

С.А. Таланов, С.В. Тімошук, О.В. Рудик, В.Ф. Сагач

Збільшення чутливості мітохондріальної пори до кальцію у серці щурів з хронічним дефіцитом нігростріатного дофаміну

Вивчали набухання мітохондрій ізольованих з серця контрольних щурів і тварин з хронічним дефіцитом нігростріатного дофаміну, викликаного ін'єкцією селективного нейротоксину 6-гідроксидофаміну у висхідний латеральний пучок переднього мозку, при дії кальцію за зниженням оптичної густини їх суспензій, яку реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 520 нм. Дослідження проводили як при фізіологічній концентрації кальцію (10^{-7} моль/л), так і за умов його навантаження в діапазоні 10^{-6} – 10^{-4} моль/л. Показано, що швидкість і амплітуда набухання мітохондрій міокарда щурів з дефіцитом церебрального дофаміну значно перевищувала контрольні значення щурів як за фізіологічної концентрації кальцію, так і за умов його навантаження. Попередня інкубація мітохондрій з блокатором відкривання мітохондріальної пори циклоспорином А повністю перешикоджала їх набухання у контрольних щурів і лише частково у щурів з дефіцитом нігростріатного дофаміну. Отримані результати дають змогу зробити висновок, що підвищення чутливості мітохондріальної пори до її природного індуктора і збільшення проникності мітохондріальних мембран можуть бути однією з причин показаного нами раніше порушення скоротливої функції серця щурів за умов хронічного дефіциту нігростріатного дофаміну.

Ключові слова: дефіцит дофаміну, міокард, мітохондрії, мітохондріальна пора, мелатонін.

ВСТУП

В основі хвороби Паркінсона (ХП) лежить вибіркова загибель дофамінергічних нейронів чорної субстанції та дефіцит дофаміну у стріатумі. Це захворювання часто супроводжується вегетативними розладами, у тому числі і хворобами серцево-судинної системи. Нещодавно на моделі геміпаркінсонізму у щурів нами було показано, що за умов хронічного дефіциту церебрального дофаміну спостерігається порушення скоротливої функції серця [5]. У зв'язку з високими енергетичними витратами кардіоміоцити відрізняються великою щільністю мітохондрій, тому робота скоротливих елементів серцевого м'яза суттєво залежить від функціонального стану згаданих органел. Дисфункція мітохондрій дофамінергічних нейронів при ХП відома вже давно.

© С.А. Таланов, С.В. Тімошук, О.В. Рудик, В.Ф. Сагач

Показано, що порушення роботи дихального ланцюга I і пов'язані з цим енергетичний дефіцит і надмірна генерація вільних радикалів, мають велике значення у процесі нейродегенерації та розвитку цього захворювання [14, 27]. Цілком можливо, що подібні процеси при нестачі дофаміну у нігростріатній системі відбуваються і в кардіоміоцитах. У свою чергу, порушення клітинного дихання внаслідок якого розвивається окисний стрес, призводить до формування у мембранах мітохондрій мегаканалів змінної проникності, так званих мітохондріальних пор (МП), через які у цитозоль можуть виходити речовини з молекулярною масою до 1500 Да. Активація МП призводить до підвищення проникності мембран мітохондрій, що супроводжується зниженням їх трансмембранного потенціалу та в

подальшому пригніченню окисного фосфорилування і синтезу АТФ. Крім того, при цьому спостерігається порушення кальцієвого гомеостазу клітини. Через МП у цитозоль виходить і цитохром с, який здатний активувати протеолітичні ферменти каспази. Все це призводить до розвитку апоптозу чи некрозу клітин і врешті-решт до дисфункції органа.

Враховуючи все вищенаведене, можна припустити, що в основі порушення функції серця при ХП і експериментальному геміпаркінсонізмі у щурів також лежить погіршення функціонального стану мітохондрій внаслідок надмірної активації МП і збільшення проникності їх мембран. Відомо, що природним індуктором МП є Ca^{2+} . Тому метою нашої роботи було дослідити чутливість МП до Ca^{2+} у щурів з хронічним дефіцитом церебрального дофаміну.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на трьох групах 6–7-місячних щурах-самцях лінії Вістар, яких поділено на 3 групи. У першу (контрольну, $n=7$) входили інтактні тварини. Друга група ($n=6$) – щури з одностороннім хронічним (3–4 міс) дефіцитом дофаміну (6-гідроксидофамінова модель геміпаркінсонізму). В експеримент брали тільки тварин з суттєвим (більше ніж 90 %) пошкодженням дофамінсинтезувальних нейронів чорної субстанції лівої півкулії. Третя група ($n=5$) була подібною до другої, але за годину до декапітації тваринам з моделлю геміпаркінсонізму внутрішньоочередово вводили 10 мг/кг мелатоніну (“Sigma”, США). Методика односторонньої деструкції дофамінсинтезувальних клітин чорної субстанції 6-гідроксидофаміном і визначення ступеня односторонньої дегенерації дофамінергічної системи нами описана раніше [6].

Серця декапітованих тварин вилучали з грудної порожнини, ретельно промивали охолодженим 0,9 %-м розчином КСІ і гомогенізували у 9-кратному об’ємі середовища

для виділення мітохондрій (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСІ-буфер – 20, ЕДТА – 1; рН 7,4. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [3]. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [20].

Суспензію мітохондрій додавали у кварцеву кювету з інкубаційним середовищем ізотонічного складу (ммоль/л): КСІ – 120, тріс-НСІ – 25, KH_2PO_4 – 3, натрію сукцинат – 5; рН 7,4. Набухання мітохондрій оцінювали за зниженням їх оптичної густини, яке реєстрували протягом 20 хв за умов дії Ca^{2+} у діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-4} ммоль/л на спектрофотометрі (СФ-46, Росія) при $\lambda=520$ нм. Зміни оптичної густини на 20-й хвилині набухання порівнювали зі значеннями на 1-й хвилині. Для підтвердження того, що набухання мітохондрій відбувається внаслідок відкриття МП, одну з проб інкубували з інгібітором активації МП – циклоспорином А (10^{-5} моль/л).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Протягом 20 хв реєстрації при концентрації Ca^{2+} у середовищі інкубації 10^{-7} ммоль/л оптична густина суспензії мітохондрій контрольних щурів зменшувалася внаслідок їх набухання (рис. 1,1). Показано, що Ca^{2+} у фізіологічній концентрації не виявляє індукуючого впливу на активність МП, і набухання мітохондрій при цьому не відрізняється від такого у безкальцієвому середовищі [4]. Навантаження Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) призводило до більш значного набухання мітохондрій (див. рис. 1,3). При цьому спостерігався дозозалежний ефект при концентраціях Ca^{2+} від 10^{-6} до 10^{-4} моль/л (див. рис. 2,1). У щурів з хронічним дефіцитом церебрального дофаміну набухання мітохондрій міокарда було достовірно більшим, як при фізіологічній концентрації Ca^{2+} (див. рис. 1,2), так і за умов його навантаження у діапазоні від 10^{-6} до 10^{-4} ммоль/л (див. рис. 1,4, 2,2).

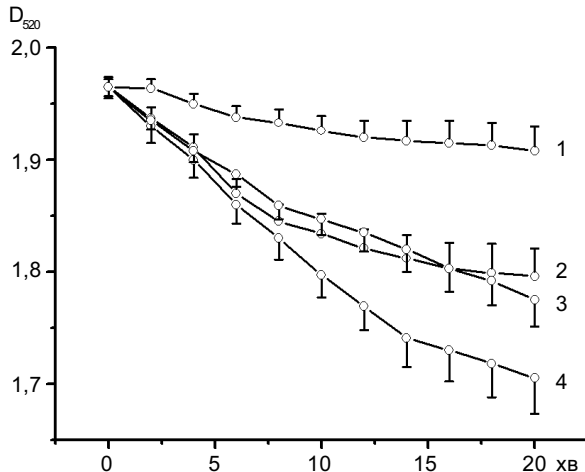


Рис. 1. Зменшення оптичної густини суспензії мітохондрій тканин серця щурів з хронічним дефіцитом церебрального дофаміну при концентрації кальцію 10^{-7} (1, 2) і 10^{-4} (3, 4) моль/л відповідно: 1, 2 – контроль, 2, 4 – дослід

Попередня інкубація мітохондрій міокарда контрольних щурів з класичним інгібітором МП циклоспорином А при концентрації $Ca^{2+} 10^{-4}$ моль/л практично повністю попереджала їх набухання (рис. 3,а). Це свідчило, що процес цей відбувався саме завдяки активації МП. Преінкубація з циклоспорином А мітохондрій серця тва-

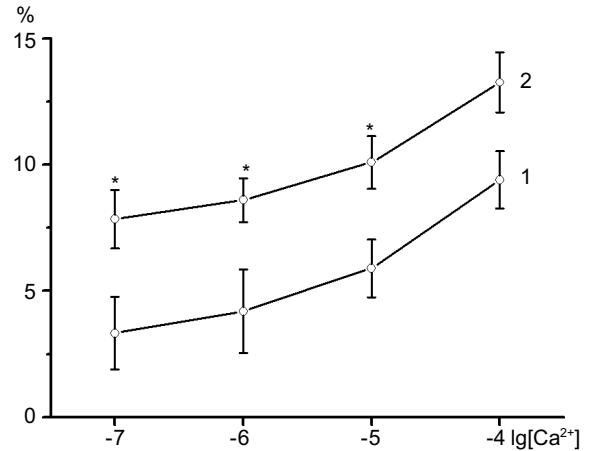
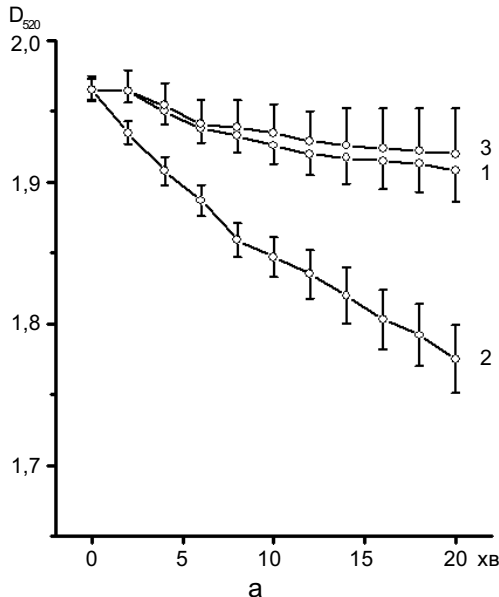


Рис. 2. Дозозалежний вплив кальцію на набухання мітохондрій серця щурів з хронічним дефіцитом церебрального дофаміну: 1 – контроль, 2 – дослід. За віссю ординат – різниця між оптичною густиною суспензії мітохондрій на 20-й хвилині і значенням цього показника на 1-й хвилині набухання; * $P < 0,05$

рин з дефіцитом церебрального дофаміну попереджала набухання цих органел лише частково (див. рис. 3,б), що доводило існування у мембранах мітохондрій разом з класичною МП інших каналів, котрі збільшують мембранну проникність.

Таким чином, у щурів з хронічним дефіцитом церебрального дофаміну підви-

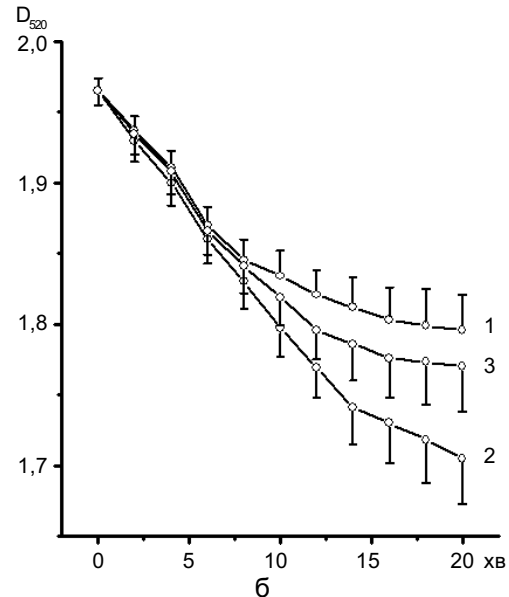


Рис. 3. Вплив циклоспорино А на набухання мітохондрій серця контрольних щурів (а) і тварин з хронічним дефіцитом церебрального дофаміну (б): 1, 2 – дія кальцію в дозі 10^{-7} і 10^{-4} моль/л відповідно; 3 – преінкубація з циклоспорином А (10^{-5} моль/л) та дія кальцію (10^{-4} моль/л)

щується чутливість МП до дії Ca^{2+} як при фізіологічній концентрації, так і за умов його навантаження. Це, ймовірно, пов'язано з порушенням кальцієвого гомеостазу, в основі якого є зміна концентрації Ca^{2+} , процесів його клітинного депонування та модифікація мембранної проникності для цих іонів [2, 15, 17]. Активація МП кальцієм відбувається насамперед внаслідок пригнічення окисного фосфорилування, пов'язаного з посиленням генерації мітохондріями вільних радикалів [16, 18]. Крім того, Ca^{2+} може змінювати реактивність тіолових груп каналних білків чи безпосередньо регулювати активність МП [12, 13]. Навантаження Ca^{2+} і окисний стрес є широко відомими активаторами МП при різних патологічних процесах, що залежно від їх інтенсивності призводить до розвитку апоптозу або некрозу клітини [13]. Ймовірно, відкриття МП є функціональним станом мітохондрій за різних патологічних процесів [11, 12, 23]. Раніше співробітниками нашого відділу було показано, що подібне збільшення чутливості МП спостерігається у старих щурів [4]. У свою чергу, ХП часто розглядається як модель раннього старіння.

Нещодавно на моделі геміпаркінсонізму у щурів, використаній у нашій роботі, нами було показано, що за умов хронічного дефіциту церебрального дофаміну у тканинах серцево-судинної системи, у тому числі у серці та мітохондріях міокарда, спостерігається окисний стрес, який супроводжується збільшенням радикальних форм кисню [8] й азоту [9]. Відомо, що мітохондрії є як основним генератором вільних радикалів, так і головною мішенню їх патогенного впливу. Тому цілком логічним було дослідити вплив на кальційіндуковане відкриття МП такого потужного антиоксиданта, як мелатонін. Раніше нами було показано, що мелатонін значною мірою зменшує дегенерацію дофамінсинтезуючих нейронів середнього мозку під впливом 6-ГОДА і, таким чином, попереджає розвиток геміпаркінсонізму у щурів [7].

Введення щурам за годину до декапітації мелатоніну достовірно зменшувало величину і швидкість набухання мітохондрій міокарда як при фізіологічній концентрації Ca^{2+} , так і за умов його навантаження при концентрації 10^{-4} моль/л (рис. 4). Це свідчило про те, що основною причиною активації МП у наших дослідах був патогенний вплив надмірної кількості вільних радикалів.

Відомо, що мелатонін є важливим нейроендокринним регулятором, що моделює як окремі фізіологічні функції, так і загальну життєдіяльність організму. Крім того, він є досить ефективним антиоксидантом, який поглинає синглетний кисень, супероксидний аніон, пероксинітрил і оксид азоту [24, 26]. При цьому його активність набагато більша порівняно з іншими відомими скавенджерями вільних радикалів [24, 25]. Антиоксидантні властивості мелатоніну проявляються і в його здатності активувати ферменти перетворення іншого потужного антиоксиданта – глутатіону [1, 10], дефіцит якого показаний при ХП та інших станах, пов'язаних з неста-

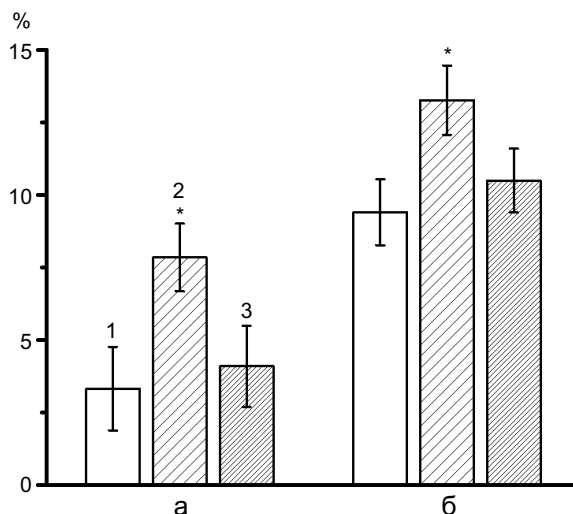


Рис. 4. Вплив мелатоніну на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця щурів: 1 – контроль; 2 – дефіцит церебрального дофаміну; 3 – дефіцит дофаміну та премедикація мелатоніном (10 мг/кг); а, б – концентрація кальцію 10^{-7} і 10^{-4} моль/л відповідно. За віссю ординат – різниця між зміною оптичної густини суспензії мітохондрій на 20-й хвилині відносно 1-ї хвилини. * $P < 0,05$ відносно контролю

чею дофаміну [22]. Крім глутатіонредуктази і глутатіонпероксидази, мелатонін підвищує активність і такого антиоксидантного ферменту, як глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, збільшує вміст мРНК супероксиддисмутази [19, 26]. Цей моноамін ефективно проникає в різні клітинні органели й ядра і, таким чином, захищає білки, ліганди, ядерну та мітохондріальну ДНК від окисного пошкодження у всіх клітинних структурах [21]. Показаний безпосередній інгібуючий вплив мелатоніну на активацію МП [10]. Відомо, що мелатонін може попереджати і ішемічно-реперфузійні ушкодження міокарда. Все це пояснює ефективне перешкоджання цим моноаміном відкриванню мегаканалів мітохондрій міокарда у наших дослідах і раніше показаний його ефективний протекторний вплив на скоротливу функцію серця, змінену у щурів з моделлю геміпаркінсонізму [5].

Отже, результати наших досліджень свідчать про те, що за умов хронічного дефіциту церебрального дофаміну спостерігається мітохондріальна дисфункція, зумовлена підвищенням чутливості МП до індукторів її відкривання (зокрема до кальцію). Це може бути основною причиною погіршення функції серця при ХП і дофаміндефіцитних станах. Мелатонін, насамперед завдяки своїм антиоксидантним властивостям, здатен суттєво зменшувати чутливість МП і, таким чином, виявляти протекторний вплив на функцію серця.

Автори висловлюють подяку М.Г. Бовту за технічну допомогу в роботі.

**С.А. Таланов, С.В. Тимошук, О.В. Рудик,
В.Ф. Сагач**

УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ К КАЛЬЦИЮ В СЕРДЦЕ КРЫС С ХРОНИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ НИГРОСТРИАТНОГО ДОФАМИНА

По изменению оптической плотности, регистрируемой спектрофотометрически при длине волны 520 нм изучали набухание митохондрий, изолированных из сердца

контрольных крыс и животных с хроническим дефицитом nigrostriatalного дофамина, вызванного инъекцией селективного нейротоксина 6-гидроксидофамина в восходящий латеральный пучок переднего мозга, при действии кальция. Исследования проводили как при физиологической концентрации кальция (10^{-7} моль/л), так и в условиях его нагрузки в диапазоне 10^{-6} – 10^{-4} моль/л. Показано, что скорость и амплитуда набухания митохондрий миокарда крыс с дефицитом церебрального дофамина значительно превышает таковую по сравнению с данным показателем у контрольных животных как при физиологической концентрации кальция, так и в условиях его нагрузки. Предварительная инкубация митохондрий с блокатором открытия митохондриальной поры циклоспорином А полностью предупреждала их набухание у контрольных крыс и лишь частично у животных с дефицитом nigrostriatalного дофамина. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что увеличение чувствительности митохондриальной поры к естественному ее индуктору кальцию и увеличение проницаемости мембран митохондрий могут быть одной из причин показанного нами ранее нарушения сократительной функции сердца у крыс в условиях хронического дефицита nigrostriatalного дофамина.

Ключевые слова: дефицит дофамина, миокард, митохондрии, митохондриальная пора, мелатонин.

**S.A. Talanov, S.V. Timoshchuk, O.V. Rudyk,
V.F. Sagach**

AN INCREASED SENSITIVITY OF THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE TO CALCIUM IN RAT HEART WITH CHRONIC DEFICIENCY OF NIGROSTRIATAL DOPAMINE

We studied the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening to natural inductors – Ca^{2+} ions in the rat heart mitochondria with chronic deficiency of nigrostriatal dopamine caused by an injection of selective neurotoxin 6-hydroxidofamine in an ascending lateral bundle of the forebrain. MPTP-opening was determined spectrophotometrically ($\lambda=520$ nm) by a decrease in an optical density resulting from mitochondrial swelling. It has been shown that the rat heart mitochondria with chronic deficiency of nigrostriatal dopamine are more sensitive to Ca^{2+} in its physiological concentration (10^{-7} mol/l) and overload (10^{-6} - 10^{-4} mol / l) in comparison to control animals. Thus, obtained results lead to a conclusion that an increased sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore to calcium and mitochondrial membrane permeability may be one of the causes previously reported of disturbance in contractile function of the rat heart with chronic deficiency of nigrostriatal dopamine. Key words: dopamine deficiency, myocardium, mitochondria permeability transition pore, melatonin.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Заморський І.І., Мешишен І.Ф., Пішак В.П. Фотоперіодичні зміни системи глутатіону мозку за гострої гіпоксії // Укр. біохім. журн. – 1998. – 70, № 6. – С. 69–75.
2. 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.
3. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Аكوпова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення неіндефікованого мітохондріального фактора // Фізіол. журн. – 2003. – 49, № 1. – С. 3–12.
4. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори // Там само. – 2004. – 50, № 2. – С. 49–63.
5. Таланов С.А., Сагач В.Ф. Нарушение функционального состояния миокарда у крыс с хроническим дефицитом nigro-стриатного дофамина и коррекция этих нарушений мелатонином // Нейрофизиология. – 2008. – 40, № 2. – С. 100–104.
6. Таланов С.А., Олешко Н. Н., Ткаченко М.Н., Сагач В.Ф. Фармакопротекторные влияния на различные звенья механизма дегенерации nigro-стриатных дофаминергических нейронов, вызванной действием 6-гидроксидаофамина // Там же. – 2006. – 38, № 2. – С. 150–156.
7. Таланов С.А., Сагач В.Ф. Антиоксиданти пригнічують розвиток експериментального геміпаркінсонізму у щурів // Фізіол. журн. – 2008. – 54, № 4. – С. 23–29.
8. Таланов С.А., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Окисний стрес в серцево-судиній системі у щурів з хронічним дефіцитом церебрального дофаміну // Там само. – 2009. – 55, № 4. – С. .
9. Таланов С.А., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Изменения синтеза оксида азота в сердечно-сосудистой системе у крыс с хроническим дефицитом церебрального дофамина // Доп. НАН. – 2009. – № 9. – С.
10. Acuna-Castroviejo D., Martyn M., Masyas M. et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics // J. Pineal. Res. – 2001. – 30. – P. 65–74.
11. Al-Nasser I.A. Salicylate-induced kidney mitochondrial permeability transition is prevented by cyclosporin A // Toxicol. Lett. – 1999. – 105, № 1. – P. 1–8.
12. 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, № 1. – P. 17–23.
13. Bernardi P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death // Biochim. and Biophys. Acta. – 1996. – 1275, № 1–2. – P. 5–9.
14. Bowling A.C., Beal M.F. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases // Life Sci. – 1995. – 56, № 14. – P. 1151–1171.
15. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A – 2002. – 99, № 3. – P. 1115–1122.
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. Ganitkevich V.Y. The role of mitochondria in cytoplasmic Ca²⁺ cycling // Exp. Physiol. – 2003. – 88, № 1. – P. 91–97.
18. Grijalba M.T., Vercesi A.E., Schreier S. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in sub-mitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain // Biochemistry. – 1999. – 38, № 40. – P. 13279–13287.
19. Kaul N., Siveski-Iliskovic N., Thomas T.P. et al. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy // Nutrition. – 1995. – 11, № 5 (Suppl). – P. 551–554.
20. 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.
21. Menedez-Pelaez A., Reiter R.J. Subcellular localization of melatonin: evidence suggests primarily a nuclear location // Ibid. – 1993. – 15. – P. 59–69.
22. Merad-Boudia M., Nicole A., Santiard-Baron D. et al. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease // Biochem. Pharmacol. – 1998. – 56, № 5. – P. 645–655.
23. Nicotera P., Ankarcrona M., Bonfoco E. et al. Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress // Adv. Neurol. – 1997. – 72. – P. 95–101.
24. Reiter R.J., Poeggeller B., Tan D.X. Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor // Neuroendocrin. Lett. – 1993. – 8. – P. 103–116.
25. Reiter R.J., Tan D.X., Cabrera J. et al. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin // Biol. Sig. Rec. – 1999. – 8, № 1-2. – P. 56–63.
26. Rosengurt E. Autocrine loops, signal transduction, and cell cycle abnormalities in the molecular biology of lung cancer // Curr. Opin. Oncol. – 1999. – 11. – P. 160–122.
27. Schapira A.H., Gu M., Taanman J.W. et al. Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease // Ann. Neurol. – 1998. – 44, № 3 (Suppl 1). – P. 89–98.

In-t фізіології ім О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: talanov@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 15.05.2009