

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ НАГРУЗКЕ ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ В ОТСУТСТВИИ И В ПРИСУТСТВИИ ФЛАВОНОИДОВ

И.Б. Заводник^{1*}, Т.А. Коваленя¹, А.Г. Вейко¹, Е.А. Лапина¹,
Т.В. Ильич¹, Р.И. Кравчук², Л.Б. Заводник¹, И.И. Климович²

¹Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
бульвар Ленинского комсомола, 50, Гродно, 230030 Беларусь; *эл. почта: zavodnik_ib@grsu.by

²Гродненский Государственный медицинский университет, ул. Горького, 80, Гродно, 230009 Беларусь

Цель настоящей работы — выяснить механизмы нарушений структуры и функциональной активности изолированных митохондрий печени крыс ионами кальция в отсутствие и в присутствии ряда флавоноидов *in vitro*. В присутствии экзогенного Ca^{2+} (20-60 мкМ) выражено возрастала гетерогенность митохондрий по размерам и электронной плотности. Большинство органелл характеризовалось набухшим электронно-светлым матриксом, удлинёнными кристами и уменьшенным их числом. Набухшие митохондрии были значительно крупнее основной популяции контрольных митохондрий и лишены нативной структуры внутренней мембраны, вплоть до её отслоения. Одновременно регистрировали конденсированные митохондрии с электронно-плотным матриксом и расширенным интракристным пространством. Индуцируемое ионами кальция открытие митохондриальных пор высокой проницаемости (МРТР) приводило к ультраструктурным нарушениям органелл и сопровождалось полным разобщением процессов окисления и фосфорилирования в изолированных митохондриях печени крыс. Вторичные метаболиты растений полифенольной природы — флавоноиды нарингенин, катехин — в концентрации 10-25 мкМ дозозависимо ингибировали респираторную активность митохондрий и стимулировали процесс открытия МРТР в присутствии ионов Ca^{2+} . Поскольку рутений красный — ингибитор митохондриального Ca^{2+} унипортера — эффективно предотвращал Ca^{2+} -индуцируемое открытие МРТР как в отсутствие, так и в присутствии флавоноидов, можно предположить, что эффект флавоноидов на процесс МРТР опосредован активацией Ca^{2+} унипортера.

Ключевые слова: митохондрии; ультраструктура; респираторная активность; ионы кальция; флавоноиды

DOI: 10.18097/PBMC20226804237

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии — динамичные и пластичные клеточные органеллы — биохимически обеспечивают энергосистему клетки и вовлечены во множество метаболических и регуляторных процессов: окислительное фосфорилирование, клеточную сигнализацию, окисление жирных кислот, кальциевый гомеостаз [1, 2]. Адаптивные перестройки митохондриального метаболизма, морфологии, подвижности, числа митохондрий и локализации в цитоплазме определяют функциональную активность клеток. Ансамбль митохондрий (митохондриом) в клетке функционирует как интегрированная сеть, митохондрии перемещаются вдоль микротрубочек внутри клетки и изменяют свою морфологию путём слияния и деления, эти процессы регулируются митохондриальным Ca^{2+} [2]. Ионы Ca^{2+} представляют один из важнейших внутриклеточных сигналов, регулирующих многочисленные физиологические процессы в клетке, её метаболизм и выживание [1, 2]. Митохондрии выполняют функцию основного сенсора, регулятора и депо ионов кальция, интегратора и декодера кальциевого сигнала [3-6]. Специфичность клеточных кальциевых сигналов контролируется многочисленными ионными каналами, насосами и обменниками, регулируемыми потоки ионов Ca^{2+} в клетке. Центральную роль в гомеостазе клеточного Ca^{2+} играют две депонирующие органеллы — эндо(сарко)-плазматический ретикулум и митохондрии [5, 6].

Известен фундаментальный молекулярный механизм, обеспечивающий перенос ионов кальция через внутреннюю митохондриальную мембрану, который включает низкоаффинный электрогенный митохондриальный кальциевый унипортер (mitochondrial Ca^{2+} -uniporter, MCU или трансмембранный белок CCDC109A), антипортеры $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ (NCLX) — и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (LETM1), катализирующие экспорт ионов Ca^{2+} , а также митохондриальный рианодиновый рецептор и митохондриальные поры высокой проницаемости (МРТР, mitochondrial permeability transition pore). MCU представляет комплекс, состоящий из нескольких белков — MCU, EMRE, MICU1, MICU2, MICU3, MCUB и MCUR1, который ингибируется рутением красным и лантанидами [4-7].

Ионы Ca^{2+} стимулируют образование NADH и АТФ в митохондриях, активируя Ca^{2+} -зависимые дегидрогеназы и F_0F_1 -АТФ-синтазу [8]. С другой стороны, нарушения кальциевого гомеостаза и чрезмерная нагрузка митохондрий ионами Ca^{2+} в сопряжении с окислительным стрессом приводят к открытию МРТР, диссипации митохондриального мембранного потенциала и уменьшению продукции АТФ [9]. МРТР представляет собой неспецифический высокопроводящий канал, который формируется во внутренней митохондриальной мембране из нескольких митохондриальных белков [9-11]. Нарушения митохондриальной Ca^{2+} сигнализации,

открытие митохондриальной поры вовлечены в патобиохимические механизмы онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний [6, 9, 12]. Несмотря на многочисленные исследования, детали взаимодействия ионов кальция с митохондриями требуют дальнейшего выяснения. Представляется актуальным оценить нарушения морфометрических характеристик ультраструктуры митохондрий в присутствии ионов Ca^{2+} и сопоставить морфологические нарушения с процессом открытия МРТР, изменениями респираторной активности митохондрий.

Хорошо известны многочисленные и выраженные эффекты флавоноидов — вторичных полифенольных метаболитов высших растений, не синтезируемых в животных тканях — на функциональную активность митохондрий [13]. Редокс-активные флавоноиды (кверцетин, кемпферол, эпикатехин) индуцируют разобщение митохондриальных процессов окисления и фосфорилирования в результате прямой транслокации протонов в матрикс, модуляции разобщающего белка UCP-2 и/или модуляции открытия МРТР [13, 14]. Известно, что флавоноиды ингибируют активность комплекса I за счёт конкуренции с убихиноном [14, 15]. Ранее мы продемонстрировали, что липофильный флавоноид кверцетин эффективно ингибировал респираторную активность митохондрий печени и повышал чувствительность митохондрий к Ca^{2+} -индуцируемому процессу открытия МРТР [16]. В экспериментах *in vivo* мы показали, что комплекс флавоноидов плодов клюквы предотвращал развитие дисфункции митохондрий при интоксикации, уменьшая степень токсического поражения печени крыс [17]. Учитывая благоприятные терапевтические эффекты флавоноидов, представляет интерес дальнейшее изучение механизмов их митохондриального действия, в том числе при нагрузке ионами кальция. Для выяснения возможности модулировать кальций-зависимые процессы мы выбрали флавоноиды различных классов (липофильный флаванон нарингенин, его гликозид нарингин, водорастворимый флаванол (флаван-3-ол) катехин), широко представленные в диете человека.

Цель настоящей работы — выяснить механизмы нарушений структуры и функциональной активности изолированных митохондрий печени крыс ионами кальция и оценить возможность модуляции *in vitro* флавоноидами митохондриальных Ca^{2+} -зависимых процессов, в том числе проапоптотического процесса открытия МРТР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и материалы

В работе использовали: сахарозу, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис- HCl), нарингенин, нарингин, катехин, этиленгликоль-бис (2-аминоэтиловый эфир)- N,N,N', N' -тетрауксусную кислоту (ЭГТА), аденозиндифосфат (ADP), сукцинат натрия гексагидрат, калия хлорид, кальция хлорид,

рутений красный, Аралдит-эпоксид (Araldite 506 epoxy resin), уранил ацетат, циклоспорин А (CsA) (“Sigma-Aldrich Biochemie GmbH”, Германия), четырёхокись осмия для электронной микроскопии (“Carl Roth GmbH”, Германия), калий фосфорнокислый однозамещенный, сульфат магния, метанол, этанол и ацетон высшей степени чистоты (“Реахим”, Россия). Все растворы были приготовлены на воде, очищенной в системе Milli-Q Direct (“Merck KGaA”, Германия).

Выделение митохондрий

Митохондрии изолировали методом дифференциального центрифугирования [18]. Печень крыс-самцов быстро извлекали на холоду (4°C), осушали, взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе (тефлон-стекло) (600 об/мин, 1 мин) в охлажденной среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,02 М Трис- HCl и 0,001 М ЭГТА, pH 7,2, при 4°C . Использовали гомогенизатор HG-15A (“Daihan Scientific”, Китай). Ядерную фракцию удаляли центрифугированием (600 g, 10 мин, 4°C). Для осаждения митохондрий полученный супернатант центрифугировали (8500 g, 10 мин, 4°C , центрифуга Hermle Z 32 HK, “Hermle Labortechnik GmbH”, Германия), митохондриальный осадок дважды промывали в среде выделения при 4°C и ресуспендировали в среде, не содержащей ЭГТА (0,15 М KCl , 0,02 М KH_2PO_4 , pH 7,4, концентрация белка — 40–45 мг/мл). Мы использовали клинически здоровых (Санитарно-гигиеническое заключение № 33-48/500 от 28.09.2017, Центр гигиены и эпидемиологии Первомайского района, г. Минск) аутбредных крыс линии Wistar массой 120–140 г разведения вивария Института физиологии НАН Беларуси. Каждая экспериментальная группа включала 5–7 животных.

Электронная микроскопия

Качественная и количественная оценка морфометрических характеристик ультраструктуры митохондрий играет важную роль при выяснении механизмов биохимических и физиологических (патофизиологических) процессов [19].

Митохондрии (5 мг белка/мл) в среде, не содержащей ЭГТА (0,15 М KCl , 0,02 М KH_2PO_4 , pH 7,4), инкубировали с ионами Ca^{2+} (20 мкМ и 60 мкМ, 30 мин, 25°C) *in vitro* и центрифугировали при 8500 g, 4°C , 25 мин. Митохондриальную фракцию (осадок) фиксировали в двух порциях 1% раствора четырёхокси осмия в 0,1 М буфере Миллонига [20], pH 7,4, при 4°C в течение 1,5 ч. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заключали в смесь Аралдит-эпоксид. Ультратонкие срезы (35 нм) изготавливали на ультрамикротоме Leica EM VC7 (“Leica Microsystems GmbH”, Австрия), контрастировали солями тяжёлых металлов [21] и анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-1011 (“Japanese Electron Optics Laboratory Ltd.”, Япония) при увеличениях $\times 5000$ – $\times 40000$ и ускоряющем напряжении 80 кВ. Для получения снимков использовали камеру Olympus Mega View III

(“Olympus Corporation”, Германия). Микрофотографии анализировали с помощью пакета программ для обработки изображений iTEM (“Olympus Corporation”), обладающего рядом стандартных встроенных алгоритмов для проведения морфометрии. Чистота фракции митохондрий составляла 80-95%. Электронные микрофотографии образцов митохондрий демонстрировали присутствие 5-20% примесей микросомальной фракции и лизосомоподобных структур. Для морфометрического анализа оценивали параметры 250-280 профилей митохондрий на 25 тестируемых неперекрывающихся площадях (полях зрения) при увеличении микроскопа 20 тыс., в каждой экспериментальной группе (контроль, 20 мкМ Ca^{2+} и 60 мкМ Ca^{2+}) анализировали микрофотографии образцов, полученных от 5 животных. Выбор концентраций кальция основан на полученных нами ранее данных о том, что в среде, не содержащей ЭГТА, ионы Ca^{2+} в концентрации 15-90 мкМ вызывают существенные изменения изолированных митохондрий печени крыс [22].

Морфометрические параметры включали: фактор элонгации, фактор формы, соотношение сторон. Фактор элонгации оценивает недостаток округлости изучаемого объекта (определяется как отношение длины и ширины объекта); по мере увеличения “эллипсоидности” происходит увеличение данного параметра выше 1. Фактор формы характеризует “округлость” изучаемого объекта и для сфер равен 1, для всех других форм он меньше единицы. Соотношение сторон определяет соотношение максимальной ширины и высоты прямоугольника, в который помещается изучаемый объект.

Респираторная активность митохондрий и открытие пор высокой проницаемости

Респираторную активность изолированных митохондрий (0,5 мг белка/мл) в отсутствие и в присутствии ионов кальция и флаваноидов регистрировали, используя электрод Кларка (“Hansatech Instruments Limited”, Великобритания) при постоянном легком перемешивании в среде 0,125 М KCl, 0,05 М сахарозы, 0,01 М Трис-HCl, 0,0025 М KH_2PO_4 , 0,005 М MgSO_4 , pH 7,2, 25°C. Измеряли скорости потребления кислорода в состоянии 2 (V_2) в присутствии субстрата (5 мМ сукцинат), в ADP-стимулированном (200 мкМ) состоянии 3 (V_3). Рассчитывали коэффициент акцепторного контроля (ACR), равный соотношению скоростей потребления кислорода (V_3/V_2) в состояниях 3 и 2, и коэффициент фосфорилирования (отношение ADP/O).

Процесс Ca^{2+} -индуцируемого открытия МРТР в изолированных митохондриях печени крыс регистрировали как изменение величины оптической плотности митохондриальной суспензии (0,5 мг белка/мл) на длине волны 520 нм (UV-VIS спектрофотометр Jasco V-650 (“Jasco International Co., Ltd.”, Япония), как описано ранее [23] при 25°C, используя среду, содержащую 0,125 М сахарозу, 0,01 М Трис-HCl, 0,001 М KH_2PO_4 ,

0,06 М KCl, pH 7,2 в присутствии 5 мМ сукцината как субстрата дыхания. Соответствующие объемы исходного 2 мМ водного раствора CaCl_2 вносили в суспензию митохондрий для получения необходимых концентраций ионов Ca^{2+} и регистрировали скорость терминальной фазы набухания ($\Delta D_{520}/\text{мин}$). Концентрация ионов Ca^{2+} в растворе варьировала в диапазоне 5-100 мкМ. Репрезентативные кривые открытия МРТР представлены при внесении в суспензию митохондрий 70 мкМ Ca^{2+} . Концентрация флаваноидов в суспензии митохондрий варьировала в диапазоне 10-25 мкМ, поскольку ранее в наших экспериментах эти концентрации оказывали выраженные эффекты на биологические и искусственные мембраны [24]. Для получения требуемых концентраций соответствующие объемы свежеприготовленных 10 мМ растворов флаваноидов в этаноле добавляли в суспензию митохондрий и преинкубировали в течение 5 мин до внесения субстрата дыхания или ионов кальция. В используемых концентрациях этанол не оказывал значимых эффектов на регистрируемые параметры. CsA (2 мкМ в виде раствора в метаноле) и ингибитор кальциевого унипортера рутений красный (2 мкМ в виде раствора в воде) добавляли в суспензию митохондрий за 2 мин до внесения ионов кальция. Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавт. [25].

Статистический анализ

Проверку нормальности распределения параметров проводили, используя тест Шапиро-Уилка. Поскольку распределения имеющихся данных отличались от нормального, достоверность различий между значениями параметров, измеренных в группах, анализировали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни для оценки различий между двумя независимыми группами результатов, Краскела-Уоллиса для проверки совпадения распределения значений параметров и равенства медиан нескольких выборок результатов, Вальда-Вольфовица для проверки однородности групп результатов. Результаты экспериментов получены в 5-7 повторениях и представлены как Me [Q1; Q3]. Парные апостериорные (“post hoc”) сравнения групп между собой (в случае наличия более чем двух групп) проводили, используя статистическую поправку Холма-Бонферрони. Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel 2013 и прикладных программ STATISTICA 10.0. Статистически значимыми принимали различия между значениями параметров в группах при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электронно-микроскопический анализ нарушений ультраструктуры митохондрий при взаимодействии с ионами Ca^{2+}

Рисунок 1 представляет электронные микрофотографии изолированных митохондрий печени крыс контрольной группы в отсутствие воздействий *in vitro*.

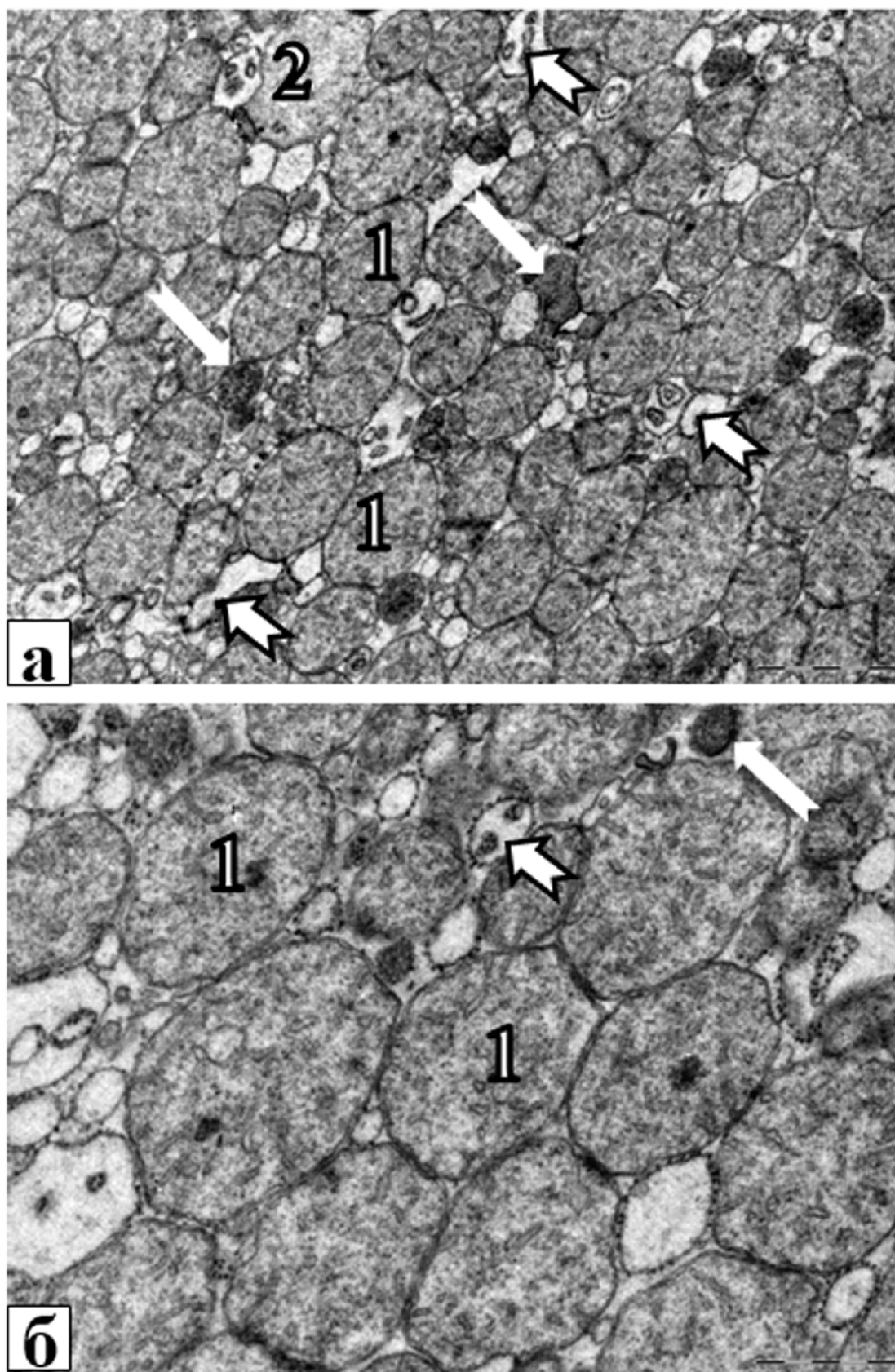


Рисунок 1. Репрезентативные электронограммы митохондрий печени крыс. Контроль. **1** – основная популяция митохондрий, отличающихся округлой формой, матриксом умеренной электронной плотности и укороченными неупорядоченно расположенными, кристами; **2** – изменённая органелла, характеризующаяся электронно-светлым матриксом и редуцированными кристами; короткие стрелки – примеси микросомальной фракции; длинные стрелки – лизосомоподобные структуры; **а** – $\times 20000$, **б** – $\times 40000$. Масштабный отрезок равен 1,0 и 0,5 $\mu\text{м}$ соответственно.

Свежеизолированные митохондрии обладали типичной ортодоксальной структурой с выраженной внутренней мембраной и кристами. Профили митохондрий отличались различными размерами, преимущественно округлой формой, матриксом умеренной электронной плотности и отчётливыми неупорядоченно расположенными кристами. При этом кристы были не расширены и несколько укорочены. Ультраструктура подобных митохондрий соответствует их оптимальному энергетическому и биосинтетическому состоянию. Среди основной популяции митохондрий встречались единичные набухшие органеллы, имеющие матрикс пониженной электронной плотности, и редуцированные кристы, которые являются низкоэнергетическими (квалифицировались как измененные митохондрии). Органеллы, имеющие матрикс повышенной электронной плотности (конденсированные), не выявлены.

На рисунках 2 и 3 представлены электронные микрофотографии изолированных митохондрий печени крыс при экспонировании органелл различными концентрациями экзогенных ионов Ca^{2+} (20 мкМ и 60 мкМ) в среде, не содержащей ЭГТА (хелатор ионов Ca^{2+}).

Ионы Ca^{2+} индуцировали выраженные дозозависимые эффекты. Как результат взаимодействия с ионами Ca^{2+} мы визуальнo наблюдали значительные ультраструктурные нарушения и существенный рост гетерогенности митохондрий по размерам и электронной плотности (таблица).

Воздействие ионов кальция (20 мкМ) на митохондрии в течение 30 мин в среде, не содержащей ЭГТА, приводило к появлению большего числа увеличенных в размерах органелл, которые отличались электронно-светлым набухшим матриксом, удлинёнными кристами (рис. 2). Мы также регистрировали определённое

число конденсированных органелл различных размеров, которые характеризовались повышенной электронной плотностью матрикса. Однако интракристные промежутки в этих органеллах были не расширены, и отслоения внутренней мембраны с формированием внутримитохондриальной вакуоли мы не наблюдали. Меньшая часть митохондрий имела признаки деструкции, характеризовалась матриксом умеренной электронной плотности, но при этом мы регистрировали неупорядоченно расположенные отчётливо визуализируемые кристы без расширения интракристного пространства (органеллы, промежуточные по морфологическим изменениям). Визуальные наблюдения мы подтверждали морфометрическими измерениями (таблица). Увеличивались как средняя площадь сечения одной митохондрии, так и средний диаметр и средний периметр митохондрий. Возрастал фактор элонгации и уменьшалась сферичность органелл. Электронная плотность матрикса митохондрий при этом по данным морфометрии несколько уменьшалась.

С увеличением концентрации ионов Ca^{2+} (60 мкМ) существенно возрастала гетерогенность и число морфологически изменённых митохондрий. Преобладали органеллы, отличающиеся электронно-светлым набухшим матриксом с уменьшенным числом крист и локально расширенными интракристными промежутками (рис. 3, таблица). Присутствовало также определённое число конденсированных органелл, которые отличались высокой электронной плотностью матрикса, со значительными деструктивными нарушениями в виде расширения интракристных промежутков вплоть до отслоения внутренней мембраны и формирования внутримитохондриальной вакуоли, и митохондрии с выраженными признаками деструкции, но при этом матрикс отличался умеренной электронной плотностью, отчётливыми и многочисленными кристами. Визуальные наблюдения

Таблица. Морфометрические параметры изолированных митохондрий печени крыс, экспонированных ионам Ca^{2+} . Митохондрии печени крыс (5 мг белка/мл) экспонировали ионам кальция (20 мкМ и 60 мкМ) в течение 30 мин в среде, содержащей 0,15 М KCl, 0,02 М KH_2PO_4 , pH 7,4, 25°C. Количество измерений $n=5$, количество животных в группе $n=5$, для морфометрического анализа оценивали параметры 250-280 профилей митохондрий на 25 тестируемых неперекрывающихся площадях. Результаты представлены как Me [Q1; Q3]

Морфометрические параметры	Контроль	20 мкМ Ca^{2+}	60 мкМ Ca^{2+}
Средняя площадь сечения одной Мх, мкм ²	0,26 [0,18; 0,42]	0,31 [0,23; 0,51]*	0,40 [0,25; 0,67]*#
Средний периметр одной Мх, мкм	2,12 [1,79; 2,47]	2,34 [1,96; 2,89]*	2,48 [2,03; 3,33]*#
Соотношение сторон	1,62 [1,51; 1,71]	1,72 [1,63; 1,95]*	1,58 [1,35; 1,79]#
Фактор элонгации	1,63 [1,49; 1,72]	1,79 [1,68; 1,94]*	1,65 [1,51; 1,82]#
Средняя относительная электронная плотность Мх	127,55 [119,67; 135,26]	119,59 [99,04; 146,24]*	118,49 [100,95; 142,41]*
Диаметр эквивалентного круга, мкм	0,63 [0,48; 0,73]	0,67 [0,49; 0,85]*	0,74 [0,57; 0,93]*#
Средний диаметр одной Мх, мкм	0,61 [0,51; 0,79]	0,76 [0,64; 0,94]*	0,79 [0,66; 1,02]*
Сферичность	0,38 [0,34; 0,44]	0,32 [0,26; 0,37]*	0,37 [0,31; 0,44]#
Фактор формы	0,79 [0,77; 0,82]	0,78 [0,74; 0,87]	0,79 [0,74; 0,82]
Среднее кол-во крист в 1 Мх, шт.	4,3 [3,7; 4,8]	3,8 [3,3; 4,5]	3,3 [2,8; 4,0]*
Средняя длина 1 кристы, мкм	0,12 [0,09; 0,15]	0,16 [0,12; 0,21]*	0,15 [0,09; 0,20]*

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с группой Контроль, # – $p < 0,05$ при сравнении с группой 20 мкМ Ca^{2+} .

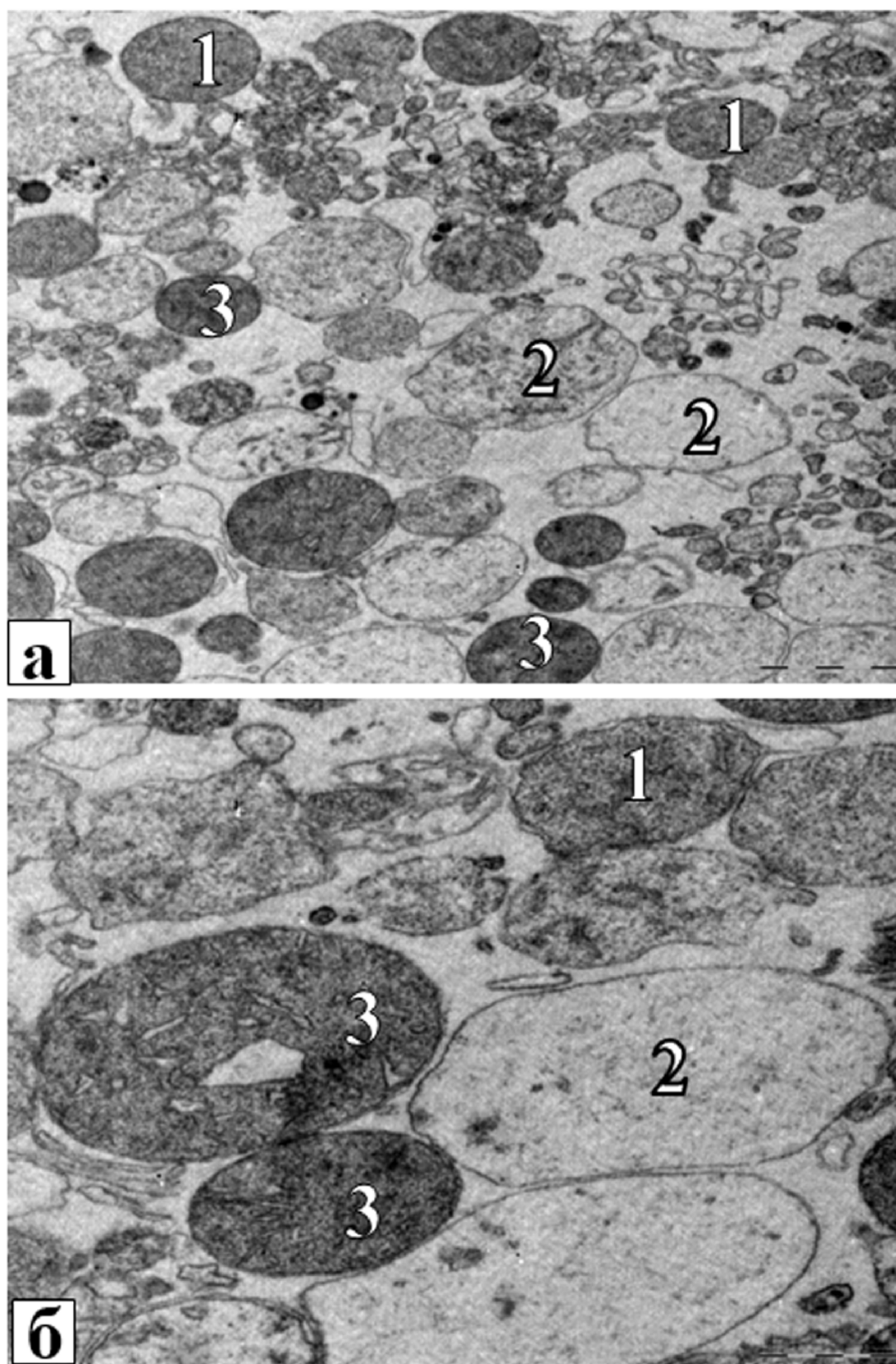


Рисунок 2. Репрезентативные электронограммы митохондрий печени крыс. Митохондрии экспонировали 20 мкМ Ca^{2+} . 1 – популяция митохондрий, отличающихся округлой формой, матриксом умеренной электронной плотности и укороченными неупорядоченно расположенными кристами; 2 – органеллы, характеризующиеся набухшим электронно-светлым матриксом и редуцированными кристами; 3 – конденсированные органеллы с электронно-плотным матриксом, расширенными интракристидными промежутками; а – $\times 20000$, б – $\times 40000$. Масштабный отрезок равен 1,0 мкм и 0,5 мкм соответственно.

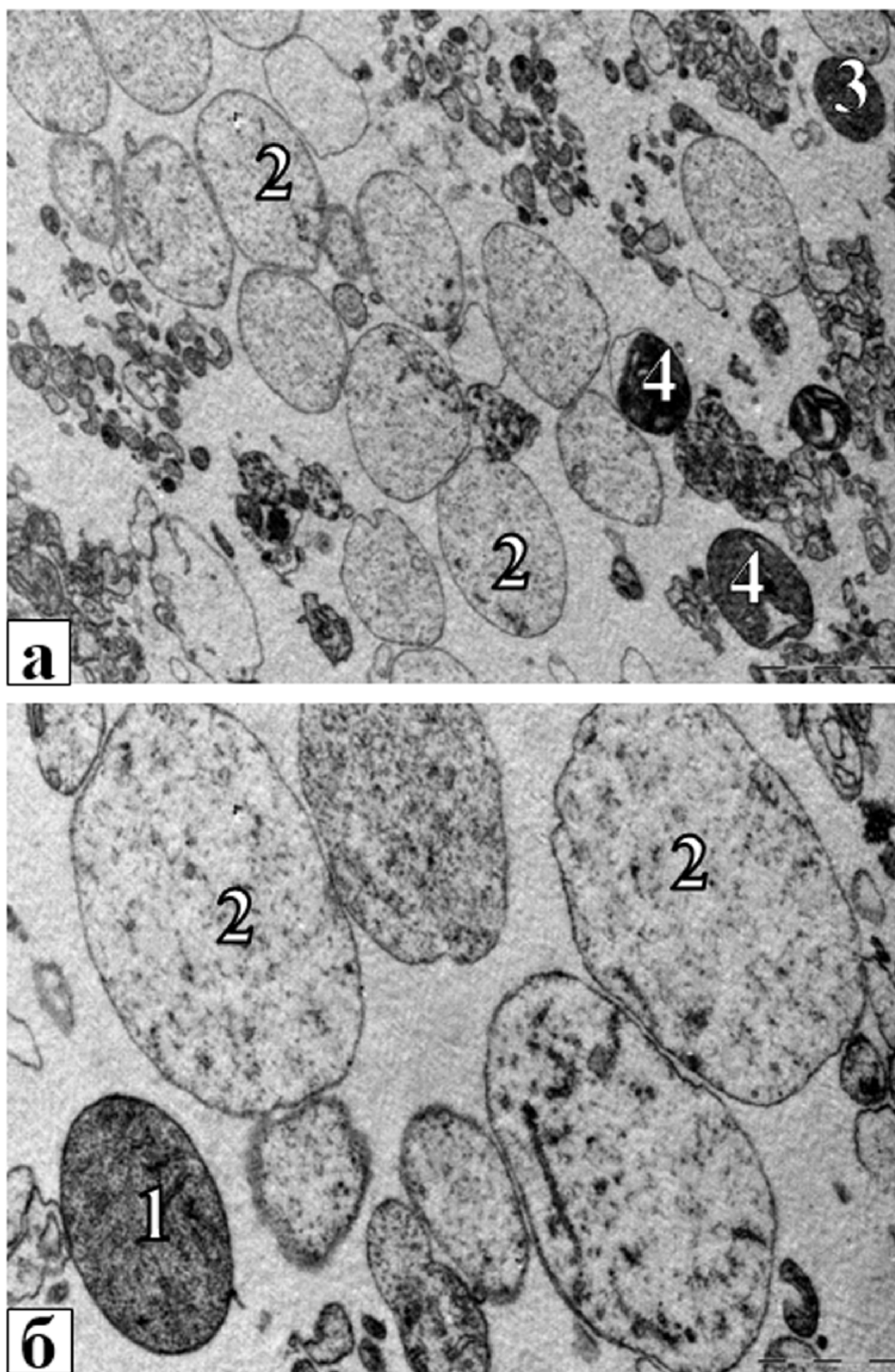


Рисунок 3. Репрезентативные электронограммы митохондрий печени крыс. Митохондрии экспонировали 60 мкМ Ca^{2+} . Значительная гетерогенность митохондриальной фракции. 1 – митохондрии промежуточного состояния с выраженными признаками деструкции, матриксом умеренной электронной плотности и укороченными неупорядоченно расположенными кристами; 2 – митохондрии, увеличенные в размерах, отличающиеся электронно-светлым набухшим матриксом, с поврежденной внутренней митохондриальной мембраной; 3 – конденсированные органеллы, отличающиеся повышенной электронной плотностью матрикса; 4 – конденсированные органеллы с повышенной электронной плотностью матрикса, расширенными интракристными промежутками, отслоением внутренней мембраны и формированием пузыря; а – $\times 20000$, б – $\times 40000$. Масштабный отрезок равен 1,0 мкм и 0,5 мкм соответственно.

подтверждались морфометрическими измерениями (таблица). Средняя площадь сечения митохондрии увеличивалась в 1,5 раза по сравнению с контрольными органеллами, диаметр и периметр — в 1,2 раза, фактор элонгации и сферичность органелл существенно не изменялись. Электронная плотность матрикса митохондрий по данным морфометрии уменьшалась незначительно (таблица), по-видимому, за счёт появления конденсированных митохондрий и значительной гетерогенности органелл. Морфометрический анализ внутренней структуры митохондрий показал, что присутствие ионов кальция уменьшает среднее количество крист, но увеличивает длину одной кристы.

Ранее в работе Petronilli и соавт. методом электронной микроскопии было показано, что в присутствии 150 мкМ Ca^{2+} и неорганического фосфата происходит полное набухание митохондрий и потеря нативной структуры внутренней митохондриальной мембраны, при этом не было обнаружено промежуточных состояний [26].

Регуляция ионами Ca^{2+} функциональной активности митохондрий. Эффект флавоноидов

Митохондриальный Ca^{2+} является ключевым регулятором клеточного энергетического метаболизма благодаря Ca^{2+} -зависимой активации ферментов цикла трикарбоновых кислот, электрон-транспортной цепи и F_0F_1 -АТФ-синтазы [27]. В наших экспериментах в среде, не содержащей ЭГТА, ионы экзогенного кальция (10-50 мкМ) эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс при использовании сукцината в качестве субстрата дыхания: скорость ADP-стимулируемого потребления кислорода V_3 значительно уменьшалась, скорость субстрат-зависимого потребления кислорода V_2 возрастала, коэффициент дыхательного контроля V_3/V_2 уменьшался до 1, коэффициент фосфорилирования ADP/O уменьшался до 0, свидетельствуя о полном нарушении сопряжения окисления и фосфорилирования (рис. 4). Ранее подобный эффект ионов Ca^{2+} мы наблюдали в случае глутамат-энергизованных митохондрий [28].

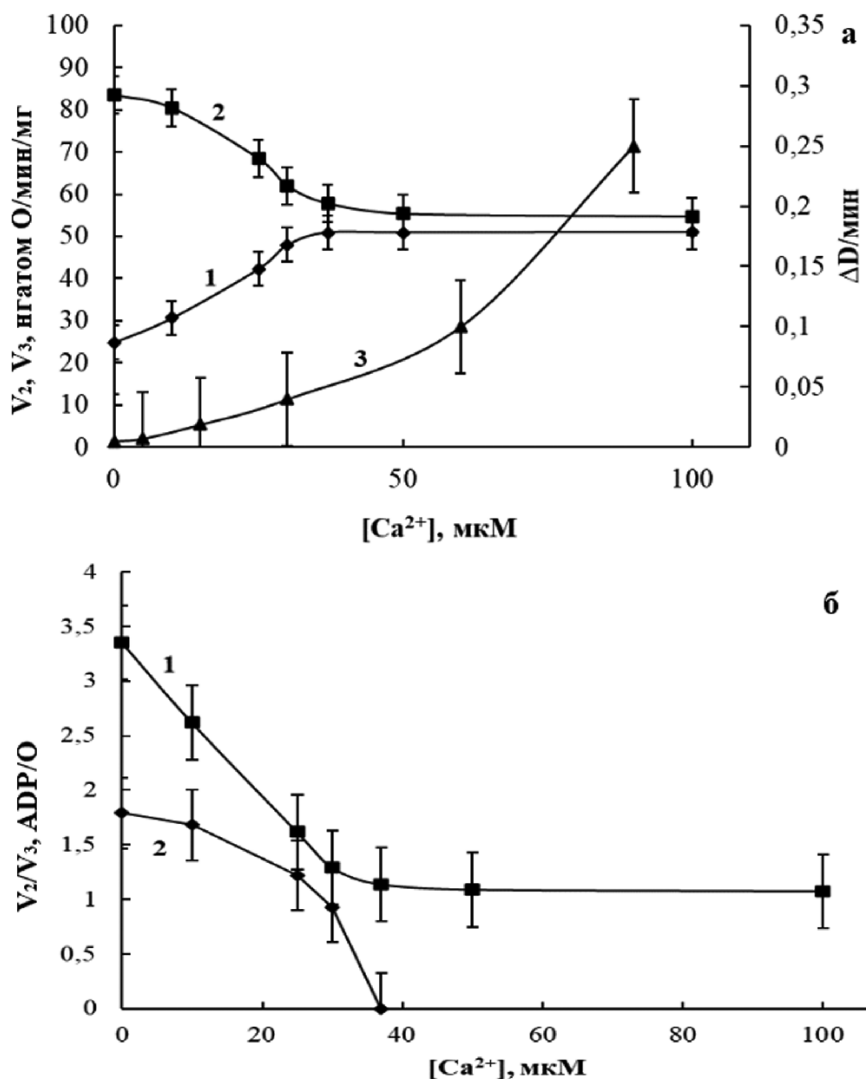


Рисунок 4. Респираторная активность митохондрий печени крыс и процесс открытия МПТР в присутствии различных концентраций ионов Ca^{2+} : **а** – скорости субстрат-зависимого дыхания V_2 (1), ADP-стимулируемого дыхания V_3 (2), процесса открытия МПТР (3); **б** – коэффициенты акцепторного контроля V_3/V_2 (1) и фосфорилирования ADP/O (2), субстрат – 5 мМ сукцинат. Количество измерений $n=7$, количество животных $n=7$.

Как недавно показано, свободный кальций в концентрации 500 нМ усиливал респираторную активность и генерацию АТР в митохондриях мышц мыши при использовании в качестве субстрата глутамата/малата (но не сукцината) и ингибировал эти процессы при концентрации 10 мкМ и выше [29].

Используемые концентрации Ca^{2+} также индуцировали выраженное набухание митохондрий, регистрируемое как изменение светорассеяния митохондриальной суспензии в результате формирования пор высокой проницаемости (МРТР). Рисунок 5 представляет репрезентативные кривые Ca^{2+} -стимулируемого процесса открытия МРТР. Флавоноиды (катехин) стимулировали, а CsA — известный блокатор открытия МРТР — ингибировал набухание митохондрий. Ранее мы оценили параметры Ca^{2+} -индуцируемого процесса образования МРТР: кажущуюся константу диссоциации взаимодействия ионов Ca^{2+} с митохондриальными сайтами, $K_d = 60 \pm 12$ мкМ, порядок реакции взаимодействия, $n=3$ [22].

Недавно Bernardi предложил как минимум два механизма Ca^{2+} -индуцируемого процесса пермеабилзации митохондриальной мембраны: 1) формирование поры с высокой проводимостью с участием F-АТР-синтазы, которая ингибируется CsA, но не бонгкрековой кислотой (ВКА), и 2) образование поры, включающей адениннуклеотидтрансферазу (ANT), которая ингибируется и CsA, и ВКА [11].

Флавоноиды (10–25 мкМ) — катехин, нарингенин, но не гликозид нарингин — ингибировали респираторную активность митохондрий *in vitro*, уменьшая скорость потребления кислорода V_3 , коэффициенты акцепторного контроля (V_3/V_2) и фосфорилирования (ADP/O) (данные не представлены). Предварительное внесение флавоноидов (10–25 мкМ),

нарингенина, нарингина, катехина, в суспензию митохондрий дозозависимо стимулировало процесс открытия МРТР в присутствии ионов Ca^{2+} (рис. 6).

Уже в ранних работах, посвященных митохондриальным эффектам флавоноидов, было показано, что в зависимости от экспериментальных условий и концентрации флавоноиды могут действовать как ингибиторы, так и индукторы открытия МРТР [13, 16, 30]. Для выяснения возможного механизма стимулирующего действия флавоноидов на Ca^{2+} -индуцируемый процесс мы предварительно вносили в суспензию митохондрий рутений красный — специфический ингибитор кальциевого унипортера. В наших экспериментах рутений красный эффективно предотвращал Ca^{2+} -стимулируемый процесс открытия МРТР как в отсутствие, так и в присутствии флавоноидов (рис. 6). Поскольку рутений красный ингибирует открытие пор высокой проницаемости (рис. 6), блокируя перенос ионов Ca^{2+} в матрикс митохондрий посредством унипортера, мы предполагаем, что эффект флавоноидов на процесс открытия МРТР опосредован стимулированием Ca^{2+} унипортера. Ранее мы также показали, что рутений красный полностью ингибирует Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий и деполяризацию митохондриальной мембраны, но не влияет существенно на стимулирование Ca^{2+} -зависимого процесса открытия МРТР терпеноидом ферутинином. Это позволило нам предположить, что ферутинин действует как Ca^{2+} -ионофор, непосредственно повышая проницаемость внутренней митохондриальной мембраны для ионов Ca^{2+} [31]. Ранее также было показано, что флавоноиды (кверцетин, кемпферол, генистин, генистеин, галангин) стимулируют митохондриальный Ca^{2+} унипортер [32].

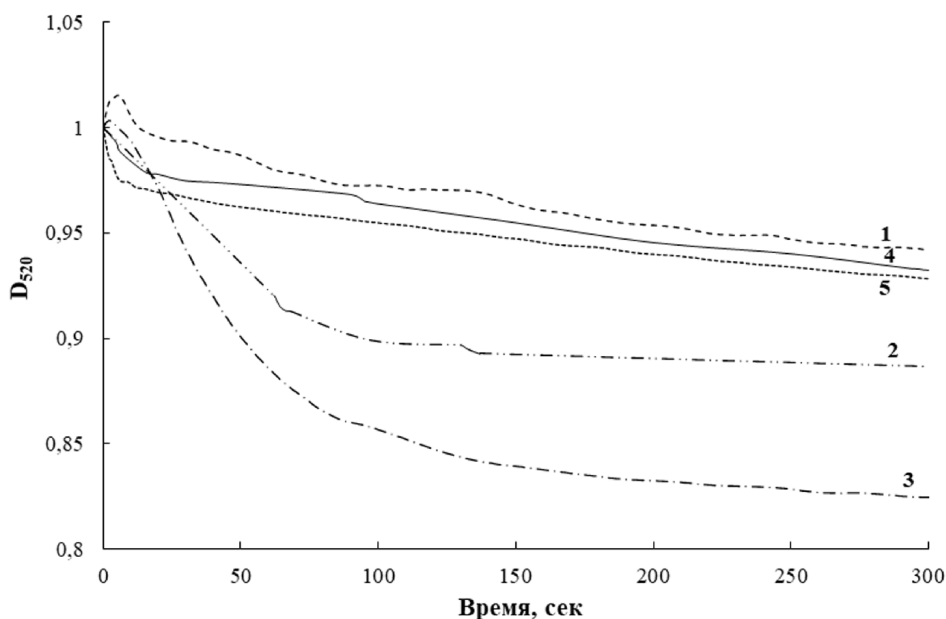


Рисунок 5. Репрезентативные кривые Ca^{2+} -стимулируемого процесса открытия МРТР в изолированных митохондриях печени крыс: 1 — контроль, 2 — митохондрии в присутствии 70 мкМ Ca^{2+} , 3 — митохондрии в присутствии 70 мкМ Ca^{2+} и 25 мкМ катехина, 4 — митохондрии в присутствии 70 мкМ Ca^{2+} и 2 мкМ CsA, 5 — митохондрии в присутствии 70 мкМ Ca^{2+} , 25 мкМ катехина и 2 мкМ рутения красного. Количество измерений $n=5$, количество животных в группе $n=5$.

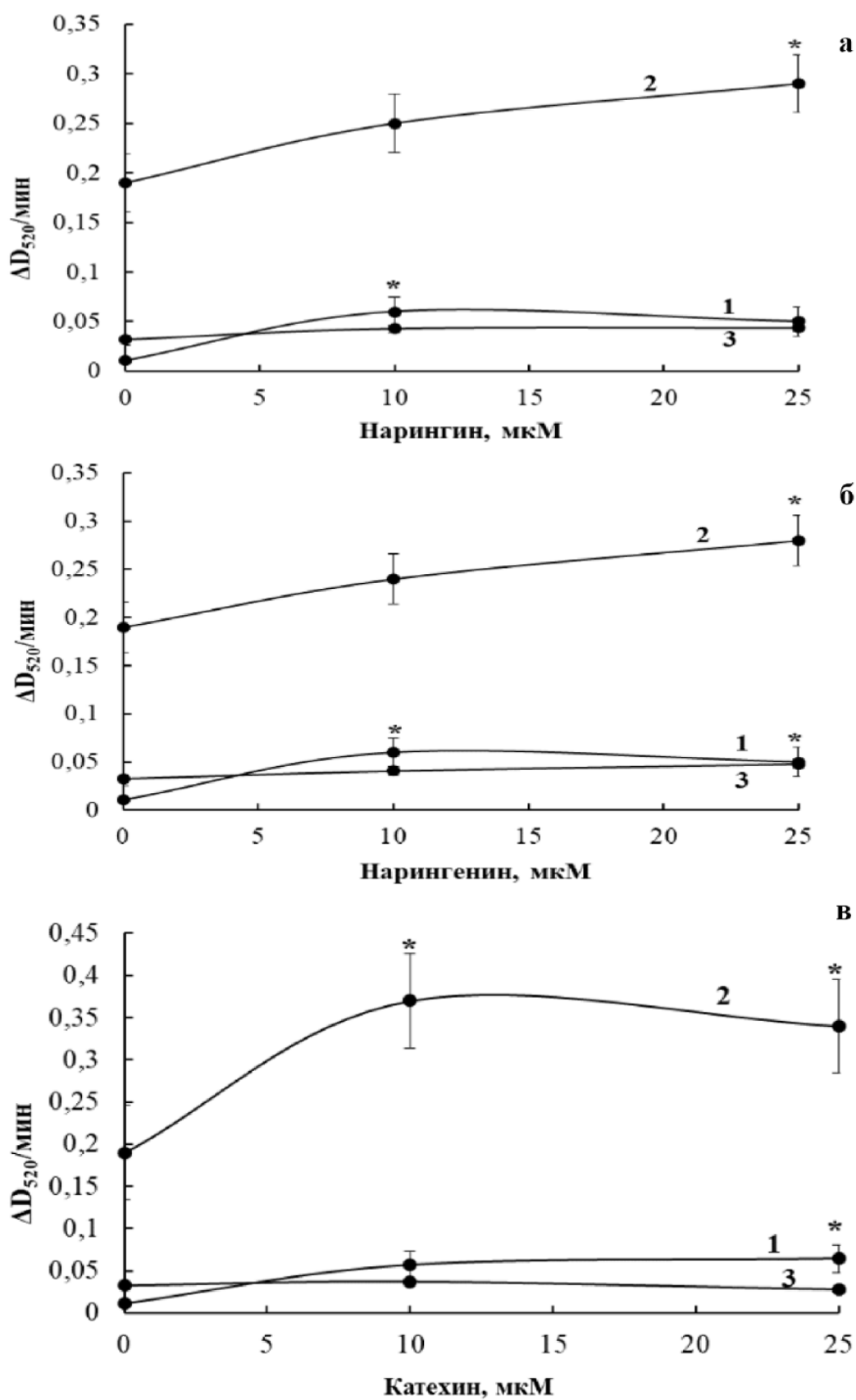


Рисунок 6. Эффект рутения красного на процесс Ca^{2+} -индуцируемого открытия МРТР в присутствии различных концентраций нарингина (а), нарингенина (б), катехина (в): 1 – флавоноид; 2 – флавоноид + Ca^{2+} (70 мкМ); 3 – флавоноид + Ca^{2+} (70 мкМ) + рутений красный (2 мкМ). Количество измерений $n=7$, количество животных $n=7$. * – $p<0,05$ при сравнении с контролем (митохондрии в отсутствие флавоноидов).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Митохондриальный захват (и выброс) ионов Ca^{2+} выполняют несколько функций: регуляция локального уровня ионов Ca^{2+} в цитоплазме, регуляция скорости дыхания и продукции АТР, проапоптотическое открытие МРТР, Ca^{2+} -зависимая секреция. В среде, не содержащей ЭГТА, ионы экзогенного кальция (20-60 мкМ) дозозависимо индуцировали выраженные нарушения ультраструктуры митохондрий и рост гетерогенности популяции органелл, стимулировали открытие пор высокой проницаемости и эффективно ингибировали респираторную активность митохондрий. При этом существенно увеличивалось число набухших низкоэнергетических органелл со значительными деструктивными изменениями в виде отслоения внутренней мембраны, вакуолизации и потери матрикса, уменьшения числа крист. Мы также регистрировали конденсированные митохондрии, образование которых, возможно, предшествует набуханию и разрушению митохондрий. Флавоноиды нарингенин и катехин (10-25 мкМ) дозозависимо ингибировали респираторную активность митохондрий *in vitro* и стимулировали процесс открытия МРТР в присутствии ионов Ca^{2+} . Мы предполагаем, что эффект флавоноидов на процесс открытия МРТР опосредован активацией Ca^{2+} унипортера. Обнаруженные нами эффекты флавоноидов на Ca^{2+} -зависимые митохондриальные процессы позволяют предложить эти растительные полифенолы как средство коррекции митохондриальной дисфункции, связанной с нарушением кальциевого гомеостаза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена частично в рамках проекта “Коррекция биоэнергетической функции митохондрий сердца крыс: механизм кардиопротекторного действия природных полифенолов и хинонов” Государственной программы научных исследований “Конвергенция-2025” Республики Беларусь на 2021-2025 годы, №ГР 20211784.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными при проведении эксперимента, были выполнены с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным, одобрены Этическим комитетом Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (Протокол от 23.05.2019 г. № 29/19) и соответствовали ГОСТу 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами” (Межгосударственный стандарт, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА

1. Folmes C.D.L., Dzeja P.P., Nelson T.J., Terzic A. (2012) Mitochondria in control of cell fate. *Circulation Res.*, **110**(4), 526-529. DOI: 10.1161/RES.0b013e31824ae5c1
2. Fatiga F.F., Wang L.-J., Hsu T., Capuno J.I., Fu C.-Y. (2021) Miro1 functions as an inhibitory regulator of MFN at elevated mitochondrial Ca^{2+} levels. *J. Cell. Biochem.*, **122**(12), 1848-1862. DOI: 10.1002/jcb.30138
3. Заводник И.Б. (2016) Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация. Биомедицинская химия, **62**(3), 311-317. [Zavodnik I.B. (2016) Mitochondria, calcium homeostasis and calcium signaling. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **62**(3), 311-317.]. DOI: 10.18097/PBMC20166203311
4. Garbincius J.F., Elrod J.W. (2021) Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. *Physiological Rev.*, **102**(2), 893-992. DOI: 10.1152/physrev.00041.2020
5. Santo-Domingo J., Demareux N. (2010) Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**(6-7), 907-912. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.01.005
6. Gilbert G., Demydenko K., Dries E., Puertas R.D., Jin X., Sipido K., Roderick H.L. (2020) Calcium signaling in cardiomyocyte function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **12**(3), a035428. DOI: 10.1101/cshperspect.a035428
7. de Stefani D., Raffaello A., Teardo E., Szabo I., Rizzuto R. (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, **476**(7360), 336-340. DOI: 10.1038/nature10230
8. Territo P.R., French S.A., Dunleavy M.C., Evans F.J., Balaban R.S. (2001) Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation. Rapid kinetics of mvO_2 , NADH and light scattering. *J. Biol. Chem.*, **276**(4), 2586-2599. DOI: 10.1074/jbc.M002923200
9. Pérez M.J., Quintanilla R.A. (2017) Development or disease: Duality of the mitochondrial permeability transition pore. *Developmental Biology*, **426**(1), 1-7. DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.04.018
10. Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. (2015) The mitochondrial permeability transition pore: Channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiological Rev.*, **95**(4), 1111-1155. DOI: 10.1152/physrev.00001.2015
11. Bernardi P. (2020) Mechanisms for Ca^{2+} -dependent permeability transition in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**(6), 2743-2744. DOI: 10.1073/pnas.1921035117
12. Drahota Z., Milerová M., Endlicher R., Rychtmoc D., Červinková Z., Ošťádal B. (2012) Developmental changes of the sensitivity of cardiac and liver mitochondrial permeability transition pore to calcium load and oxidative stress. *Physiological Res.*, **61**(Suppl. 1), S165-S172. DOI: 10.33549/physiolres.93237
13. Sandoval-Acuña C., Ferreira J., Speisky H. (2014) Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **559**, 75-90. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.017
14. Sandoval-Acuña C., López-Alarcón C., Aliaga M.E., Speisky H. (2012) Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action. *Chemico-Biological Interactions*, **199**(1), 18-28. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.05.006

15. Lagoa R., Graziani I., López-Sánchez C., García-Martínez V., Gutierrez-Merino C. (2011) Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**(12), 1562-1572. DOI: 10.1016/j.bbabo.2011.09.022
16. Ilyich T.V., Kovalenia T.A., Lapshina E.A., Stepniak A., Palecz B., Zavadnik I.B. (2021) Thermodynamic parameters and mitochondrial effects of supramolecular complexes of quercetin with β -cyclodextrins. *J. Molecular Liquids*, **325**, 1-10. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.115184
17. Zavadnik I., Buko V., Lukivskaya O., Lapshina E., Ilyich T., Belonovskaya E., Kirko S., Naruta E., Kuzmitskaya I., Budryn G., Zyzelevicz D., Orach J., Zakrzewska A., Kiryukhina L. (2019) Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) peel polyphenol-rich extract attenuates rat liver mitochondria impairments in alcoholic steatohepatitis *in vivo* and after oxidative treatment *in vitro*. *J. Functional Foods*, **57**, 83-94. DOI: 10.1016/j.jff.2019.04.001
18. Johnson D., Lardy H.A. (1967) Isolation of liver or kidney mitochondria. *Methods Enzymol.*, **10**, 94-101.
19. El'darov Ch.M., Vays V.B., Vangeli I.M., Kolosova N.G., Bakeeva L.E. (2015) Morphometric examination of mitochondrial ultrastructure in aging cardiomyocytes. *Biochemistry (Moscow)*, **80**(5), 604-609. DOI: 10.1134/S0006297915050132
20. Millonig G.A. (1961) Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. *J. Appl. Physics*, **32**, 1637-1643.
21. Reynolds E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**(1), 208-212. DOI: 10.1083/jcb.17.1.208
22. Golovach N.G., Cheshchevik V.T., Lapshina E.A., Ilyich T.V., Zavadnik I.B. (2017) Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca^{2+} ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents. *J. Membr. Biol.*, **250**(2), 225-236. DOI: 10.1007/s00232-017-9953-2
23. Richardson A.P., Halestrap A.P. (2016) Quantification of active mitochondrial permeability transition pores using GNX-4975 inhibitor titrations provides insights into molecular identity. *Biochemical J.*, **473**(9), 1129-1140. DOI: 10.1042/BCJ20160070
24. Veiko A.G., Sekowski S., Lapshina E.A., Wilczewska A.Z., Markiewicz K.H., Zamaraeva M., Zhao H.-Ch., Zavadnik I.B. (2020) Flavonoids modulate liposomal membrane structure, regulate mitochondrial membrane permeability and prevent erythrocyte oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes*, **1862**(11), 183442. DOI: 10.1016/j.bbame.2020.183442
25. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
26. Petronilli V., Cola C., Massari S., Colonna R., Bernardi P. (1993) Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **268**(29), 21939-21945. DOI: 10.1016/s0021-9258(20)80631-0
27. Williams G.S.B., Boyman L., Lederer W.J. (2015) Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **78**, 35-45. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.019
28. Zavadnik I.B., Dremza I.K., Cheshchevik V.T., Lapshina E.A., Zamaraeva M. (2013) Oxidative damage of rat liver mitochondria during exposure to *t*-butyl hydroperoxide. Role of Ca^{2+} ions in oxidative processes. *Life Sciences*, **92**(23), 1110-1117. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.04.009
29. Fink B.D., Bai F., Yu L., Sivitz W.I. (2017) Regulation of ATP production: dependence on calcium concentration and respiratory state. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **313**(2), C146-C153. DOI: 10.1152/ajpcell.00086.2017
30. Dorta D.J., Pigoso A.A., Mingatto F.E., Rodrigues T., Pestana C.R., Uyemura S.A., Santos A.C., Curti C. (2008) Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. *Phytotherapy Res.*, **22**(9), 1213-1218. DOI: 10.1002/ptr.2441
31. Ilyich T., Charishnikova O., Sekowski S., Zamaraeva M., Cheshchevik V., Dremza I., Cheshchevik N., Kiryukhina L., Lapshina E., Zavadnik I. (2018) Ferutinin induces membrane depolarization, permeability transition pore formation, and respiration uncoupling in isolated rat liver mitochondria by stimulation of Ca^{2+} -permeability. *J. Membr. Biol.*, **251**(4), 563-572. DOI: 10.1007/s00232-018-0032-0
32. Montero M., Lobaton C.D., Hernandez-Sanmiguel E., Santodomingo J., Vay L., Moreno A., Alvarez J. (2004) Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *Biochemical J.*, **384**, 19-24. DOI: 10.1042/BJ20040990

Поступила в редакцию: 12. 03. 2022.
После доработки: 19. 06. 2022.
Принята к печати: 19. 06. 2022.

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN RAT LIVER MITOCHONDRIA
UNDER CALCIUM ION LOADING IN THE ABSENCE AND PRESENCE OF FLAVONOIDS**

***I.B. Zavodnik^{1*}, T.A. Kovalenia¹, A.G. Veiko¹, E.A. Lapshina¹,
T.V. Ilyich¹, R.I. Kravchuk², L.B. Zavodnik¹, I.I. Klimovich²***

¹Department of Biochemistry, Yanka Kupala State University of Grodno,
50 Leninskogo Komsomola ave., Grodno, 230030 Belarus; *e-mail: zavodnik_ib@grsu.by

²Grodno State Medical University, 80 Gorkii str., Grodno, 230009 Belarus

The aim of the present work was to elucidate the mechanisms of calcium ion-induced impairments of the ultrastructure and functional activity of isolated rat liver mitochondria in the absence and presence of a number of flavonoids *in vitro*. In the presence of exogenous Ca^{2+} (20-60 μM), mitochondrial heterogeneity in size and electron density markedly increased: most organelles demonstrated a swollen electron-light matrix, bigger size, elongated cristae and a reduced their number, a damaged native structure of the inner membrane up to its detachment, and some mitochondria showed a more electron-dense matrix (condensed mitochondria). The calcium-induced opening of the mitochondrial permeability transition pores (MPTP) resulted in the ultrastructural disturbances and in the effective inhibition of the respiratory activity of rat liver mitochondria. The flavonoids (10-25 μM) naringenin and catechin, dose-dependently inhibited the respiratory activity of mitochondria and stimulated the MPTP opening in the presence of Ca^{2+} ions. Since Ruthenium red, an inhibitor of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter, effectively prevented Ca^{2+} -induced MPTP opening both in the absence and presence of flavonoids, we hypothesized that the effect of flavonoids on the MPTP opening could be mediated by stimulation of the Ca^{2+} uniporter.

Key words: mitochondria; ultrastructure; respiratory activity; calcium ions; flavonoids

Funding. The work was partially carried out within the framework of the project “Correction of the bioenergetic function of rat heart mitochondria: the mechanism of the cardioprotective action of natural polyphenols and quinones” of the State Program of Scientific Research “Convergence-2025” of the Republic of Belarus for 2021-2025, No. GR 20211784.

Received: 12.03.2022; revised: 19.06.2022; accepted: 19.06.2022.