tandler J. et al. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and failure // *J. Mol. Cardiol.* – 2001. – **33**, № 6. – P.1065–1089.
29. Lesnefsky E.J., Hoppel C.L. Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria // *Arch. Biochem Biophys.* – 2003. – **420**, №2. – P.287–297.
30. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, № 1. – P.265–275.
31. Loeffler M., Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: Certainties and incognita // *Expt. Cell Res.* – 2000. – **256**. – P.19–26.
32. Lucas D.T., Szweda L.I. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1998. – **95**. – P.510–514.
33. Mather M., Rottenberg H. Ageing enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **273**. – P.603–608.
34. Miquel J., Economos J., Fleming J.E. Mitochondrial role in cell aging // *Exp. Gerontol.* – 1980. – **15**. – P.579–591.
35. Muscari C., Frascaro M., Guarnieri C., Caldarera C.M. Mitochondrial function and superoxide generation from submitochondrial particles of aged rat hearts // *Biochim et Biophys. Acta.* – 1990. – **1015**. – P.2000–2004.
36. Narita M., Shimizu S., Ito T. et. al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome C release in isolated mitochondria // *PNAS* – 1998. – **95**, №25. – P.14681–14686.
37. Nicotera P., Ankarcrone M., Bonfoco E. et. al. Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress // *Adv. Neurol.* – 1997. – **72**. – 95–101.
38. Ravagnan L., Roumier Th., Kroemer G. Mitochondria, the killer organells and their weapons // *J. Cell. Physiol.* – 2002. – **192**. – P. 131–137.
39. Robertson J.D., Orrenius S.D. Molecular Mechanisms of Apoptosis Induced by Cytotoxic Chemicals // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2000. – **30**, №5. – P.609–627.
40. Rottenberg H., Wu S. Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: enhanced activation of the permeability transition // *Biochem. et Biophys. Res. Commun.* – 1997. – **240**. – P. 68–74.
41. Sagach V., Scrosati M., Fielding J. et al. The water-soluble vitamin E analogue trolox protects against ischemia-reperfusion damage in vitro and ex-vivo. A

- comparison with vitamin E // Pharmacol. Res. – 2002. – **45**. – P.435–439.
42. Sastre J., Pallardo F.V., Garcia A.J. Mitochondria, oxidative stress and aging // Free Rad. Res. – 2000. – **32**. – P.189–198.
43. Skulachev V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms // Mol. Asp. Med. – 1999. – **20**. – P.139–184.
44. Wallace D.C. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease // Amer. Heart. J. – 2000. – **139**. – P.S70–S85.
45. Weiss J.N., Korge P., Honda H.M. et al. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease // Circulat. Res. – 2003. – **93**. – P.292–301.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 10.02.2004*