

ВЛИЯНИЕ Na^+ НА НАГРУЖЕННЫЕ КАЛЬЦИЕМ МИТОХОНДРИИ СЕРДЦА КРЫСЫ И МИОКАРД ЛЯГУШКИ

© 2021 г. С. М. Коротков^{1,*}, К. В. Соболев¹, И. В. Шемарова¹, В. П. Нестеров¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: korotkov@SK1645.spb.edu

Поступила в редакцию 28.06.2021 г.

После доработки 29.07.2021 г.

Принята к публикации 06.08.2021 г.

Проведено сравнительное исследование влияния кальциевой нагрузки на митохондрии сердца крысы (МСК(K^+)), у которых часть ионов K^+ в их матриксе была заменена на ионы Na^+ (МСК(Na^+)). Нагрузка МСК(K^+) кальцием снижала их дыхание, разобщенное 2,4-динитрофенолом, и уменьшала потенциал внутренней мембраны ($\Delta\Psi_{\text{МИТО}}$). При этом набухание этих митохондрий увеличивалось в средах с 25 мМ К-ацетатом или 125 мМ NH_4NO_3 . Эти эффекты кальциевой нагрузки были еще больше в аналогичных опытах с МСК(Na^+). Ингибиторы митохондриальной кальций-зависимой поры (МКЗП), АДФ и циклоспорин А, полностью устраняли вышеуказанные эффекты Ca^{2+} в опытах с МСК(K^+), и лишь частично в опытах с МСК(Na^+). При увеличении внеклеточной концентрации Na^+ наблюдался положительный инотропный эффект, однако пре-инкубация в бескальциевом растворе приводила к отрицательному инотропному эффекту. Таким образом, частичная замена K^+ на Na^+ в матриксе сделала митохондрии сердца крысы более чувствительными к Ca^{2+} и увеличивала в их внутренней мембране вероятность открытия МКЗП. Вместе с увеличением цитоплазматического $[\text{Na}^+]_i$, это может увеличивать кальциевую перегрузку кардиомиоцитов, делая более вероятным их повреждение при ишемии/реперфузии.

Ключевые слова: миокард, Na^+ , Ca^{2+} , инотропное действие, митохондриальный потенциал, митохондриальная кальций-зависимая пора

Сокращения: CsA – циклоспорин А, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – внутриклеточный кальций, $[\text{Na}^+]_i$ – внутриклеточный натрий, $\Delta\Psi_{\text{МИТО}}$ – потенциал внутренней митохондриальной мембраны, ВММ – внутренняя мембрана митохондрий, ДНФ – 2,4-динитрофенол, МСК – митохондрии сердца крысы, МКЗП – митохондриальная кальций-зависимая пора

DOI: 10.31857/S0044452921060073

Концентрация Na^+ в цитоплазме кардиомиоцитов, как известно, увеличивается в результате ишемии сердечной мышцы, но при этом накопления в этих клетках Ca^{2+} не наблюдается [1, 2]. Последующая реперфузия миокарда способствует кальциевой и натриевой перегрузке кардиомиоцитов и митохондрий [2–4]. Повреждение мембран клеток и митохондрий является другим отрицательным последствием ишемии/реперфузии, наряду с уменьшением цитоплазматической концентрации АТФ в кардиомиоцитах [4–6]. Ишемия сердечной мышцы крысы приводит к снижению давления в левом желудочке, а также в результате этого снижается скорость дыхания митохондрий в состоянии 3, изолированных из этой ткани [1]. В результате ишемии/реперфузии происходит активное поступление в матрикс ионов Na^+ посредством $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ и Na^+/H^+ митохондриальных обменников [1, 3, 7, 8].

В результате ишемии/реперфузии цитоплазматическая концентрация ионов Na^+ в кардиомиоцитах, как было показано, достигает 25–35 мМ [8]. По этой причине ранее мы исследовали [9] митохондрии сердца крысы (МСК), матрикс которых был нагружен ионами Na^+ в среде, содержащей 100 мМ NaCl . В матриксе таких митохондрий концентрация Na^+ увеличивалась от 23 до 44 мМ [9]. В сравнении с контрольными органеллами без натриевой нагрузки (МСК(K^+)) у митохондрий с повышенной концентрацией Na^+ в их матриксе (МСК(Na^+)) возрастали пассивная калиевая и протонная проницаемость их внутренней мембраны (ВММ) и энергозависимое поступление K^+ в матрикс. При этом снижались скорости дыхания митохондрий, находящихся в состоянии 3 и $3\text{P}_{\text{ДНФ}}$ (разобщенные ДНФ).

Показано, что окислительный стресс и кальциевая перегрузка митохондрий делали более вероятным открытие митохондриальной кальций-зависимой поры (МКЗП) в их внутренней мембране (ВММ) что является причиной возникновения повреждений сердечной мышцы из-за ишемии/реперфузии [10–13]. В данном случае наблюдается нарушение структуры наиболее важного и сложного I митохондриального комплекса дыхательной цепи [14].

Концентрация внутриклеточного натрия ([Na⁺]_i) играет важную роль в контроле внутриклеточной концентрации кальция ([Ca²⁺]_i), поскольку [Na⁺]_i является основным регулятором Na⁺/Ca²⁺ обменника [15, 16]. Са-АТФаза саркоплазматического ретикула и Na⁺/Ca²⁺ обменник – два основных из четырех регулирующих механизмов снижения [Ca²⁺]_i в цитоплазме [16]. Na⁺/Ca²⁺ обменник – это сарколеммальный белок, который двунаправленно обменивает три иона Na⁺ на один ион Ca²⁺. Направление обмена зависит от вне- и внутриклеточных концентраций Na⁺ и Ca²⁺, а также от величины мембранного потенциала. При величине мембранного потенциала, равной величине потенциала покоя Na⁺/Ca²⁺ обменник служит преимущественно для удаления Ca²⁺ из клетки, однако, при деполяризации через Na⁺/Ca²⁺ обменник осуществляется приток Ca²⁺ клетку. Увеличение концентрации [Na⁺]_i приводит к снижению скорости вытеснения Ca²⁺ через Na⁺/Ca²⁺ обменник и оказывает положительный инотропный эффект [17, 18]. Однако такое увеличение [Ca²⁺]_i посредством увеличения концентрации [Na⁺]_i может приводить к нарушению ритма сердца и особенно опасно для сердца в условиях ишемии/реперфузии [17–19]. В данной работе мы стимулировали рост [Na⁺]_i методом увеличения внеклеточной концентрации натрия в растворе Рингера и изучали эффекты повышенной концентрации Na⁺ на спонтанное сокращение препаратов предсердий лягушки. Вместе с тем можно полагать, что сопоставление данных, полученных в опытах с использованием представителей этих двух видов животных, вполне оправдано исходя из полученных ранее данных о единой структурной организации митохондрий в сократительных тканях всех типов многоклеточных животных и также в исследованных хондриомах сердца крысы и сердца лягушки *Rana ridibunda*.

Цель данной работы – исследовать эффекты натриевой перегрузки кардиомиоцитов на динамику мышечных сокращений и оценить влияние нагрузки митохондрий сердца крысы ионами Na⁺ и Ca²⁺ на потенциал внутренней мембраны, дыхание митохондрий в состояниях 4 и 3Р_{днф}, на набухание

этих органелл, а также на индукцию в их внутренней мембране кальций-зависимой поры (МКЗП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе использовали самцов породы Вистар весом 200–250 г. Животные содержали при 20–23°C с 12-часовым циклом свет/темнота со свободным доступом к питьевой воде и к стандартной диете для крыс. В работе также использовали самцов лягушек *Rana ridibunda* весом 140–160 г. Животные содержались при 8–10°C с 12-часовым циклом свет/темнота в ванне с небольшим количеством воды.

Выделение митохондрий. Митохондрии сердца крысы (МСК(K⁺)) выделяли согласно методике, разработанной нами ранее [20]. Концентрация (мМ) ионов K⁺ и Na⁺ в матриксе этих митохондрий была соответственно 128 ± 11 и 23 ± 2 [9]. Нагрузку матрикса МСК ионами натрия проводили в растворе, содержащем 5 мМ Трис-НСl (рН 8.60) и 110 мМ NaCl, согласно детально описанной нами ранее процедуре [9]. Концентрация (мМ) ионов K⁺ и Na⁺ в матриксе нагруженных Na⁺ митохондрий сердца крысы (МСК(Na⁺)) оказалась соответственно равна 101 ± 4 и 44 ± 2 [9]. Концентрацию белка в митохондриальных препаратах оценивали методом Бредфорда. Она оказалась около 25–30 мг/мл.

Измерение скоростей поглощения кислорода в препаратах изолированных из сердца крысы митохондрий. Данные скорости (натовов О/мин мг белка) тестировали при 26°C в ячейке объемом 1.5 мл на полярографе LP-7 (ЧССР) методом полярографии с применением закрытого платинового электрода Кларка. Оценивали дыхание энергизованных смесью глутамата и малата митохондрий, находящихся в состояниях 4₀ и 3Р_{днф} (разобщенном 2,4-динитрофенолом) [21]. Митохондрии (1 мг белка в 1 мл) инъецировали в среду, содержащую (мМ): 20 MOPS (рН 7.3), 125 KCl, 10 глутамат, 3 КН₂Р₀₄, 2 малат и 0.05 EGTA. Остальные добавки указаны в подписи к рис. 1.

Оценка набухания митохондрий спектрофотометрическим методом. Увеличение объема митохондриального матрикса (набухание митохондрий) исследовали с использованием спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, РФ) при температуре 20°C по снижению оптической плотности митохондриальной суспензии из-за уменьшения светорассеяния при длине волны 540 нм. Органеллы (1 мг белка в 1 мл) вносили в среду, содержащую (мМ): 5 Трис-НСl (рН 7.3) и 125 NH₄NO₃ или 100 сахарозы, 25 К-ацетата и 10 трис-НСl (рН 7.3). Во всех средах присутствовал олигомицин (4 мкг/мл). Остальные добавки указаны в подписях к рис. 2 и 3.

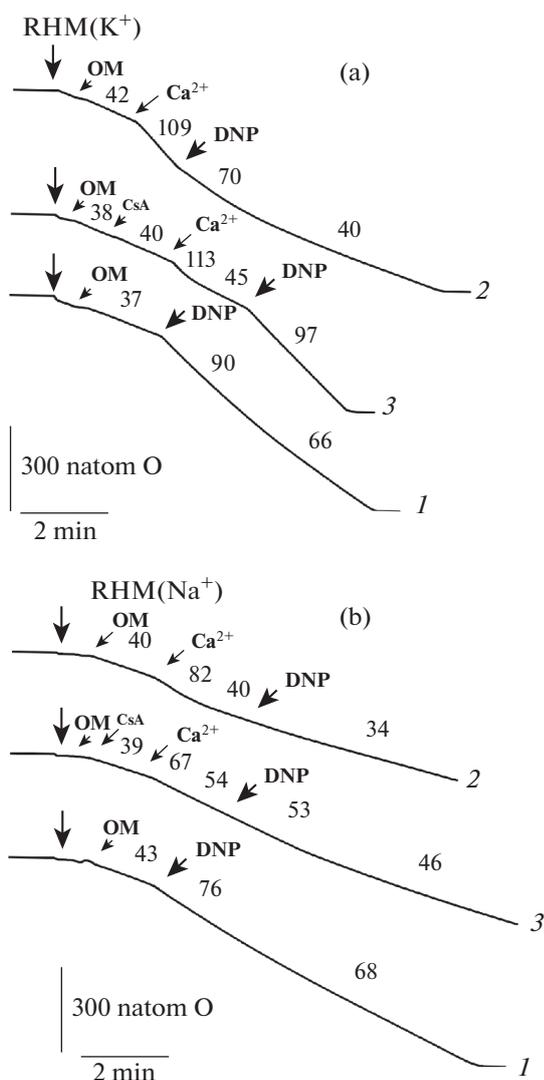


Рис. 1. Влияние Ca^{2+} на скорость поглощения кислорода энергизованными глутаматом и малатом митохондриями сердца крысы. Митохондрии (1 мг/мл) были внесены в среду, содержащую 125 мМ KCl, 20 мМ трис-МОПС (pH 7.3), 3 мМ трис- PO_4 , 10 мМ глутамат и 2 мМ малат. Числами над кривыми показаны скорости поглощения кислорода (натом O/мин на 1 мг белка). Вертикальными стрелками показаны добавки митохондрий: а – ($\text{RHM}(\text{K}^+)$), б – ($\text{RHM}(\text{Na}^+)$). Наклонными стрелками обозначено внесение в среду 150 мкМ Ca^{2+} (Ca^{2+}), 1 мкМ CsA (CsA), 4 мкг/мл олигомицина (ОМ) и 30 мкМ 2,4-динитрофенола (DNP). Цифрами справа от кривых показано: 1 – без добавок, 2 – Ca^{2+} , 3 – ОМ + Ca^{2+} + CsA.

Оценка потенциала внутренней мембраны митохондрий. Трансмембранный потенциал ($\Delta\Psi_{\text{мито}}$) тестировали при 20°C стандартным методом [20] с использованием спектрофлуориметра Shimadzu RF-1501 (Shimadzu, Япония). Измеряли изменение интенсивности флуоресценции сафранина О. Длина волны возбуждающего света была 485 нм, а длина эмиссионной волны равнялась 590 нм. Мито-

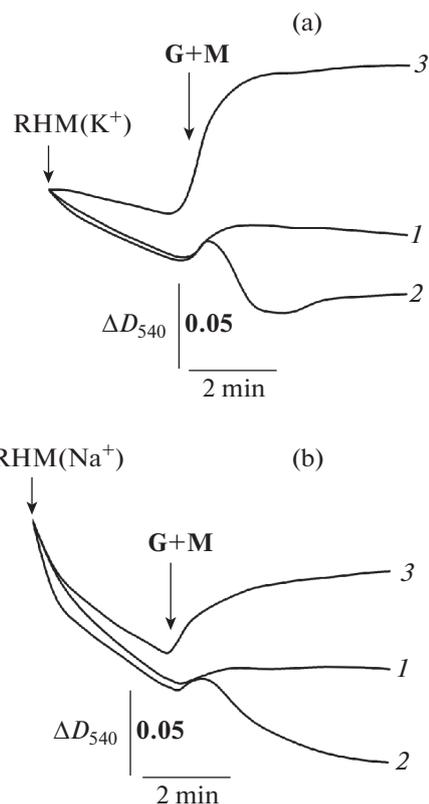


Рис. 2. Влияние Ca^{2+} на набухание (ΔD_{540}) митохондрий сердца крысы в среде с NH_4NO_3 . Митохондрии (1 мг/мл) добавляли в среду, содержащую 125 мМ NH_4NO_3 , 5 мМ трис-НСl и 1 мкг/мл олигомицина, а также (где указано) 100 мкМ Ca^{2+} (Ca^{2+}), 2 мкМ CsA (CsA), 500 мкМ АDР (ADP). Цифрами справа от кривых показана добавка до митохондрий: 1 – без добавок, 2 – Ca^{2+} , 3 – Ca^{2+} + CsA + ADP. Стрелками показаны добавки митохондрий: а – ($\text{RHM}(\text{K}^+)$), б – ($\text{RHM}(\text{Na}^+)$), а также 10 мМ глутамат с 2 мМ малатом (G + M).

хондрии (0.5 мг белка в 1 мл) вносили в среду, содержащую (мМ): 10 трис-НСl (pH 7.3), 125 KCl, 50 сахарозы, 3 MgCl_2 и 3 трис- PO_4 , а также 3 мкМ сафранин и 1 мкг/мл олигомицина. Другие добавки приведены в подписях к рис. 4.

Регистрация и анализ параметров сокращения. Для изучения инотропного эффекта натрия использовали спонтанно-сокращающиеся препараты предсердий лягушки *Rana ridibunda*. Подробное описание методики было представлено ранее [22]. Препараты помещали вертикально в ячейку из оргстекла и с помощью стальных крючков растягивали до оптимальной длины для получения максимальных спонтанных сокращений. Все эксперименты проводили в изометрическом режиме и при температуре 8°C. С одной стороны препарат крепили к неподвижному платиновому крючку, с другой стороны к тензометрическому датчику для измерения силы сокращений. Сигнал с тензодатчика подавался на компьютер, где обрабатывался с по-

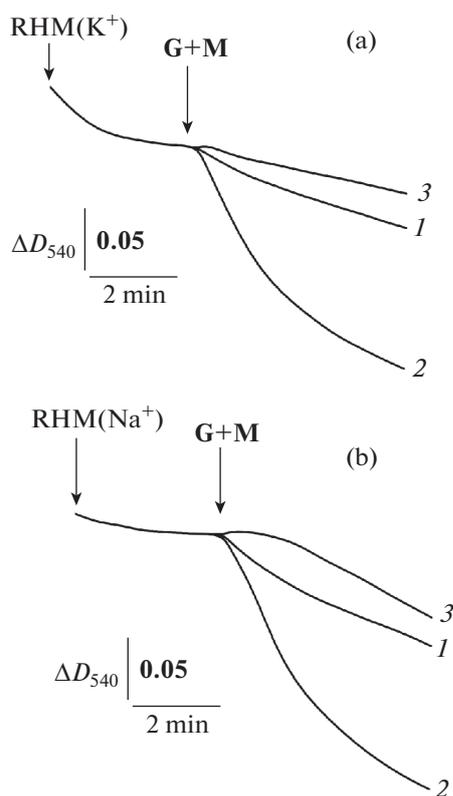


Рис. 3. Влияние Ca^{2+} на набухание (ΔD_{540}) митохондрий сердца крысы в среде с К-ацетатом и сахарозой. Митохондрии (1 мг/мл) добавляли в среду, содержащую 25 мМ К-ацетат, 100 мМ сахарозу, 10 мМ трис-ацетат и 1 мкг/мл олигомицина. Добавки и обозначения как на рис. 2.

мощью программы WinPulse. Силу сокращения выражали в Ньютонах (Н). В экспериментах использовали раствор Рингера, содержащий (мМ): 2.5 KCl, 110 NaCl, 2.5 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 0.5 NaHCO_3 , 0.75 NaN_2PO_4 и 5 глюкозы (pH 7.4). Повышенную концентрацию натрия получали добавлением соответствующего количества NaCl в раствор Рингера.

Схема экспериментов была следующей: предсердия инкубировались в растворе с повышенной концентрацией Na^+ (140 мМ), затем из раствора убирали Ca^{2+} , а затем снова добавляли. Время инкубации в каждом из растворов составляло 3–4 мин.

Применяли стандартные способы статистической обработки результатов с использованием критерия Стьюдента в статистической программе Microsoft Origin 6.0. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. На всех рисунках представлены стандартные результаты из трех независимых экспериментов.

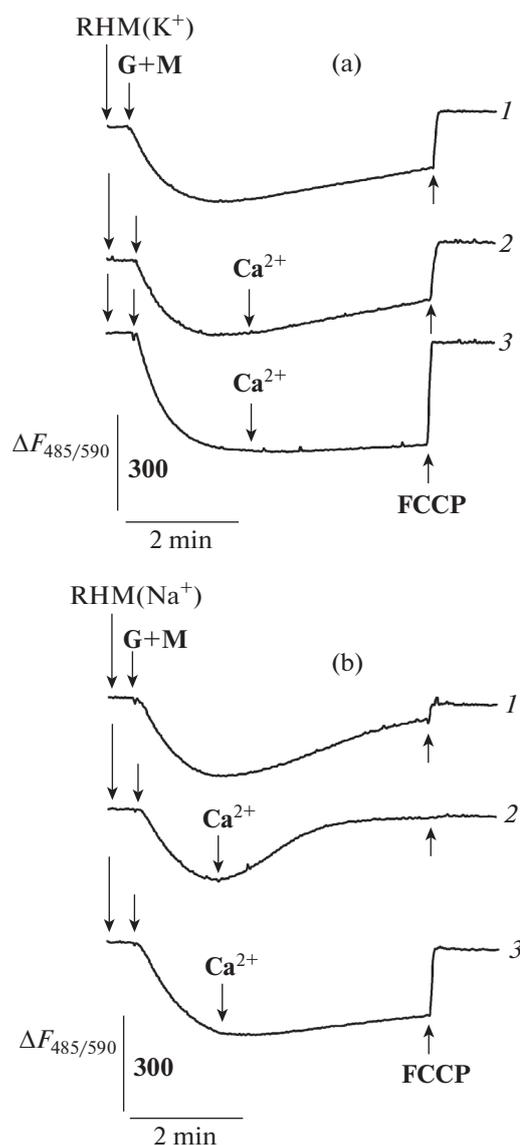


Рис. 4. Влияние Ca^{2+} на изменение потенциала ($\Delta\Psi_{\text{мито}}$) внутренней мембраны энергизованных глутаматом и малатом митохондрий сердца крысы. Митохондрии (0.5 мг/мл) вносили в среду, содержащую 125 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, 3 мМ MgCl_2 , 3 мМ трис- PO_4 , 3 мкМ сафранин О и 1 мкг/мл олигомицина, а также (где указано) 1 мкМ CsA (CsA) и 500 мкМ ADP (ADP). Стрелками показаны добавки митохондрий: а – ($\text{RHM}(\text{K}^+)$), б – $\text{RHM}(\text{Na}^+)$, а также 10 мМ глутамат с 2 мМ малатом (G + M), 60 мкМ Ca^{2+} (Ca^{2+}) и 1 мкМ FCCP (FCCP). Цифрами справа от кривых показаны опыты: 1 – без добавок, 2 – Ca^{2+} , 3 – Ca^{2+} + CsA + ADP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние кальция на митохондрии сердца крысы, нагруженные Na^+ . Мы обнаружили ранее, что перегрузка МСК(K^+) ионами Ca^{2+} индуцировала открытие поры во ВММ митохондрий сердца крысы, что проявлялось в снижении их дыхания в состоянии $3P_{\text{ДФ}}$ (рис. 1а, кривые 1 и 2) [23]. После внесе-

ния Ca^{2+} в среду наблюдалось уменьшение дыхания энергизованных глутаматом и малатом $\text{MCK}(\text{Na}^+)$, находящихся в состоянии $3\text{P}_{\text{днф}}$ (рис. 1b, кривые 1 и 2). Такое уменьшение данного дыхания было больше по сравнению с аналогичным снижением дыхания в опытах с контрольными митохондриями ($\text{MCK}(\text{K}^+)$) (рис. 1a, кривые 1 и 2). Эксперименты с ингибитором МКЗП циклоспорином А (CsA) показали, что индуцированное кальцием снижение дыхания в состоянии $3\text{P}_{\text{днф}}$ полностью исчезало в контроле (рис. 1a, кривая 3) и дыхание этих митохондрий показало значения, найденные в бескальциевых опытах (рис. 1a, кривая 1). В подобных опытах с $\text{MCK}(\text{Na}^+)$ воздействие CsA было явно слабее (рис. 1b, кривая 3) и дыхание этих митохондрий в состоянии $3\text{P}_{\text{днф}}$ практически не изменилось в сравнении с опытами с Ca^{2+} без CsA (рис. 1b, кривая 2). Поскольку снижение дыхания в состоянии $3\text{P}_{\text{днф}}$ не обязательно является результатом открытия кальций-зависимой поры во ВММ, а может быть связано с увеличением митохондриального объема [23, 24], поэтому мы изучали набухание митохондрий, $\text{MCK}(\text{Na}^+)$ и $\text{MCK}(\text{K}^+)$, в средах с NH_4NO_3 или с К-ацетатом и сахарозой.

Набухание неэнергизованных митохондрий в среде, содержащей NH_4NO_3 , дает возможность изучить пассивную проницаемость ВММ для H^+ , поскольку эта мембрана имеет высокую проницаемость для анионов NO_3^- и молекул аммиака (NH_3), образующихся при диссоциации катионов аммония (NH_4^+) на NH_3 и протоны [25]. В этом случае набухание органелл зависит только от поступления H^+ в матрикс. На рис. 2a (кривые 1 и 2) можно увидеть, что независимо от присутствия кальция, деэнергизованные $\text{MCK}(\text{K}^+)$ слабее набухали в этой среде в сравнении с аналогичными результатами, найденными в опытах с $\text{MCK}(\text{Na}^+)$ (рис. 2b, кривые 1 и 2). Возможно, большая пассивная протонная проницаемость ВММ, найденная нами ранее в опытах с $\text{MCK}(\text{Na}^+)$ [9], является причиной такого результата, что позволяет предположить отсутствие влияния ионов Ca^{2+} на эту проницаемость. Можно увидеть (рис. 2a и 2b, кривая 1), что митохондрии активно сжимались после внесения в среду глутамата и малата по причине откачки ионов аммония (NH_4^+) из матрикса в результате работы K^+/H^+ обменника [25, 26]. Обнаруженное здесь (рис. 2a, кривая 2) массивное набухание нагруженных кальцием $\text{MCK}(\text{K}^+)$ обусловлено появлением во внутренней мембране МКЗП [23]. При наличии в этой среде ингибиторов МКЗП (АДФ и CsA) набухание этих митохондрий сменилось их заметным сжатием (рис. 2a, кривая 3). С другой стороны, такого результата не удалось достичь в аналогичных опытах с $\text{MCK}(\text{Na}^+)$ (рис. 2b, кри-

вая 3). Кальциевая нагрузка этих митохондрий стимулировала большее их набухание после внесения субстратов, а влияние АДФ и CsA было слабее (рис. 2b, кривая 3).

Изучение набухания энергизованных митохондрий в 160 мОсм среде с CH_3COOK и сахарозой дает возможность оценить электрофоретический транспорт K^+ в матрикс энергизованных митохондрий [20, 26]. В этом случае ионы K^+ накапливаются в матриксе электрофоретически при помощи K^+ -унипортера митохондрий. Анион ацетата во внешней среде находится в равновесии со свободно проникающими через ВММ молекулами CH_3COOH , которые, проникнув в митохондрии, снова диссоциируют на CH_3COO^- и протоны, которые далее удаляются из матрикса протонными помпами электрон-транспортной цепи энергизованных митохондрий [27]. В конечном итоге происходит накопление в матриксе ацетата калия и идущей за ним воды, что влечет за собой набухание митохондрий (рис. 3a и 3b, кривая 1). В сравнении с $\text{MCK}(\text{K}^+)$, набухание $\text{MCK}(\text{Na}^+)$ было больше после внесения субстратов в калий ацетатную среду с Ca^{2+} (рис. 3a и 3b, кривая 2). Независимо от наличия кальция в калий ацетатной среде, набухание $\text{MCK}(\text{Na}^+)$ оказывалось всегда больше аналогичного набухания $\text{MCK}(\text{K}^+)$.

Индуцированное кальцием набухание энергизованных митохондрий (рис. 3a и 3b, кривая 3) заметно снижалось в среде с АДФ и CsA, и стало сопоставимо с результатами опытов без кальция (рис. 3a и 3b, кривая 1). Однако данные ингибиторы действовали слабее в экспериментах с $\text{MCK}(\text{Na}^+)$.

Как известно, снижение флуоресценции сафранина О в митохондриальной суспензии свидетельствует о возникновении электрохимического потенциала ($\Delta\Psi_{\text{мито}}$) внутренней мембраны [28]. В этом случае на ее матриксной стороне возникает отрицательный заряд являющейся движущей силой при движении сафранина О в митохондрии. В опытах без Ca^{2+} и ингибиторов потенциал внутренней мембраны $\text{MCK}(\text{K}^+)$ после добавки глутамата и малата снижался медленнее (рис. 4a, кривая 1), чем в аналогичных опытах с $\text{MCK}(\text{Na}^+)$ (рис. 4b, кривая 1). После добавки Ca^{2+} в среду наблюдалось ошутимое снижение $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ в опытах с $\text{MCK}(\text{Na}^+)$ (рис. 4b, кривая 2), однако этот эффект был не так выражен в аналогичных опытах с $\text{MCK}(\text{K}^+)$ (рис. 4a, кривая 2) и был сопоставим со снижением потенциала, найденным в опытах без кальция (рис. 4a, кривая 1). Индуцированное кальцием открытие поры во ВММ приводит к снижению $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ и выходу сафранина О из митохондрий в инкубационную среду, что регистрируется как увеличение флуоресценции этого красителя [23, 29, 30]. Индуцированное кальцием уменьшение $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ в опытах

с МСК(K^+) было ингибировано в присутствии АДФ и CsA (рис. 4а, кривая 3), однако эффект последних был заметно слабее в аналогичных экспериментах с МСК(Na^+) (рис. 4б, кривая 3).

Существует точка зрения [12], что в цитоплазме миоцитов существует некий микродомен, натриевое пространство с нечеткими границами (Na^+ “Fuzzy Space”), тесно примыкающий к саркоплазматическому ретикулуму. Регулирование концентрации Na^+ в этом пространстве обеспечивается за счет Na^+ - Ca^{2+} обменника и Na^+ канала сарколеммы, а также активностью Na^+ помпы (Na^+/K^+ -АТФазы). Увеличение поступления Na^+ в цитоплазму миоцитов связывают с открытием Na^+ канала в плазмолемме [12]. Приток ионов Na^+ в это пространство вследствие ишемии может способствовать поступлению Ca^{2+} в цитоплазму по механизму $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, что усиливает кальциевую перегрузку миоцитов [12]. Другими причинами Na^+ и Ca^{2+} перегрузки миоцитов во время ишемии/реперфузии могут быть приток Na^+ в миоплазму через Na^+/H^+ обменник, а также нарушение функции Na^+/K^+ -АТФазы из-за истощения АДФ и увеличение притока Na^+ через гемиканалы коннексина [12]. Как известно, результатом ишемии является увеличение концентрации Na^+ , H^+ и Ca^{2+} в матриксе митохондрий с одновременным увеличением ионной проницаемости внутренней мембраны [4].

При последующей реперфузии концентрация H^+ в плазмолемме снижается, а концентрация Ca^{2+} еще больше возрастает, и в частности за счет $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ обменника, который транспортирует ионы Na^+ в цитоплазму с последующим их удалением из цитоплазмы кардиомиоцитов Na^+/K^+ -АТФазой [4]. Ранее было обнаружено, что концентрация Ca^{2+} в матриксе митохондрий $[\text{Ca}^{2+}]_m$ сапонин пермеабилizованных кардиомиоцитов дозозависимо уменьшалась при FCCP-индуцированном снижении $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ и достигала 50% от исходного уровня при полном обнулении потенциала в условиях полного ингибирования Ca^{2+} унипортера [31]. Снижение $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ при условии эксперимента $[\text{Ca}^{2+}]_m < [\text{Ca}^{2+}]_c$ стимулировало открытие МКЗП и вход ионов Ca^{2+} в матрикс деэнергизованных митохондрий. Однако в присутствии CsA (ингибитора МКЗП) происходило уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_m$, что связывали с удалением Ca^{2+} из матрикса посредством $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена. При этом ингибирование этого обменника в безнатриевом растворе устраняло этот эффект, и в матриксе сохранялась высокая концентрация Ca^{2+} [31, 32]. Поскольку наша среда не содержала Na^+ , то в этом случае $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник был не активен и концентрация Ca^{2+} в мат-

риксе МСК(Na^+) не могла снижаться в опытах с CsA.

Поглощение митохондриями кальция в основном катализируется расположенным во внутренней мембране кальциевым унипортером, тогда как удаление ионов Ca^{2+} из матрикса возбудимых тканей осуществляется в основном за счет митохондриального $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ обменника [13, 31, 33]. При наличии кальция запускается катализируемый циклофилином D процесс структурной перестройки белков, ответственных за открытие МКЗП во внутренней мембране [4]. Этот процесс ингибируется селективным ингибитором этой поры циклоспорином А (CsA) уже в наномолярных концентрациях. При умеренной кальциевой нагрузке органелл МКЗП открывается в низко-проводящем состоянии и ВММ становится проницаемой для небольших неорганических катионов, и в том числе для Ca^{2+} [35]. В связи с этим ряд исследователей предположили, что открытие такой поры, возможно, является еще одним путем удаления кальция из энергизованных митохондрий [11, 13]. С другой стороны, открытие МКЗП при патофизиологических условиях может служить в качестве пути транспорта Ca^{2+} в митохондрии [11, 13, 33].

Ранее показали, что скорости дыхания энергизованных NAD-зависимыми субстратами митохондрий в состоянии 3 заметно снижались при уменьшении концентрации ионов K^+ в их матриксе [36]. При этом было обнаружено [9, 36, 37] (рис. 1а, 1б, кривые 1), что в результате нагрузки ионами Na^+ митохондрий печени и сердца крысы их дыхание в состоянии 3Р_{днф} снижалось в сравнении с дыханием контрольных органелл (без Na^+ нагрузки). Одной из причин такого снижения дыхания может быть уменьшение транспорта электронов в НАДН-убихиноновом участке дыхательной цепи [38]. Индуцированное кальцием снижение дыхания митохондрий в состоянии 3РДНФ (рис. 1а и 1б, кривые 2) и в этом случае было более заметно в опытах с МСК(Na^+). Возможно, такой результат может быть связан с тем, что Na^+ увеличивал выход Mg^{2+} и адениновых нуклеотидов из матрикса нагруженных кальцием митохондрий [39].

Влияние избыточной концентрации натрия на амплитуду спонтанных сокращений предсердий лягушки. В наших экспериментах увеличение внеклеточной концентрации Na^+ на 30 мМ приводило к положительному инотропному эффекту (сокращения 4 и 5 на рис. 5с). Амплитуда спонтанных сокращений увеличивалась на $22 \pm 2\%$ ($n = 3, p < 0.05$).

Причем время нарастания напряжения и время полурелаксации одиночного сокращения практически не изменялись при увеличении внеклеточного натрия. Однако инкубация предсердий в бескальциевом растворе при повышенной концентрации натрия приводила к отрицательному

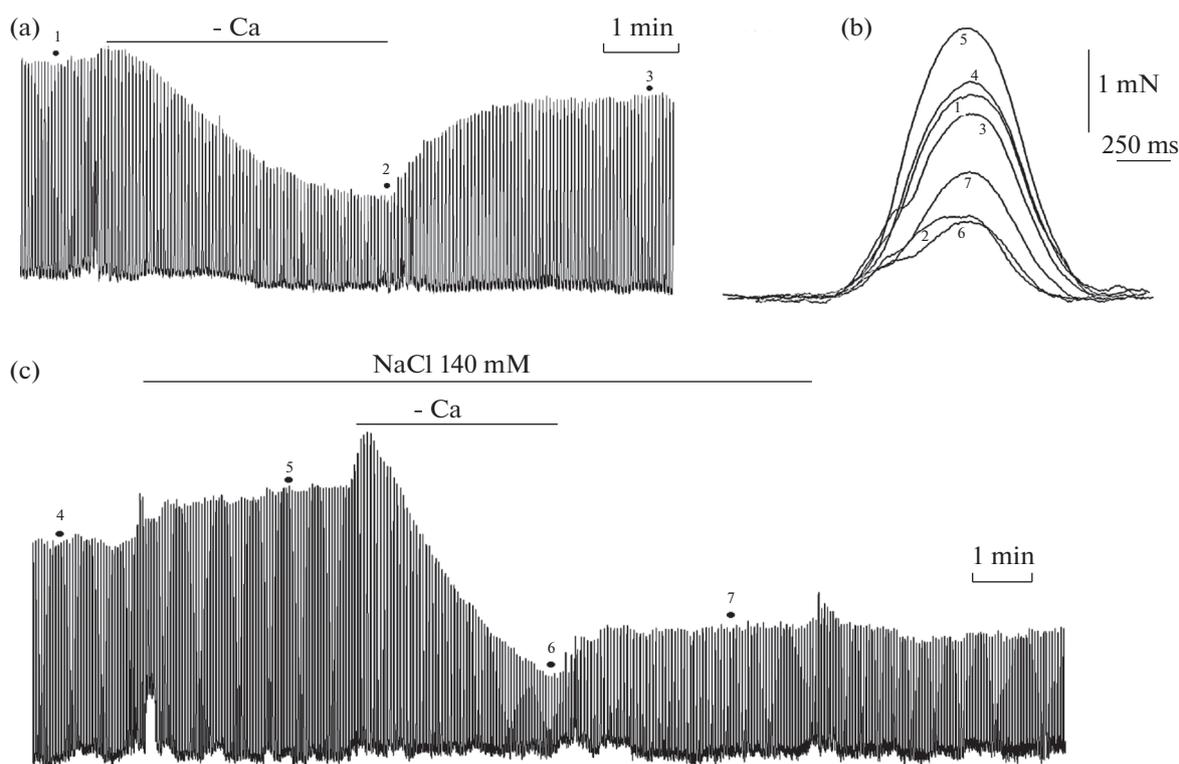


Рис. 5. Влияние ионов Na^+ и Ca^{2+} на спонтанные мышечные сокращения сегмента предсердий сердца лягушки. Регистрация спонтанных сокращений в бескальциевых растворах (а) и при аппликации в растворе с высокой концентрацией натрия — 140 мМ NaCl (с) показана горизонтальной линией над миограммами. б — показаны одиночные сокращения, отмеченные черными кружками с цифрами на записях а и с, при другой временной шкале. На панелях а и с показана непрерывная регистрация сокращений.

инотропному эффекту. Амплитуда спонтанных сокращений снижалась на $31 \pm 7\%$ ($n = 3$, $p < 0.01$) (сокращение 4 vs. 7 на рис. 5с) и полностью не восстанавливалась при нормальной концентрации кальция. При этом в бескальциевом растворе инотропный эффект натрия полностью нивелировался (сокращение 2 vs. 6 на рис. 5). Поэтому, мы можем предположить, что инотропный эффект повышенной концентрации натрия может быть обусловлен изменением $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Частота спонтанных сокращений была практически постоянной как в растворе с высокой концентрацией натрия, так и в бескальциевых растворах, что свидетельствует о том, что ионы натрия практически не влияют на пейсмекерную активность предсердий. Однако в некоторых экспериментах мы наблюдали появление аритмий при инкубации предсердий в растворе с высокой концентрацией натрия. Положительный инотропный эффект в наших экспериментах мог быть обусловлен увеличением $[\text{Na}^+]_i$, что приводит к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Однако отрицательный инотропный эффект натрия при преинкубации в бескальциевом растворе (рис. 5с) был обнаружен нами впервые и молекулярные механизмы такого снижения неизвестны. Однако нельзя ис-

ключить, что одной из причин является нарушение митохондриальных функций.

Заключение. И так, натриевая перегрузка митохондрий сердца крысы привела к увеличению чувствительности этих органелл к действию на них Ca^{2+} , что проявилось в заметном снижении дыхания этих митохондрий в состоянии $3R_{\text{ДФ}}$, уменьшении $\Delta\Psi_{\text{МИТО}}$ и увеличении их набухания в солевых средах в сравнении с такими же опытами с МСК(K^+). Более слабое действие ингибиторов МКЗП (АДФ и CsA) на кальциевые эффекты в экспериментах с МСК(Na^+) дает основание предположить, что нагрузка матрикса ионами Na^+ облегчает открытие МКЗП во внутренней мембране и делает эту пору менее чувствительной к действию ингибиторов. Наряду с увеличением $[\text{Na}^+]_i$ в цитоплазме это может приводить к усилению кальциевой перегрузки кардиомиоцитов, обуславливая, в свою очередь, еще большее их повреждение при ишемии и последующей реперфузии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.В. Брайловскую за помощь при выделении митохондрий и полярографическом измере-

нии скоростей поглощения кислорода этими органеллами, а Л.В. Емельянову за помощь при определении потенциала внутренней мембраны митохондрий сердца крысы, а также А.И. Бурдыгина за создание программы для регистрации и обработки данных по сокращению. Исследования по определению митохондриального потенциала проводили на базе Центра коллективного пользования в ИЭФБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена с использованием средств государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290142-9.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.М. Коротков осуществил планирование, сбор и обработку данных, написание и редактирование манускрипта, а также исследовал набухание митохондрий. К.В. Соболев исследовал сократительные характеристики препаратов сердечной мышцы лягушки *Rana ridibunda* и участвовал в написании соответствующих экспериментальных разделов статьи, а также совместно с В.П. Нестеровым, И.В. Шемаровой и С.М. Коротковым в обсуждении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tanonaka K., Motegi K., Arino T., Marunouchi T., Takagi N., Takeo S.* (2012) Possible pathway of Na⁺ flux into mitochondria in ischemic heart. *Biol Pharm Bull* 35: 1661–1668. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00010>
2. *Gursahani H.I., Schaefer S.* (2004) Acidification reduces mitochondrial calcium uptake in rat cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2659–H2665. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00344.2004>
3. *Iwai T., Tanonaka K., Inoue R., Kasahara S., Motegi K., Nagaya S., Takeo S.* (2002) Sodium accumulation during ischemia induces mitochondrial damage in perfused rat hearts. *Cardiovasc Res* 55: 141–149. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00282-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00282-1)
4. *Saris N.E., Eriksson K.O.* (1995) Mitochondrial dysfunction in ischaemia-reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 107: 171–176. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1995.tb04353.x>
5. *Costa A.D., Quinlan C.L., Andrukhiy A., West I.C., Jaburek M., Garlid K.D.* (2006) The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H406–H415. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00794.2005>
6. *Dos Santos P., Laclau M.N., Boudina S., Garlid K.D.* (2004) Alterations of the bioenergetics systems of the cell in acute and chronic myocardial ischemia. *Mol Cell Biochem* 256–257: 157–166. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009866.75225.e2>
7. *Tani M., Neely J.R.* (1989) Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts Possible involvement of H⁺–Na⁺ and Na⁺–Ca²⁺ exchange. *Circ Res* 65: 1045–1056. <https://doi.org/10.1161/01.res.65.4.1045>
8. *Iwai T., Tanonaka K., Inoue R., Kasahara S., Kamo N., Takeo S.* (2002) Mitochondrial damage during ischemia determines post-ischemic contractile dysfunction in perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 34: 725–738. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2002>
9. *Korotkov S.M., Nesterov V.P., Demina I.N.* (2009) Effect of sodium load of the matrix on properties of isolated rat heart mitochondria. *Dokl Biochem Biophys* 424: 56–60. <https://doi.org/10.1134/s1607672909010165>
10. *Halestrap A.P., Richardson A.P.* (2015) The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 78: 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.08.018>
11. *Bernardi P.* (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127–1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1127>
12. *Barry W.H.* (2006) Na “Fuzzy space”: does it exist, and is it important in ischemic injury? *J Cardiovasc Electrophysiol* 17: S43–S46. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2005.00396.x>
13. *Wei A.C., Liu T., Cortassa S., Winslow R.L., O'Rourke B.* (2011) Mitochondrial Ca²⁺ influx and efflux rates in guinea pig cardiac mitochondria: low and high affinity effects of cyclosporine. *A Biochim Biophys Acta* 1813: 1373–1381. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.02.012>
14. *Perry C.N., Huang C., Liu W., Magee N., Carreira R.S., Gottlieb R.A.* (2011) Xenotransplantation of mitochondrial electron transfer enzyme, Ndi1, in myocardial reperfusion injury. *PLoS One* 6: 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016288>
15. *Pieske B., Houser S.R.* (2003) Na⁺ handling in the failing human heart. *Cardiovasc Res* 57: 874–886. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00841-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00841-6)
16. *Bers D.M., Despa S.* (2006) Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci* 100: 315–322. <https://doi.org/10.1254/jphs.cpj06001x>
17. *Flesch M., Erdmann E.* (2002) Na channel activators as positive inotropic agents for the treatment of chronic heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 15: 379–386. <https://doi.org/10.1023/a:1013329203750>
18. *Coppini R., Ferrantini C., Mugelli A., Poggesi C., Cerbai E.* (2018) Altered Ca²⁺ and Na⁺ Homeostasis in Human Hypertrophic Cardiomyopathy: Implications for Arrhythmogenesis. *Front Physiol* 16: 1391. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01391>
19. *Goldhaber J.I., Philipson K.D.* (2013) Cardiac Sodium-Calcium Exchange and Efficient Excitation-Contraction Coupling: Implications for Heart Disease. *Adv Exp Med*

- Biol 961: 355–364.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4756-6_30
20. *Коротков С.М., Соболев К.В., Шемарова И.В., Фуряев В.В., Новожиллов А.В., Нестеров В.П.* (2018) Действие Nd^{3+} на кальций-зависимые процессы в изолированных митохондриях сердца крысы и сердечной мышце лягушки. Биол мембраны 35: 200–207. [*Korotkov S.M., Sobol K.V., Shemarova I.V., Furaev V.V., Novozhilov A.V., Nesterov V.P.* (2019) Effects of Nd^{3+} on calcium-dependent processes in isolated rat heart mitochondria and frog heart muscle *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 13: 161–167.]
<https://doi.org/10.7868/S0233475518030040>
 21. *Панов А.В.* (2015) Практическая митохондриология Новосибирск. [*Panov A.V.* (2015) *Practical mitochondrialology Novosibirsk (In Russ)*].
<https://doi.org/10.13140/2.1.1599.3127>
 22. *Соболев К.В., Коротков С.М., Нестеров В.П.* (2014) Инотропное действие нового пробиотического продукта на сокращение миокарда Сравнение с эффектами диазоксиды. Биофизика 59: 959–966. [*Sobol C.V., Korotkov S.M., Nesterov V.P.* (2014) Inotropic effect of a new probiotic product on myocardial contractility Comparison with diazoxide. *Biophysics* 59: 780–785.]
<https://doi.org/10.1134/S000635091405025X>
 23. *Korotkov S.M., Emel'yanova L.V., Brailovskaya I.V., Nesterov V.P.* (2012) Effects of pinacidil and calcium on isolated rat heart mitochondria. *Dokl Biochem Biophys* 443: 113–117.
<https://doi.org/10.1134/S1607672912020147>
 24. *Biasutto L., Azolini M., Szabò I., Zoratti M.* (2016) The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update *Biochim. Biophys Acta* 1863: 2515–2530.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2016.02.012>
 25. *Mitchell P., Moyle J.* (1969) Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 9: 149–155.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00588.x>
 26. *Garlid K.D., Paucek P.* (2003) Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle. *Biochim Biophys Acta* 1606: 23–41.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(03\)00108-7](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(03)00108-7)
 27. *Brierley G.P.* (1976) The uptake and extrusion of monovalent cations by isolated heart mitochondria. *Mol Cell Biochem* 10 (1): 41–63.
<https://doi.org/10.1007/BF01731680>
 28. *Waldmeier P.C., Feldtrauer J.J., Qian T., Lemasters J.* (2002) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol* 62: 22–29.
<https://doi.org/10.1124/mol.62.1.22>
 29. *Korotkov S., Konovalova S., Emelyanova L., Brailovskaya I.* (2014) Y^{3+} , La^{3+} , and some bivalent metals inhibited the opening of the TI^+ -induced permeability transition pore in Ca^{2+} -loaded rat liver mitochondria. *J Inorg Biochem* 141: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.004>
 30. *Korotkov S.M., Nesterov V.P., Brailovskaya I.V., Furaev V.V., Novozhilov A.V.* (2013) TI^+ induces both cationic and transition pore permeability in the inner membrane of rat heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 45: 531–539.
<https://doi.org/10.1007/s10863-013-9526-8>
 31. *Saotome M., Katoh H., Satoh H., Nagasaka S., Yoshihara S., Terada H., Hayashi H.* (2005) Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca^{2+} in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1820–1828.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00589.2004>
 32. *Vajda S., Mándi M., Konrád C., Kiss G., Ambrus A., Adam-Vizi V., Chinopoulos C.* (2009) A re-evaluation of the role of matrix acidification in uncoupler-induced Ca^{2+} release from mitochondria. *FEBS J* 276: 2713–2724.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06995.x>
 33. *Gunter T.E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R., Gunter K.* (2000.) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28: 285–296.
<https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0168>
 34. *Ichas F., Mazat J.P.* (1998) From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1366: 33–50.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00119-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00119-4)
 35. *Gómez-Puyou A., Sandoval F., Chávez E., Tuena M.* (1970) On the role of K^+ on oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 245: 5239–5247.
 36. *Глазунов В.В., Коротков С.М.* (1997) Дыхание и набухание изолированных митохондрий печени крысы модифицированных замещением калия в их матриксе на натрий. ДАН 356: 551–554. [*Glazunov V.V., Korotkov S.M.* (1997) Respiration and swelling of isolated rat liver mitochondria, modified by replacing potassium for sodium in their matrix. *Dokl Akad Nauk* 356: 551–554. (In Russ)].
 37. *Gómez-Puyou A., Tuena de Gómez-Puyou M.* (1977) Monovalent cations in mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Bioenerg Biomembr* 9: 91–102.
<https://doi.org/10.1007/BF00745045>
 38. *Harris E.J., Cooper M.B.* (1981) Calcium and magnesium ion losses in response to stimulants of efflux applied to heart, liver and kidney mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 103: 788–796.
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(81\)90518-0](https://doi.org/10.1016/0006-291x(81)90518-0)

EFFECT OF SODIUM IONS ON CALCIUM-LOADED RAT HEART MITOCHONDRIA AND FROG MYOCARDIUM

S. M. Korotkov^{a,#}, C. V. Sobol^a, I. V. Shemarova^a, and V. P. Nesterov^a

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: korotkov@SK1645.spb.edu*

A comparative study of the effect of calcium load on rat heart mitochondria [RHM(K^+)] in which a part of the K^+ ions in their matrix were replaced by Na^+ ions [RHM(Na^+)] was carried out. Calcium loading of RHM(K^+) decreased their 2,4-dinitrophenol-uncoupled respiration and reduced the inner membrane potential ($\Delta\Psi_{\text{mito}}$). Swelling of these mitochondria increased in media with 25 mM potassium acetate or 125 mM NH_4NO_3 . These effects of calcium loading were even greater in similar experiments with RHM(Na^+). Inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), ADP and cyclosporin A (CsA), abolished completely the above-mentioned effects of Ca^{2+} in experiments with RHM(K^+) and did only partially in experiments with RHM(Na^+). A positive inotropic effect was observed with an increase in the extracellular concentration of Na^+ , however pre-incubation in a calcium-free solution led to a negative inotropic effect. Thus, the partial replacement of K^+ by Na^+ in the matrix made rat heart mitochondria more sensitive to Ca^{2+} and increased the probability of MPTP opening in their inner membrane. Along with an elevation of cytoplasmic $[\text{Na}^+]_i$, this can further increase calcium overload of cardiomyocytes, making their damage during ischemia/reperfusion more likely.

Keywords: mitochondrial permeability transition pore, mitochondrial potential, inotropic action, myocardium, Na^+ , Ca^{2+}