

УДК 577.342.45:61

## АКУМУЛЯЦІЯ КАЛЬЦІЮ МІТОХОНДРІЯМИ НА РАННІХ ЕТАПАХ АПОПТОЗУ ТИМОЦИТІВ ЩУРА

Гребіник Д. М., Матишевська О.П.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
E-mail: grebinik@yahoo.com

Надійшла до редакції 12.11..2008

Досліджено параметри функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем мітохондрій тимоцитів у контролі і на ранніх етапах апоптозу, індукованого перекисом водню у кінцевій концентрації 0,1 мМ. Показано зниження  $\text{Ca}^{2+}$ -акумулюючої здатності мітохондрій, а також зміна кінетичних параметрів накопичення кальцію цими органелами на ранніх етапах після дії  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Припускається, що можливою причиною виявлених ефектів є порушення бар'єрної функції і селективної проникності мітохондріальних мембран.

**Ключові слова:** мітохондрії, апоптоз, кальцій, перекис водню.

### ВСТУП

Останнім часом все більшу увагу дослідників привертає дослідження механізмів так званого безрецепторного апоптозу – каспазо-залежної форми загибелі, яка індукується без участі рецепторів клітинної смерті на плазматичній мембрані [1-3]. Дана форма апоптозу включає в себе стадії, які характеризуються втратою мітохондріями їх фізіологічної функціональної активності, підвищенням проникності мітохондріальних мембран, порушенням регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних процесів, роз'єднанням окислення і фосфорилування, і, як наслідок, підвищеною продукцією активних форм кисню (АФК) та окисним стресом цих органел [1,2]. Вважається, що мітохондріальна стадія є важливою для подальшого розвитку апоптозу, оскільки результатом порушення структури мітохондрій (так званого набухання) є вихід з них у цитозоль цілої низки апоптогенних факторів [3,4].

У якості об'єкту досліджень нами було обрано ізольовані тимоцити щура, оскільки раніше нами було показано, що під впливом 0,1 мМ пероксиду водню у цих клітинах виявляються типові ознаки апоптозу, а саме - ДНК, виділена з ядер тимоцитів через 3 год інкубації клітин з пероксидом, зазнає міжнуклеосомної фрагментації за типом „ladder-pattern” [5]. Також нами було виявлено, що за дії пероксиду водню концентрація вільного цитозольного кальцію у тимоцитах зростає вже через 2 год інкубації клітин і досягає

максимального значення через 3 год, перевищуючи контрольне значення майже у 6 разів. [5].

Враховуючи вищевикладене, основними задачами даної роботи було оцінити акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями та визначити кінетичні параметри функціонування мітохондріальної  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортної системи у контролі та за дії  $\text{H}_2\text{O}_2$  на моделі пермеабілізованих дигітоніном тимоцитів щура.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Тимоцити отримували з тимусу щурів лінії Вістар вагою 120-150 г. Тимус перетирали через нейлонове сито в буфер А, що містив (мМ):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  - 3,  $\text{KCl}$  - 5,  $\text{NaCl}$  - 120, глюкоза - 10,  $\text{HEPES}$  - 5,  $\text{NaHCO}_3$  - 4,  $\text{MgCl}_2$  - 1 и  $\text{CaCl}_2$  - 1. Кількість життєздатних клітин визначали у камері Горяєва з використанням 0,2%-го трипанового синього.

Інкубацію тимоцитів ( $2 - 4 \times 10^6$  клітин/мл) проводили у термостаті у середовищі RPMI-1640. Після осадження (600g, 10 хв) клітини переводили у буфер А.

Накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями оцінювали ізотопним методом, інкубуючи тимоцити ( $1 \times 10^7$  клітин) за  $37^\circ \text{C}$  середовищі об'ємом 0,5 мл, що містило 15 мкМ дігітонін для подолання бар'єрної функції плазматичної мембрани, а також 20 мМ  $\text{HEPES}$ , 125 мМ  $\text{KCl}$ , 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 3 мМ АТФ, 10 мкМ  $^{40}\text{CaCl}_2$  + 1 мкКи  $^{45}\text{CaCl}_2$  (Amersham), 2 мМ  $\text{K}^+$ -фосфатний буфер (pH = 7,4), 3 мМ сукцинат

натрію, а також 100 нМ тапсигаргін для попередження накопичення катіону в ЕПР.

Реакцію зупиняли швидкою фільтрацією проб через фільтри "Millipore" (0,45 мкм), котрі тричі промивали 3 мл охолодженого розчину, що містив 150 мМ КСІ, 5 мМ  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4. Для визначення адсорбції кальцію суспензію клітин наносили на фільтри відразу після додавання мітки у середовищі, що не містило  $\text{MgCl}_2$ . Радіоактивність проб вимірювали на рідинносцинтиляційному лічильнику Delta (США). Кількість акумульованого у мітохондріях  $\text{Ca}^{2+}$  розраховували за різницею між загальним накопиченням катіону із середовища інкубації та його адсорбцією.

Кінетичні параметри  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортуючих систем мітохондрій тимоцитів, а саме початкову швидкість накопичення  $V_0$  і кальцієву ємність  $P_{\text{макс}}$  визначали за методом, описаним у [6].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами з використанням t-критерію Стьюдента.

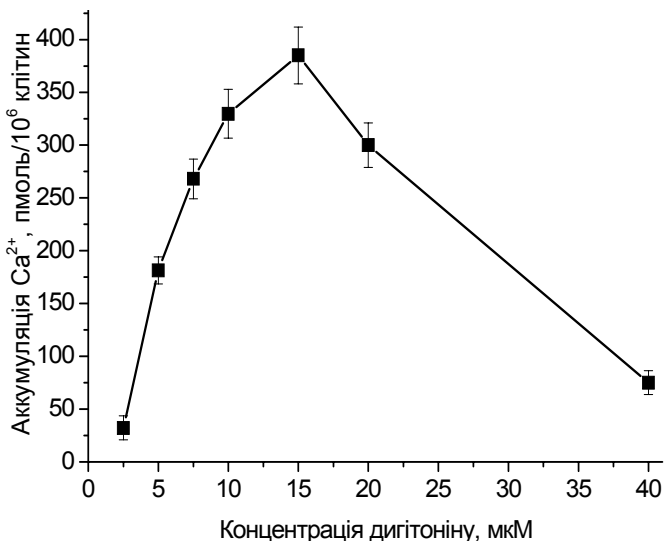


Рис. 1. Залежність накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  тимоцитами від концентрації дигітоніну у середовищі інкубації.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Особливості та механізми функціонування систем акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях та ЕПР тимоцитів, а також внесок цих систем у підтримання кальцієвого гомеостазу вивчені недостатньо, оскільки дослідження АТФ-залежного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішньоклітинні структури інтактних тимоцитів ускладнені. Цих ускладнень можна уникнути, використовуючи пермеабілізовані дигітоніном клітини, що дозволяє забезпечити доступ АТФ та  $\text{Ca}^{2+}$  всередину клітин та зберегти природне співвідношення об'ємів внутрішньоклітинних  $\text{Ca}^{2+}$ -депо.

Виявилось, що оброблені дигітоніном (2-30 мкМ) тимоцити здатні накопичувати  $\text{Ca}^{2+}$  із стандартного середовища інкубації. Як видно з даних, представлених на рис. 1, максимальний рівень накопиченого за 5 хв катіону був виявлений за присутності 15 мкМ дигітоніну і становив  $405 \pm 21$  пмоль/10<sup>6</sup> клітин.

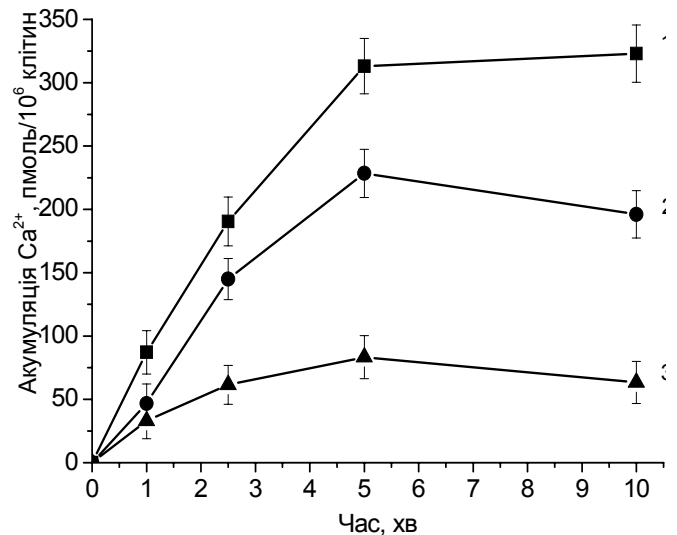


Рис. 2. Акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями тимоцитів у контролі (1) та через 5 (2) і 15 хв (3) після дії  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Таблиця 1

Кінетичні параметри накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями тимоцитів в контролі та після дії 0,1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ )

Проба	Час інкубації, хв	$P_{\text{макс}}$ , пмоль $^{45}\text{Ca}^{2+}/10^6$ кл	$V_0$ , пмоль $^{45}\text{Ca}^{2+}/10^6$ кл $\times$ хв
контроль	-	$336 \pm 16$	$106 \pm 8$
0,1 мМ $\text{H}_2\text{O}_2$	5	$232 \pm 11^*$	$80 \pm 7^*$
	15	$83 \pm 4^*$	$42 \pm 5^*$

Примітки: \* -  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем.

Динаміку накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях контрольних клітин представлено на рис. 2 (крива 1). Крива акумуляції катіону мітохондріями тимоцитів мала тенденцію до встановлення рівноважного стаціонарного рівня акумульованого

$\text{Ca}^{2+}$  на 5-й хвилині інкубації, який виявився значним. Результати кінетичного аналізу кривої акумуляції катіону у мітохондрії контрольних клітин, а саме – значення максимального рівня

накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\max}$ ) та початкової швидкості акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  ( $V_0$ ), представлені у табл. 1.

Активність системи акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях після дії пероксиду водню досліджували, інкубуючи тимоцити у присутності 0,1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  упродовж 5 та 15 хв, після чого клітини переносили у середовище, що містило дігітонін та  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

Як видно з даних, представлених на рис. 2, вже через 5 хв після інкубації клітин у присутності 0,1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  спостерігається зниження активності  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючої системи мітохондрій (крива 2). Стаціонарний рівень накопичення катіону, який встановлюється на 5-ій хвилині інкубації, знижується в 1,5 рази порівняно з контролем. Через 15 хв після дії  $\text{H}_2\text{O}_2$  спостерігається ще більш значне пригнічення накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями тимоцитів (крива 3) - стаціонарний рівень акумуляції на 5-ій хвилині інкубації падає в 3,5 рази у порівнянні з контролем.

Результати кінетичного аналізу отриманих кривих (табл. 1) показали, що вже через 5 хв після інкубації клітин у присутності 0,1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  спостерігається зниження активності  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючої системи мітохондрій - кальцієва ємність  $P_{\max}$  знижується у 1,4 рази порівняно з контрольним значенням, а початкова швидкість накопичення катіону  $V_0$  - у 1,3 рази. Через 15 хв після обробки тимоцитів пероксидом водню спостерігається більш значне зниження кінетичних параметрів входу  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондрії:  $P_{\max}$  знижується у 4 рази, а  $V_0$  - у 2,5 рази у порівнянні з контролем.

Отримані дані можна пояснити наступним чином. Дія  $\text{H}_2\text{O}_2$  як індуктора утворення АФК супроводжується, перш за все, зниженням здатності мітохондрій до накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  з цитозолу. Першопричиною такого зниження може бути порушення функціонування залежного від величини мембранного потенціалу  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера. У подальшому активність  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючої системи мітохондрій може пригнічуватись внаслідок окиснення мембранних фосфоліпідів та підвищення неспецифічної проникності внутрішньої мембрани мітохондрій [1-3].

Виявлений вплив  $\text{H}_2\text{O}_2$  на структурний стан мітохондріальної мембрани слід пов'язувати насамперед з його перетворенням на високо-реакційний гідроксил-радикал  $\cdot\text{OH}$  у присутності  $\text{Fe}^{2+}$  та з посиленням процесів неферментативного вільнорадикального окиснення. Відомо, що за фізіологічних умов вміст заліза у мітохондріях, окрім гемового та того, що входить до складу FeS білків, становить приблизно 1,7 нмоль/мг білка - це залізо зв'язане у складі низькомолекулярних комплексів з АДФ, ГТФ, АТФ та цитратом [7]. Припускають, що під впливом продуктів вільнорадикального окиснення порушуються бар'єрні властивості ліпідного бішару мітохондріальних мембран, зокрема посилюється

проникність мембран для іонів  $\text{H}^+/\text{OH}^-$ , внаслідок чого зростає продукція супероксид-аніону у ході одноелектронного відновлення  $\text{O}_2$  у дихальному ланцюгу та формується замкнене коло процесів вільнорадикального окиснення [1].

У літературі є дані, що АФК та внутрішньомітохондріальний кальцій можуть діяти сумісно, індуюючи проникність внутрішньої мітохондріальної мембрани [8]. Так, відомо, що перевантаження мітохондрій іонами кальцію призводить до інгібування I комплексу дихального ланцюга мітохондрій, за рахунок чого відбувається додаткове посилене утворення АФК з наступним окисненням тіолових груп білків мітохондріальних мембран [1,2]. Такі події сприяють утворенню пор у внутрішній мембрані мітохондрій - так званих неселективних мітохондріальних пор, що здатні пропускати речовини масою до 1500 Да. Найбільш вірогідним білком, залученим до формування подібних пор за умов окисного стресу вважається вбудований у внутрішню мітохондріальну мембрану АДФ/АТФ антипортер, який містить 4 тіолові групи цистеїну, що легко окиснюються. Зміна конформації АДФ/АТФ антипортера за таких умов сприяє утворенню неселективної мітохондріальної пори [1,2].

Ще одним механізмом підвищення проникності мітохондріальних мембран може бути активація фосфоліпази  $\text{A}_2$ , яка знаходиться на внутрішній мембрані мітохондрій. Цей фермент активується іонами  $\text{Ca}^{2+}$ , які містяться не у мітохондріальному матриксі, а поза мітохондріями. У нормі мітохондрії поглинають кальцій, видаляючи його із середовища, і тим самим активуюча дія  $\text{Ca}^{2+}$  запобігається. Внаслідок посилення активності фосфоліпази  $\text{A}_2$  у мітохондріях підвищується вміст жирних кислот, які, як відомо, посилюють мембранну провідність та проникність для катіонів.

## ВИСНОВКИ

Отже, отримані нами дані вказують на те, що у тимоцитах на ранніх етапах після дії  $\text{H}_2\text{O}_2$  відбувається зміна проникності мітохондріальних мембран, порушення процесів трансмембранного обміну катіону у мітохондріях та зниження  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючої здатності цих органел, що може бути однією з причин раннього підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі оброблених  $\text{H}_2\text{O}_2$  тимоцитів.

## Література

1. Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. L., Anders M. W., et. al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. - 2004. - Vol. 287. - P. 817 - 833.

2. *Brini M.* Ca<sup>2+</sup> signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology // *Cell. Calcium.* – 2003. – Vol. 34, №4-5. – P. 399-405.
3. *Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P.* Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2003. – Vol. 4, №7. – P. 552-65.
4. *Patterson S.D., Spahr C.S., Daugas E., Susin S.A., et al.* Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition // *Cell. Death. Differ.* – 2000. – Vol. 7, №2. – P. 137-144.
5. *Гребиник Д. М., Коваль Т. В., Матишевская О. П.* Исследование кальциевого гомеостаза в тимоцитах при апоптозе. I. Повышение концентрации цитозольного Ca<sup>2+</sup> на ранней стадии апоптоза, индуцированного пероксидом водорода // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – Т. 76, № 6. – С. 63 – 69.
6. *Костерин С. А., Бурчинская Н. Ф.* Метод определения кинетических характеристик Ca<sup>2+</sup>-транспортирующих систем субклеточных структур гладких мышц // *Укр. биохим. журн.* – 1987. – Т. 59, №2. – С. 66-69.
7. *Halliwell B. Gutteridge JM.* Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview // *Methods Enzymol.* - 1990. – Vol. 186. – P. 1 - 85.
8. *Гордеева А.В., Звягильская Р.А., Лабас Ю.А.* Взаимосвязь между активными формами кислорода и кальцием в живых клетках // *Биохимия.* - 2003. – Т.68, вып. 10. – С.1318 – 1332.

## АККУМУЛЯЦИЯ КАЛЬЦИЯ МИТОХОНДРИЯМИ НА РАННИХ ЭТАПАХ АПОПТОЗА ТИМОЦИТОВ КРЫСЫ

**Гребиник Д. Н., Матишевская О.П.**

Исследованы параметры функционирования Ca<sup>2+</sup>-транспортных систем митохондрий тимоцитов в контроле и на ранних этапах апоптоза, индуцированного пероксидом водорода в конечной концентрации 0,1 мМ. Показано снижение Ca<sup>2+</sup>-аккумулирующей способности митохондрий, а также изменение кинетических параметров накопления кальция этими органеллами на ранних этапах после действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Предполагается, что возможной причиной обнаруженных эффектов является нарушение барьерной функции и селективной проницаемости митохондриальных мембран.

**Ключевые слова:** митохондрии, апоптоз, кальций, пероксид водорода.

## CALCIUM ACCUMULATION IN MITOCHONDRIA AT THE EARLY STAGES OF RAT THYMOCYTE APOPTOSIS

**Grebinyk D.M., Matyshevskya O.P.**

The functional parameters of mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-transporting systems of rat thymocytes, both at the control conditions and at the early stages of rat thymocyte apoptosis induced by 0,1 Mm hydrogen peroxide, were studied. At the early stages after addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> the Ca<sup>2+</sup>-accumulating ability of mitochondria, as well as the kinetic parameters of this accumulation, were shown to be decreased. It was suggested that alterations of barrier function and selective permeability of mitochondrial membranes might be the possible cause of the effects discovered.

**Key words:** mitochondria, apoptosis, calcium, hydrogen peroxide.