

## ЛЕКЦИЯ

УДК 577.352

©Заводник

### МИТОХОНДРИИ, КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ И КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

*И.Б. Заводник*

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,  
Беларусь, 230030 Гродно, Бульвар Ленинского комсомола, 50; тел. +375 152484583; факс: +375 152434121;  
эл. почта: zavodnik\_il@mail.ru

$\text{Ca}^{2+}$  представляет один из важнейших внутриклеточных сигналов, регулирующих многочисленные биохимические и физиологические (патофизиологические) процессы в клетке. В последнее время становится очевидным, что митохондрии являются основным сенсором, регулятором и депо ионов кальция. Для тонкой регуляции кальциевого сигнала в клетке существует широкий спектр молекул-мишеней, индуцирующих и декодирующих изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке (помпы, каналы,  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые ферменты, локализованные как в цитоплазме, так и в органеллах). Аккумуляция в митохондриях избыточного цитоплазматического кальция происходит при помощи кальциевого унипортера, а высвобождение кальция происходит посредством натрий/кальциевого и кальций/протонного антипортеров. В свою очередь, избыточное накопление кальция в митохондриях приводит к формированию пор высокой проницаемости в митохондриях, которые играют важную роль в гибели клеток при многих патологиях. Митохондрии регулируют кальциевый гомеостаз в клетке и, соответственно, контролируют важнейшие клеточные функции, метаболизм, пролиферацию, выживаемость. Идентификация клеточных и митохондриальных  $\text{Ca}^{2+}$  транспортеров и выяснение механизмов их функционирования открывает новые перспективы их использования в качестве мишеней терапевтического воздействия.

**Ключевые слова:** митохондрии, кальций, клеточная сигнализация, транспортеры кальция

**DOI** 10.18097/PBMC20166203311

## ВВЕДЕНИЕ

Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке редко выступают кофакторами ферментативных реакций, основная функция  $\text{Ca}^{2+}$  – участие в передаче регуляторных сигналов; регуляторная функция кальция осуществляется благодаря взаимодействию и активации специфических  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков.  $\text{Ca}^{2+}$  играют роль важнейшего клеточного водорастворимого вторичного мессенджера и используется во множестве процессов, среди них мышечное сокращение, выброс нейротрансмиттеров из нервных окончаний, зрительные процессы в клетках сетчатки глаза, клеточная пролиферация, дифференциация, секреция, миграция клеток, экспрессия генов и метаболизм. Комплексы кальция с фосфорилированными и карбоксилированными молекулами клетки нерастворимы.

Для тонкой регуляции кальциевого сигнала в клетке существует широкий спектр молекул-мишеней, индуцирующих и декодирующих изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке (помпы, каналы,  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые ферменты, локализованные как в цитоплазме, так и в органеллах). В настоящее время доказана определяющая роль митохондрий как сенсора и регулятора кальциевой сигнализации. Митохондрии – динамичные и пластичные органеллы, биохимически обеспечивающие энергосистему клетки, вовлечены во множество метаболических процессов: цикл трикарбоновых кислот,  $\beta$ -окисление жирных кислот, окислительное фосфорилирование,

клеточную сигнализацию. Митохондрии привлекают пристальное внимание исследователей как основной источник клеточного АТФ, переключатель, декодер и интегратор многих клеточных сигнальных каскадов, регулятор кальциевого гомеостаза. Нарушения митохондриальной биохимии и физиологии играют определяющую роль в развитии многих патологических процессов.

Митохондрии регулируют клеточные  $\text{Ca}^{2+}$  сигналы и одновременно выступают как  $\text{Ca}^{2+}$  буферы со строго определенным местоположением: они предпочтительно аккумулируют ионы кальция в областях цитоплазмы (микродоменах) с повышенной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$ , расположенных вблизи точек поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму.

Митохондрии способны существовать как дискретные и независимые структуры или образовывать сложную высоко подвижную взаимодействующую сеть в зависимости от типа ткани. Митохондрии содержат ряд областей, различающихся структурно и функционально: внутреннюю (inner mitochondrial membrane, IMM) и внешнюю (outer mitochondrial membrane, OMM) мембраны, образующие межмембранное пространство и матрикс. Внутренняя и внешняя митохондриальная мембраны, сближаясь, формируют контактные сайты. Межмембранное пространство содержит ряд белков, которые играют важную роль в клеточной физиологии, митохондриальной энергетике и гибели клетки. Матрикс содержит митохондриальную ДНК,

рибосомы и ферменты целого ряда метаболических путей. Наружная мембрана проницаема для малых молекул и ионов, которые перемещаются через трансмембранные каналы, сформированные семейством интегральных мембранных белков – поринов. Деполяризация митохондрий влияет на аккумуляцию митохондриями кальция, что имеет важное значение как в кальциевой сигнализации в норме, так и в развитии патофизиологических процессов. Вследствие этого, механизмы, вызывающие небольшие изменения в митохондриальном потенциале, могут иметь определенный цитопротекторный эффект при патологических условиях кальциевой перегрузки.

Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  играют определяющую роль в развитии апоптоза, инициируя формирование пор высокой проницаемости (permeability transition pore, PTP) в митохондриальной мембране и истечение апоптотических факторов из митохондрий, например, цитохрома c. Поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии является механизмом, связывающим действие множества токсических факторов и истечение субстратов каспаз из митохондрий. Регулируемый митохондриями кальциевый гомеостаз рассматривается в настоящее время как перспективная мишень терапевтического воздействия (митохондриальная медицина).

В настоящей работе рассмотрены современные представления о роли митохондрий в регуляции кальциевого гомеостаза в клетке, об участии митохондрий в переносе кальциевого сигнала, о закономерностях  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемого формирования PTP.

## 1. КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

Концентрация ионов кальция в морской воде – порядка 11 мМ. В плазме крови человека концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  составляет 2,5 мМ, половина которых связана с органическими фосфатами и белками плазмы. В цитоплазме клетки концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  очень низка и составляет величину порядка 50-100 нМ (продолжительное, в течение десятков минут, повышение содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клетки (до  $10^{-5}$  М) приводит к гибели клетки). Согласно современным представлениям, в клетках существуют области (микродомены), в которых концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  варьирует от нескольких десятков нМ до нескольких мМ.  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке депонируется в эндоплазматическом ретикулуме (саркоплазматический ретикулум в мышечной клетке), где связан с кальретикулином ( $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим гликопротеином с молекулярной массой 7 кДа). Этот белок, связывающий с низкой аффинностью ( $K_d=2$  мМ) 20 моль  $\text{Ca}^{2+}$  на моль белка, играет буферную роль в эндоплазматическом ретикулуме неммышечных клеток и в митохондриях.

Впервые концепцию регуляции ионами кальция физиологических процессов предложил Рингер, который в 1883 году наблюдал сокращение изолированного сердца при внесении в перфузирующий раствор ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Изменения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке строго локализованы, например в области синапса

или области межклеточного контакта. С другой стороны, локальные изменения внутриклеточной концентрации кальция распространяются в клетке на достаточные расстояния, формируя кальциевые волны. В большинстве типов клеток изменения содержания  $\text{Ca}^{2+}$  носят осциллирующий характер. В некоторых тканях (сердце, мозг)  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляции в одной клетке могут вызывать осцилляцию  $\text{Ca}^{2+}$  в соседних клетках, причем с той же частотой, что и в клетке, инициировавшей этот процесс. Кальциевая волна распространяется на сотни мкм со скоростью 100 мкм/с. В распространении  $\text{Ca}^{2+}$ -волны участвуют межклеточные контакты – щелевидные соединения, обладающие высокой ионной проводимостью. Щелевые соединения превращают цитоплазму контактирующих клеток в единое пространство, благодаря чему достигается ионное, электрическое и гуморальное сопряжение, межклеточный транспорт ионов кальция.

Имеются три основных сигнальных пути, которые приводят к активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых процессов: сигнальные пути регулируемые G-белками, сигнальные пути, регулируемые тирозинкиназными рецепторами, лиганд- или потенциал-регулируемые ионные каналы.

Выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума, поступление кальция из других клеточных депо и внеклеточного пространства в цитозоль приводит к связыванию его сигнальными белками, которые при этом активируются, в том числе за счёт кальций-индуцируемых структурных перестроек.

Одним из наиболее изученных процессов взаимодействия  $\text{Ca}^{2+}$  с белками является регуляция кальций-зависимого регуляторного белка кальмодулина ионами кальция. При связывании кальция с кальмодулином, содержащим 4 центра связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , в белке происходят конформационные изменения и формируется  $\alpha$ -спиральная структура, что позволяет кальмодулину связывать и регулировать другие белки. Активированный ионами  $\text{Ca}^{2+}$  кальмодулин способен взаимодействовать с гидрофобными поверхностными участками ряда белков, ферментов, насосов и т.д. Например, комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин активирует мембранную  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу, которая откачивает  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы и прекращает действие управляющего сигнала. Кальмодулин-зависимая протеинкиназа фосфорилирует ряд белков, регулирующих метаболические реакции, синтез нейромедиаторов, мембранную проницаемость. Активация кальмодулина происходит при концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клетки, превышающей 500 нМ. Многие белки, не способные связывать ионы кальция, используют кальмодулин как кальциевый сенсор и звено в цепи переноса кальциевого сигнала. Кальмодулин может сам регулировать другие белки или являться частью большего белка (например, киназы фосфорилазы). К наиболее известным (помимо кальмодулина)  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим белкам относятся **тропонин С**, регулятор мышечных сокращений, **фосфолипаза С**, осуществляющая гидролиз фосфоинозитидов, **кальцинеин В**, являющийся фосфатазой, **кальпаин**, являющийся протеазой,

**парвальбумин**, буфер  $\text{Ca}^{2+}$ , **фосфолипаза  $\text{A}_2$** , катализирующая высвобождение арахидоновой кислоты из фосфолипидов и др.

Удаление/освобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  должно быть локализовано в определённых участках клетки, что позволяет клетке лимитировать пространство и время  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальной активности.

## 2. ТРАНСПОРТ ИОНОВ $\text{Ca}^{2+}$ В КЛЕТКУ И МИТОХОНДРИИ

Внутриклеточная концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  может резко повышаться (изменяться) при воздействии управляющих сигналов, регулирующих открытие кальциевых каналов и включение кальциевых насосов ( $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза) в плазматической и внутриклеточной (саркоплазматический/эндоплазматический ретикулум, митохондрии) мембранах. Ионные каналы в плазматической мембране и мембранах внутриклеточных депо быстро доставляют ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму клетки, медленное удаление ионов обеспечивает активный экспорт из цитоплазмы.

В настоящее время идентифицированы несколько основных белковых комплексов, которые контролируют транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке. В первую очередь – это группа кальциевых насосов,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза, различающихся по локализации, строению, способу регуляции:  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза плазматической мембраны (plasma-membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, PMCA), удаляющая ионы кальция из цитоплазмы во внеклеточную среду,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза мембран сарко(эндо)плазматического ретикулума (sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, SERCA), “закачивающая” ионы кальция в сарко(эндо)плазматический ретикулум. Существуют также многочисленные рецепторы/ионные каналы. В плазматической мембране клетки присутствуют депо – управляемые  $\text{Ca}^{2+}$  каналы (store-operated channels, SOC), открывающиеся при опустошении внутриклеточных депо ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , потенциал – зависимые  $\text{Ca}^{2+}$  каналы (voltage-gated Ca channels, VGCC) L типа (long-lasting, долгоживущие каналы, сохраняющие активное состояние довольно долго), рецептор – управляемые каналы (receptor – operated channels, ROC). Каналы VGCC L типа блокируются некоторыми лекарственными соединениями: производными 1,4-дигидропиридинов (нифедипином), верапамилом, дилтиаземом. Регуляция активности канала VGCC L типа осуществляется его фосфорилированием под действием cAMP-, кальмодулин-, cGMP- зависимых протеинкиназ. В большинстве животных клеток стимулирование множества рецепторов клеточной поверхности, сопряжённых с G-белками или тирозинпротеинкиназами индуцирует поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку через депо – управляемые кальциевые каналы (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, CRAC).

Рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата ( $\text{IP}_3$ ), расположенный на поверхности эндоплазматического ретикулума (и других немитохондриальных депо), ассоциирован с каналом, контролирующим выброс ионов кальция из клеточных депо. (Следует отметить, что по своей емкости митохондрии представляют

важнейший клеточный буфер  $\text{Ca}^{2+}$ , значительно превосходящий эндоплазматический ретикулум.) Активация данного рецептора инозитол-1,4,5-трисфосфатом приводит к выбросу кальция из эндоплазматического ретикулума и увеличению его концентрации в цитозоле. В мембранах клеточных депо кальция присутствуют также  $\text{IP}_3$ -независимые рианодиновые рецепторы (класс кальциевых каналов, имеющих высокое сродство к алкалоиду рианодину), которые распознают ион кальция цитозольной частью рецептора и функционируют по механизму обратной связи (небольшое количество ионов кальция в цитозоле вблизи рецептора будет стимулировать выброс еще большего количества иона в цитоплазму). Это особенно важно в нейронах и мышцах. В клетках сердца и поджелудочной железы другой вторичный мессенджер cADP – рибоза принимает участие в активации рецептора – канала в мембранах внутриклеточных депо. В невозбудимых клетках (гепатоциты, клетки эндотелия) вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму из внеклеточного пространства или эндоплазматического ретикулума происходит в результате сложного каскада реакций, первым этапом которого является катализируемый мембраносвязанной фосфолипазой C гидролиз фосфатидилинозитолбисфосфата – минорного фосфолипида клеточной мембраны – с образованием вторичных мессенджеров – водорастворимого  $\text{IP}_3$  и мембрано-связанного диацилглицерола (DAG). Фосфолипаза C, в свою очередь, активируется взаимодействием гормона либо фактора роста со специфическим рецептором, ассоциированным с G-белком. В зависимости от вида G-белка комплекс GTP-G $\alpha$  опосредует передачу внутриклеточного сигнала либо на эффекторные молекулы, аденилатциклазу или фосфолипазу C, либо непосредственно регулируя ионные каналы или активность киназ.  $\text{IP}_3$ , взаимодействуя с рецептором-каналом-образователем в эндоплазматическом ретикулуме, обеспечивает выход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из ретикулума. Гидрофобная молекула DAG, оставаясь во внутреннем монослое плазматической мембраны клетки, латерально диффундирует и взаимодействует с протеинкиназой C, зависимой от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и способной фосфорилировать белки цитоскелета, хроматина, мембран, что приводит к морфологической трансформации клетки, изменениям метаболизма, пролиферации, секреции. В свою очередь,  $\text{IP}_3$  инактивируется дефосфорилированием, DAG инактивируется гидролизом. С помощью описанного механизма уровень ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке возрастает обычно от  $10^{-7}$  до  $10^{-6}$  М. Возбудимые клетки (нейроны, миоциты) помимо фосфоинозитидного пути регуляции уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , имеют потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, обеспечивающие вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку при деполяризации мембраны. Специализированный сенсор в составе  $\text{Ca}^{2+}$ -канала при изменении потенциала покоя (при прохождении некоторой пороговой величины потенциала) переводит канал в открытое состояние (скорость переноса составляет величину порядка  $10^6$  ионов в секунду). Потенциал-зависимые кальциевые каналы в некоторых тканях, например в сердце,

могут регулироваться также взаимодействием с G-белками или путём фосфорилирования (реакцию катализируют серин/треонин cAMP-зависимые протеинкиназы). Эти взаимодействия увеличивают время существования канала в открытом состоянии. В настоящее время ряд веществ, специфически блокирующих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы ( $\text{Ca}^{2+}$ -антагонисты), широко используются в качестве лекарственных средств, в частности, в лечении кардиологических заболеваний (например, верапамил, производные дигидропиридина).

Поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии зависит от митохондриального мембранного потенциала, а также от внутримитохондриальной  $\text{Ca}^{2+}$  концентрации ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ), которая, как полагают, сохраняется низкой в неэнергизованных митохондриях благодаря активности  $x\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - и  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортеров, освобождающих  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий (рисунок). Поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями осуществляется с определенным запаздыванием по сравнению с  $\text{Ca}^{2+}$  сигналом в цитоплазме и происходит достаточно медленно.

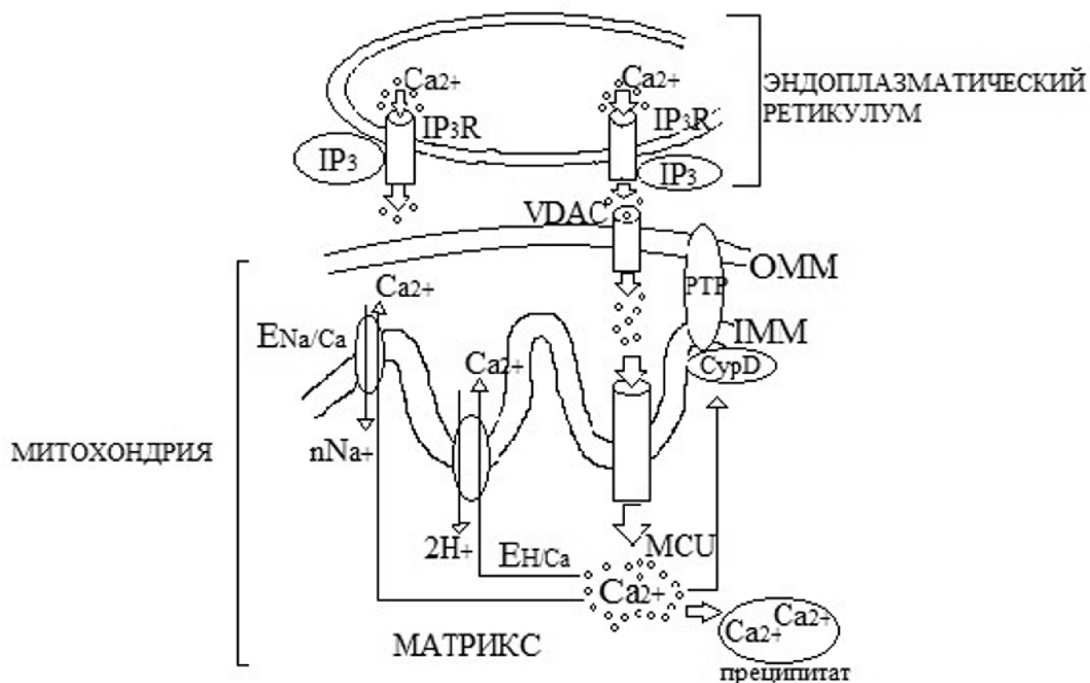
Основным транспортером, обеспечивающим перенос  $\text{Ca}^{2+}$  через внутреннюю митохондриальную мембрану, является так называемый кальциевый унипортер (mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter, MCU), осуществляющий перенос ионов кальция в матрикс, а также рианодинный рецептор митохондрий.

Внешняя мембрана митохондрий модулирует доступность кальция к унипортеру через избирательный фильтр VDAC (voltage-dependent anion channel, потенциал-зависимый анионный канал), который проницаем для кальция и регулируется

кальцием и рутением красным. Главным путём оттока ионов кальция из митохондрий является транспортный белок осуществляющий обмен (антипорт)  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Na}^+$  (2,6 нмоль кальция/мин/мг белка). Натрий-независимый путь оттока кальция из митохондрий (протон-кальциевый антипортер) является более медленным (1-2 нмоль кальция/мин/мг белка). (Антипортеры для переноса ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий используют градиент других ионов, в первую очередь, используют энергию, определяемую градиентом pH). Транспорт ионов  $\text{Ca}^{2+}$  не электрогенен, перенос заряда компенсируется переносом ионов  $\text{K}^+$  (или других катионов) в противоположном направлении.

Существуют многочисленные доказательства того, что драматическое нарушение способности митохондрий удерживать ионы  $\text{Ca}^{2+}$  (секвестрировать) непосредственно связано с гибелью клеток при инфаркте, эксайтотоксичности, ишемии и реперфузии, нейродегенеративных и иных заболеваниях. Преципитация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и неорганического фосфата в матриксе митохондрий представляет основной способ хранения аккумулируемого кальция.

В связывании  $\text{Ca}^{2+}$  участвует ряд митохондриальных белков: в межмембранном пространстве идентифицирован гликопротеин калвектин (calvectin) с молекулярной массой 30 кДа и высоким сродством к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d=100$  нМ), из внутренней митохондриальной мембраны выделен низкомолекулярный (3 кДа) интегральный белок – высокоафинный кальциевый переносчик – кальцифорин (calciphorin).



**Рисунок.** Общепринятая схема аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями: MCU - кальциевый унипортер, E -  $\text{Ca}^{2+}/\text{nNa}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -антипортеры, локализованные во внутренней митохондриальной мембране, PTP - пора высокой проницаемости, CypD - циклофиллин D, IP3R - рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата - кальциевый канал, локализованный в мембране эндоплазматического ретикулума, VDAC - потенциал-зависимый анионный канал, локализованный во внешней митохондриальной мембране, показано морфологическое и функциональное взаимодействие митохондрий и эндоплазматического ретикулума.

### 3. РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В РЕГУЛЯЦИИ $\text{Ca}^{2+}$ -СИГНАЛА

Захват кальция энергизованными митохондриями определяет уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке, контролирует клеточную  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию, метаболизм, многие специфические клеточные функции, жизнь и смерть клетки. Митохондрии быстро удаляют  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортера, который представляет канал во внутренней мембране митохондрий, и медленно освобождают  $\text{Ca}^{2+}$  с помощью  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ - и  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортеров. Захват  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями ограничивает подъем его уровня и обеспечивает быстрое затухание кальциевого сигнала.

Вход кальция в митохондрии, в первую очередь, управляется градиентом его электрохимического потенциала, создаваемого митохондриальным мембранным потенциалом, и относительно низкой внутримитохондриальной  $\text{Ca}^{2+}$  концентрацией  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ . Электрохимический протонный градиент  $\Delta\mu\text{H}^{+}$ , формируемый на внутренней митохондриальной мембране, обеспечивает аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе энергизованных митохондрий. Когда энергизованные митохондрии подвергаются воздействию возрастающих концентраций цитозольного кальция,  $\text{Ca}^{2+}$  движется из локального окружения в матрикс, что управляется градиентом электрохимического потенциала  $\text{Ca}^{2+}$ .

В MCU-опосредованном транспорте  $\text{Ca}^{2+}$  могут участвовать митохондриальные белки-разобщители (uncoupling proteins) UCP2 и UCP3. В последнее время идентифицированы зоны (области) тесного контакта между эндоплазматическим ретикуломом и митохондриями, получившие название “мембраны, ассоциированные с митохондриями” (mitochondria associated membranes, MAMs). Доказано существование перекрывающихся областей, где максимальное расстояние между эндоплазматическим ретикуломом и митохондриями составляет 10-25 нм, что позволяет осуществлять прямой физический контакт между белками мембран обеих органелл. Формирование контактов митохондрии-эндоплазматический ретикулум контролирует ряд шаперонов и регуляторных белков. Быстрый и эффективный захват  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями ответственен за появление пространственно-временных кальциевых волн в клетке и возникновение областей в клетке, существенно (на несколько порядков) различающихся по концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Митохондрии распознают микродомены (области) высокой концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  в цитоплазме, которые благодаря действию унипортера с низким сродством быстро рассеиваются.

### 4. $\text{Ca}^{2+}$ -ИНДУЦИРУЕМОЕ ФОРМИРОВАНИЕ ПОР ВЫСОКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ

Следствием чрезмерной нагрузки митохондрий  $\text{Ca}^{2+}$  является открытие пор высокой проницаемости, что неизбежно приводит к гибели клеток по апоптотическому, либо некротическому (в результате полного повреждения митохондрий) механизму.

Определяющую роль в открытии РТР играет окислительный стресс. Этот процесс стимулирует также белок матрикса циклофилин D (cypD). Один из наиболее intriguing вопросов митохондриальной физиологии – идентификация белков, формирующих митохондриальную пору высокой проницаемости, и белков, обеспечивающих хранение и перенос  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии и цитоплазму. Окисление SH-группы Cys-56 в ATP/ADP-антипортере (adenine nucleotide translocator, ANT) – белке внутренней мембраны митохондрий – приводит к превращению этого переносчика адениннуклеотидов в неспецифический канал, проницаемый для низкомолекулярных веществ – РТР (пора, вызывающая переход мембраны митохондрий в состояние высокой проницаемости). Митохондриальные поры высокой проницаемости образуются в результате конформационных изменений нескольких конститутивных белков митохондрий: ANT во внутренней мембране, VDAC во внешней мембране, и циклофилина D, локализованного в матриксе митохондрий (эффект cypD связан, вероятно, с его пептидил-пролил *цис-транс* изомеразной активностью, что обеспечивает конформационные изменения белков внутренней митохондриальной мембраны), а также, вероятно, митохондриального переносчика фосфата. Необратимое открытие пор приводит к клеточной гибели. Образующиеся поры потенциал-зависимы, неспецифичны и проницаемы для молекул с массой не превышающей 1,5 кДа, имеют диаметр 3 нм.

Факторы, индуцирующие открытие пор, делят на матриксные (возрастание концентрации митохондриального кальция, окислительный стресс, снижение содержания ATP, окисление пиридиновых нуклеотидов и сульфгидрильных групп белков, которое зависит от уровня восстановленности глутатиона в матриксе митохондрий, концентрация фосфатов, ингибирование ANT) и мембранные (деполяризация митохондрий (высокий мембранный потенциал стабилизирует поры в закрытом состоянии), усиление потока электронов через I комплекс, окисление мембранного липида кардиолипина, ведущая к потере активности ANT). К ингибиторам пор относят двухвалентные металлы, циклоспорин А, ATP, ADP, высокий мембранный потенциал, снижение матриксного pH (поры модулируются протонными насосами), модуляторы ANT, белки семейства Bcl-2.

Поры высокой проницаемости могут существовать в конформациях с высокой и низкой проводимостью. Поры в состоянии низкой проводимости могут участвовать в кальциевой клеточной сигнализации, амплифицируя цитозольный кальциевый сигнал. К первичным следствиям открытия пор высокой проницаемости относятся деполяризация митохондрий, набухание, которое не наблюдается при кратковременном открытии пор или их открытии в состоянии низкой проводимости, нарушение мембранного потенциала, уменьшение синтеза ATP, высвобождение матриксного кальция. В то же время уменьшение мембранного потенциала

при открытии пор, сопровождающееся гидролизом АТФ и накоплением ADP и магния, может приводить к закрытию пор и реполяризации митохондрий.

Согласно альтернативной модели формирования РТР, пора образуется в результате агрегации ряда интегральных мембранных белков с нарушенной структурой, накопление  $\text{Ca}^{2+}$  и окислительный стресс приводят к нарушению структуры белков. VDAC и ANT формируют область контакта между ОММ и IMM. Октамерная с-субъединица внешнего домена  $F_0$  комплекса  $F_0F_1$  АТФ-синтазы способна образовывать потенциал-чувствительную поро-подобную структуру, формирование которой приводит к нарушению сопряжения митохондрий. Цитохром *c* помимо функции переносчика электронов в дыхательной цепи обладает способностью отделяться от внутренней митохондриальной мембраны, транспортироваться в цитоплазму клетки в результате образования РТР и запускать цепь событий в цитозоле, которая ускоряет апоптоз. Способность цитохрома *c* проявлять различные функции внутри митохондрии и в цитозоле связана с клеточной локализацией гемопroteина. Это единственный периферический белок, который взаимодействует с внешней стороной внутренней митохондриальной мембраны. Выброс нескольких белков, которые в норме локализуются в межмембранном пространстве, наблюдается на ранних стадиях апоптоза. Только холоцитохром *c*, но не апоцитохром *c*, способен стимулировать активацию прокаспазы-9, когда он выбрасывается в цитозоль и взаимодействует с Araf-1 (apoptotic protease activating factor) и прокаспазой-9 с образованием апоптосомного комплекса. Истечение цитохрома *c* из митохондрий происходит через специальный канал MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel), пору, которая образуется во внешней митохондриальной мембране на ранней стадии апоптоза и регулируется Bcl-2 семейством белков. В результате формирования поры матрикс митохондрий набухает, гребни (складки) внутренней мембраны расправляются, а внешняя мембрана, площадь которой меньше площади внутренней мембраны, разрывается.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

$\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз в клетке важен для клеточного метаболизма, пролиферации, дифференциации, жизни и смерти клетки. Цитотоксичность, обусловленная такими патологиями, как ишемия-реперфузия, эксайтотоксичность, как известно, включает в себя патофизиологическое возрастание внутриклеточной концентрации кальция и другие митохондрио-опосредованные процессы. Механизмы этих процессов, связаны биохимически, поскольку митохондрии являются основным сенсором и декодером  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации, регулятором кальциевого гомеостаза и депо ионов кальция. Посредством кальциевого унипортера происходит аккумуляция в митохондриях избыточного цитозольного кальция, а высвобождение кальция происходит посредством натрий/кальциевого и кальций/протонного

антипортеров, обуславливая тем самым медленный и продолжительный обмен кальция через внутреннюю митохондриальную мембрану. В свою очередь, избыточное накопление кальция в митохондриях приводит к формированию пор высокой проницаемости в митохондриях, которые играют важную роль в гибели клеток при многих патологиях. РТР в изолированных митохондриях определяется как циклоспорин А-чувствительное  $\text{Ca}^{2+}$ -опосредованное формирование пор во внутренней митохондриальной мембране, обеспечивающее свободную диффузию воды и других молекул, молекулярная масса которых не превышает 1500 Да, и приводящее к последующему набуханию митохондрий и высвобождению аккумулярованного кальция. Регулируя кальциевый гомеостаз в клетке, митохондрии контролируют важнейшие клеточные функции. Идентификация клеточных и митохондриальных  $\text{Ca}^{2+}$  транспортеров и выяснение механизмов их функционирования открывает новые перспективы их использования в качестве мишеней терапевтического воздействия.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Зинченко В.П., Долгачева Л.П. (2003) Внутриклеточная сигнализация. Пушино, Электронное издательство "Аналитическая микроскопия", 84 с.
2. Clapham D.E. (2007) Cell, **131**, 1047-1058.
3. Rizzuto R., De Stefani D., Raffaello A., Mammucari C. (2012) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **13**, 566-578.
4. Duchen M.R. (2004) Molecular Aspects of Medicine, **25**, 365-451.
5. Jouaville L.S., Ichas F., Holmuhamedov E.L., Camacho P., Lechleiter J.D. (1995) Nature, **377**, 438-441.
6. Rizzuto R., Duchen M.R., Pozzan T. (2004) Sci STKE, **215**, 1237-1240.
7. Carafoli E. (2003) Trends Biochem. Sci., **28**, 175-181.
8. Giorgi C., Agnoletto C., Bononi A., Bonora M., De Marchi E., Marchi S., Missiroli S., Patergnani S., Poletti F., Rimessi A., Suski J.M., Wieckowski M.R., Pinton P. (2012) Mitochondrion, **12**, 77-85.
9. Ткачук В.А. (2001) Соросовский образовательный журнал, **7**, 10-15.
10. Wasniewska M. (2000) Advances in Biochemistry, **46**, 247-252.
11. Ringer S. (1883) J. Physiol., **4**, 222-225.
12. Cobbold P.H., Cuthbertson K.S. (1990) Semin. Cell Biol., **1**, 311-321.
13. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. (2003) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **4**, 517-529.
14. Владимиров Ю.А. (1998) Соросовский образовательный журнал, №3, 20-27.
15. Rizzuto R., Pozzan T. (2006) Physiol. Rev., **86**, 360-408.
16. Nicholls D.G. (2005) Cell Calcium, **38**, 311-317.
17. Gincel D., Zaid H., Shoshan-Barmatz V. (2001) Biochem. J., **358**, 147-155.
18. Starkov A.A. (2010) FEBS J., **277**, 3652-3663.
19. Ambudkar I.S., Kima P.E., Shamoo A.E. (1984) Biochim. Biophys. Acta, **771**, 165-170.
20. Patergnani S., Suski J.M., Agnoletto C., Bononi A., Bonora M., De Marchi E., Giorgi C., Marchi S., Missiroli S., Poletti F., Rimessi A., Duszynski J., Wieckowski M.R., Pinton P. (2011) Cell Commun. Signal., **9**, 19-28.

21. Zoratti M., Szabo I. (1995) *Biochim Biophys Acta.*, **124**, 139-176.
22. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. (2001) *FEBS Lett.*, **495**, 12-15.
23. Gincel D., Zaid H., Shoshan-Barmatz V. (2001) *Biochem J.*, **358**, 147-155.
24. Bernardi P. (1999) *Physiol. Rev.*, **79**, 1127-1155.
25. Buntinas L., Gunter K.K., Sparagna G.C., Gunter T.E. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 248-261.
26. Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blachly-Dyson E., Di Lisa F., Forte M.A. (2006) *FEBS J.*, **273**, 2077-2099.
27. Brdiczka D.G., Zorov D.B., Sheu S.S. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 148-163.
28. Alavian K.N., Beutner G., Lazrove E., Sacchetti S., Park H.A., Licznarski P., Li H., Nabili P., Hockensmith K., Graham M., Porter G.A. Jr, Jonas E.A. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 10580-10585.
29. Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D. (1997) *Science*, **275**, 1132-1136.
30. Brookes P.S., Yoon Y., James L., Robotham J.L., Anders M.W., Sheu S.-S. (2004) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **287**, C817-C833.
31. Abeti R., Abramov A.Y. (2015) *Pharmacol. Res.*, **99**, 377-381.

Поступила: 27. 01. 2015.  
Принята к печати: 02. 02. 2016.

## MITOCHONDRIA, CALCIUM HOMEOSTASIS AND CALCIUM SIGNALING

**I.B. Zavadnik**

Yanka Kupala Grodno State University,  
50 Blvd. Len. Kom., Grodno, 230030 Belarus; tel.: +375 152484583; fax: +375 152434121;  
e-mail: zavadnik\_il@mail.ru

$\text{Ca}^{2+}$  is a very important and versatile intracellular signal which controls numerous biochemical and physiological (pathophysiological) processes in the cell. Good evidence exists that mitochondria are sensors, decoders and regulators of calcium signaling. Precise regulation of calcium signaling in the cell involves numerous molecular targets, which induce and decode changes of  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in the cell (pumps, channels,  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzymes, localized in the cytoplasm and organelles). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter accumulates excess of  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondria, while  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -antiporters extrude  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytoplasm. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overloading results in formation of mitochondria permeability transition pores which play an important role in cell death under many pathological conditions. Mitochondria regulate  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and control important cellular functions such as metabolism, proliferation, survival. Identification of cellular and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transporters and understanding their functional mechanisms open up new prospects for their using as therapeutic targets.

**Key words:** mitochondria, calcium, cell signalling,  $\text{Ca}^{2+}$  transporters