

# Накопичення $\text{Ca}^{2+}$ у мітохондріях серця щурів за умов підтримання мітохондріального потенціалу

А.Ю. Будько, Н.А. Струтинська, І.Ю. Охай, О.М. Семенихіна, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця, НАН України, Київ; e-mail: a.budko@biph.kiev.ua

*Досліджували накопичення різних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях серця щурів за умов підтримання в них потенціалу. Навантаження органел флуоресцентним барвником Fluo-4 AM (2,5 мкмоль/л) проводили при 26°C протягом 30 хв. За цих умов підтримувався достатньо високий рівень мітохондріального потенціалу, що необхідно для функціонування кальційтранспортувальної системи органел. Встановлено, що мітохондрії мають обмежену здатність накопичувати іонізованій кальції, оскільки внесення у суспензію  $\text{Ca}^{2+}$  у концентраціях 10, 20, 50 мкмоль/л забезпечувало певний рівень його акумуляції в органелах з подальшим припиненням зростання флуоресцентного сигналу. Навантаження мітохондрій кальцієм у концентрації 100 мкмоль/л призвело до суттєвого зростання інтенсивності флуоресценції (на 46% на 5-й хвилині порівняно з флуоресценцією при внесенні 20 мкмоль/л) і, ймовірно, до активації процесів вивільнення катіона. Використання неспецифічного інгібітора  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера рутенію червоного ( $10^{-5}$  моль/л) на тлі дії 100 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  попереджало його накопичення в органелах на 89%. Показано, що для акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріям серця необхідний комплекс  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ (3 мкмоль/л), ймовірно для підтримання потенціалу на внутрішній мембрані, збереження активності уніпортера і енергозалежних процесів в органелах. Отже, процес акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях серця щурів відбувається головним чином за умов функціонування мітохондріального уніпортера та підтримання потенціалу в органелах, залежить від концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  і наявності комплексу  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ.*

*Ключові слова: ізольовані мітохондрії; серце;  $\text{Ca}^{2+}$ ; протокова цитофлуориметрія; флуоресцентний зонд Fluo-4 AM.*

## ВСТУП

Мітохондрії – субклітинні органели, які відіграють істотну роль у регуляції життя та смерті клітини. З одного боку, вони забезпечують енергетичний метаболізм клітин, оскільки є основними постачальниками аденозинтрифосфату (АТФ) [1, 2]. Зокрема, у кардіоміоцитах мітохондрії займають 35% об'єму клітини і продукують 90 % енергії у вигляді АТФ, яка потрібна для роботи серцевого м'яза [2, 3]. Під час окисного фосфорилування органела генерує мітохондріальний потенціал за допомогою транспортування протонів з матриксу у міжмембранний простір, що є рушійною силою для АТФ-синтази [1]. З іншого боку, дуже важлива участь мітохондрій у процесі запрограмованої клітинної смерті, тому що вони

© А.Ю. Будько, Н.А. Струтинська, І.Ю. Охай, О.М. Семенихіна, В.Ф. Сагач

відповідають за вихід цитохрому c і протеїнів, які індукують апоптоз, а також протеїнів, котрі нейтралізують ендогенні інгібітори апоптозу (SMAC/DIABLO) та містять фактор індукції апоптозу [4].

Відомо, що мітохондрії разом з ендоплазматичним ретикулумом є внутрішньоклітинними депо кальцію, які потрібні для миттєвої регуляції цитоплазматичного його вмісту у м'язових клітинах [5]. Більше того,  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях стимулює окисне фосфорилування. Цей процес відбувається на декількох рівнях, що включає алостеричну активацію піруват-, ізоцитрат- та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназ, а також стимуляцію АТФ-синтази,  $\alpha$ -глицеролфосфатдегідрогенази і аденіннуклеотид-трансферази (АНТ) [6]. Загалом, зростання вмісту внутрішньомітохондріального каль-

цію активує роботу електронно-транспортного ланцюга і, як наслідок, утворення АТФ [3]. Наприклад,  $\beta$ -адренергічна стимуляція кардіоміоцитів потребує посилення скорочення серцевого м'яза. Підвищення вмісту кальцію в мітохондріях забезпечує утворення потрібної кількості АТФ для збільшення сили скорочення органа [7].

Перевантаження мітохондрій кальцієм призводить до формування неспецифічної мітохондріальної пори перемінної проникності (МП) [8]. Вона описана близько 35 років тому Хавортом і Хантером як сукупність протеїнів внутрішньої та зовнішньої мембран, що формують великий канал, проникний для молекул масою до 1500 Да. МП активується кальцієм у високих концентраціях та іншими стимулами, включаючи оксиданти та нестачу аденілових нуклеотидів. Її інгібування відбувається за низького рівня рН, такими антиоксидантами, як відновлений глутатіон, мелатонін, коензим Q, а також імунодепресантом циклоспорином А, який зв'язується зі структурним компонентом МП циклофіліном Д [7, 9, 10]. Відкриття МП призводить до вивільнення цитохрому *c* з органел, що є основним пусковим механізмом розвитку апоптозу. Якщо ж у клітині недостатньо АТФ – розвивається некроз [8]. Тобто дисфункція мітохондрій внаслідок утворення МП – один з найважливіших чинників патологічних станів серця, а її фармакологічне інгібування відіграє кардіопротекторну роль. Отже, ефекти іонів Са в мітохондріях залежать від їх концентрації. Так, у низьких концентраціях вони активують дихальний ланцюг, збільшуючи синтез АТФ, а у високих – призводять до утворення МП і, як наслідок до загибелі кардіоміоцитів. Нині кальційакумуляційна здатність ізольованих мітохондрій клітин серця недостатньо вивчена. Для нас надзвичайно важливо було дослідити накопичення кальцію мітохондріями за фізіологічних умов, коли підтримується мітохондріальний потенціал а також за дії високих позамітохондріальних концентрацій іона.

Наразі для дослідження вмісту кальцію у мітохондріях та його внутрішньоклітинного обміну застосовують різні методи, зокрема  $\text{Ca}^{2+}$ -селективні електроди, ізотопну техніку ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ), двопроменеву спектрофлуориметрію з використанням кальційчутливих металохромних барвників (арсеназо), конфокальну мікроскопію, де як зонди є біоломінесцентні акварини, флуоресцентні протеїни та низькомолекулярні кальційфлуоресцентні індикатори [11]. У сучасній літературі [11 – 14] доводиться можливість використання протокової цитофлуориметрії для дослідження метаболізму кальцію в ізольованих мітохондріях.

Мета нашої роботи – дослідження акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях серця щурів за умов підтримання мітохондріального потенціалу та дії фізіологічних і високих концентрацій позамітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  з використанням методу протокової цитофлуориметрії.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 220 – 250 г) щурах лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. При дослідженні враховано міжнародні принципи Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Мітохондрії серця виділяли методом диференційного центрифугування в нашій модифікації [15]. Для проведення досліджень було використано три середовища: виділення, зберігання (ресуспендування) та інкубації. Серця ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином КСІ (2 – 4°C), подрібнювали та гомогенізували у 9-кратному об'ємі середовища виділення (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСІ – 25, ЕГТА – 1; рН 7,2 – 7,4. Гомогенат центрифугували при 700g 8 хв (4°C). Супернатант повторно центрифугували при 11000g 16 хв (4°C). Отриманий

осад (мітохондріальна фракція) ресуспендували в середовищі зберігання, яке містило (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСІ – 25; рН 7,2 – 7,4, і одразу використовували в дослідах. Одержану суспензію мітохондрій зберігали на льоду. Концентрацію в ній білка визначали за методом Лоурі [16]. Вміст білка в пробі становив 50 мкг/мл.

Для дослідження акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями, органели навантажували флуоресцентним зондом Fluo-4 АМ у концентрації 2,5 мкмоль/л протягом 30 хв при 37, 26 і 22°C. Цей барвник використовується у вигляді ацетоксиметильного естеру, незарядженої сполуки, що вільно проникає у клітини, а у нашому випадку – мітохондрії, де потім неспецифічні естерази розщеплюють складнофірні зв'язки, перетворюючи його в заряджену кислотну форму зонда, який не може вийти з місця локалізації. Збудження Fluo-4 АМ відбувається за довжини хвилі 488 нм, що дає змогу використовувати його на приладах, обладнаних аргонним лазером, а інтенсивність флуоресценції зростає у відповідь на зв'язування з  $\text{Ca}^{2+}$ . Для покращення процесу навантаження барвник змішували з Pluronic F-127 (0,02%-й), як описано у протоколі навантаження для Fluo-3 АМ [11]. Виміри здійснювали у середовищі інкубації з наступним складом (ммоль/л): КСІ – 120;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3; тріс-НСІ – 25; сукцинат Na – 5, 0,1%-й бичачий сироватковий альбумін (БСА). Вимірювання флуоресценції проводили до внесення розчину  $\text{CaCl}_2$  у середовище інкубації (вихідні значення) і після – на 1, 3, 5, 7, 9, 11 та 23-й хвилині. Отримані результати представлено в умовних одиницях інтенсивності флуоресценції.

Накопичення кальцію мітохондріями реєстрували на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XL<sup>TM</sup> («Beckman Coulter», США) з аргонним лазером, який дає змогу якісно та кількісно досліджувати біологічні і фізичні властивості клітин і субклітинних структур. Створений робочий протокол містив логічне обмеження для

реєстрації зразків за прямим та бічним світлорозсіюванням. Аналіз проб припиняли за умови реєстрації 10 000 подій в обмеженій ділянці.

Для дослідження мітохондріального потенціалу методом, запропонованим Брандом, органели інкубували в середовищі, що містило (ммоль/л): КСІ – 120, тріс-НСІ – 25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3, 5% знежиреного БСА; рН 7,2 – 7,4 [17]. У герметичну термостатовану камеру (37°C), обладнану ТРМР-селективним електродом (від англ. triphenylmethylphosphonium sensitive electrode) і електродом Кларка, вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Роботу першого комплексу дихального ланцюга блокували ротеноном ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л), а АТФ-синтази – олігоміцином ( $10^{-7}$  моль/л). Для ініціації дихання вносили сукцинат натрію (5 ммоль/л). Поглинання кисню суспензією мітохондрій реєстрували за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk 2 (Данія), а зміни концентрації ТРМР – рН-метра РР-25 «Sartorius» (Німеччина). Мембранний потенціал мітохондрій розраховували за рівнянням Нернста, приймаючи значення внутрішнього об'єму мітохондрій за 0,65 мкл/мг білка [18].

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програм MS Excel, OriginPro 7.5., FCS Express.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Створений попередньо робочий протокол [11, 12] дав змогу здійснювати дослідження в ділянці, де 95 % подій, які реєстрував прилад були мітохондріального походження (рис. 1, а). Для цього було введено два «логічних обмеження» для відокремлення лише сигналу з мітохондрій, оскільки суспензія органел могла містити немітохондріальні домішки. Введення першого «логічного обмеження» – за показником прямого світлорозсіювання (вісь абсцис – FS Log) проти бічного світлорозсіювання (вісь ординат – SS Log) дало можливість не реєструвати ушкоджені клітинні структури під час дослідження.

Друге «логічне обмеження» було застосовано за параметром флуоресцентного сигналу від акридин-оранж-10-ноніл бромід-позитивних частинок (NAO-позитивних). Використання NAO у концентрації 100 нмоль/л дає змогу виявити саме мітохондріальний сигнал, оскільки барвник зв'язується з кардіоліпіном – специфічним фосфоліпідом внутрішньої мембрани мітохондрій. Наявність флуоресцентного сигналу (див. рис. 1, б, крива 1) свідчить про зв'язування барвника з вільним  $\text{Ca}^{2+}$  у матриці мітохондрій, а його зміщення вправо (див. рис. 1, б, крива 2) – про акумуляцію іонів ізольованими мітохондріями. У літературі описано, що навантаження клітин зондом у концентрації 2 – 10 мкмоль/л може здійснюватися протягом 30 – 45 хв при 4, 22, 30 або 37°C. [13]. Оскільки об'єктом нашого дослідження є мітохондрії кардіоміоцитів ми намагалися підібрати оптимальні умови навантаження Fluo-4 АМ. Використовували барвник у концентрації 2,5 мкмоль/л протягом 30 хв за різних температур, зокрема 37, 26 і 22°C. Високу інтенсивність сигналу флуоресцентного зонда в енергізованих мітохондріях реєстрували за наявності іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у разі навантаження мітохондрій маркером протягом 30 хв при 26°C (рис. 2, різниця між

групами на кожній хвилині, починаючи з 3-ї, є вірогідною).

При навантаженні мітохондрій зондом протягом 30 хв при 37°C інтенсивність флуоресценції на 5-й хвилині була нижчою на 72% порівняно зі значеннями в цей час при 26°C (див. рис. 2). Зменшення температури навантаження до 22°C знижувало інтенсивність флуоресценції, ймовірно, внаслідок зменшення активності роботи внутрішньомітохондріальних естераз, які перетворюють зонд в активну форму, і в результаті відсутності достатньої кількості барвника в органелах.

Оскільки основним шляхом надходження кальцію у мітохондрії є мітохондріальний кальцієвий уніпортер (МКУ), робота якого залежить від потенціалу на внутрішній мембрані органел, ми припустили, що зниження акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями, які навантажувалися барвником при 37°C може бути пов'язане з деполяризацією їхньої мембрани під час такого режиму. Адже відомо, що деполяризація мітохондріальної мембрани роз'єднувачами FCCP, CCCP окремо або в комбінації з інгібітором  $\text{F}_1\text{F}_0$  АТФ-синтази олігоміцином призводить до інгібування входу  $\text{Ca}^{2+}$  через уніпортер внаслідок елімінації електричної рушійної сили (потенціалу) [8].

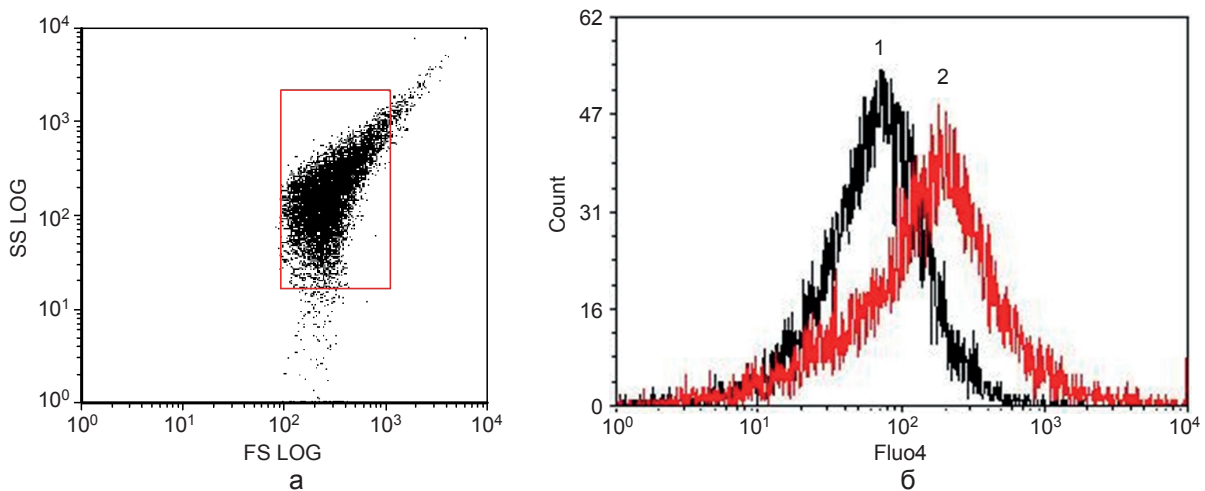


Рис. 1. Характеристика препарату мітохондрій на протоковому цитофлуориметрі: а – виділена ділянка дослідження; б – типові криві накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями кардіоміоцитів (1 – контроль; 2 – дія  $\text{Ca}^{2+}$  у концентрації 100 мкмоль/л); за віссю абсцис – інтенсивність флуоресценції, за віссю ординат – кількість подій, зареєстрованих приладом

Тому ми дослідили мембранний потенціал ізольованих мітохондрій серця щурів і, як видно з рис. 3, він знижується після 30-хвилинної інкубації як при 26°C, так і 37°C. Проте зниження за вищої температури є більш значним і становить 65 мВ порівняно з рівнем потенціалу при інкубації за нижчої температури (різниця становить 27 мВ), що й зумовлює зниження накопичення кальцію органелами.

Тобто ми припускаємо, що зменшення інтенсивності флуоресценції в мітохондріях, які навантажувалися флуоресцентним зондом протягом 30 хв при 37°C, пов'язане зі зниженням мітохондріального потенціалу і погіршенням Ca<sup>2+</sup>-транспортувальної здатності уніпортера. Спираючись на дані літератури та на отримані результати, навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2,5 мкмоль/л у наступних експериментах проводили при 26°C протягом 30 хв.

Відомо, що мітохондріальний уніпортер регулюється низкою інгібіторів і активаторів. Найбільш відомими інгібіторами МКУ є сполуки рутенію, зокрема рутеній червоний

(RuRed) та Ru360. У дослідженні було використано рутеній червоний – гексавалентний полікатионний барвник, неспецифічний інгібітор входу кальцію у мітохондрії у концентрації 10<sup>-5</sup> моль/л. Ця сполука попереджає вхід катіона через МКУ, ріанодинові рецептори та швидкий режим входу Ca<sup>2+</sup> (від англ. rapid uptake mode, RaM) [20]. На рис. 4. представлено криві накопичення Ca<sup>2+</sup> у концентрації 100 мкмоль/л, без впливу інгібітора (крива 1) та під час інкубації мітохондрій протягом 3 хв з вищезазначеним інгібітором (крива 2). Чітко видно, що за попередньої дії інгібітора входу Ca<sup>2+</sup>, інтенсивність флуоресценції знижується на 5-й хвилині на 89%, що свідчить про відсутність акумуляції іонів кальцію ізольованими органелами.

Ми також встановили, що накопичення Ca<sup>2+</sup> мітохондріями клітин серця відбувається за наявності комплексу Mg<sup>2+</sup>-АТФ у концентрації 3 ммоль/л (див. рис. 4). У 2007 р. на ізольованих мітохондріях клітин гладеньких м'язів матки було показано, що відсутність у середовищі інкубації мітохондрій MgCl<sub>2</sub> і АТФ під час внесення 100 мкмоль/л Ca<sup>2+</sup>

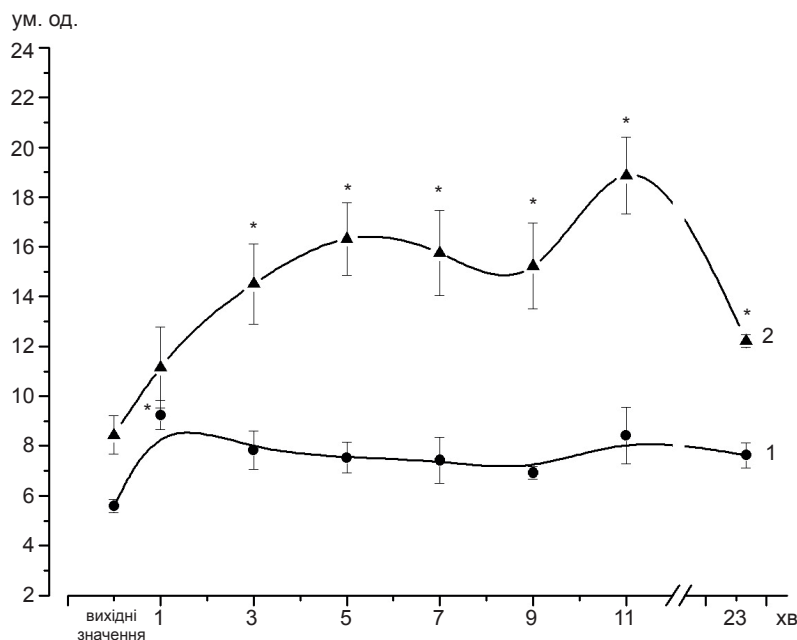


Рис. 2. Зміна інтенсивності флуоресценції кальційчутливого зонду Fluo-4 AM у мітохондріях серця щурів за умов наявності у середовищі інкубації Ca<sup>2+</sup> (100 мкмоль/л) і комплексу Mg<sup>2+</sup>-АТФ (3 ммоль/л). Навантаження зондом відбувалося протягом 30 хв: 1 – при 37°C (n=5); 2 – при 26°C (n=15). \*P<0,05 відносно вихідного значення

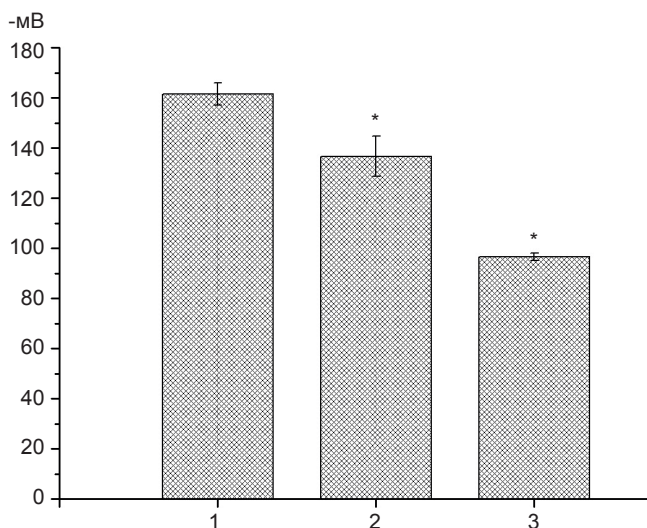


Рис. 3. Вплив температури на потенціал мітохондрій, інкубованих протягом 20 хв на льоду (1 – контроль); 30 хв при 26°C (2); 30 хв при 37°C (3). \* $P < 0,05$  відносно контролю (n=5)

спричиняє деполаризацію мітохондріальної мембрани, що призводить до нездатності мітохондріями акумулювати  $\text{Ca}^{2+}$  [11, 12]. Слід відмітити, що інтенсивність флуоресценції зонда Fluo-4 AM вища, якщо в середовищі інкубації містяться вищезгадані

субстрати (див. рис. 4, крива 1). У наших умовах дослідження за відсутності комплексу  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях не спостерігалася (див. рис. 4., крива 3), що свідчить про енергозалежність цього процесу. Отже, для акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях кар-

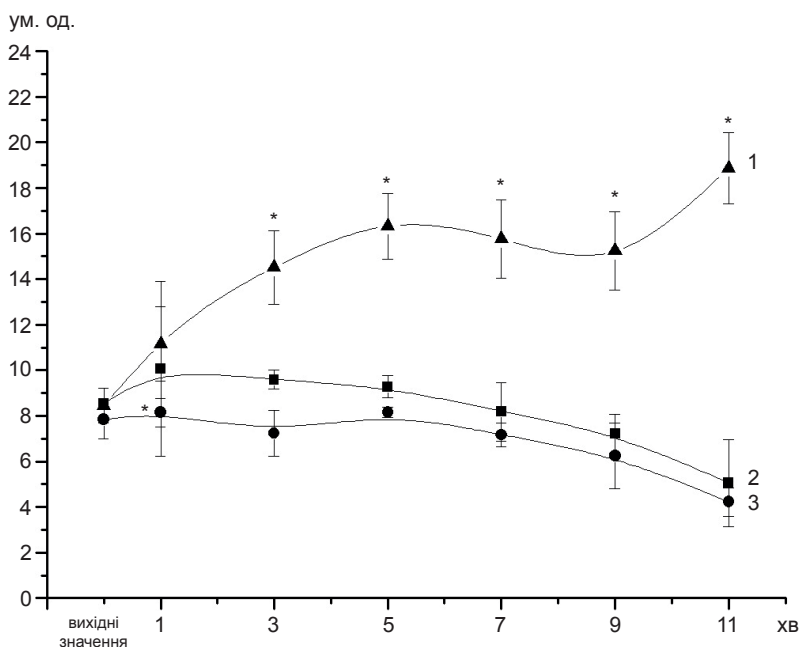


Рис. 4. Зміна інтенсивності флуоресценції зонду Fluo-4 AM у мітохондріях серця щурів за наявності в середовищі інкубації 100 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ : 1 – преінкубація з  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ (3 ммоль/л), дія  $\text{Ca}^{2+}$  (n=15); 2 – преінкубація 3 хв з рутенієм червоним ( $10^{-5}$  моль/л), дія  $\text{Ca}^{2+}$  (n=5); 3 – дія  $\text{Ca}^{2+}$  за відсутності  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ у середовищі (n=5). \* $P < 0,05$  відносно вихідного значення

діоміоцитів необхідні сполуки  $Mg^{2+}$  і АТФ.

З даних літератури відомо, що концентрація вільного кальцію в умовах спокою в мітохондріях і цитоплазмі кардіоміоцитів становить близько 100 нмоль/л [5, 21]. При цьому у саркоплазматичному ретикулумі вона набагато більша, 500 мкмоль/л, і майже сягає концентрації іона у міжклітинному просторі (близько 1 ммоль/л).

У середовищі без додавання кальцію відбувалося незначне зниження флуоресцентного сигналу з часом, що може свідчити про вивільнення внутрішньомітохондріального  $Ca^{2+}$  через  $Ca^{2+}$ - $H^{+}$  обмінник (рис. 5). Очевидно, що мітохондрії мають обмежену здатність накопичувати іонізований кальцій, оскільки додаючи його у таких концентраціях як 10, 20 і 50 мкмоль/л, спостерігали уповільнення процесу акумуляції іонів і вихід кривої на плато. Ми припускаємо, що при цьому функціонування кальційтранспортальної системи мітохондрій відбувається за фізіологічних умов, а максимальна амплітуда накопичення іона, що визначає кальційакумулявальну здатність мітохондрій, може бути показником їх інтактності. Навантаження мітохондрій кальцієм у концентрації 100 мкмоль/л призводило до суттєвого зростання інтенсивності флуоресценції (на 46% на 5-й хвилині

порівняно з флуоресценцією при внесенні 20 мкмоль/л  $Ca^{2+}$ ) і викликало нерівномірну динаміку його накопичення в органелах. Існує два піки акумуляції іонів  $Ca^{2+}$  (див. рис. 5, а, крива 2). Наступне зниження кальційакумулявальної здатності мітохондрій за умов наявності кальцію в інкубаційному середовищі у високих концентраціях, ймовірно, може свідчити про активацію процесів вивільнення іона (I пік) чи пошкодження мітохондріальних мембран (II пік), можливо, внаслідок відкриття неспецифічної високопровідної МП. На рис. 5, б. представлено концентраційну залежність дії  $Ca^{2+}$  на 5-й хвилині реєстрації інтенсивності флуоресцентного сигналу. Найвищу інтенсивність флуоресценції спостерігали при додаванні  $Ca^{2+}$  у концентрації 100 мкмоль/л, що вказує про посилення накопичення катіона мітохондріями.

Таким чином, в нашій роботі була ідентифікована кальційакумулявальна здатність ізольованих мітохондрій серця дорослих щурів і досліджені деякі її властивості за фізіологічних умов та у разі навантаження високими концентраціями іонів кальцію, які призводять до дисфункції мітохондрій. Продемонстровано можливість застосування методу протокової цитофлуориметрії для вивчення кальцієвого гомеостазу ізольованих

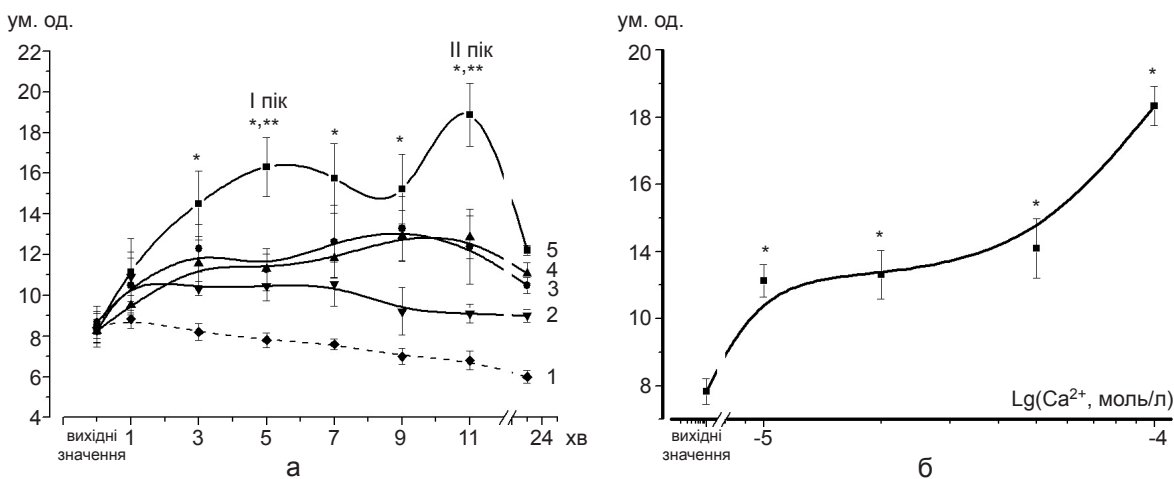


Рис. 5. Акумуляція  $Ca^{2+}$  у різних концентраціях мітохондріями серця щурів: а – дія  $Ca^{2+}$  у концентрації 10, 20, 50 і 100 мкмоль/л (криві 2, 3, 4 і 5),  $n=6, 6, 8, 15$  відповідно; крива 1 – флуоресцентний сигнал у розчині без додавання  $Ca^{2+}$ ; б – концентраційна залежність дії  $Ca^{2+}$  на 5-й хвилині реєстрації інтенсивності флуоресцентного сигналу. \* $P<0,05$  відносно вихідного значення, \*\* $P<0,05$  відносно значення на тій самій хвилині при дії 20 мкмоль/л  $Ca^{2+}$

мітохондрій кардіоміоцитів і встановлено оптимальні умови процесу акумуляції, а саме залежність від температури інкубації, коли підтримується мітохондріальний потенціал і наявності субстрату комплексу  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ а також сукцинату. З'ясовано, що накопичення іонів кальцію чутливе до інгібітора МКУ – рутенію червоного, що свідчить про основну роль цієї транспортальної системи в процесі акумуляції. Нами показано, що ізольовані мітохондрії серця мають обмежену здатність накопичувати кальцій.

Отже, висвітлені питання створюють підґрунтя для проведення наукових досліджень, які будуть актуальними насамперед для з'ясування молекулярних механізмів регуляції і підтримання кальцієвого гомеостазу в мітохондріях, що необхідно для запобігання дисфункції мітохондрій серця за умов ішемії-реперфузії та різних патологічних станів організму.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що навантаження ізольованих органел флуоресцентним барвником Fluo-4 AM (2,5 мкмоль/л) оптимально здійснювати при  $26^\circ\text{C}$  протягом 30 хв. За цих умов підтримуються достатньо високі значення мітохондріального потенціалу, що необхідно для функціонування кальцієвого уніпортера.

2. Інкубація ізольованих мітохондрій кардіоміоцитів з неспецифічним інгібітором мітохондріального кальцієвого уніпортера – рутенієм червоним ( $10^{-5}$  моль/л) на тлі дії 100 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  призводила до зниження інтенсивності флуоресцентного сигналу зонда на 89%, що вказує на запобігання акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями кардіоміоцитів.

3. Встановлена енергозалежність кальційакумуляційної системи мітохондрій серця щурів, оскільки накопичення іонів кальцію не спостерігалось за відсутності комплексу  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ.

4. Внесення кальцію у концентраціях 10, 20 і 50 мкмоль/л дало можливість показати дозозалежність процесу акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ , а також обмежену здатність його накопичувати.

Натомість навантаження мітохондрій кальцієм у концентрації 100 мкмоль/л призводило до суттєвого зростання інтенсивності флуоресценції і, ймовірно, до активації процесів вивільнення катіона з органел.

*Автори статті висловлюють щире подяку колегам з Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Даниловичу Ю.В., Данилович Г.В., Чуніхіну О.Ю. та Костеріну С.О. за допомогу у виконанні роботи.*

**А.Ю. Будько, Н.А. Струтинская, И.Ю. Охай, Е.Н. Семенихина, В.Ф. Сагач**

## АККУМУЛЯЦІЯ $\text{Ca}^{2+}$ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОДДЕРЖАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА

Исследовали накопление разных концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  в изолированных митохондриях сердца крыс в условиях поддержания митохондриального потенциала. Нагрузку органелл проводили при  $26^\circ\text{C}$  в течение 30 мин флуоресцентным красителем Fluo-4 AM (2,5 мкмоль/л). В этих условиях поддерживался достаточно высокий уровень митохондриального потенциала, что необходимо для функционирования кальцийтранспортирующей системы органелл. Показано, что изолированные митохондрии имеют ограниченную способность накапливать ионизированный кальций, поскольку внесение ионов в концентрациях 10, 20, 50 мкмоль/л обеспечивало определенный уровень его аккумуляции в органеллах с последующим прекращением увеличения флуоресцентного сигнала. Использование неспецифического ингибитора митохондриального уніпортера рутенія красного ( $10^{-5}$  моль/л) на фоне действия 100 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  предупреждало накопление катиона в органеллах на 89%. Показано, что аккумуляция  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями сердца происходит в присутствии комплекса  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ (3 ммоль/л), вероятно для поддержания потенциала на внутренней мембране, сохранения активности уніпортера и энергозависимых процессов в органеллах. Нагрузка митохондрій кальцієм у концентрації 100 мкмоль/л приводила к существенному росту интенсивности флуоресценции (на 46% на 5-й минуте по сравнению с флуоресценцией при внесении 20 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ ) и вероятно к активации процессов высвобождения катиона. Следовательно, процесс аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях сердца крыс происходит главным образом в условиях функционирования митохондриального уніпортера и поддержания потенциала в органеллах, зависит от концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  и присутствия комплекса  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ.

Ключевые слова: изолированные митохондрии; сердце;  $\text{Ca}^{2+}$ ; проточная цитофлуориметрия; флуоресцентный зонд Fluo-4 AM.



**A.Yu. Budko, N.A. Strutyńska, I.Yu. Okhay, O.M. Semenykhina, V.F. Sagach**

**Ca<sup>2+</sup> ACCUMULATION IN ISOLATED RAT HEART MITOCHONDRIA UNDER MAINTENANCE OF MITOCHONDRIAL POTENTIAL**

It is known that mitochondria can accumulate calcium, which regulates energy metabolism and cell death. About 90% of energy of cardiomyocytes is synthesized in mitochondria. Heart cells are also affected by the rapid changes in the Ca<sup>2+</sup> concentration in the cytoplasm. Therefore, mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-accumulation ability is crucial. The aim of our work was to study the accumulation of Ca<sup>2+</sup> in isolated rat heart mitochondria in the presence of mitochondrial potential and different extramitochondrial Ca<sup>2+</sup> concentrations. Isolated organelles were loaded with fluorescent dye Fluo-4 AM (2,5 μmol/l) at a temperature of 26°C for 30 min. It has been revealed that under these conditions high mitochondrial potential was maintained sufficiently, which is necessary for the functioning of the calcium transporting system in organelles. We established that mitochondria have a limited ability to store ionized calcium, as addition of Ca<sup>2+</sup> ion in concentrations of 10, 20, 50 μmol/l ensures a certain level of accumulation in organelles with further fluorescent signal growth cessation. Addition of 100 μmol/l Ca<sup>2+</sup> to isolated mitochondria resulted in a significant increase in fluorescence intensity (46% in the fifth minute, compared to the fluorescence when 20 μmol/l Ca<sup>2+</sup> was added) and likely to activation of cation release. It was shown that ruthenium red (10<sup>-5</sup> mol/l), an inhibitor of Ca<sup>2+</sup>-uniporter, prevented accumulation of calcium ions in organelles by 89%, in the presence of 100 μmol/l Ca<sup>2+</sup>. It was clearly seen that heart mitochondria require Mg<sup>2+</sup>-ATP complex (3 mmol/l) to accumulate Ca<sup>2+</sup>, likely to maintain the inner membrane potential, activity of Ca<sup>2+</sup> uniporter and energetic processes in organelles. Thus, the process of Ca<sup>2+</sup> accumulation in rat heart mitochondria requires the maintenance of mitochondrial potential, activity of Ca<sup>2+</sup>-uniporter, depends on extramitochondrial Ca<sup>2+</sup> concentration and presence of Mg<sup>2+</sup>-ATP complex.

Key words: isolated mitochondria; heart; Ca<sup>2+</sup>; flow cytometry; fluorescence probe Fluo-4 AM.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

**REFERENCES**

1. Garlid KD, Costa AD, Quinlan CL, Pierre SV, Santos PD. Cardioprotective Signaling to Mitochondria. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 46:858-66.
2. Javadov S, Karmazyn M, Escobales N. Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as a Promising Therapeutic Target in Cardiac Diseases. *J Pharmacol and Exp Therap.* 2009; 330(3):670-8.
3. Dedkova EN, Blatter LA. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *J Mol and Cell Cardiol.* 2012; 52:48-61.
4. Frasier ChR. The role of cardiac mitochondria in myocardial ischemia/reperfusion injury [dissertation]. East

- Carolina University; 2012.
5. Boyman L, Chikando AC, Williams GSB, Khairallah RJ, Kettlewell S, Ward ChW, Smith GL, Kao JPY, Lederer WJ. Calcium Movement in Cardiac Mitochondria. *Bio-physical J.* 2014; 107:1289-1301.
6. Glancy B, Balaban RS. Role of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the Regulation of Cellular Energetics. *Biochemistry.* 2012; 51:2959-73.
7. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *AJP-Cell Physiol.* 2004; 287:817-33.
8. Dedkova EN, Blatter LA. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and the heart. *Cell Calcium.* 2008; 44:77-91.
9. Akopova OV. The role of permeability transition pore in transmembrane Ca<sup>2+</sup>-exchange in mitochondria. *Ukr Biochem J.* 2008; 80(3):40-7 [Ukrainian].
10. Strutyńska NA, Timoshchuk SV, Vavilova GL, Kotsuruba AV, Sagach VF. Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening to Ca<sup>2+</sup> in old rat heart under activation of biosynthesis of coenzyme Q. *Fiziol Zh.* 2009; 55(3):44-54 [Ukrainian].
11. Kolomiets OV, Danylovych YuV, Danylovych GV, Kosterin SO. Ca<sup>2+</sup> accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4AM. *Ukr Biochem J.* 2013; 85(4):30-9 [Ukrainian].
12. Babich LG, Shlykov SG, Naumova NV, Kosterin SO. Investigation of Ca<sup>2+</sup>-induced changes of membrane potential of smooth muscle mitochondria using flow cytometric analysis. *Ukr Biochem J.* 2007; 79(6):34-41 [Ukrainian].
13. Babich LG, Shlykov SG, Naumova NV, Kosterin SO. Use of flow cytometry method to determine Ca<sup>2+</sup> content in mitochondria and influence of calmodulin antagonists on it. *Ukr Biochem J.* 2008; 80(4):51-8 [Ukrainian].
14. Zalessky VN. Molecular diagnostics: laser-scanning and flow cytometry in the analysis of apoptosis. *Ukr Med Chasopys.* 2010; 78(4):27-31 [Ukrainian].
15. Sagach VF, Vavilova GL, Strutyńska NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inductors in rat heart. *Fiziol Zh.* 2004; 50(2): 49-63 [Ukrainian].
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; (1):265-75.
17. Brand MD, Brown GC, Cooper CE, Editors. *Bioenergetics: a practical approach.* Oxford.: IRL Press. 1995; 39–62.
18. Borutaite V, Mildaziene V, Brown GC, Brand MD. Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia? *Biochim and Biophys Acta.* 1995; (1272):154-8.
19. Jean-Quartier C, Bondarenko AI, Alam MR, Trenker M, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF. Studying mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake – a revisit. *Mol and Cell Endocrinol.* 2012; 353:114-127.
20. Szabadkai G, Duchon MR. Mitochondria: The Hub of Cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Physiology.* 2008; 23:84-94.
21. Dedkova EN, Blatter LA. Calcium signaling in cardiac mitochondria. *J Mol and Cell Cardiol.* 2013; 58:125-33.

*Матеріал надійшов до редакції 03.08.2015*