

Вплив іонів кальцію на дихальний ланцюг мітохондрій у серці старих щурів

А.Ю. Лучкова, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач

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

Досліджували показники мітохондріального дихання у серці старих щурів при використанні субстратів для I і II комплексу дихального ланцюга – глутамату та сукцинату відповідно, а також залежність цього процесу від концентрації іонів кальцію. Показано, що динаміка входу Ca^{2+} в мітохондрії старих тварин відрізнялася від такої у дорослих контрольних щурів, а максимальна флуоресценція кальційчутливого барвника Fluo-4 AM в органелах при дії катіона (100 мкмоль/л) спостерігалася на 3-й хвилині і була на 27 % вищою, ніж у контролі. Отже, в старих щурів виявили більш різке підвищення вмісту внутрішньомітохондріального кальцію. Незважаючи на те, що показник вільного дихання V_2 за Чансом у 24-місячних щурів помірно зростав (з використанням сукцинату) або не відрізнявся від такого у дорослих тварин (з використанням глутамату), швидкість АДФ-стимульованого дихання знижувалася, що призводило до зменшення показників дихального контролю (ДК) за Чансом та Ларді у 1,18 та 1,6 рази (при окисненні сукцинату), а також у 1,18 та 1,4 рази (за наявності глутамату). Проте ефективність фосфорилування АТФ, що характеризується відношенням між синтезом АТФ та поглинанням кисню (АДФ/О) не змінювалася, як і не знижувалася швидкість його фосфорилування. Вплив іонів кальцію на процес мітохондріального дихання у дорослих щурів був дозозалежним. За низької концентрації катіона (10^{-7} моль/л) ДК за Ларді не змінювався, а показники ДК за Чансом та АДФ/О достовірно зростали, що свідчило про підвищення спряження процесів окиснення і фосфорилування. Водночас у мітохондріях серця старих щурів кальцій навіть у невисоких концентраціях (10^{-7} моль/л) достовірно не підвищував швидкість дихання та коефіцієнт АДФ/О. Іони у концентраціях 10^{-5} та 10^{-4} моль/л призводили до часткового зниження активності роботи дихального ланцюга у дорослих тварин, а також вірогідно знижували АДФ-стимульоване дихання, коефіцієнти ДК за Чансом та Ларді у старих щурів. При цьому АДФ/О та АДФ/Δt також мали тенденцію до зниження.

Ключові слова: мітохондрії; Ca^{2+} ; окисне фосфорилування; дихальний ланцюг; серце; старіння.

ВСТУП

Старіння характеризується прогресивною втратою функцій органами, що призводить до розвитку дегенеративних розладів та виникнення апоптозу в клітинах [1, 2]. Існує велика кількість даних, які підтверджують так звану мітохондріальну теорію старіння, розвинуту на основі окисної теорії [1-3]. Відповідно до неї рівень утворення активних форм кисню (АФК) підвищується з віком, внаслідок чого зростає ступінь пошкодження мітохондріальної ДНК та виникає дисфункція дихального ланцюга органел. Ці патологічні зміни стають взаємопов'язаними, утворюють цикл, який

© А.Ю. Лучкова, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач

призводить до прогресивного зниження мітохондріальних функцій, що негативно впливає на функціонування та життєздатність клітин [1].

Мітохондрії – незамінні органели, які забезпечують енергією проходження біохімічних реакцій та виконання органами власних функцій [4]. Відомо, що синтез АТФ асоціюється з утворенням АФК, головним чином, супероксидного аніон-радикала (I та III комплексами дихального ланцюга), який згодом, призводить до формування інших активних радикалів, таких як пероксинітрит, пероксид водню та високореактивний гідроксильний радикал [2]. Це відбувається за

фізіологічних умов та регулюється антиоксидантною системою захисту. Проте з віком рівень окисного стресу в клітинах зростає, як унаслідок посиленого утворення вільних радикалів, так і втрати антиоксидантними ферментами своєї активності. Також відомо, що при старінні в клітинах серця зменшується вміст цитохрому *c*, а окиснення жирних кислот знижується на 30% [1]. У разі порушення функціональної здатності мітохондрій, АТФ-синтаза починає гідролізувати АТФ, замість його синтезу, що призводить до виснаження енергії в клітинах та може спричинити їх загибель [5]. Окрім значного дисбалансу між синтезом АТФ та його використанням, змін у органелах (злиття, роз'єднання) та метаболізмі, які спостерігали при старінні, у мітохондріях кардіоміоцитів також порушується іонний гомеостаз [1]. Оскільки зниження концентрації АТФ призводить до погіршення роботи АТФ-залежних Ca^{2+} -транспортів саркоплазматичного ретикула (SERCA) та плазматичної мембрани, це сприяє підвищенню вмісту Ca^{2+} в цитопламі.

Важливе значення для клітин серця має здатність мітохондрій акумулювати кальцій для підтримання функціонування електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) та внутрішньоклітинного гомеостазу [2]. Таким чином зменшується концентрація цього катіона в цитоплазмі на період розслаблення серцевого м'язу, а також стимулюється окисне фосфорилування через активацію дегідрогеназ циклу Кребса та АТФ-синтази, α -гліцеролфосфатдегідрогенази і аденіннуклеотидтранслокази (АНТ). З іншого боку, перевантаження мітохондрій кальцієм призводить до деполяризації мембрани, зниження продукції АТФ, підвищення цитозольного вмісту НАДН, зниження активності білків-сиртуїнів та відкриття неспецифічної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори перемінної проникності (МП) [2].

Деякі суперечливими є дані щодо функціонування дихального ланцюга за умов фізіологічного старіння. Зокрема деякі до-

слідники стверджують, що незважаючи на прогресуюче окиснення ліпідів, активність комплексів ЕТЛ органел з віком не змінюється [1]. Інші науковці спостерігають зниження ефективності роботи дихального ланцюга у щурів у разі старіння [6]. Також раніше нами було показано, що з віком чутливість МП до кальцію зростає [7]. Проте механізми цього процесу, а також вплив кальцію на дихальний ланцюг мітохондрій серця старих щурів не були достатньо вивчені.

Мета нашої роботи – дослідження акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями серця, а також вивчення функціональних показників дихального ланцюга за умов дії екзогенного кальцію при старінні.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на дорослих (5-6 міс, 300-350 г) та старих (22-24 міс, 380-440 г) щурах лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Експериментальна частина роботи виконана з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються у дослідницьких цілях (Страсбург, 1986).

Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [7]. Після декапітації серце тварин ретельно промивали охолодженим 0,9 %-м розчином КСІ (2-4 °С), подрібнювали та гомогенізували у 9-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСІ – 25, ЕГТА – 1; рН 7,25. Гомогенат центрифугували двічі при 700 і 11000g (4 °С). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) ресуспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСІ – 25; рН 7,25, і одразу використовували в дослідях. Одержану суспензію мітохондрій зберігали при 2 °С. Концентрацію білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [8].

Для вивчення накопичення кальцію ізольованими мітохондріями їх навантажували

флуоресцентним зондом Fluo-4 AM (2,5 мкмоль/л) у середовищі з таким складом (ммоль/л): KCl – 120, KH_2PO_4 – 3, тріс-HCl – 25, сукцинат Na – 5, Mg^{2+} -АТФ – 3, 0,1 %-й бичачий сироватковий альбумін протягом 30 хв при 26 °C [9]. Під час проведення вимірювань у середовище додавали комплекс Mg^{2+} -АТФ для створення умов, за яких мембранний потенціал генерується також внаслідок гідролізу АТФ ферментом мітохондріальною АТФ-азою. Для покращення процесу навантаження барвник змішували з речовиною Pluronic F-127 (0,02 %-й) [10].

Реєстрацію акумуляції Ca^{2+} в органелах вивчали з використанням протокового цитофлуориметра («Bechman Coulter», США) з аргонним лазером. Створений робочий протокол містив логічне обмеження для реєстрації зразків за прямим та бічним світлорозсіюваннями. Аналіз проб припиняли за умови реєстрації 10000 подій в обмеженій ділянці. Вимірювання флуоресценції проводили до та після додавання CaCl_2 у різних концентраціях у середовище інкубації на 1, 3, 5, 7, 9, 11-й хвилинах.

Процеси мітохондріального дихання досліджували полярографічним методом з використанням закритого електрода Кларка за допомогою приладу «Oxygraph+» («Hansatech instruments», Великобританія). Функціональний стан мітохондрій визначали за показниками Чанса [11]. Середовище інкубації містило (ммоль/л): KCl – 120; KH_2PO_4 – 3; тріс-HCl – 25; рН 7,2. Як субстрати використовували сукцинат натрію (5 ммоль/л) та L-глутамат (5 ммоль/л). Дихання стимулювали додаванням до суспензії мітохондрій 200 мкмоль/л АДФ. При цьому розраховували: швидкість нестимульованого дихання (V_2), швидкість АДФ-стимульованого (V_3) та контрольованого дихання (V_4 ; за відсутності АДФ), дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4) та дихальний контроль за Ларді (V_3/V_2), коефіцієнт ефективності окисного фосфорилування (АДФ/О) та швидкість фосфорилування АДФ (АДФ/ Δt).

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програм Oxygraph+, MS Excel, OriginPro 7.5., Flowing software 2. В кожній серії експериментів було використано не менше ніж 5 тварин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для дослідження накопичення кальцію в мітохондріях серця старих щурів використовували розчин CaCl_2 у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} і 10^{-4} моль/л (рис.1). Виявлено, що динаміка акумуляції іона ізольованими мітохондріями серця старих щурів залежала від його вмісту у середовищі. Так, внесення Ca^{2+} у концентрації 10^{-7} моль/л лише незначно підвищувало флуоресценцію кальційчутливого барвника на 1-й хвилині. При збільшенні концентрації до 10^{-5} моль/л накопичення було поступовим з виходом на плато на 5-й хвилині. Додавання 100 мкмоль/л Ca^{2+} сприяло більш активній акумуляції катіона в органелах одразу з перших хвилин (максимум на 3-й хвилині) з подальшим зниженням флуоресценції, ймовірно через його вивільнення з органел внаслідок Ca^{2+} -індукованого відкриття МП (див. рис.1, крива 2, 3, 4). Було з'ясовано, що акумуляція цього катіона у дорослих тварин відбувалася поступово з максимумом на 9-й хвилині, тоді як у старих максимальна флуоресценція барвника спостерігалася вже на 3-й хвилині і була вищою на 27 %, ніж у вихідному стані.

Основним транспортером кальцію в мітохондрії є електрофоретичний кальцієвий уніпортер (МКУ), робота якого залежить від мембранного потенціалу органел, який у нормі становить -180 мВ [12]. Як свідчать дані літератури, активність його роботи підвищується внаслідок окиснення АФК, вміст яких, як відомо, при старінні зростає [13]. Можливо, це один з механізмів підвищеної акумуляції кальцію органелами старих тварин, що у свою чергу збільшує ризик перевантаження ним мітохондрій [13]. Отримані результати узгоджуються з даними наших попередніх

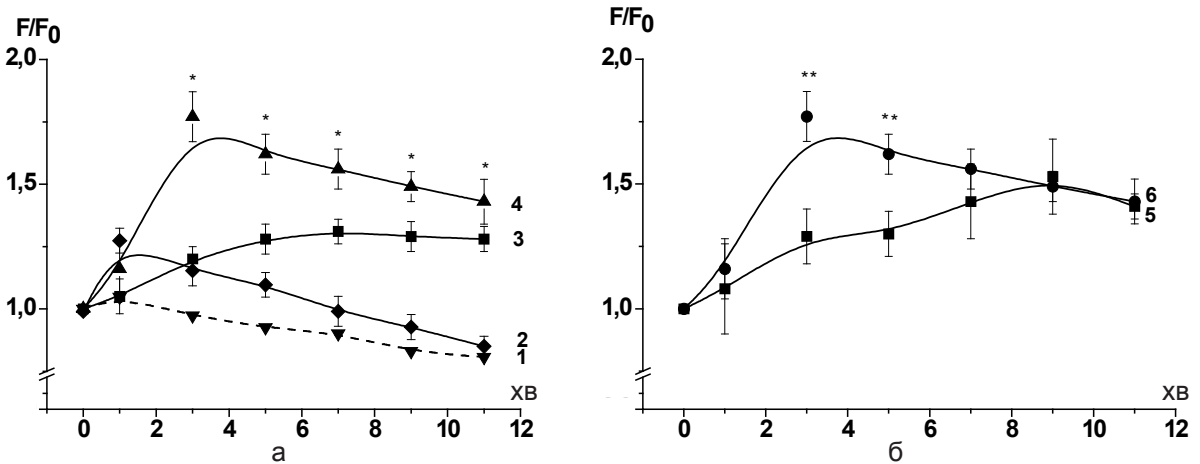


Рис. 1. Накопичення Ca^{2+} мітохондріями серця дорослих і старих щурів у середовищі з різними концентраціями катіона: а, 1 – за відсутності Ca^{2+} у середовищі, 2, 3, 4 – за наявності катіона у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} , і 10^{-4} моль/л відповідно, * $P \leq 0,05$ відносно значень у середовищі з 10^{-7} моль/л Ca^{2+} ; б, 5 – за наявності 10^{-4} моль/л Ca^{2+} у суспензії органел, виділеніх з серця дорослих щурів, 6 – старих щурів, ** $P \leq 0,05$ відносно значень у дорослих щурів

досліджень, де було показано підвищену чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у старих тварин [7]. Ймовірною причиною є посилений вхід катіона через МКУ і його підвищений вміст в матриксі.

Разом з тим невисокі концентрації Ca^{2+} потрібні для фізіологічного функціонування органел. Хоча найбільш активно вивченням біоенергетичних параметрів займалися протягом 60-70-х років ХХ століття, дещо суперечливими залишаються результати досліджень функціонального стану дихального ланцюга старих тварин. Було показано, що у тварин при старінні ці показники не зазнають істотних змін за винятком деяких у процесі окиснення жирних кислот [1]. Саме так можна пояснити адаптацію організму до процесу старіння на функціональному рівні. Інші ж дослідники підтверджують зниження ефективності роботи дихального ланцюга у щурів з віком у результаті зміни активності ферментів циклу Кребса [6]. Їхня робота при старінні змінюється в різних тканинах неоднаково, а часом і різноспрямовано. Такі відмінності в результатах можуть виникати внаслідок функціонального та топологічного диференціювання мітохондрій кардіоміоцитів, які, як відомо, поділяються на дві популяції:

субсарколемальних та інтерфібрилярних мітохондрій. Вважається, що функціональні характеристики дихального ланцюга перших не змінюються у старих тварин, тоді як у других спостерігається помітне зниження значень ДК та АДФ/О [14].

Також вважається, що відмінності у результатах дослідження мітохондріального дихання у щурів різного віку можуть залежати від субстрату, який використовували в експериментах. При окисненні сукцинату споживання кисню в серці старих тварин не відрізняється від такого у дорослих. Тому нами було використано два субстрати для активації першого та другого комплексів ЕТЛ незалежно один від одного. При вивченні показників мітохондріального дихання з використанням сукцинату як субстрату для комплексу II дихального ланцюга, показано, що швидкість споживання кисню у мітохондріях серця старих тварин у стані V_2 за Чансом підвищувалася у 1,16 раза. Проте швидкість АДФ-стимульованого дихання в органелах цих тварин мала тенденцію до зниження (рис. 2, а), а це, у свою чергу, призводило до достовірного зменшення показників дихального контролю за Чансом (V_3/V_4) у 1,18 раза та за Ларді (V_3/V_2) у 1,6 раза (рис. 3, а).

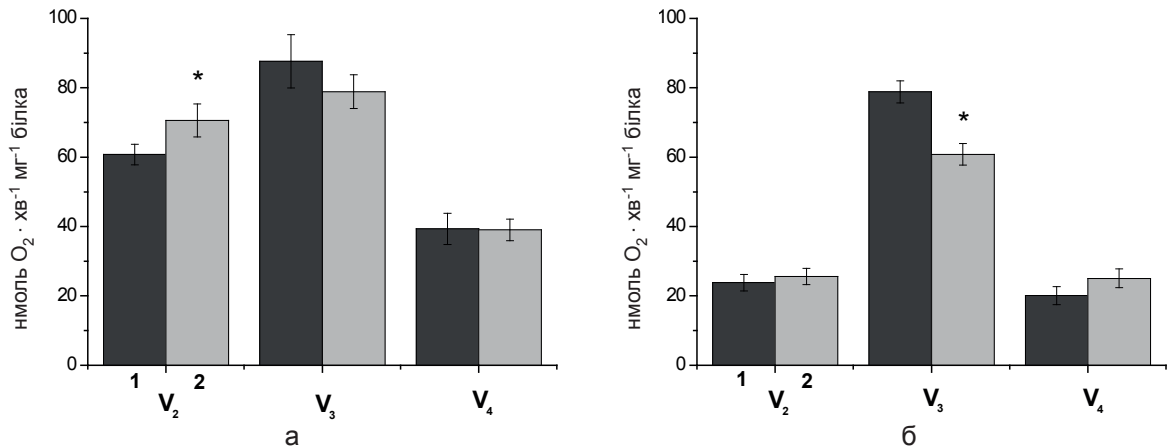


Рис. 2. Швидкість споживання кисню мітохондріями серця дорослих (1) і старих (2) шурів у станах V₂, V₃ та V₄ за Чансом, з використанням субстрату сукцинату (а) та глутамату (б). *P≤0,05 відносно значень у дорослих шурів

Дещо інші результати отримали, використовуючи НАД-залежний субстрат для стимуляції активності комплексу I дихального ланцюга – глутамат. Хоча показник V₂ був тотожним як у дорослих, так і старих шурів, достовірне зниження V₃ на 24 % з віком (див. рис. 2, б) призводило до помірного зменшення показника ДК як за Чансом (у 1,18 раза), так і за Ларді (у 1,4 раза; див. рис. 3,б). Зниження значень цих величин свідчить про порушення процесу спряження окиснення та фосфорилування, що пов'язано зі змінами транспорту електронів і протонів у дихальному ланцюзі. Це може бути зумовлено зниженням активності ферментів, що його формують, чи процесу переносу електронів

від субстратів окиснення внаслідок структурних змін у дихальному ланцюзі при старінні.

Результати цього дослідження вказують на те, що швидкість АДФ-стимульованого дихання незначно, проте все-таки змінюється з віком, ймовірно, внаслідок підвищення рівня окисного стресу. І цю різницю легше виявити, використовуючи субстрати для роботи I комплексу ЕТЛ. Оскільки, як свідчать дані літератури, вміст сукцинату при старінні зростає внаслідок помірних гіпоксичних умов, які встановлюються з віком [15]. Тому відбувається регуляторне репрограмування роботи дихального ланцюга: оборотне пригнічення електронно-транспортної функції комплексу I і компенсаторна активація

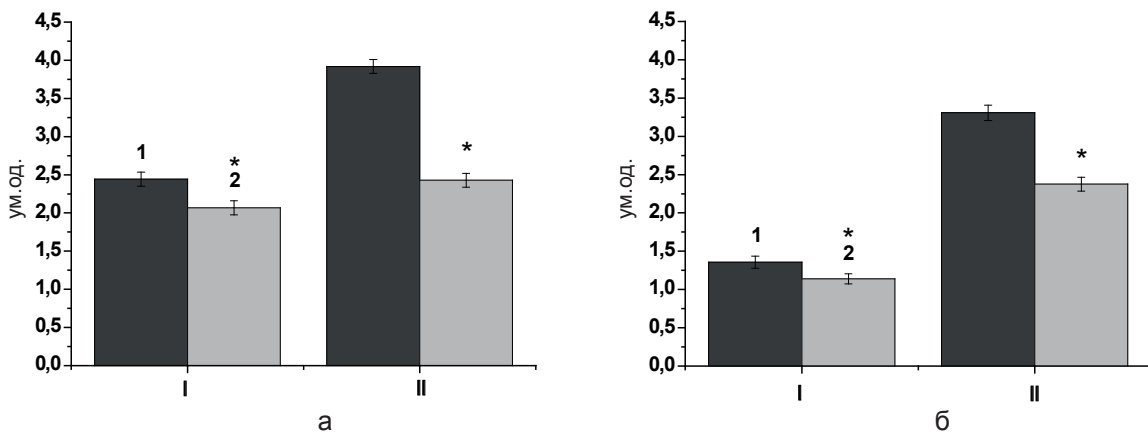


Рис. 3. Дихальний контроль за Чансом, V₃/V₄ (а) та Ларді, V₃/V₂ (б) за наявності сукцинату (I) і глутамату (II) у мітохондріях серця дорослих (1) і старих (2) шурів. *P≤0,05 відносно значень у дорослих шурів

комплексу II. Вміст сукцинату в крові і тканинах різко зростає. При цьому внесок сукцинатоксидазного окиснення в загальне дихання може сягати 70-80 % порівняно з 20-30 % при нормоксичному стані. Вважається, що перемикання окиснення НАД-залежних субстратів у дихальному ланцюзі на окиснення сукцинату є обов'язковим еволюційно сформованим сигнальним компенсаторним механізмом, завдяки чому забезпечується збереження енергосинтезувальної функції ЕТЛ при порушенні кисневого гомеостазу [15].

Основним показником ефективності фосфорилування АТФ є відношення між синтезом АТФ та поглинанням кисню (АДФ/О). Наші дослідження показали, що незважаючи на часткове зниження ДК за Чансом та Ларді, ефективність фосфорилування не змінюється. Також не було зафіксовано достовірного зменшення швидкості фосфорилування АТФ, що, ймовірно, є результатом адаптації до старіння (рис. 4).

Отже, у тварин при старінні незначно знижувалися киснезалежні процеси, про що свідчать показники дихання мітохондрій в усіх метаболічних станах, та активність споживання кисню за умов окиснення глутамату і сукцинату, при цьому синтез АТФ відбувався досить ефективно, що вказує на збереження АТФ-синтазної активності мітохондрій.

Окрім дослідження відмінностей окисно-фосфорилування у тварин різних вікових

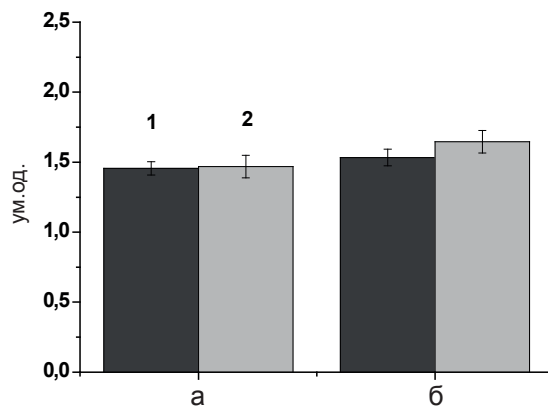


Рис. 4. Значення показника АДФ/О у суспензії ізольованих мітохондрій дорослих (1) та старих (2) щурів з використанням субстрату сукцинату (а) та глутамату (б)

груп вивчали також дію Ca^{2+} у різних концентраціях на функції органел за умов активації сукцинатзалежного шляху окиснення у мітохондріях серця. Як видно з таблиці, додавання катіона у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} і 10^{-4} моль/л у суспензію мітохондрій дорослих щурів достовірно підвищувало швидкість дихання у субстратному стані V_2 за Чансом. Ймовірно, активність кальційзалежних ферментів підвищувалася, що стимулювало прискорене перенесення електронів по дихальному ланцюгу. З іншого боку, швидкість АДФ-стимульованого дихання навпаки знижувалася при дії Ca^{2+} у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} та 10^{-4} моль/л на 13, 19 та 25 % відповідно. Проте за дії найнижчої з використаних концентрацій (10^{-7} моль/л), у мітохондріях серця дорослих тварин ДК за Ларді не змінювався, а показники ДК за Чансом та АДФ/О достовірно зростали, що свідчить про підвищення спряження процесів окиснення і фосфорилування. Швидкість фосфорилування АДФ також залишалася незмінною. Екзогенний кальцій у високих концентраціях 10^{-5} та 10^{-4} моль/л призводив до часткового зниження активності роботи дихального ланцюга у дорослих тварин, можливо, внаслідок зменшення мітохондріального потенціалу, яке відбувається під час формування МП.

Оскільки мітохондрії серця старих тварин виявилися більш чутливими до накопичення позаклітинного кальцію, а також характеризуються підвищеною чутливістю МП до Ca^{2+} , тому поглинання кисню за дії цього катіона в концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} та 10^{-4} моль/л у двох метаболічних станах V_3 і V_4 знижувалося. У органелах кальцій у невисоких концентраціях (10^{-7} моль/л) достовірно не підвищував ДК за Чансом, коефіцієнт АДФ/О та швидкість фосфорилування. З таблиці видно, що він у всіх концентраціях вірогідно знижує АДФ-стимульоване дихання, а коефіцієнт ДК за Чансом лише при дії 10^{-5} і 10^{-4} моль/л. Показники АДФ/О та АДФ/ Δt також мали тенденцію до зниження. Найбільш ефективно катіони кальцію стимулювали дихання

Зміни швидкості АДФ-стимульованого дихання ізольованих мітохондрій серця дорослих та старих щурів при дії різних концентрацій кальцію (10^{-7} моль/л – 10^{-4} моль/л) з використанням субстрату окиснення сукцинату (5 ммоль/л)

Показник	Дорослі				Старі			
	Вихідний стан	Дія кальцію, моль/л			Вихідний стан	Дія кальцію, моль/л		
		10^{-7}	10^{-5}	10^{-4}		10^{-7}	10^{-5}	10^{-4}
Швидкість споживання кисню без АДФ при дії кальцію, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка (V_2)	60,77±2,97	70,15±5,19*	70,2±2,3*	67,4±2,29*	70,5±4,75*	75,64±7,27	69,2±4,5	68,84±5,9
Швидкість фосфорильованого дихання мітохондрій (у метаболічному стані 3), $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка (V_3)	87,6±7,7	76,49±1,47*	71,12±3,2*	65,5±0,91*	78,8±4,85	66,63±3,18**	64,8±2,8**	51,5±1,97**
Швидкість контрольного дихання мітохондрій (в метаболічному стані 4), $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка (V_4)	39,3±4,5	28,32±1,2*	30,92±2,5*	34,5±1,8	39,02±3,12	31,73±5,4**	38,12±2,4	32,18±3,4
Коефіцієнт дихального контролю за Чансом	2,44±0,09	2,7±0,02*	2,3±0,03	1,9±0,05*	2,06±0,09*	2,10±0,75	1,7±0,22**	1,6±0,4**
Коефіцієнт дихального контролю за Ларді	1,35±0,08	1,24±0,038	1,19±0,18	1,13±0,007*	1,14±0,06*	0,88±0,068**	0,93±0,014	0,75±0,019**
Коефіцієнт ефективності фосфорильовання, $\text{нмоль} / \text{нмоль } O_2$ (АДФ/О)	1,45±0,05	1,63±0,06*	1,4±0,15	1,35±0,16	1,46±0,08	1,53±0,25	1,52±0,23	1,38±0,24
Швидкість фосфорильовання АДФ, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка (АДФ/Δt)	69,80±5,04	65,8±7,9	65,75±14,7	63,4±2,13	64,13±7,84	65,06±1,64	58,9±5,7	55,84±7,3

* $P < 0,05$ порівняно зі змінами у вихідному стані, ** $P < 0,05$ порівняно з контрольними старими щурами.

у концентрації 10^{-7} моль/л, яка характерна для саркоплазми кардіоміоцитів за діастоли. Мабуть це пов'язано з імпульсним надходженням крові і поживних речовин до серця саме під час його розслаблення і готує до наступного акту скорочення.

Отже, при старінні інтенсивність роботи дихального ланцюга мітохондрій за наявності АДФ, згідно з нашими результатами, зменшувалася. Можливою причиною зниженої здатності окиснювати субстрати мітохондріями є зміна активності ферментів, що формують цей ланцюг і, за участю яких здійснюється перенесення електронів. Відомо, що у старих тварин зменшується кількість самих органел у кардіоміоцитах. Усе це супроводжується зниженням концентрації АТФ у клітинах і як наслідок порушенням енергопостачання серця і функціонування органа загалом. Ми також показали, що активність роботи ЕТЛ є кальційзалежною, катіон у низьких концентраціях інтенсифікував процеси дихання у дорослих тварин, тоді як навантаження ним – пригнічувало, що може вказувати на негативний вплив високих концентрацій катіона на цей процес. При цьому у мітохондріях серця старих тварин при дії екзогенного кальцію у невисоких концентраціях (10^{-7} моль/л) спостерігали тенденцію до активації процесів спряження окиснення і фосфорилування, про що свідчить незначне зростання ДК за Чансом на тлі збереження ефективності фосфорилування. Проте дія Ca^{2+} у вищих концентраціях, а саме 10^{-4} моль/л, характеризує вже патологічні умови, за яких досліджувані параметри дихання знижувалися. Це говорить про пригнічення з віком процесу дихання і ймовірної дисфункції органел.

ВИСНОВКИ

1. Динаміка накопичення іонів кальцію ізольованими мітохондріями серця старих щурів залежить від вмісту катіона в середовищі інкубації і є найбільш активною при концентрації 10^{-4} моль/л.

2. Ізольовані мітохондрії серця старих тварин є більш чутливими до дії високих концентрацій кальцію (10^{-4} моль/л): максимальна концентрація катіона в мітохондріях серця старих щурів була на 3-й хвилині з подальшим його виходом з матриксу, у органелах дорослих щурів максимум флуоресценції барвника спостерігали на 9-й хвилині.

3. Функціональні показники мітохондріального дихання змінюються з віком. Так, швидкість АДФ-стимульованого дихання знижувалася у старих тварин як при використанні субстрату сукцинату (5 ммоль/л), так і глутамату (5 ммоль/л). Також достовірно зменшувалися показники ДК за Чансом та Ларді, що характеризує помірне роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування. При цьому ефективність та швидкість окисного фосфорилування (АДФ/О) у тварин з віком не змінювалася.

4. Показана кальційзалежна активність роботи дихального ланцюга у серці тварин різного віку. Так, дія катіона у низьких фізіологічних концентраціях (10^{-7} моль/л) інтенсифікувала процеси дихання у дорослих і незначно – у старих тварин, тоді як навантаження кальцієм (10^{-4} моль/л) – пригнічувало, що може вказувати на негативний вплив катіона у високих концентраціях на мітохондріальне дихання у серці таких тварин.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

А.Ю. Лучкова, Н.А. Струтинская, В.Ф. Сагач

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ ЦЕПЬ МИТОХОНДРИЙ В СЕРДЦЕ СТАРЫХ КРЫС

Исследовали параметры митохондриального дыхания в сердце старых крыс при использовании субстратов для I и II комплексов дыхательной цепи – глутамата и сукцината соответственно, а также зависимость этого процесса от действия ионов кальция. Показано, что динамика входа

иона в органеллы старых животных отличалась от таковой в контрольных, а максимальная флуоресценция кальцийчувствительного красителя Fluo-4 AM при действии катиона в концентрации 100 мкмоль/л наблюдалась на 3-й минуте и была на 27% выше. Следовательно, в старых животных обнаружили более резкое повышение внутримитохондриального кальция. Несмотря на то, что показатель свободного дыхания V_2 за Чансом у 24-месячных крыс умеренно повышался (при использовании сукцината), или не отличался от такового у взрослых крыс (при использовании глутамата), скорость АДФ-стимулированного дыхания снижалась, что приводило к снижению показателей дыхательного контроля (ДК) за Чансом и Ларди в 1,18 и 1,6 раза (при окислении сукцината) и 1,18 и 1,4 раза (при окислении глутамата) соответственно. Однако эффективность фосфорилирования АТФ, которая характеризуется соотношением между синтезом АТФ и поглощением кислорода (АДФ/О) не изменялась, как и не снижалась скорость фосфорилирования АТФ. Влияние ионов кальция на процесс митохондриального дыхания у взрослых крыс был дозозависимым. При низких концентрациях катиона (10^{-7} моль/л) ДК за Ларди не изменялся, а показатели ДК за Чансом и АДФ/О достоверно возросли, что свидетельствует о повышении сопряжения процессов окисления и фосфорилирования. В то же время в митохондриях сердца старых крыс даже невысокие концентрации кальция (10^{-7} моль/л) достоверно не повышали скорость дыхания и коэффициент АДФ/О. Ионы кальция в концентрации 10^{-5} и 10^{-4} моль/л Ca^{2+} приводили к частичному снижению активности работы дыхательной цепи у взрослых животных и достоверно снижали АДФ-стимулированное дыхание и коэффициенты ДК за Чансом и Ларди у старых. При этом АДФ/О и АДФ/ Δt также имели тенденцию к снижению. Ключевые слова: митохондрии; Ca^{2+} ; окислительное фосфорилирование; дыхательная цепь; сердце; старение.

A. Yu. Luchkova, N.A. Strutynska, V.F. Sagach

THE INFLUENCE OF CALCIUM ACCUMULATION ON THE FUNCTION OF ELECTRON TRANSPORT CHAIN IN THE OLD RAT HEART MITOCHONDRIA

We studied the parameters of mitochondrial respiration in the suspension of isolated heart mitochondria from old rats using glutamate and succinate – the substrates for the I and II respiratory chain complexes, as well as the dependence of this process on the action of calcium ions. It was shown that Ca^{2+} influx dynamics in old rat heart mitochondria is different from that in adult control organelles, and the maximum of fluorescence of the calcium-sensitive dye Fluo-4 AM at Ca^{2+} concentration 100 μ mol/l was observed at 3rd minute and was 27% higher than in the control. Consequently, in older rats, we observed a more sharp increase in intramitochondrial calcium. Despite the moderate increase (using succinate) or no different from that in adult animals (using glutamate) of the

V_2 indicator in the 24-month rats, ADP-stimulated respiration rate decreased, which led to a decrease in respiratory control ratio (RCR) by Chance and Lardy 1.18 and 1.6 times (with oxidation of succinate) and 1.18 and 1.4 times (in the presence of glutamate). However, the efficiency of phosphorylation of ATP, which is characterized by the ratio of ATP synthesis and oxygen absorption (ADP/O), did not change, nor did the velocity of phosphorylation of ATP (ADP/ Δt). The effect of calcium ions on mitochondrial respiration in adult rats was dose dependent. At low concentrations of cation (10^{-7} mol/l), the Lardy's RCR did not change, and Chance's RCR and ADP/O ratio significantly increased, indicating an increase in the coupling of oxidation and phosphorylation processes. At the same time, in the old rat heart mitochondria, calcium ions, even at low concentrations (10^{-7} mol/l), did not significantly increase the rate of respiration and the ADP/O ratio. 10^{-5} and 10^{-4} mol/l Ca^{2+} resulted in a partial reduction of the activity of the respiratory chain in adult animals and significantly reduced the ADP-stimulated respiration, and the coefficients of RCR after Chance and Lardy in the elderly. $+\Delta t$ also tended to fall. Key words: mitochondria; Ca^{2+} ; oxidative phosphorylation; respiratory chain; heart; aging.

*Bogomoletz Institute of Physiology, NAS Ukraine, Kyiv;
e-mail: a.luchkova@biph.kiev.ua*

REFERENCES

1. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovascular Res.* 2005; 66:222-32.
2. Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell.* 2015; 14:1-7.
3. Cui H, Kong Y, and Zhang H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *J of Signal Transd.* 2012; 1-14.
4. Dai D, Rabinovitch PS, Ungvari Z, Sinclair D, North B. Mitochondria and Cardiovascular Aging. *Circul Res.* 2012; 110(8):1109-25.
5. Long Q, Yang K, and Yang Q. Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *Am J Cardiovasc Dis.* 2015; 5(1):19-32.
6. Duicu OM, Mirica SN, Gheorghesu DE, Privistirescu AI, Fira-Mladinescu O, Muntean DM. Ageing-induced decrease in cardiac mitochondrial function in healthy rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2013; 91:1-8.
7. Sagach VF, Vavilova GL, Strutynska 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].
8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; (1):265-75.
9. Budko AYU, Strutynska NA, Okhay IYu, Semenykhina OM, Sagach VF. Ca^{2+} accumulation in isolated rat heart mitochondria under maintenance of mitochondrial poten-

- tial. Fiziol Zh. 2015; 61(6):17-25. [Ukrainian].
10. Kolomiets OV, Danylovyh YuV, Danylovyh GV, Kosterin SO. Ca²⁺ accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. Ukr Biochem J. 2013; 85(4):30-9. [Ukrainian].
 11. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. University of Pennsylvania. 1955:429-39.
 12. Dedkova EN, Blatter LA. Calcium signaling in cardiac mitochondria. J Mol and Cell Cardiol. 2013; 58:125-33.
 13. Dong Z, Shanmughapriya S, Tomar D, Rajan S, Stathopoulos PB, Madesh M. Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor that Augments MCU Channel Activity. Moll Cell. 2017; 65:1014-28.
 14. Lesnefsky EJ, Hoppel CL. Oxidative phosphorylation and aging. Age Res Rev. 2006:402-33.
 15. Lukyanova LD. Mitochondria signaling in adaptation to hypoxia. Fiziol Zh. 2013; 59(6): 141-54.

*Матеріал надійшов
до редакції 18.07.2018*