

## ОСОБЕННОСТИ ТРАНСПОРТА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И ИНДУКЦИИ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПОР В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ ПТИЦ

Дубинин М.В., Ведерников А.А., Теньков К.С., Старинец В.С.,  
Хорошавина Е.И., Белослудцев К.Н., Самарцев В.Н.  
Марийский государственный университет  
пл. Ленина, 1, г. Йошкар-Ола, 424001, РФ  
e-mail: dubinin1989@gmail.com

**Аннотация.** На изолированных митохондриях печени лабораторных крыс, а также птиц (цесарок и голубей) исследована кинетика процессов, сопровождающих индукцию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры во внутренней мембране: набухание органелл, выход  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса, падение мембранного потенциала. Отмечается, что митохондрии крыс, цесарок и голубей схожи по показателям дыхания и окислительного синтеза АТФ. Установлено, что митохондрии изучаемых крыс, цесарок и голубей, энергизованные путем окисления сукцината и инкубируемые в присутствии 1 мМ неорганического фосфата, эффективно набухают при добавлении  $\text{CaCl}_2$  в количестве как минимум 125, 875 и 1000 нмоль на 1 мг белка соответственно. Циклоспорин А эффективно ингибировал набухание митохондрий. Показано, что митохондрии крыс и цесарок, но не голубей, способны эффективно поглощать и удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе. Кальциевая емкость митохондрий крыс и цесарок составляет соответственно 70 и 844 нмоль  $\text{CaCl}_2$  на 1 мг белка.

**Ключевые слова:** митохондрии печени,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая пора, циклоспорин А, птицы.

## FEATURES OF CALCIUM ION TRANSPORT AND INDUCTION OF CALCIUM-DEPENDENT PORES IN LIVER MITOCHONDRIA OF BIRDS

Dubinin M.V., Vedernikov A.A., Tenkov K.S., Starinets V.S.,  
Khoroshavina E.I., Belosludtsev K.N., Samartsev V.N.  
Mari State University  
pl. Lenina, 1, Yoshkar-Ola, 424001, Russia  
e-mail: dubinin1989@gmail.com

**Abstract.** The kinetics of the processes accompanying the induction of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in the inner membrane-swelling of organelles,  $\text{Ca}^{2+}$  release from the matrix and drop in the membrane potential - was studied in isolated liver mitochondria of laboratory rats and birds (guinea fowls and pigeons). It is noted that the mitochondria of rats, guinea fowls and pigeons are similar in terms of respiration and oxidative ATP synthesis. It was established that mitochondria of rats, guinea fowls and pigeons energized by succinate oxidation and incubated with 1 mM of inorganic phosphate are able to swell upon the addition of 125, 875 and 1000 nmol of  $\text{CaCl}_2$  per 1 mg protein, respectively. Cyclosporin A effectively inhibited mitochondrial swelling. It was shown that mitochondria of rats and guinea fowls but not of pigeons are able to effectively absorb and retain  $\text{Ca}^{2+}$  in the matrix. Calcium retention capacity of mitochondria from rats and guinea fowls were, respectively, 70 and 844 nmol of  $\text{CaCl}_2$  per 1 mg of protein.

**Key words:** liver mitochondria,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore, cyclosporin A, birds.

Считается, что митохондрии играют ведущую роль в процессах регуляции функций клетки при участии свободного  $\text{Ca}^{2+}$  [1]. В энергизованном состоянии эти органеллы обладают способностью транспортировать  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс посредством кальциевого унипортера [2,3]. Пути выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий различны. При этом максимальный выход  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса этих органелл наблюдается при условии индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны для ионов и растворимых в воде веществ с молекулярной массой до 1500 Да по их градиенту концентрации, эквивалентный открытию митохондриальной поры [2-4]. Образование такой поры приводит к нарушению энергетических функций митохондрий, прежде всего синтеза АТФ, а также может вызвать набухание матрикса митохондрий, разрыв внешней мембраны и, как следствие, выход находящихся в межмембранном пространстве цитохрома *c* и других, так называемых, апоптогенных белков [2-4].

В настоящий момент предполагается участие целого ряда белков внутренней мембраны митохондрий в формировании основного порового компонента. К ним относятся ADP/АТФ-антипортер, переносчик фосфата и  $\text{F}_0\text{F}_1$ -АТФ-синтаза [5]. В то же время молекулярная природа поры до сих пор является предметом дискуссии, и мнение большинства исследователей сходится лишь в том, что важную регулирующую роль выполняет циклофилин D – белок, являющийся мишенью циклоспорина А (ЦсА) [2,3,5]. Эффективным природным индуктором  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры во внутренней мембране митохондрий печени является неорганический фосфат (Р) [6].

На сегодняшний день механизмы и пути регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости, в основном, изучены на митохондриях млекопитающих, которые характеризуются короткой продолжительностью жизни [7]. Имеются лишь фрагментарные данные, свидетельствующие о возможности индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях других видов позвоночных и беспозвоночных животных. Птицы, обладающие схожей с некоторыми млекопитающими массой тела, отличаются от них более интенсивным метаболизмом, более высокой температурой тела, а также большей продолжительностью жизни.

Целью настоящей работы было выяснение особенностей индукции ЦсА-чувствительной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени птиц (цесарок и голубей), а также

сравнение полученных данных с результатами, полученными на митохондриях печени контрольных животных (крыс).

В работе были использованы млекопитающие – лабораторные крысы, а также птицы, отличающиеся как потенциальной максимальной продолжительностью жизни, так и интенсивностью метаболизма, который связан с массой тела [8]. Птицы зрелого возраста (самцы): цесарки (*Numida meleagris*) серо-крапчатой популяции (СКП) (масса тела 1570–2100 г.), сизые голуби (*Columba livia*) (масса тела 420–460 г). Условия содержания, кормления и забоя животных соответствовали международным правилам «Guide for the Care and Use of Animals». Митохондрии из печени изучаемых животных выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS-Tris (pH 7,4). Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарную кислоту, 5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{P}_i$ ), 0,5 мМ EGTA, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ MOPS-Tris (pH 7,4) и БСА (0,2–0,4 мг/мл). При исследовании индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарную кислоту, 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 мкМ EGTA, 10 мМ MOPS-Tris (pH 7,4). Набухание митохондрий регистрировали по изменению оптической плотности суспензии митохондрий (А) при длине волны 540 нм. Проницаемость внутренней мембраны митохондрий для ионов кальция и кальциевую емкость митохондрий определяли с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -селективного электрода.  $\Delta\psi$  на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катионов  $\text{TPP}^+$ , концентрацию которых регистрировали  $\text{TPP}^+$ -чувствительным электродом.

В таблице 1 приведены данные, характеризующие митохондрии печени исследуемых животных как по показателям дыхания в различных состояниях ( $J_2$ ,  $J_3$ ,  $J_4$ ,  $J_u$ ), так и по показателям степени сопряжения дыхания с окислительным синтезом АТФ ( $RC_2$ ,  $RC_4$ ,  $ADP/O$ ). Как видно из таблицы, митохондрии печени крыс, голубей и цесарок не отличаются по указанным показателям, за исключением скорости разобщенного 2,4-динитрофенолом дыхания.

Таблица 1 – Сравнение показателей дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени различных животных

Животные	$J_2$	$J_3$	$J_4$	$J_u$	$RC_2$	$ADP/O$
	нмоль $\text{O}_2$ / мин на 1 мг белка				относительные единицы	
Крысы ( $n=8$ )	$10.9 \pm 0.4$	$43.7 \pm 1.8$	$10.6 \pm 0.4$	$65.8 \pm 1.7$	$4.01 \pm 0.06$	$1.73 \pm 0.03$
Голуби ( $n=7$ )	$9.8 \pm 0.7$	$38.3 \pm 2.8$	$10.1 \pm 0.7$	$46.1 \pm 3.0^*$	$3.91 \pm 0.18$	$1.65 \pm 0.07$
Цесарки ( $n=8$ )	$10.2 \pm 0.5$	$44.2 \pm 2.6$	$11.2 \pm 0.6$	$51.8 \pm 3.1$	$4.36 \pm 0.22$	$1.75 \pm 0.03$

*Примечание.* Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.  $n$  – количество экспериментальных животных (независимых экспериментов). \*Различия между показателями митохондрий контрольной группы животных (крысы) и показателями митохондрий указанных групп животных статистически значимы,  $p < 0,05$  (критерий Стьюдента).

Известно, что в энергизованных митохондриях печени формирование неспецифической проницаемости внутренней мембраны для растворимых в воде ионов и веществ с молекулярной массой до 1500 Да приводит к высокоамплитудному набуханию органелл [6]. Такое набухание митохондрий приводит к уменьшению рассеивания проходящего через суспензию света, и это может быть зарегистрировано как снижение оптической плотности суспензии этих органелл [6]. Как показано на рисунке 1 (кривая *a*), добавление 125 нмоль  $\text{CaCl}_2$  на 1 мг белка к энергизованным митохондриям печени крыс, инкубируемых в сахарозной среде с  $\text{P}_i$  приводит к существенному снижению оптической плотности суспензии. В присутствии ЦсА такого эффекта не наблюдается (см. рис. 1, *a*).

Митохондрии печени цесарок и голубей по сравнению с митохондриями печени крыс обладают значительно более высокой резистентностью по отношению к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как к индуктору открытия «классической» ЦсА-чувствительной поры. Существенное снижение оптической плотности суспензии митохондрий печени цесарок и голубей, свидетельствующее об индукции поры, наблюдается только при условии добавления  $\text{CaCl}_2$  в количестве как минимум 875 и 100 нмоль на 1 мг белка соответственно.

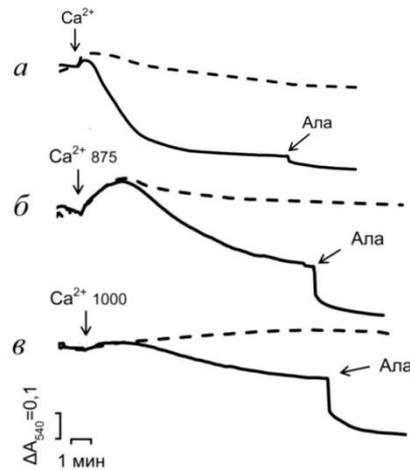


Рисунок 1 – Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени крыс (а), цесарок (б) и голубей (в) инкубируемых в присутствии 1 мМ  $P_i$ , при добавлении 125 нмоль на 1 мг белка  $CaCl_2$  ( $Ca^{2+}$ ), 875 нмоль на 1 мг белка  $CaCl_2$  ( $Ca^{2+}$  875) и 1000 нмоль на 1 мг белка  $CaCl_2$  ( $Ca^{2+}$  1000) в отсутствие (сплошная линия) и присутствии (пунктирная линия) 1 мкМ ЦСА

На рисунке 2 представлены результаты исследований кинетики транспорта  $Ca^{2+}$  митохондрий печени крыс, цесарок и голубей, инкубируемых в сахарозной среде в присутствии  $P_i$ . В отсутствие ЦСА митохондрии печени крыс способны полностью поглощать  $Ca^{2+}$  при условии добавления  $CaCl_2$  5 раз по 13.3 нмоль на 1 мг белка (см. рис. 2, а), в этом случае после шестой добавки  $CaCl_2$  наблюдается выход  $Ca^{2+}$  из митохондрий. В отличие от митохондрий печени крыс, митохондрии печени цесарок способны даже в отсутствие ЦСА поглощать и удерживать  $Ca^{2+}$  при условии добавления  $CaCl_2$  6 раз по 133 нмоль на 1 мг белка (см. рис. 2, б, кривая 1). Совсем иная картина наблюдается на митохондриях печени голубей - митохондрии печени этих птиц существенно отличаются от митохондрий печени крыс и цесарок, так как не обладают способностью полностью захватывать и удерживать в матриксе  $Ca^{2+}$  (рис. 2, в). Это, однако, не препятствует индукции  $Ca^{2+}$ -зависимой поры, по крайней мере, у части митохондрий этих птиц. Более подробное изучение этого феномена – задача последующих исследований. В то же время следует отметить, что в присутствии избытка  $Ca^{2+}$  для митохондрий печени всех изученных животных характерно необратимое падение потенциала (данные не приведены).

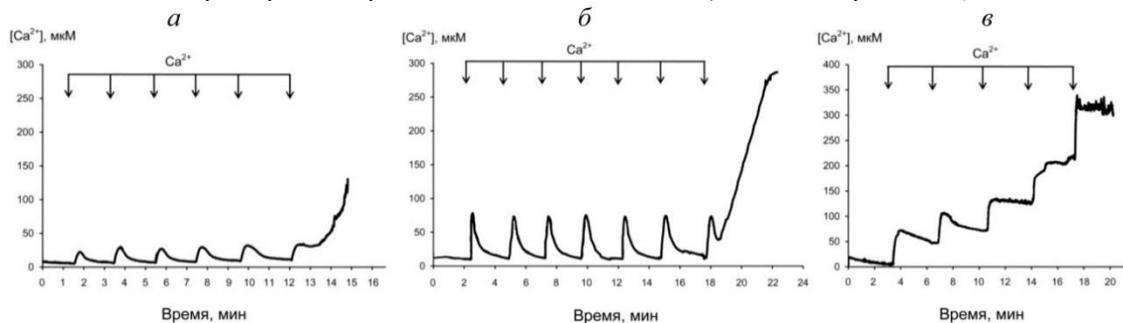


Рисунок 2 – Транспорт  $Ca^{2+}$  в митохондриях печени крыс (а), цесарок (б) и голубей (в), инкубируемых в присутствии 1 мМ  $P_i$ . Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $CaCl_2$  по 13,3 (а), 133 (б) и 66 (в) нмоль на 1 мг белка ( $Ca^{2+}$ )

Одной из величин, позволяющей оценивать и сравнивать устойчивость митохондрий различных животных к индукции  $Ca^{2+}$ -зависимой поры является кальциевая емкость (КЕ) митохондрий, т.е. то максимальное количество  $Ca^{2+}$ , которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры [6]. Очевидно, что исходя из кинетики поглощения  $Ca^{2+}$  (рис. 2), можно определить КЕ митохондрий указанных животных за исключением голубей. Как показано в таблице 2, КЕ митохондрий печени цесарок существенно превосходит таковую для митохондрий печени крыс. Предварительная инкубация органелл с 1 мкМ ЦСА приводила к существенному повышению КЕ митохондрий печени животных

Таблица 2– Сравнение кальциевой емкости (нмоль  $CaCl_2$ /на 1 мг белка) митохондрий печени крыс, цесарок и голубей в отсутствие и в присутствии 1 мкМ ЦСА

Животные	Без добавок	ЦСА
Крысы ( $n = 9$ )	$70 \pm 5$	$933 \pm 51$
Цесарки СКП ( $n = 6$ )	$844 \pm 46^*$	$1400 \pm 67^*$
Голуби ( $n = 7$ )	-	-

*Примечание.* Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.  $n$  – количество экспериментальных животных (независимых экспериментов). \*Выявлены статистически значимые различия между показателями митохондрий цесарок и аналогичными показателями митохондрий крыс,  $p < 0,05$  (критерий Стьюдента).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что митохондрии печени исследуемых птиц обладают существенно большей резистентностью к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры, чем митохондрии печени млекопитающих. Известно, что для эффективной индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры необходим транспорт этих ионов в матрикс [2-4]. В связи с этим более высокая резистентность к индукторам ЦсА-чувствительной поры митохондрий печени голубей может быть обусловлена их неспособностью захватывать и удерживать в матриксе  $\text{Ca}^{2+}$  в необходимом для индукции поры количестве. В отличие от этого митохондрии печени цесарок способны эффективно поглощать и удерживать в матриксе  $\text{Ca}^{2+}$  в существенно большем количестве, чем митохондрии печени млекопитающих.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00435).

#### **Список литературы / References:**

1. Сарис Н.-Е.Л., Карафоли Э. Роль митохондрий в перераспределении внутриклеточного кальция: исторический обзор. *Биохимия*, 2005, т. 70, с. 231-239. [Saris N.E., Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biokhimiya*, 2005, vol. 70, pp. 231-239. (In Russ.)]
2. Lemasters J.J., Theruvath T.P., Zhong Z., Nieminen A.L. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, vol. 1787, pp. 1395-1401.
3. Rasola A., Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis. *Cell. Calcium*, 2011, vol. 50, pp. 222-233.
4. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. *Мембранная биоэнергетика*. М: Изд. Московского университета, 2010, 368 с. [Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinsky F.O. *Membrannaja bioenergetika*. Moscow: Moscow University Press, 2010, 368 p. (In Russ.)]
5. Самарцев В.Н., Дубинин М.В. *Взаимодействие жирных кислот с митохондриями: индукция свободного окисления и кальций-зависимой проницаемости внутренней мембраны*. Йошкар-Ола: изд-во МарГУ, 2016, 176 с. [Samartsev V.N., Dubinin M.V. *Interaction of fatty acids with mitochondria: induction of free oxidation and calcium-dependent permeability of the inner membrane*. Yoshkar-Ola: MarSU Publishing House, 2016, 176 p. (In Russ.)]
6. Varanyuwatana P., Halestrap A.P. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*, 2012, vol. 12, pp. 120-125.
7. Azzolin L., von Stockum S., Basso E., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P. The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, pp. 2504-2509.
8. Furness L.J., Speakman J.R. Energetics and longevity in birds. *Age (Dordr.)*, 2008, vol. 30, pp. 75-87.

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕВЫХ БЕЛКОВ НА МИКРОТРУБОЧКАХ**

Костарев А.В., Мустьяца В.В., Творогова А.В., Атауллаханов Ф.И., Гудимчук Н.Б., Воробьев И.А.  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
ул. Воробьевы горы, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ  
e-mail: aleksandrkostarevv@gmail.com

**Аннотация.** Микротрубочки – белковые внутриклеточные конструкции, напоминающие трубку, сделанную из протофиламентов – длинных цепочек из белка тубулина. Они динамически нестабильны, что выражается в их постоянном пребывании в фазах роста или укорочения. Микротрубочки участвуют во множестве внутриклеточных процессов, таких как внутриклеточный транспорт, сегрегация хромосом и формирование веретена деления. Эффективный метод исследования динамики микротрубочек основан на особых концевых белках. Концевые белки включают семейство EB-белков (EB1, EB2, EB3), которые распознают только растущий плюс-конец микротрубочки. Считается, что они распознают область, богатую ГТФ-тубулинами и отвечающую за стабильность микротрубочки. В рамках данной работы мы решили проверить эту гипотезу, измерив корреляцию между размером области, распознаваемой белком EB3, скоростью роста микротрубочки и временем роста микротрубочки. Полученные данные, особенно в контексте сравнения с опубликованными ранее результатами *in vitro* экспериментов, позволяют лучше понять характер изменения структуры конца микротрубочек во время роста, а, следовательно - приближают нас к пониманию механизмов динамической нестабильности микротрубочек в живых клетках.

**Ключевые слова.** Концевой белок, микротрубочка, ГТФ-тубулин, динамическая нестабильность.