

Ю. А. Владимиров

Физико-химические основы патологии клетки

Лекция 3

Нарушение функций митохондрий при тканевой гипоксии

Москва, МГУ, РГМУ, 1998г

Нарушение функций митохондрий при гипоксии

Снижение потребления кислорода

Уменьшение скорости потребления кислорода митохондриями, связанное с нарушением работы переносчиков электронов, наблюдается при действии многих токсических соединений, например, ионов тяжелых металлов, таких как ртуть или серебро, ряда гидрофобных соединений, производных различных углеводов, при перекисном окислении липидов. Оно может быть также следствием набухания митохондрий и разрыва их наружных мембран, в результате чего из митохондрий выходит цитохром с, который является одним из переносчиков электрона по дыхательной цепи. Скорость потребления кислорода митохондриями в фосфорилирующем состоянии (V_3) снижается также при гипоксии (см. [рис. 1](#)).

Рис. 2.

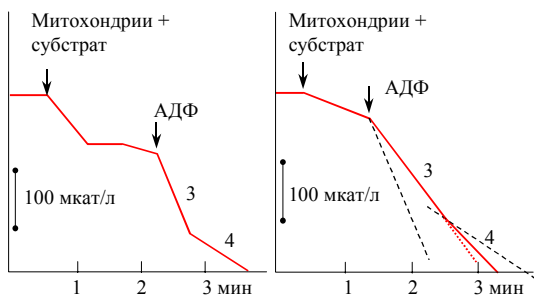


Рис. 1. Изменение свойств митохондрий при гипоксии ткани.

Слева - митохондрии печени крысы выделены сразу после декапитации животного и извлечения печени. Справа - печень выдерживали в анаэробных условиях в течение 30 мин.

Видно одновременное снижение скорости дыхания в фосфорилирующем состоянии (V_3) и возрастание в состоянии дыхательного контроля (V_4).

Отношение $DK = V_3 / V_4$ (коэффициент дыхательного контроля) также снижается.

Увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий

Низкая скорость дыхания неповрежденных митохондрий в состоянии 4 связана с тем, что высокий мембранный потенциал (создаваемый в отсутствие АДФ и при наличии кислорода и субстратов) препятствует переносу протонов через внутреннюю мембрану, связанному с работой дыхательной цепи, и тем самым останавливает поток электронов по этой цепи. Утечка ионов через мембрану снимает мембранный потенциал и приводит к увеличению скорости дыхания (V_4). Поэтому рост V_4 – свидетельство увеличения проницаемости внутренних мембран митохондрий. В митохондриях V_4 растет при повреждении органелл в результате гипоксии или перекиса липидов (см. [рис. 1](#)).

Анализ полярографических кривых (типа [рис. 1](#)) позволяет определить два взаимосвязанных показателя работоспособности митохондрий. Первый – это коэффициент P/O , который рассчитывается как отношение

$$\frac{P}{O} = \frac{\text{моли синтезированного АТФ}}{\text{моли поглощенного кислорода}}$$

Второй показатель – коэффициент дыхательного контроля (DK), который находят как отношение:

$$DK = V_3 / V_4.$$

Снижение DK до единицы сопровождается снижением коэффициента P/O до нуля и является свидетельством разобщения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях при их повреждении.

На [рис. 2](#) (слева) показано снижение дыхательного контроля в митохондриях, выделенных из почек крысы через разные сроки после смерти животного

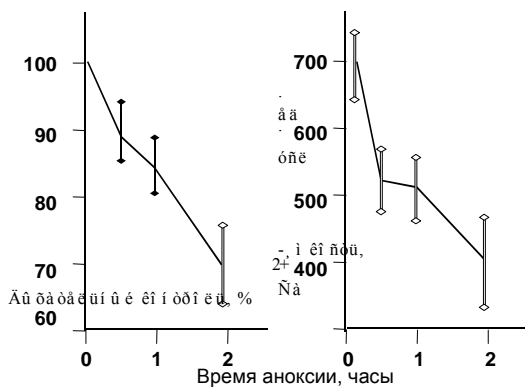


Рис. 2. Снижение дыхательного контроля (слева) и кальций-аккумулирующей способности митохондрий (справа) при инкубации изолированной почки крысы в анаэробных условиях (опыты Л. Г. Коркиной, В. И. Сорокового и Е. О. Брагина в нашей лаборатории, 1975 год).

Снижение способности митохондрий накапливать кальций

Параллельно разобщению окислительного фосфорилирования наблюдается потеря способности митохондрий к накоплению ионов кальция. В присутствии избытка субстратов дыхания и при наличии кислорода и ортофосфата митохондрий печени способны накопить в матриксе количество фосфорнокислого кальция, по массе превышающее массу митохондрий в сотни и даже в тысячу раз! Повреждение митохондрий приводит к падению разности потенциалов на митохондриальной мембране. Положительно заряженные ионы кальция, удерживаемые в матриксе электрическим полем, начинают выходить наружу из поврежденных митохондрий.

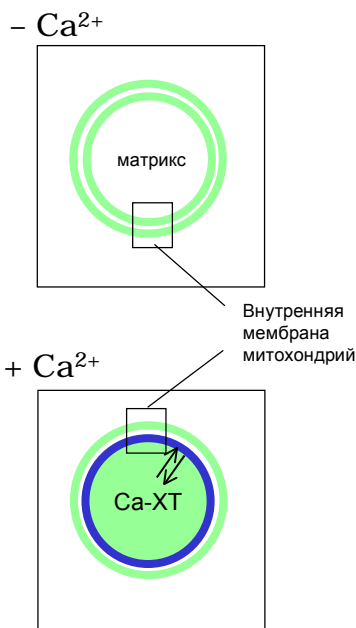


Рис. 3. Схема, поясняющая причину роста флуоресценции хлортетрациклина при накоплении ионов кальция в матриксе митохондрий.

В отсутствие кальция хлортетрациклин (ХТ) равномерно распределяется между водной и мембранной фазами, но не флуоресцирует. При добавлении к среде кальция комплекс Ca-ХТ частично входит в мембрану в соответствие с коэффициентом распределения между липидной и водной фазами. Однако его концентрация в липидной фазе невысока из-за низкой концентрации в водной фазе (верхний рисунок).

При повышении концентрации кальция в матриксе пропорционально растет концентрация комплекса Ca-ХТ во внутреннем липидном слое внутренней мембраны митохондрий, и флуоресценция суспензии существенно усиливается.

Способность митохондрий накапливать ионы кальция в присутствии субстратов и кислорода хорошо видна в опытах по измерению флуоресценции суспензии этих органелл, к которой добавлен флуорофор – антибиотик тетрациклин (еще лучше – хлортетрациклин, ХТ).

Дело в том, что хлортетрациклин связывает ионы Ca^{2+} , образуя флуоресцирующий комплекс. Но в водной среде квантовый выход этой флуоресценции довольно низкий, и комплекс флуоресцирует слабо. При переносе кальция в матрикс (в отсутствие фосфата!) его концентрация во внутренней митохондриальной мембране повышается (см. объяснено на [рис. 3](#)). На [рис. 4](#) приведены результаты опыта, в котором к митохондриям в среде инкубации, содержащей субстраты, но не содержащей фосфата и АДФ, добавляли небольшие порции $CaCl_2$. На введение первой порции митохондрии ответили усилением дыхания и ростом флуоресценции тетрациклина. Вторая порция кальция оказала меньший эффект, последующие добавки эффекта не вызывали, но вместо этого из митохондрий начал выходить кальций

(падение флуоресценции), органеллы стали набухать (снижение светорассеяния) и дыхание стало расти, свидетельствуя об увеличении проницаемости мембран в состоянии 2 по Чансу. По-видимому, способность митохондрий аккумулировать кальций была ограничена, и в конце концов произошло повреждение митохондрий и выход кальция.

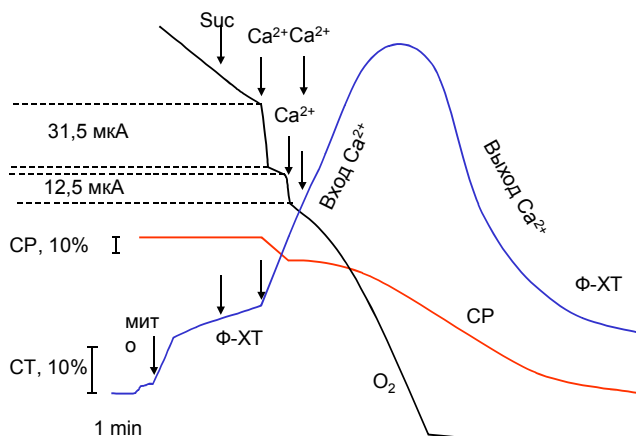


Рис. 4. Изменение флуоресценции митохондрий, окрашенных тетрациклином, в ответ на поглощение и выход ионов кальция. Ф-ХТ - флуоресценция хлортетрациклина; CP - светорассеяние; O₂ - концентрация кислорода.

Стрелками показаны моменты введения митохондрий (МИТ), сукцината (Suc), хлорида кальция (Ca²⁺). Остальные объяснения даны в тексте.

Максимальная амплитуда, которая достигается суспензией, соответствует максимальному количеству кальция, которое могут поглотить митохондрии в отсутствие фосфата. Эта величина была названа "кальций аккумулирующей способностью" митохондрий. Она, как и коэффициент дыхательного контроля, снижается при повреждении митохондрий и может служить показателем их интактности. На [рис. 5](#) показано, что при небольшом повреждении митохондрий происходит частичное снижение этого показателя. При полном повреждении митохондрий возрастания флуоресценции при добавлении кальция к митохондриям вообще не происходит (на рисунке не показано).

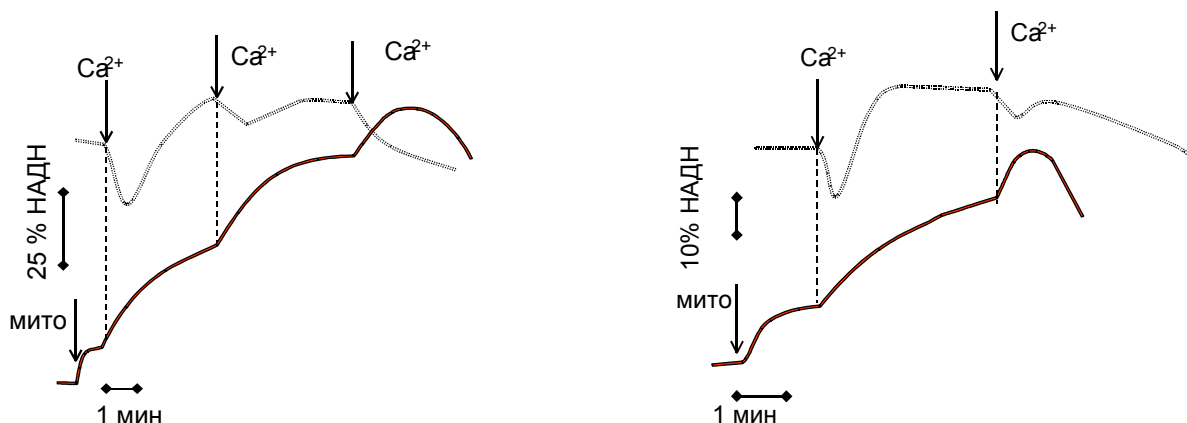


Рис. 5. Ответ флуоресценции хлортетрациклина (сплошные кривые) и восстановленных пиридиннуклеотидов (пунктир) при введении ионов кальция к интактным митохондриям (слева) и митохондриям, выделенным из печени после 15 мин аноксии. Видно, что в момент максимального вхождения кальция происходит окисление пиридиннуклеотидов.

При тканевой гипоксии происходит параллельное снижение дыхательного контроля и кальций-аккумулирующей способности митохондрий, как это видно на [рис. 2](#).

Разобщение окислительного фосфорилирования и выход кальция из митохондрий имеют самые драматические последствия для клетки. Снижение уровня АТФ в клетке приводит к выключению ионных насосов, выходу калия и вхождению ионов натрия и кальция в клетку из окружающей среды. Одновременная потеря митохондриями способности аккумулировать кальций приводит к тому, что попавший в клетку кальций ими также не удаляется. Это в свою очередь приводит к активации целого комплекса ферментных систем, активируемых ионами кальция, включая фосфолипазы, многие системы биосинтезов и протеинкиназы; метаболизм клетки вначале активируется, а затем дезорганизуется. Именно повреждение митохондрий является, согласно современным представлениям, тем переломным моментом, после которого

изменения в клетке, вызванные повреждающим агентом, становятся необратимыми и клетка погибает.

Набухание митохондрий

Весьма важным морфологическим признаком повреждения митохондрий является их набухание. Набухание митохондрий наблюдается, например, в клетках миокарда при недостаточности сердца, а также при многих инфекционных, гипоксических, токсических и других патологических процессах. Набухание митохондрий происходит при помещении клеток в гипотоническую среду, под влиянием ионизирующей радиации, бактериальных токсинов, при действии химических ядов и других патогенных агентов на клетку. Набухание приводит сначала к разрывам наружных мембран митохондрий, а затем - к их полному разрушению.

В опытах с изолированными митохондриями показано, что существует два типа набухания: **пассивное** и **активное**. В противоположность клеточным мембранам, сравнительно хорошо проницаемым для ионов K^+ и Cl^- , внутренние мембраны митохондрий непроницаемы для заряженных частиц (ионов), за исключением ионов Ca^{2+} и, возможно, ионов железа. В изотоническом растворе KCl неповрежденные митохондрии сохраняют свой объем, несмотря на то, что концентрация ионов калия и хлора внутри существенно меньше, чем снаружи: осмотическое давление внутри создается и другими ионами, а также белками матрикса. При одновременном увеличении проницаемости для ионов калия и хлора они начинают диффундировать в митохондрию, что приводит к повышению внутри осмотического давления, входу воды и набуханию органоелл, которое называется **пассивным**, т. к. не зависит от дыхания и энергизации. К агентам, вызывающим пассивное набухание, относятся ионы тяжелых металлов, включая ртуть, серебро, свинец. Таким же действием обладает далеко зашедшее перекисное окисление липидов в мембранах митохондрий.

В условиях живой клетки чаще имеет место иной тип набухания - **активное набухание**, связанное с работой цепи переноса электронов. Повреждение митохондрий под действием малых доз тяжелых металлов, активации собственной фосфолипазы в условиях гипоксии, при перекисном окислении липидов - сопровождается, прежде всего, повышением проницаемости внутренней мембраны для **катионов**.

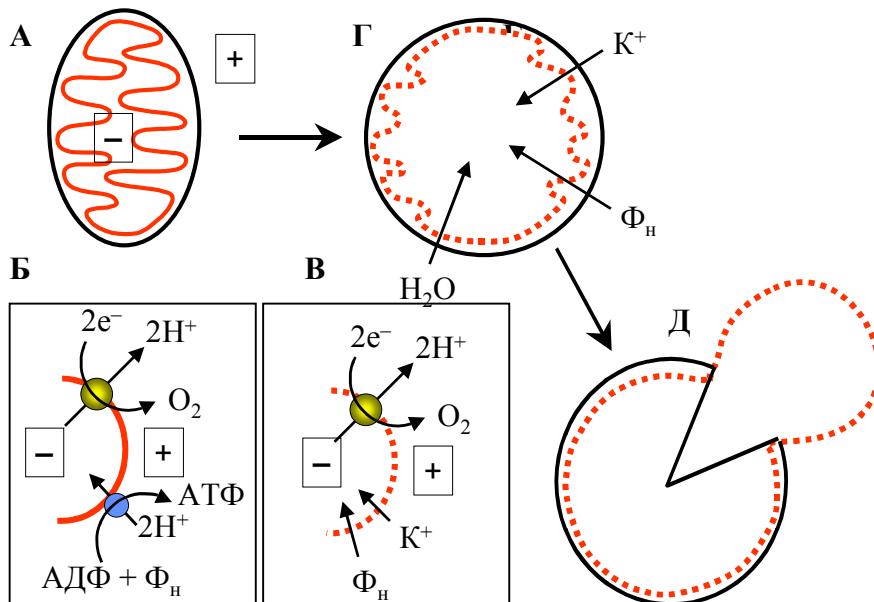


Рис. 6. Активное набухание поврежденных митохондрий.

В неповрежденной митохондрии (А) энергизация сопровождается окислительным фосфорилированием (Б). В поврежденных митохондриях часто увеличивается проницаемость внутренней мембраны для катионов, что приводит к переносу катиона внутрь (В) вместе с фосфатом (сравни [рис. 6 в лекции 2](#)). Митохондрии набухают (Г) и могут лопнуть (Д).

В присутствии источников энергии (субстраты дыхания и кислород, АТФ) на мембранах митохондрий генерируется разность потенциалов величиной около 170-180 мВ со знаком "минус" в матриксе, под действием которой ионы K^+ поступают внутрь поврежденных митохондрий. Вместе с калием в матрикс поступает ортофосфат, который переносится в

электронейтральной форме через внутреннюю мембрану с помощью специального белкового переносчика. Активное (т. е. связанное с затратой энергии) накопление фосфата калия в матриксе сопровождается набуханием митохондрий.

Набухание митохондрий изучают довольно простым методом, измеряя светорассеяние суспензии в режиме турбидиметрии (на пропускание) или нефелометрии (измеряется рассеянный свет). При набухании митохондрий светорассеяние суспензии уменьшается, а пропускание – увеличивается. Пример записи набухания митохондрий приведен на рис. 7.

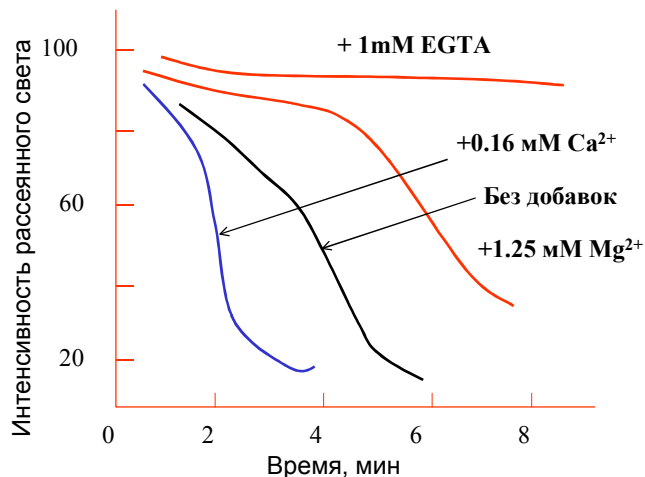


Рис. 7. Спонтанное набухание митохондрий (S-swelling)

Набухание (увеличение объёма) митохондрий сопровождается уменьшением светорассеяния суспензии. Оно происходит спонтанно по мере активации фосфолипазы A_2 , встроенной во внутреннюю мембрану. Ионы Ca^{2+} активируют фермент, а ионы Mg^{2+} – его угнетают.

По данным работы: Olenov, V.I.; Suslova, T.B.; Vladimirov, Yu.A. Comparative study of different types of swelling of rat liver mitochondria. *Studia Biophysica* 2:147-161 (1976)

Набухание митохондрий – не только следствие, но и причина их дальнейшего повреждения. Это хорошо видно из данных опыта, где набухание митохондрий и растяжение их мембран вызывали помещением органелл в гипотонические среды (см. [рис. 8](#)).

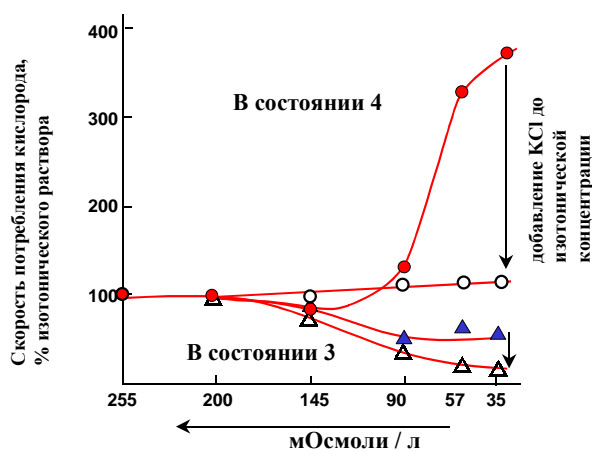


Рис. 8. Действие осмотического набухания митохондрий на скорость их дыхания

При помещении митохондрий в гипотоническую среду их объем увеличивается. При осмотической концентрации ниже 145 мОсм уменьшается скорость дыхания в состоянии 3. Частично это связано с выходом цитохрома с при повреждении целостности наружной мембраны (сравни [рис. 6.](#)) Добавление цитохрома может частично восстановить работу дыхательной цепи. При дальнейшем разбавлении (ниже 90 мОсм) растяжение внутренней мембраны, "вывалившейся" из разорванной внешней, приводит к нарушению барьерных свойств мембраны (рост дыхания в состоянии 4).

Заметьте! Потеря барьерных свойств митохондрий обратима: при восстановлении тоничности среды дыхание в состоянии 4 возвращается к норме (-o-).

Таким образом, само по себе растяжение мембраны, какими бы причинами они ни было вызвано, приводит сначала к повреждению наружной мембраны, а затем – к обратимому нарушению свойств мембраны внутренней.

Вопросы для зачета

1. Изменение скорости потребления кислорода в разных функциональных состояниях митохондрий и дыхательного контроля после тканевой гипоксии.
2. Как изменяется способность митохондрий аккумулировать ионы кальция при аноксии?
Метод и результаты опытов
3. Пассивное и активное набухание митохондрий. Какие причины могут вызвать изменение объема митохондрии?
4. Набухание митохондрий при аноксии и реоксигенации, причины этого явления
5. Влияние набухания митохондрий на их функции.