

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

Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення неідентифікованого мітохондріального фактора

В опытах in vitro на изолированных митохондриях из сердца морской свинки и крысы обнаружено высвобождение неидентифицированных веществ (фактора), индуцированное действием модификатора сульфгидрильных (SH) групп фениларсинаоксида (ФАО), а также в условиях моделирования окислительного стресса (аноксия – реоксигенация). Высвобождение фактора, индуцированное действием ФАО, практически полностью угнеталось классическим ингибитором митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore, MPT), циклоспорином А в концентрации 10^{-5} моль/л, что свидетельствовало о причастности открытия поры к высвобождению исследуемого фактора. Изучали влияние антиоксидантов мелатонина и тролокса как в условиях in vitro, так и in vivo, реагента на SH-группы дитиотреитола (ДТТ) и скарвенджера глутатиона диэтилмалеата (ДЕМ), а также донора оксида азота (NO) нитропруссид натрия в опытах in vitro на высвобождение митохондриального фактора на фоне действия ФАО и в условиях аноксии – реоксигенации. При этом выявлен протекторный эффект исследуемых антиоксидантов и реагентов на SH-группы на высвобождение фактора. Результаты экспериментов по изучению роли NO в высвобождении митохондриального фактора дают возможность заключить, что этот агент принимает участие в регуляции образования фактора в условиях ингибирования аминоксидинами NO-синтазной активности. Получены экспериментальные результаты об образовании MPT на суспензии митохондрий сердца крысы в условиях действия индуктора MPT ФАО и ингибитора – циклоспорина А. Результаты по высвобождению фактора изолированными митохондриями сердца с помощью индукторов MPT коррелируют с данными по обнаружению фактора в условиях реперфузии изолированного ишемизированного сердца морской свинки. Делается вывод о том, что митохондрии играют существенную роль в высвобождении неидентифицированного фактора, который выделяется во время реперфузии изолированного ишемизированного сердца морской свинки.

ВСТУП

В останні роки мітохондріям приділяється величезна увага з боку дослідників, зокрема цим субклітинним структурам відводиться важлива роль в патогенезі апоптозу. До цього часу накопичено чимало даних про те, що різні порушення в клітині при окисному стресі, ішемії – реперфузії, гіпоксії, старінні та інших патологічних станах організму так чи інакше пов'язані з дисфункцією мітохондрій [16,17,19,21].

Встановлено, що індукція зміни проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани може призводити до набряку мітохондрій і, як наслідок цього, до ушкодження зовнішньої мембрани мітохондрій і утворення в ній пор – MPT. У патологічних умовах, пов'язаних з надлишком клітинного кальцію, відкриття цих пор спричиняє більшу плинність мембран мітохондрій і веде до зниження мембранного потенціалу, обмежування окисного фосфорилування, галь-

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

мування синтезу аденозинтрифосфату та інших наслідків, які можуть призводити до загибелі клітин [12,13,18,22,23].

Нещодавно в дослідках на серці морської свинки під час реперфузії ішемізованого серця знайдено фактор, який спричиняє розвиток аритмій, пригнічення скорочувальної активності ізольованого серця, депресію скорочувальної активності передсердної трабекули і артеріальної судинної смужки [7]. У зв'язку з вищесказаним виникло питання стосовно з'ясування генезу цього фактора та встановлення впливу модуляторів МРТ та оксиду азоту на його вивільнення. Метою нашої роботи було дослідити умови вивільнення неідентифікованого фактора із мітохондрій серця морської свинки за допомогою індуктора МРТ ФАО (модифікатора SH-груп), дії аноксії – реоксигенації в експериментах *in vitro* та вивчити вплив на його вивільнення речовин-антиоксидантів і реагентів на сульфгідрильні групи. Для з'ясування кореляції між вивільненням фактора і утворенням МРТ були досліджені умови утворення МРТ під впливом індуктора МРТ ФАО та іонів Ca^{2+} за допомогою методу світлорозсіювання на ізольованих мітохондріях серця щурів.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на морських свинках масою 300 – 350 г і білих щурах лінії Вістар масою 200 – 250 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію.

Серця, видалені у декапітованих тварин, ретельно промивали охолодженим 0,9% -м розчином KCl (2°C), подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСІ буфер – 20, ЕДТА – 1; рН 7,4. Мітохондрії виділяли за методом [4] у нашій модифікації. Для виділення мітохондрій гомогенату тканин центрифугували спочатку при 700 g, 5 хв (2°C). Потім супернатант центрифугували повторно при 11000 g,

15 хв, (2 °С). Отриманий осад суспендували в розчині, що містив (ммоль/л): сахароза – 250, тріс – НСІ буфер (рН 7,2 при 23 °С) – 25, і відразу використовували в дослідках.

Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Lowry [20]. У дослідках використовували суспензію з концентрацією білка 1 – 1,2 мг/мл.

Середовище інкубації для мітохондрій було такого складу (ммоль/л): тріс-НСІ (рН 7,2 при 23 °С) – 50, $MgCl_2$ – 3, KCl – 125, Na_2 -АТФ – 3, сукцинат натрію – 3, $CaCl_2$ – 0,01, фосфатний буфер (KH_2PO_4) (рН 7,2) – 2. Об'єм інкубаційного середовища – 4 мл.

З метою визначення вивільнення фактора з мітохондрій в інкубаційне середовище вводили розчин ФАО – індуктора МРТ, дія якого тривала протягом 10 хв або частково моделювали вплив умов ішемії-реперфузії на суспензії мітохондрій *in vitro* через аерацію їх потоком чистого азоту протягом 20 хв (аноксія-реоксигенація).

Перед аноксією – реоксигенацією мітохондрій або обробкою ФАО проводили попередню інкубацію мітохондрій з досліджуваними речовинами в інкубаційному середовищі протягом 10 хв при 20 °С. Після цього мітохондрії (як оброблені, так і нативні) відразу центрифугували при 11000 g протягом 20 хв. Надосадову рідину використовували для вимірювання екстинції оптичної густини на спектрофотометрі СФ-46 у діапазоні довжин хвиль λ 230-260 нм проти дистильованої води. Як контроль використовували показники оптичної густини надосадової рідини нативних мітохондрій.

Досліди, в яких вивчали протекторний вплив речовин проти утворення МРТ, наприклад, антиоксидантів мелатоніну або тролоксу *in vitro*, чи модифікаторів сульфгідрильних груп – діетилмалеату (ДЕМ) або дитіотреїтолу (ДТТ), теж проводили за умов попередньої інкубації цих речовин з мітохондріями протягом 10 хв. У дослідках

in vivo морським свинкам вводили інтраперитонеально розчини антиоксидантів – мелатоніну або тролоксу з розрахунку 10 мг/кг маси за одну годину до виділення мітохондрій.

Утворення МРТ оцінювали спектрофотометрично при 520 нм за зміною оптичної густини суспензії мітохондрій (1 мг/мл білка) у середовищі (ммоль/л): КСІ – 120, KH_2PO_4 – 3, малат – 5, глутамат – 2. У деяких випадках використовували сукцинат (5 ммоль/л). Титрування мітохондрій Ca^{2+} проводили при наявності арсеназо-III при 655 нм за описаним методом [21].

Для проведення досліджень використовували такі реактиви: ФАО, ДЕМ, ДТТ, мелатонін, тролокс, аміногуанідін, циклоспорин А ("Sigma", США), аденозинтрифосфат-динатрієва сіль ($\text{Na}_2\text{-ATP}$), тріс ("Reanal", Угорщина), додецилсульфат натрію ("Fluka", Швейцарія) та інші реактиви вітчизняного виробництва ("Реакхім").

Одержані результати оброблено статистично за допомогою критерію *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Фактор, який за нашим припущенням повинен вивільнюватись із мітохондрій, був зареєстрований спектрофотометрично в діапазоні довжин хвиль 230-260 нм з максимумом поглинання при λ 240–245 нм.

З метою підбору оптимальних умов вивільнення неідентифікованого фактора із мітохондрій проводили дослідження впливу ФАО у діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-4} моль/л

(рис.1). Відомо, що ФАО, реагент на сульфгідрильні групи (специфічно зв'язує вільні сульфгідрильні групи), діє як потенційний індуктор МРТ в ізольованих мітохондріях [10]. Відомо також, що ФАО викликає відкриття мітохондріальної пори через пряму взаємодію з тіоловими групами мембранних білків [9, 18]. У наших експериментах максимальне вивільнення фактора із мітохондрій відбувалося при дії ФАО у концентрації 10^{-5} моль/л. За умов його оптимальної концентрації встановлено дозозалежний ефект інгібітора МРТ циклоспорину А у межах концентрацій 10^{-9} – 10^{-4} моль/л. Видно, що циклоспорин А у концентрації 10^{-5} моль/л повністю ефективний у попередженні ФАО-індукованого вивільнення фактора (див. рис.1). У літературі є дані, що різні агенти, які інгібують МРТ, зокрема, циклоспорин А, захищають мітохондрії сер-

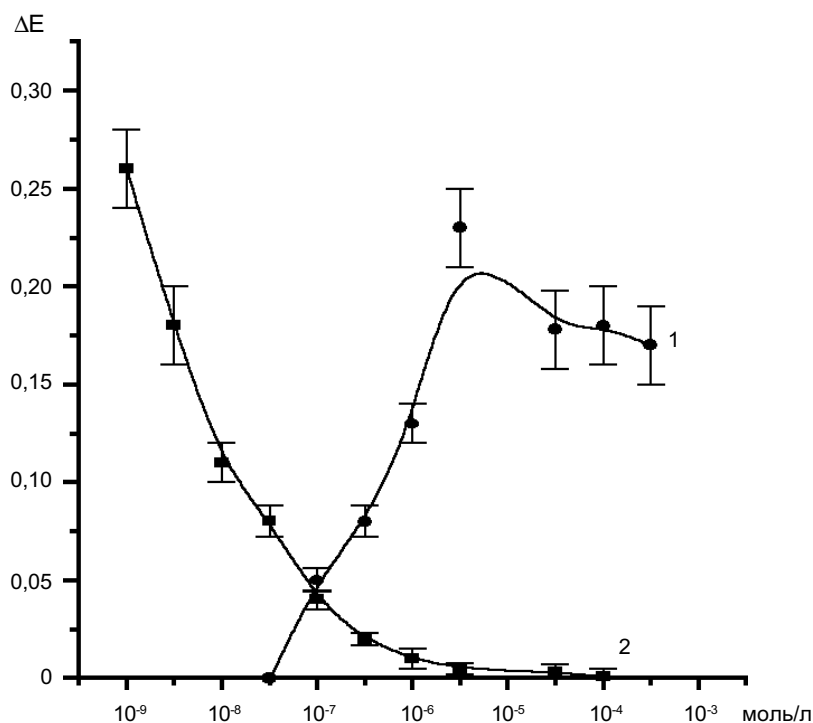


Рис.1. Концентраційні залежності впливу феноларсиноксиду (1) та циклоспорину А (2) на вивільнення фактора з мітохондрій (n=3). Тут і далі ΔE – приріст оптичної густини порівняно з контролем. $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

ця, нирок, печінки від функціональних пошкоджень, пов'язаних з надмірним навантаженням Ca^{2+} . Механізм блокади мітохондріальної пори циклоспорином А ще не повністю досліджено, але припускають зв'язування його з білками мітохондріального матриксу [8,14,15].

Таким чином, було знайдено оптимальну концентрацію ФАО (10^{-5} моль/л), яку доцільно застосовувати для вивчення ФАО-індукованого вивільнення мітохондріального фактора. Крім того, чутливість ФАО-індукованого вивільнення фактора до дії специфічного інгібітора МРТ циклоспорино А дає підставу для припущення, що воно відбувається через утворення МРТ.

Як відомо, за таких патологічних станів як, ішемія – реперфузія, відбувається утворення МРТ [14,18]. Посилаючись на дані про існування стабільного фактора, який вивільнюється у відтікаючий розчин при тотальній ішемії ізольованого серця [7], метою наступного експерименту було встанов-

лення вивільнення мітохондріального фактора через індукцію МРТ за допомогою моделювання *in vitro* дії умов ішемії – реперфузії (аноксія – реоксигенація) на суспензії мітохондрій. На рис.2. показано, що вивільнення фактора із мітохондрій серця морських свинок та білих щурів відбувається як за наявності в середовищі інкубації ФАО, так і за умов аноксії – реоксигенації. Наші результати корелюють з даними, отриманими на ізольованому серці морської свинки, перфузованому за методом Лангендорфа [7].

Слід зазначити, що вивільнення фактора із мітохондрій, викликане дією ФАО, за умов попередньої обробки суспензії мітохондрій розчинами мелатоніну ($4 \cdot 10^{-5}$ моль/л) та тролоксу ($2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) зменшувалося на 68 та 67 % відповідно порівнянно з рівнем вивільнення фактора при дії ФАО в концентрації 10^{-5} моль/л (рис.3). Однак внутрішньоочеревинне введення тваринам цих речовин у дозі 10 мг/кг за 1 год до виділення мітохондрій ефективніше порівнянно з дослідями *in*

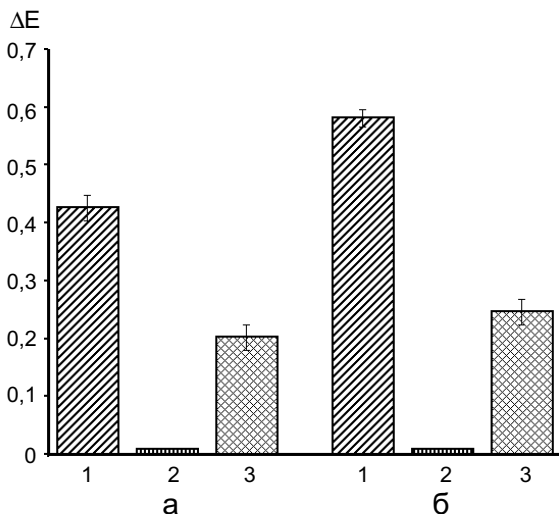


Рис.2. Вплив фенілрсиноксиду (ФАО) та аноксії–реоксигенації на вивільнення фактора з мітохондрій серця морських свинок (а) та білих щурів (б):

1 – ФАО (10^{-5} моль/л) у морських свинок (n=10) та щурів (n=3); 2 – циклоспорин А (10^{-5} моль/л) за наявності ФАО (10^{-5} моль/л) у морських свинок та щурів (n=3); 3 – умови аноксії – реоксигенації у морських свинок (n=8) та щурів (n=3).

$P \leq 0,05$ порівнянно з контролем.

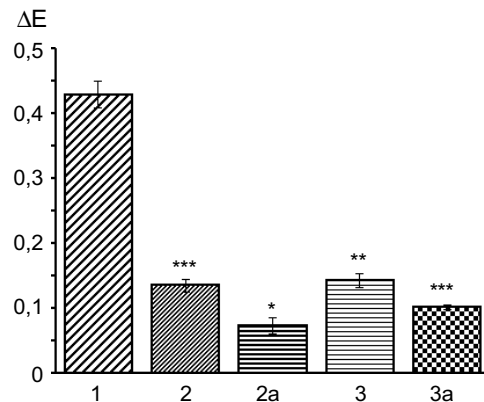


Рис.3. Вплив антиоксидантів мелатоніну і тролоксу за умов *in vitro* та *in vivo* на вивільнення фактора з мітохондрій, спричиненого дією фенілрсиноксиду (ФАО): 1 – ФАО (10^{-5} моль/л) (n=10); 2 – мелатонін ($40 \cdot 10^{-6}$ моль/л) за наявності ФАО *in vitro* (n=4); 2a – мелатонін *in vivo* (n=4); 3 – тролокс ($20 \cdot 10^{-6}$ моль/л) за наявності ФАО *in vitro* (n=3); 3a – тролокс *in vivo* (n=3). Вивільнення фактора ініціювали додаванням в інкубаційне середовище ФАО у кінцевій концентрації 10^{-5} моль/л.

Значення ΔE при дії мелатоніну та тролоксу відносно ΔE при дії ФАО достовірні:

$P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

in vitro і перешкоджало вивільненню фактора із мітохондрій, індукованого дією ФАО: захисний ефект мелатоніну становив 83 %, тролоксу – 76 %. Як відомо, одним із центральних місць у антиоксидантному захисті організму займає система глутатіону. Показано, що антиоксидант мелатонін, який синтезується в організмі людини, має суттєвий активуючий вплив на ферменти глутатіонової системи, що пояснює його антиоксидантний ефект [3]. Біологічна роль іншого антиоксиданта тролоксу (вітаміну Е) полягає у попередженні окиснення ліпідів біомембран і зменшенні потреби у глутатіонпероксидазі, яка необхідна для руйнування пероксидів, що утворюються в клітині [1]

Таким чином, ці результати вказують на протекторний проти утворення МРТ вплив антиоксидантів мелатоніну та тролоксу, які доцільно використовувати за умов окисного стресу, що спричиняє відкриття МРТ.

Хімічна модифікація поверхневих груп мітохондріальної мембрани за допомогою різних модуляторів відіграє важливу роль у механізмах регуляції її функціонального стану. У наступних експериментах (рис.4) нами був використаний ДТТ – реагент, який відновлює S – S - зв'язки, створюючи, таким чином, вільні SH-групи. Отримані результати показують, що відновлювач дисульфідних зв'язків у білках ДТТ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л), який попередньо інкубували з суспензією мітохондрій, ефективно (на 84 %) захищав мітохондрії від дії ФАО. На фоні дії ФАО скавенджер глутатіону ДЕМ ($2 \cdot 10^{-4}$ моль/л), преінкубований з суспензією мітохондрій, теж значно попереджав (на 70 %) вивільнення мітохондріального фактора (див. рис.4). Отже, захисний механізм дії ДТТ полягає у попередженні зв'язування вільних сульфгідрильних груп з ФАО. Це підтверджує той факт, що дія ФАО пов'язана із селективним зв'язуванням вільних сульфгідрильних груп [18].

Слід зазначити, що за умов попередньої обробки суспензії мітохондрій розчинами

мелатоніну ($4 \cdot 10^{-5}$ моль/л) та тролоксу ($2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) вивільнення фактора із мітохондрій при аноксії – реоксигенації зменшувалося на 54 та 47 % відповідно порівнянно з рівнем вивільнення фактора за умов аноксії – реоксигенації (рис. 5). Однак внутрішньоочеревинне введення тваринам цих речовин у дозі 10 мг/кг за 1 год до виділення мітохондрій ефективніше щодо результатів *in vitro*, перешкоджало вивільненню фактора із мітохондрій за умов аноксії – реоксигенації: захисний ефект мелатоніну становив 82 %, тролоксу – 71 % (див. рис. 5).

Отже, отримані результати підтверджують протекторний вплив антиоксидантів мелатоніну та тролоксу за умов окисного стресу.

На рис.6 представлено результати відносно впливу нітропрусиду натрію – донора NO на ФАО-індуковане вивільнення фактора з мітохондрій. Встановлено, за умов преінкубації суспензії мітохондрій з інгібітором обох ізоформ NO-синтази (NOS) – індукцибельної NOS і конститутивної NOS, аміногуанідіном (10^{-4} моль/л) за наявності ФАО відмічено досить значне (на 89 %) зни-

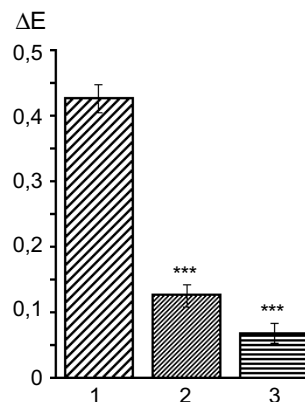


Рис.4. Вплив діетилmaleату (ДЕМ) та дитіотреїтолу (ДТТ) *in vitro* на вивільнення фактора із мітохондрій, спричиненого дією феніларсиноксиду (ФАО): 1 - ФАО (10^{-5} моль/л) (n=10); 2 - ДЕМ ($2 \cdot 10^{-4}$ моль/л) за наявності ФАО (n=3); 3 - ДТТ ($3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) за наявності ФАО (n=4). Вивільнення фактора ініціювали додаванням в інкубаційне середовище ФАО у кінцевій концентрації 10^{-5} моль/л. Значення ΔE при дії ДЕМ та ДТТ відносно ΔE при дії ФАО достовірні: *** P ≤ 0,001.

ження рівня вивільнення фактора із мітохондрій. Проте внаслідок відновлення пулу ендogenous NO у результаті внесення в інкубаційне середовище донора NO нітропрусида натрію (10^{-4} моль/л), після обробки суспензії мітохондрій аміногуанідіном, частково (до 85 %) відновлювалося ФАО-індуковане вивільнення мітохондріального фактора (див. рис.6). Згідно з так званим "циклом оксиду азоту" [6], крім NO у функціонуванні клітин значну роль можуть відігравати продукти ферментативного або неферментативного окиснення NO, в першу чергу $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ – стабільні метаболіти NO. Встановлено, що NO або нітрит-аніон модифікує аміно- та карбоксильні групи поверхні мембрани [2]. Інші автори пов'язують дію NO також з окисненням SH-груп білків цито- та ендоплазматичних мембран [5]. Отримані результати дають підставу заключити, що оксид азоту може брати участь у регуляції утворення мітохондріального фактора за умов інгібування активності NOS.

Таким чином, дослідження, проведені на ізольованих мітохондріях, показують, що

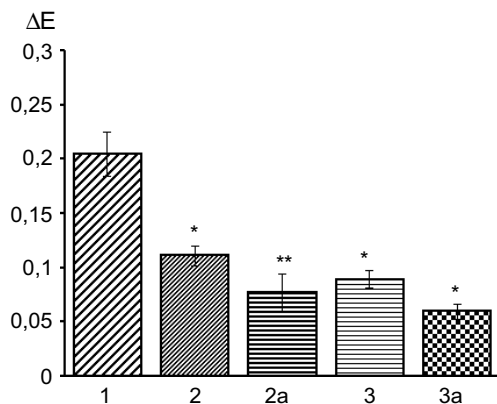


Рис. 5. Вплив антиоксидантів мелатоніну та тролоксу *in vitro* та *in vivo* на вивільнення фактора із мітохондрій, спричиненого впливом аноксії-реоксигенації: 1 - ішемії (n=8); 2 – мелатонін ($40 \cdot 10^{-6}$ моль/л) в умовах *in vitro* (n=3); 2a – мелатонін *in vivo* (n=3); 3 – тролокс ($20 \cdot 10^{-6}$ моль/л) *in vitro* (n=3); 3a – тролокс *in vivo* (n=3). Вивільнення фактора ініціювали моделюванням на суспензії мітохондрій умов аноксії-реоксигенації. Значення ΔE при дії мелатоніну та тролоксу відносно ΔE при дії аноксії-реоксигенації достовірні: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$.

вивільнення мітохондріального фактора є чутливим до індукторів та інгібіторів МРТ. Тому з метою подальшого з'ясування кореляції між вивільненням фактора і МРТ було додатково досліджено утворення МРТ під дією іонів Ca^{2+} та інших індукторів МРТ (ФАО, антимицин А) за допомогою методу світлорозсіювання на ізольованих мітохондріях серця щурів. Також оцінювали утворення пори під дією Ca^{2+} при наявності Ca^{2+} -індикатора, арсеназо-III.

Внаслідок проведених експериментів встановлено, що добавки Ca^{2+} , починаючи з певної порогової концентрації, призводять до зниження оптичної густини суспензії (OD) внаслідок утворення МРТ, яка за літературними даними викликає набряк мітохондрій в ізотонічному середовищі (рис.7). При наявності циклоспорину А в концентрації 10^{-5} моль/л, інгібітора мітохондріальної пори, додавання Ca^{2+} , навіть у значно більших концентраціях, ніж порогові, не призводить до значних змін OD (див. рис. 7). МРТ викликалась також інгібітором дихання антимицином А і модифікатором SH-груп ФАО (10^{-5} моль/л) (див. рис. 7), що корелює

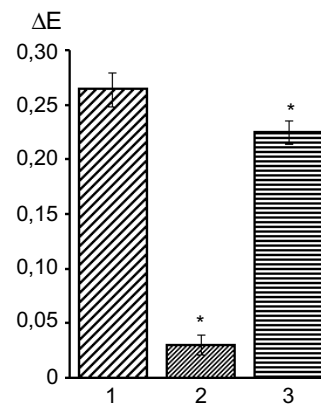


Рис. 6. Вплив нітропрусида натрію на вивільнення фактора із мітохондрій, спричиненого дією феноларсиноксиду (ФАО, 10^{-5} моль/л):

1 - ФАО;
2 - ФАО за наявності аміногуанідіну (10^{-4} моль/л);
3 – нітропрусид натрію (10^{-4} моль/л) за наявності ФАО за умов інгібування активності NOS аміногуанідіном. Значення ΔE при дії аміногуанідіну та нітропрусида натрію відносно ΔE при дії ФАО достовірні: * $P \leq 0,05$.

із даними, які вказують на вивільнення мітохондріального фактора під дією цих агентів за умов ішемії – реперфузії ізольованого серця морської свинки. Встановлено також, що вивільнення мітохондріального фактора відбувається внаслідок утворення пори при концентраціях Ca^{2+} більших від порогових (рис. 8). Слід зазначити, що знайдені порогові концентрації є близькими до тих, які було визначено для ізольованих мітохондрій печінки шурів [11,22].

Результати, отримані за допомогою методу світлорозсіювання, підтверджуються даними, одержаними при додаванні Ca^{2+} до суспензії мітохондрій при наявності арсеназо-III. У разі титрування, при додаванні Ca^{2+} у концентраціях, відповідних пороговим, відбувається вихід Ca^{2+} з мітохондрій, який інгібується циклоспорином А (див.

рис.8), що свідчить про утворення МРТ. Встановлено також, що вивільнення мітохондріального фактора відбувається внаслідок утворення пори при концентраціях Ca^{2+} більших від порогових (див. рис. 8). Слід зазначити, що порогова концентрація не залежала від того, який саме субстрат (сукцинат чи глутамат) було використано для стимуляції мітохондріального дихання.

Таким чином, як показали проведені дослідження, за умов дії індуктора МРТ ФАО відбувається утворення МРТ, що супроводжується зниженням оптичної густини суспензії і виходом Ca^{2+} з мітохондрій.

Отже, результати експериментів, які було отримано на ізольованих мітохондріях із серця морських свинок і білих шурів, корелюють з результатами, отриманими на

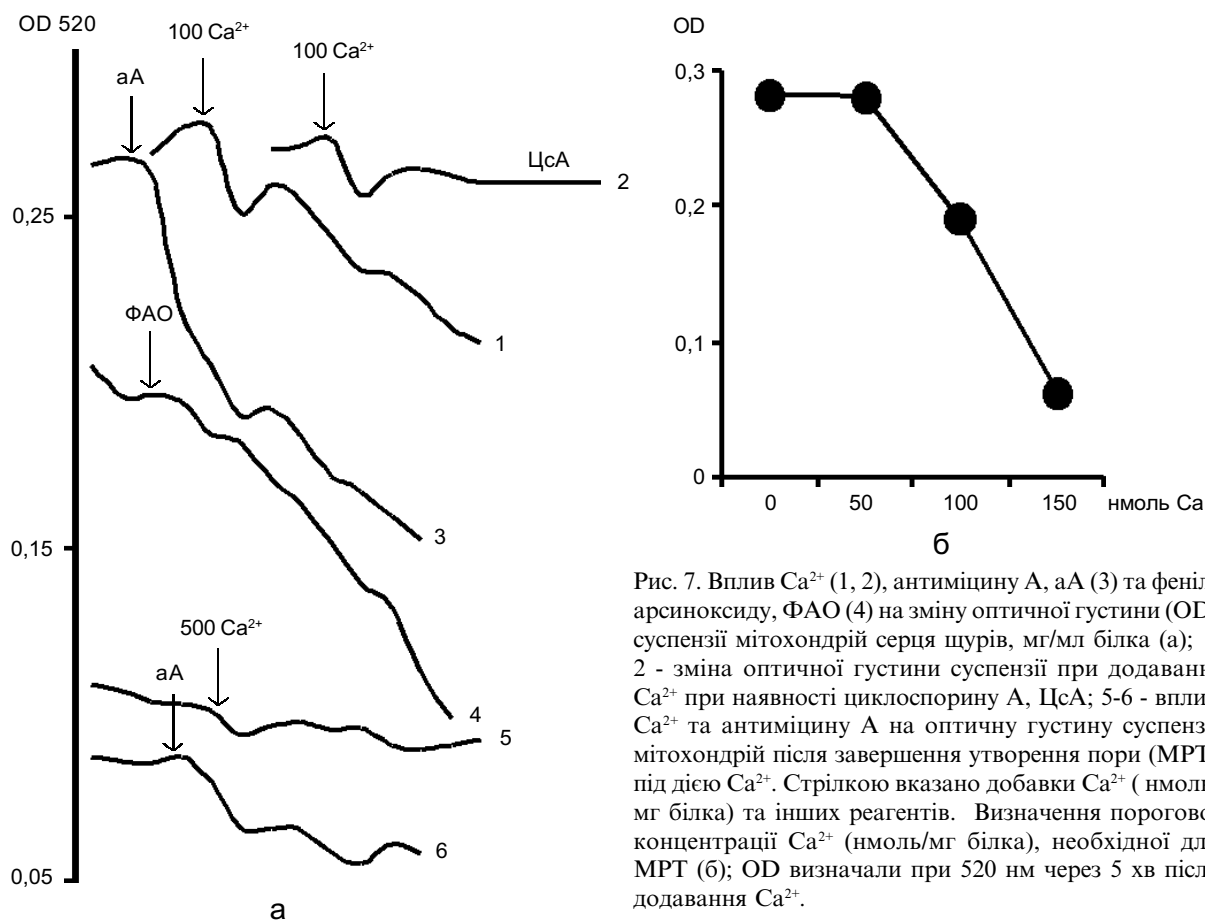


Рис. 7. Вплив Ca^{2+} (1, 2), антимицину А, аА (3) та феніл-арсиноксиду, ФАО (4) на зміну оптичної густини (OD) суспензії мітохондрій серця шурів, мг/мл білка (а); 2 - зміна оптичної густини суспензії при додаванні Ca^{2+} при наявності циклоспорино А, ЦсА; 5-6 - вплив Ca^{2+} та антимицину А на оптичну густину суспензії мітохондрій після завершення утворення пори (МРТ) під дією Ca^{2+} . Стрілкою вказано добавки Ca^{2+} (нмоль/мг білка) та інших реагентів. Визначення порогової концентрації Ca^{2+} (нмоль/мг білка), необхідної для МРТ (б); OD визначали при 520 нм через 5 хв після додавання Ca^{2+} .

ізолюваному ішемізованому серці морських свинок після реперфузії. Останні свідчать про циклоспоринчутливе вивільнення неідентифікованих речовин (фактора) за умов аноксії–реоксигенації мітохондрій, а також внаслідок дії інгібіторів мітохондріального дихання, зокрема, антимицину А. Отримані результати підтверджують припущення про мітохондріальне походження фактора, який знайдено при ішемії–реперфузії ізолюваного серця. Запобігання вивільненню мітохондріального фактора антиоксидантами мелатоніном і тролоксом вказує на можливий взаємозв'язок його вивільнення й активації окисних і вільнорадикальних процесів внаслідок інгібування мі-

тохондріального дихання за умов ішемії чи при дії антимицину А.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено вивільнення неідентифікованих речовин (фактора) із мітохондрій, викликане індуктором МРТ ФАО (10^{-5} моль/л) та умовами аноксії – реоксигенації, з максимумом поглинання в діапазоні довжин хвиль 240 – 245 нм. Це корелює зі значеннями оптичної густини речовин, які вивільнюються за умов реперфузії ізолюваного ішемізованого серця морської свинки. Специфічний інгібітор МРТ циклоспорин А (10^{-5} моль/л) практично повністю пригнічував

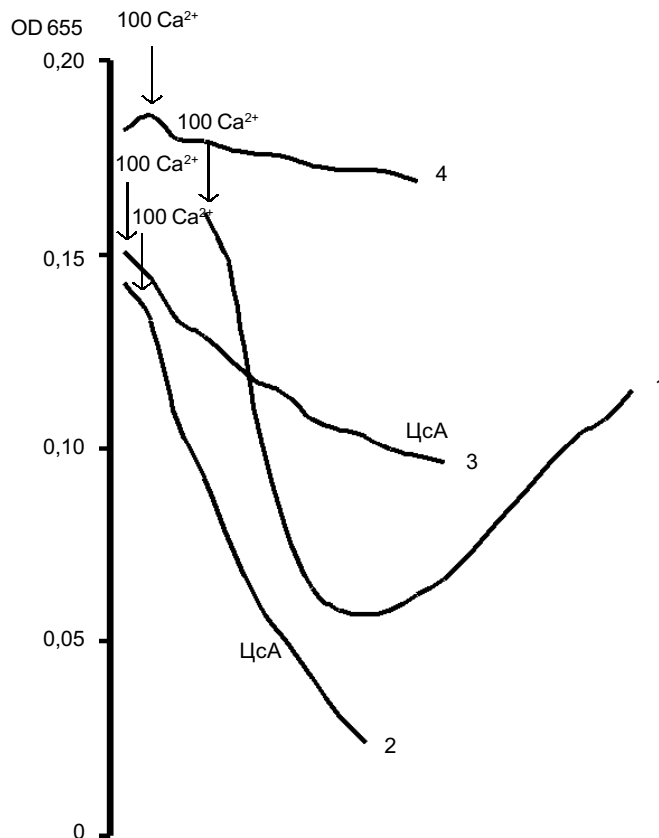


Рис. 8. Індукція мітохондріальної пори (МРТ) у суспензії мітохондрій серця щурів:
 1 - під дією порогових концентрацій Ca^{2+} (100 нмоль/мг білка) при наявності арсеназо-III.
 2-3 - послідовні добавки Ca^{2+} (100 нмоль/мг білка) при наявності циклоспорину А, ЦсА;
 4 - додавання Ca^{2+} до суспензії мітохондрій при наявності рутенієвого червоного.

ФАО-індуковане вивільнення мітохондріального фактора.

2. Показано, що за умов *in vitro* та *in vivo* антиоксиданти мелатонін і тролокс спричиняють захисну дію відносно вивільнення з мітохондрій фактора, індукованого ФАО та умовами аноксії – реоксигенації. SH-модифікатори ДТТ і ДЕМ *in vitro* попереджали ФАО-індуковане вивільнення цього фактора.

3. Знайдено, що інгібування аміногуанідіном NO-синтазної активності мітохондрій зменшує утворення мітохондріального фактора, що можливо внаслідок пригнічення утворення МРТ чи внаслідок входження NO до складу фактора.

4. Показано, що навантаження мітохондрій іонами Ca^{2+} при наявності Ca^{2+} -індикатора арсеназо-III призводить до зниження оптичної густини суспензії мітохондрій внаслідок утворення МРТ.

5. За допомогою методу світлорозсіювання ($\lambda = 520$ нм) показано, що ФАО в концентрації 10^{-5} моль/л спричиняє утворення МРТ, а циклоспорин А в тій самій концентрації – перешкоджає її утворенню, що може свідчити про причетність утворення пор до процесу вивільнення мітохондріального фактора.

V.F. Sagach, G.L. Vavilova, N.A. Strutinskaya,
O.V. Akopova

EFFECT OF INDUCTORS AND INHIBITORS OF THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE (MPT) ON ITS OPENING AND RELEASE OF UNIDENTIFIED MITOCHONDRIAL FACTOR

The release of an unidentified substance (factor) induced by sulfhydryl group (SH) modifier and mitochondrial permeability transition pore (MPT) inductor phenylarsine oxide (PAO) has been found *in vitro* on isolated guinea-pig and rat heart mitochondria. The factor was also released at oxidative stress. The factor release induced by PAO was inhibited by cyclosporin A (CsA), the MPT inhibitor. Protective actions of antioxidants melatonin and trolox *in vitro* and *in vivo*, as well as dithiothreitol (DTT) and diethylmaleate (DEM) were studied. The influences of nitric oxide (NO) donor, sodium nitroprusside (SNP) on the mitochondrial factor release were

also studied. We have shown the participation of this agent in the regulation of factor formation after inhibition of NO-synthase activity (NOS) by aminoguanidine. The data were obtained about MPT-opening after Ca^{2+} loading and under the influence of the MPT inductor PAO, inhibited by CsA. The results obtained on isolated mitochondria are in a good agreement with the those on the isolated guinea-pig heart after myocardial ischemia-reperfusion. It was concluded that mitochondria are essential for the factor formation and its release under ischemia-reperfusion of the myocardium.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology

National Academy of Science of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Р. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1990. – 528 с.
2. Данилович Ю.В. Транспорт Ca^{2+} в сарколемі міомерія в умовах її хімічної модифікації // Укр. біохім. журн. – 2002. – 74, № 3. – С.58 – 64.
3. 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.
4. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколемми и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // Биохимия. – 1985. – 50, № 8. – С.1350 – 1361.
5. Мальшев И.Ю. Введение в биохимию оксида азота. Роль оксида азота в регуляции основных систем организма // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1997. – 7, № 1. – С.49 – 55.
6. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных состояниях // Биохимия. – 2000. – 65, №4. – С.485 – 503.
7. Сагач В.Ф., Дмитрієва А.В., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, дослідження впливу на міокард, коронарні та периферичні судини // Фізіол. журн. – 2002. – 48, № 1. – С.3 – 8.
8. Al-Nasser I.A. Salicylate-induced kidney mitochondrial permeability transition is prevented by cyclosporin A // Toxicology Letters. – 1999. – 105. – P.1 – 8.
9. 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.
10. Bernardy P., Vassanelli S., Veronese P. et al. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore // J. Biol. Chem. – 1993. – 268. – P.1005-1010.
11. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration// Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – 1411. – P. 351 – 369.

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. Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death // *J. Physiol.* – 2000. – **529**, № 1. – P. 11 – 21.
14. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *Biochem J.* – 1999. – **341.** – P. 233 – 249.
15. 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.
16. Halestrap A.P., Mc Stray G.P., Clarke S.J. The permeability transition pore complex: another view // *Biochemie.* – 2002. – **84.** – P.153 – 166.
17. Hausenloy D.J., Maddock H.L., Baxter G.F., Yellon D.M. Inhibiting induces mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning ? // *Cardiovas. Res.* – 2002. – **55.** – P. 534 – 543.
18. Korge P., Goldhaber J.I., Weiss J.N. Phenylarsine oxide induces mitochondrial permeability transition hypercontracture, and cardiac cell death // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – **280.** – P.H2203 – H2213.
19. Kroemer G., Zamzami N., Susin S.A. Mitochondrial control of apoptosis // *Immunol. Today.* – 1997. – **18.** – P. 44 – 51.
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. Mather M., Rottenberg H. Ageing enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria // *Biophys. Biochem. Res. Commun.* – 2000.- **273.** – P. 603 – 608.
22. Petit P.X., Goubern M., Diolez P., Susin S.A. et al. Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition // *FEBS Lett.* – 1998. – **426.** – P. 111 – 116.
23. Richter C., Schweizer M., Cossarizza A., Franceschi C. Control apoptosis by the cellular ATP level // *FEBS Lett.* – 1996. – **378**, № 2. – P.107 – 110.

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

*Матеріал надійшов
до редакції 22.11.2002*