

Фізіологія людини і тварин

УДК 612.014.46:577.352.4

ЗАЛЕЖНІСТЬ Ca^{2+} -АКУМУЛЮВАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ВІД ВІКУ ТВАРИН

Л. Дубицький, Н. Наливайко, Є. Кравенська

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: l_dubitsky@franko.lviv.ua

Досліджували кальцієву ємність і кінетичні властивості Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій печінки шурів різного віку. Встановлено, що максимальна швидкість (V_{max}) уніпорту Ca^{2+} у матрикс мітохондрій печінки з віком суттєво знижується і становить у молодих (6 тижнів), дорослих (10 місяців) і старих тварин (20-22 місяці) відповідно 285,71, 169,49 і 86,96 нмоль Ca^{2+} /хв·мг білка. Константа Міхаеліса Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій (K_m) у дорослих і старих тварин суттєво не відрізняється (19,86–22,77 мкМ), але значно вища у молодих тварин (31,71 мкМ). Це свідчить про низьку спорідненість Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій молодих тварин до Ca^{2+} . З віком тварин суттєво знижується також кальцієва ємність мітохондрій печінки. Отримані результати свідчать про пригнічення кальційакумуляційної функції мітохондрій у печінці під час старіння тварин.

Ключові слова: мітохондрії, Ca^{2+} -уніпортер, кальцієва ємність.

Порушення кальцієвого гомеостазу клітини є однією із важливих причин старіння і загибелі клітини. Показано, зокрема, що під час старіння організму спостерігається пригнічення Ca^{2+} -акумуляційної функції саркоплазматичного ретикулулу і мітохондрій м'язів, що призводить до окисних стресів і порушення функціонування м'язової клітини [3, 6, 7]. Встановлено [9], що пригнічення клітинного метаболізму інтактних гепатоцитів старих тварин тісно корелює зі специфічними змінами ліпідного вмісту мембрани мітохондрій, їхнього об'єму і величини мембранного потенціалу. Відомо також, що саме мітохондрії є одним із найбільших депо кальцію у клітині, які здатні суттєво впливати на процеси внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації [11]. Кальційакумуляційна функція мітохондрій різних тканин організму забезпечується Ca^{2+} -уніпортером цих органел [1, 4]. Проте кількісні характеристики кальцієвої ємності мітохондрій і кінетичні характеристики Ca^{2+} -уніпортера цих органел залежно від віку тварини не були предметом системних досліджень. Тому метою цієї роботи стало з'ясування кінетичних властивостей Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій печінки та кальцієвої ємності цих органел у молодих, дорослих і старих тварин.

Дослідження проводили на ізольованих мітохондріях печінки шурів. Для дослідження було підібрано тварин трьох вікових категорій: 1 – молоді тварини (до 6 тижнів); 2 – дорослі тварини (10 місяців); 3 – старі тварини (20–22 місяці). Мітохондрії печінки білих шурів виділяли методом диференціального центрифугування [2], з модифікаціями, що дозволяють зменшити вміст кальцію у виділених мітохондріях. Середовище виділення мітохондрій містило (мМ): сахароза – 300, тріс – 10, EGTA – 1 (рН 7,4). Видалення EGTA зі суспензії мітохондрій здійснювали шляхом ресуспендування осаду і повторного центрифугування у середовищі без EGTA. Життєздатність мітохондрій

оцінювали за інтенсивністю дихання й окисного фосфорилування полярографічним методом в основних метаболічних станах за Чансом [5]. Поглинання Ca^{2+} мітохондріями та кальцієву ємність реєстрували за допомогою установки, зібраної на основі Ca^{2+} -селективного електрода фірми Orion (модель 93-20), універсального іономіра ЭВ-74, магнітної мішалки, скляної відкритої термостатованої комірки об'ємом 2 мл, програмно-цифрового модуля DRA 1.4 та персонального комп'ютера. Використовували середовище інкубації мітохондрій печінки такого складу (мМ): сахароза – 150, KCl – 50, KH_2PO_4 – 0,1, тріс – 5 (рН 7,4, 26°C). Для дослідження швидкості акумуляції Ca^{2+} мітохондріями у середовище інкубації цих органел вносили CaCl_2 (10–50 мкМ) та сукцинат (0,35 мМ). Відразу ж після внесення мітохондрій у середовище інкубації (3–4 мг мітохондріального білка) розпочинали реєстрацію поглинання Ca^{2+} цими органелами. Зміни концентрації Ca^{2+} у середовищі розраховували за калібрувальною кривою з урахуванням зв'язування кальцію компонентами середовища інкубації шляхом його титрування CaCl_2 . Швидкість уніпорту Ca^{2+} у мітохондрії виражали у нмоль Ca^{2+} /хв·мг білка. Для визначення кальцієвої ємності мітохондрій Ca^{2+} вносили у середовище інкубації порціями по 10 нмоль на 1 мл після акумуляції кожної порції іонів металу суспензією цих органел. Кальцій вносили у суспензію мітохондрій до моменту швидкого виходу кальцію з матриксу цих органел. Середовище інкубації мітохондрій містило (мМ): сахароза – 150, KCl – 50, KH_2PO_4 – 0,1, тріс – 5 (рН 7,4, 26°C). Кальцієву ємність мітохондрій розраховували у мкмоль/мг мітохондріального білка. Вміст білка в суспензії ізольованих мітохондрій визначали за О.Г. Лоурі [8]. У дослідах використовували реактиви кваліфікації х.ч. та ос.ч. (Сінбіас), EGTA ("Sigma", США).

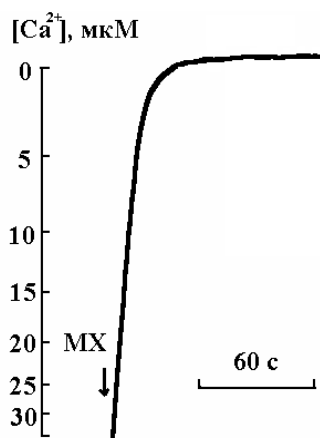


Рис. 1. Типовий запис реєстрації поглинання Ca^{2+} мітохондріями печінки електрометричним методом із використанням Ca^{2+} -селективного електрода фірми Orion (модель 9320). За віссю абсцис – час реєстрації, с; за віссю ординат – зміни концентрації кальцію у суспензії мітохондрій, мкМ. MX – внесення мітохондрій у середовище інкубації з концентрацією Ca^{2+} 50 мкМ.

Електрометричним методом з використанням Ca^{2+} -селективного електрода показано, що внесення мітохондрій у кальційвмісне середовище інкубації супроводжується швидким зниженням концентрації іонізованого кальцію у середовищі інкубації, що свідчить про поглинання його цими органелами (рис. 1).

Підвищення концентрації Ca^{2+} у середовищі інкубації мітохондрій печінки щурів різного віку у діапазоні 3–50 мкмоль/л супроводжується дозозалежним збільшенням початкової швидкості уніпорту Ca^{2+} у матрикс цих органел. Разом з тим мітохондрії печінки тварин різного віку суттєво розрізняються за початковою швидкістю акумуляції ними Ca^{2+} . Так, початкова швидкість акумуляції Ca^{2+} за участю Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій печінки молодих тварин за концентрації цього металу у середовищі інкубації 50 мкмоль/л становила $194,05 \pm 5,3$ нмоль Ca^{2+} /хв·мг білка. Швидкість цього процесу у мітохондріях печінки дорослих і старих тварин за аналогічних умов становила відповідно $166,35 \pm 6,8$ та $63,50 \pm 2,1$ нмоль Ca^{2+} /хв·мг білка, що відповідно на $14,27$ і $67,28\%$

менше від швидкості акумуляції Ca^{2+} мітохондріями молодих тварин (рис. 2). Отже, швидкість акумуляції Ca^{2+} мітохондріями печінки знижується з віком тварин.

Шляхом кінетичного аналізу встановлено, що максимальна швидкість (V_{\max}) транспортування кальцію Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій молодих тварин становить 285,71 нмоль $\text{Ca}^{2+}/\text{хв}\times\text{мг}$ білка, а константа Міхаеліса (K_m) цього Ca^{2+} -транспортувального процесу – 31,71 мкМ (рис. 3). V_{\max} транспортування кальцію Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій печінки дорослих тварин становить 169,49 нмоль $\text{Ca}^{2+}/\text{хв}\times\text{мг}$ білка, а K_m – 19,86 мкМ. Найменше значення V_{\max} транспортування кальцію Ca^{2+} -уніпортером характерне для мітохондрій старих тварин, де воно становить 86,96 нмоль $\text{Ca}^{2+}/\text{хв}\times\text{мг}$ білка, а K_m цієї іон-транспортувальної системи до іонів кальцію є близькою до K_m уніпортера мітохондрій дорослих тварин і становить 22,77 мкМ. Отримані результати свідчать, що максимальна швидкість Ca^{2+} -уніпорту мітохондрій суттєво знижується з віком і є найменшою у печінці старих тварин. Разом з тим спорідненість Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій до Ca^{2+} у молодих тварин є суттєво нижчою порівняно із дорослими і старими тваринами.

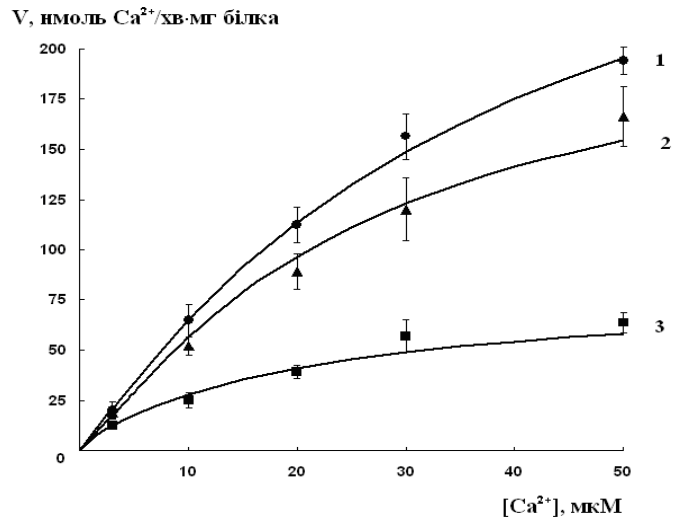


Рис. 2. Залежність швидкості акумуляції іонів кальцію Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій печінки тварин різного віку від концентрації іонів цього металу у середовищі інкубації. За віссю абсцис – концентрація іонів кальцію у середовищі інкубації, $[\text{Ca}^{2+}]$, мкМ; за віссю ординат – швидкість акумуляції іонів кальцію (V , (нмоль $\text{Ca}^{2+}/\text{хв}\times\text{мг}$ білка) Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій печінки тварин різного віку (1 – молоді; 2 – дорослі; 3 – старі).

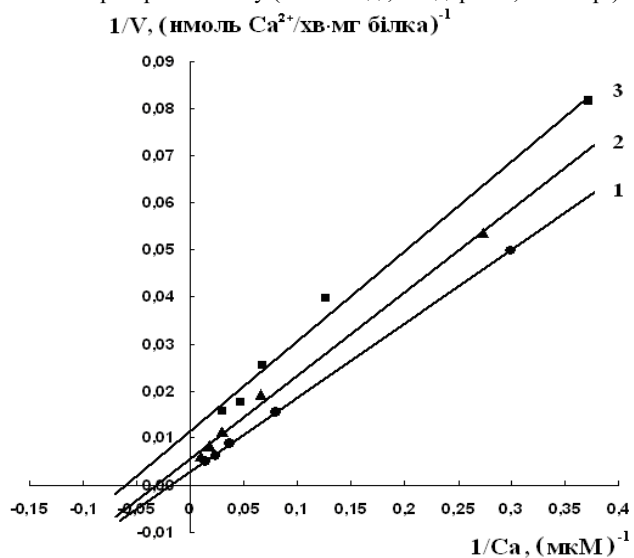


Рис. 3. Лінеаризація залежності швидкості акумуляції іонів кальцію Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій печінки від концентрації Ca^{2+} у середовищі інкубації у системі координат Лайнуівера – Берка. За віссю абсцис – обернена величина концентрації кальцію, $1/\text{Ca}$, мкМ $^{-1}$; за віссю ординат – обернена величина швидкості акумуляції іонів кальцію ($1/V$, (нмоль $\text{Ca}^{2+}/\text{хв}\times\text{мг}$ білка) $^{-1}$) Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій печінки тварин різного віку (1 – молоді; 2 – дорослі; 3 – старі).

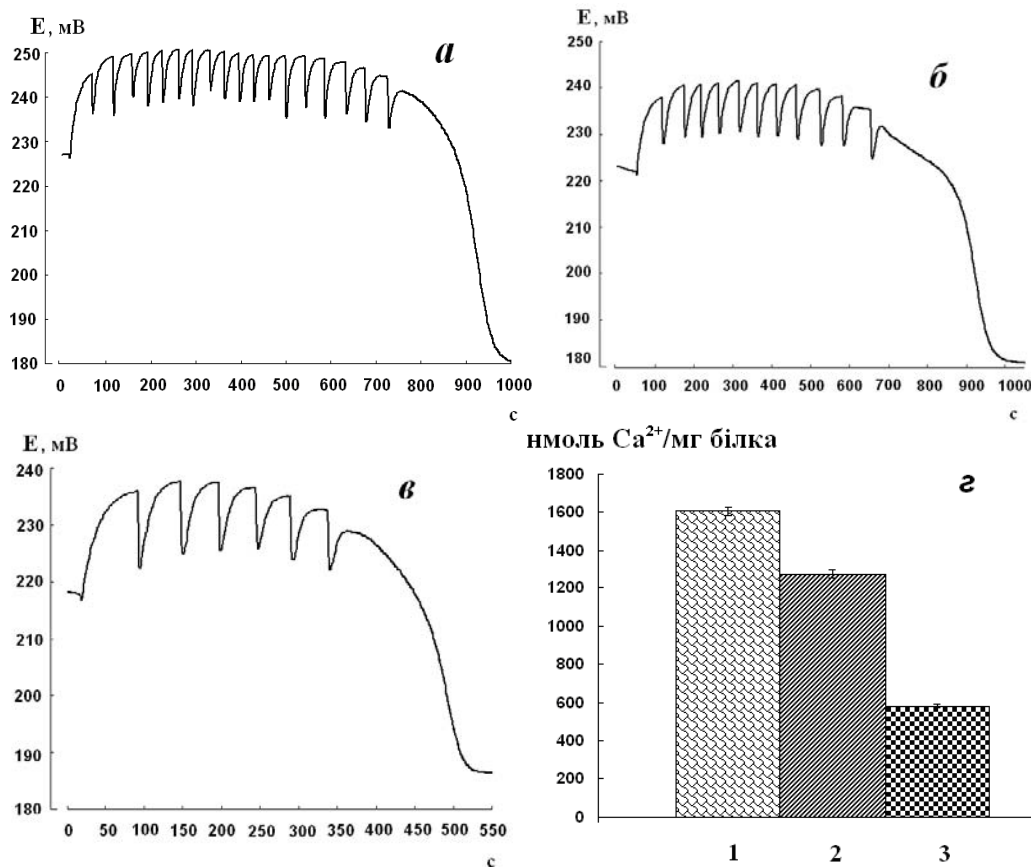


Рис. 4. Визначення кальцієвої ємності мітохондрій печінки тварин різного віку: *a*, *b*, *v* – за віссю абсцис – час реєстрації, *c*; за віссю ординат – потенціал Ca^{2+} -селективного електрода (E , мВ) під час внесення у суспензію мітохондрій кальцію (10 нмоль/мл); *a* – молоді тварини; *b* – дорослі тварини; *v* – старі тварини; кількість піків на графіку (*a*, *b*, *v*) відображає кількість порцій доданого кальцію (10 нмоль/мл), які акумульовано суспензією мітохондрій до моменту швидкого виходу кальцію з цих органел; *z* – за віссю ординат кальцієва ємність мітохондрій печінки молодих (1), дорослих (2) і старих тварин (3), нмоль Ca^{2+} /мг білка.

Встановлено, що зі збільшенням віку тварин суттєво змінюється також кальцієва ємність мітохондрій печінки. Зокрема, показано, що мітохондрії печінки молодих тварин здатні більш активно поглинати й утримувати кальцій, порівняно із мітохондріями печінки дорослих і старих тварин. Так, за умови внесення до суспензії мітохондрій печінки молодих тварин Ca^{2+} аліквотами по 10 нмоль/мл кальцієва ємність цих органел становила $1604,67 \pm 22,6$ нмоль Ca^{2+} /мг білка. Дещо нижчою виявилася кальцієва ємність мітохондрій печінки дорослих тварин, яка становила $1271,00 \pm 21,0$ нмоль Ca^{2+} /мг білка. Разом з тим визначена нами кальцієва ємність мітохондрій печінки старих тварин була суттєво нижчою, ніж у попередньо охарактеризованих групах тварин і становила $581,67 \pm 10,4$ нмоль Ca^{2+} /мг білка (рис. 4). Отримані результати свідчать

про пригнічення кальційакумулювальної функції мітохондрій печінки старих тварин. На користь цього свідчать також результати досліджень інших авторів. Зокрема, показано, що старіння тварин супроводжується зменшенням кальцієвої ємності мітохондрій гладеньких м'язів [6] та нервової тканини [10]. Крім того, у мітохондріях старих тварин акумуляція Ca^{2+} досить швидко призводить до переходу цих органел у стан високої неспецифічної проникності [4], що може бути однією із причин зниження їхньої кальцієвої ємності у цих тварин.

Таким чином, показано, що кінетичні параметри Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій печінки суттєво змінюються з віком тварин. Так, максимальна швидкість (V_{\max}) Ca^{2+} -уніпорту у мітохондріях печінки суттєво знижується з віком тварин і є найменшою у печінці старих тварин. Разом з тим константа Міхаеліса (K_m) Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій печінки молодих тварин є суттєво вищою порівняно із дорослими і старими тваринами, що свідчить про низьку спорідненість Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій молодих тварин до Ca^{2+} . З віком тварин суттєво знижується також кальцієва ємність мітохондрій печінки. Отримані результати свідчать про пригнічення кальційакумулювальної функції мітохондрій у печінці під час старіння тварин.

1. Дубицький Л. О., Вовканич Л. С. Вплив катіонів перехідних металів на дихання і продукування H^+ мітохондріями печінки // Укр. біохім. журн. 1996. Т. 68. № 5. С. 59–63.
2. Дубицький Л. О., Вовканич Л. С. Кінетичні властивості H^+ -стимульованого виходу Ca^{2+} з мітохондрій печінки // Експерим. та клін. фізіол. та мед. 2001. № 3. С. 12–17.
3. Barja G. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 225–238.
4. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition // Physiol. Rev. 1999. Vol. 79. N 4. P. 1127–1155.
5. Chance B., Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. Kinetics of oxygen utilization // J. Biol. Chem. 1955. Vol. 217. P. 383–393.
6. Lopes G. S., Ferreira A. T., Etsuko Oshiro M. et al. Aging-related changes of intracellular Ca^{2+} stores and contractile response of intestinal smooth muscle // Experimental Gerontology. 2006. Vol. 41. P. 55–62.
7. Lopes G. S., Mora O., Cerri P. et al. Mitochondrial alterations and apoptosis in smooth muscle from aged rats // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1658. N 3. P. 187–194.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. H., Farr A. L. et al. Protein measurements with the Folin protein reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. N 2. P. 265–275.
9. Sastre J., Pallardo F. V., Pla R. et al. Aging Of The Liver: Age-Associated Mitochondrial Damage Inintact Hepatocytes // Hepatology. 1996. Vol. 24. N. 5. P. 1199–1205.
10. Satrustegui J., Villalba M., Pereira R. et al. Cytosolic and mitochondrial calcium in synaptosomes during aging // Life Sci. 1996. Vol. 59. N 5–6. P. 429–434.
11. Smaili S. S., Hsu Y. T., Carvalho A. C. et al. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling // Braz. J. Med. Biol. Res. 2003. Vol. 36. N 2. P. 183–190.

**DEPENDENCE OF Ca^{2+} -ACUMULATION FUNCTION
OF LIVER MITOCHONDRIA FROM ANIMALS AGE****L. Dubitsky, N. Nalyvayko, J. Kravenska***Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: l_dubitsky@franko.lviv.ua*

The calcium capacity and kinetic properties of Ca^{2+} -uniporter of different ages rat liver mitochondria has been studied. The maximal velocity (V_{max}) of Ca^{2+} uniport to the liver mitochondrial matrix decreases with aging essentially and for young (6 weeks), adult (10 months) and old animals (20–22 months) amounts to 285.71, 169.49 and 86.96 nmol Ca^{2+} /min×mg of protein. Michaelice constant of mitochondrial Ca^{2+} -uniporter (K_m) for adult and old animals is not differ essentially (19,86-22,77 mM), but for young animals it is greatly superior to other (31,71 mM). This fact is the evidence of low affinity of the young animals' mitochondrial Ca^{2+} -uniporter to Ca^{2+} . The calcium capacity of liver mitochondria decreases essentially with aging too. Obtained results are the evidence of liver mitochondria capability for Ca^{2+} -accumulation reduction with aging.

Key words: mitochondria, Ca^{2+} -uniporter, calcium capacity.

Стаття надійшла до редколегії 07.11.07

Прийнята до друку 21.01.08