

Ю. А. Владимиров

**Физико-химические основы
патологии клетки**

Лекция 4

**Роль кальция и фосфолипазы A_2 в повреждении
митохондрий при гипоксии**

Роль ионов кальция в повреждении митохондрий

Итак, отсутствие кислорода в живой клетке приводит к повреждению прежде всего митохондрий. Что же произошло в клетке, без чего митохондрии разрушаются? В течение первых же пяти минут аноксии в клетках резко снижается уровень АТФ и накапливается молочная кислота (см. [рис. 1](#)).

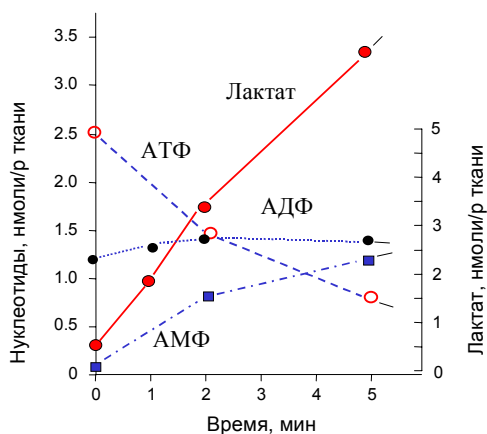


Рис. 1. Быстрый расход АТФ в переживающей печени (По данным Hems Brosnam)

По абсциссе отложено время после прекращения доступа кислорода, по ординатам — концентрации АТФ, АДФ (слева) и лактата (справа).

Несмотря на гликолиз концентрация АТФ в ткани быстро падает в течение первых 5 минут.

Снижение концентрации источника энергии не может не сказаться на работе ионных насосов, выкачивающих из клетки ионы кальция (Ca^{2+} -АТФаза) и натрия (в отмен на калий, Na^+ - K^+ -АТФаза). Выключение натрий-калиевой АТФазы приводит к повышению осмотического давления в клетке и её набуханию. Отек ткани — характерный признак гипоксии, резко усугубляющий ситуацию, поскольку сжатие кровеносных сосудов ухудшает кровоснабжение и усугубляет кислородную недостаточность. Не менее драматичны последствия увеличения концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток. Именно эти ионы, как мы сейчас увидим, несут прямую ответственность за повреждение митохондрий в анаэробных условиях. На [рис. 2](#) приведены данные опытов, в которых изолированные митохондрии инкубировались в аэробных ($+\text{O}_2$) и анаэробных условиях ($-\text{O}_2$) в присутствии ($+\text{Ca}^{2+}$) и в отсутствие ионов кальция, добавленных в относительно низкой концентрации (около 10 мкМ, т.е. порядка 10^{-5}M).

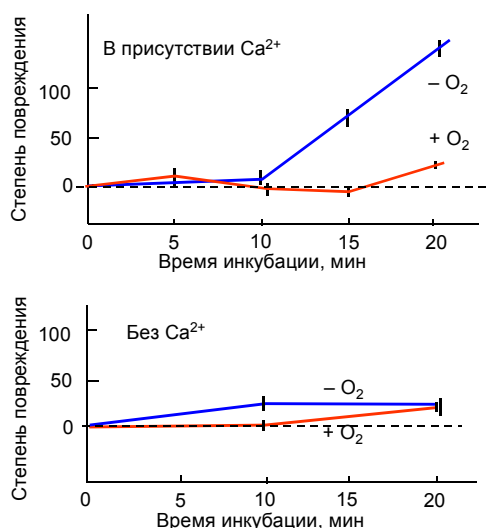


Рис. 2. Повреждение митохондрий при анаэробной ($-\text{O}_2$) и аэробной ($+\text{O}_2$) инкубации

За степень повреждения принята отношение коэффициентов дыхательного контроля до и после инкубации минус 1, в %.

Можно видеть, что митохондрии повреждаются только в том случае, если они инкубируются:

- 1 Анаэробно
2. В присутствии ионов Ca^{2+}

Объяснение результатов этого опыта дано на [рис. 3](#).

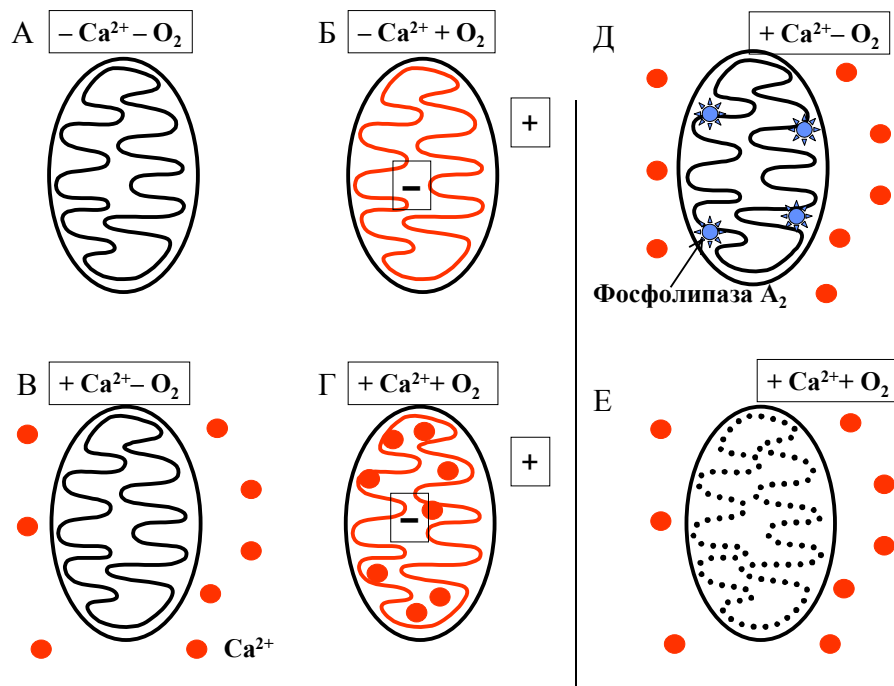


Рисунок 3. Повреждение митохондрий в отсутствие кислорода.

На рисунке дано схематическое изображение митохондрий. В отсутствие ионов кальция и кислорода (А) митохондрии могут некоторое время существовать, не повреждаясь. Введение кислорода (при наличии субстратов окисления) приводит к "энергизации" (Б), основным проявлением которой служит появление разности потенциалов на внутренней мембране (знак "минус" внутри).

В присутствии ионов кальция и при отсутствии кислорода в среде (В) митохондрии повреждаются (см. также Д и Е). Но если наряду с кальцием в среде присутствует кислород (Г), ионы кальция "заглатываются" митохондриями и, находясь внутри, уже не оказывают своего повреждающего действия.

Фосфолипаза А₂ повреждает мембраны митохондрий

Рисунки 3, Д и Е объясняют причину повреждающего действия внемитохондриального кальция. Дело в том, что на внутренние мембраны митохондрий содержат фермент, фосфолипазу А₂, который расщепляет фосфолипиды мембран и делает мембраны проницаемыми для ионов. Этот фермент активируется ионами кальция, которые находятся снаружи, но не внутри митохондрий (Д). Поврежденные фосфолипазой митохондрии (Е), хотя и могут потреблять кислород, но не могут удерживать мембранный потенциал, не удерживают внутри ионы кальция и не способны к синтезу АТФ. Клетка, содержащая такие митохондрии, уже не жизнеспособна.

Гидролиз фосфолипазой липидов мембран сопровождается накоплением свободных жирных кислот, которые можно определять, используя те или иные методы биохимического анализа. Сам по себе факт накопления жирных кислот при ишемии был известен довольно давно, но роль этого явления в нарушении функций митохондрий стала несомненной только после сопоставления уровня накопившихся в митохондриях свободных жирных кислот и степени повреждения митохондрий. Один из таких опытов приведен на рис. 4.

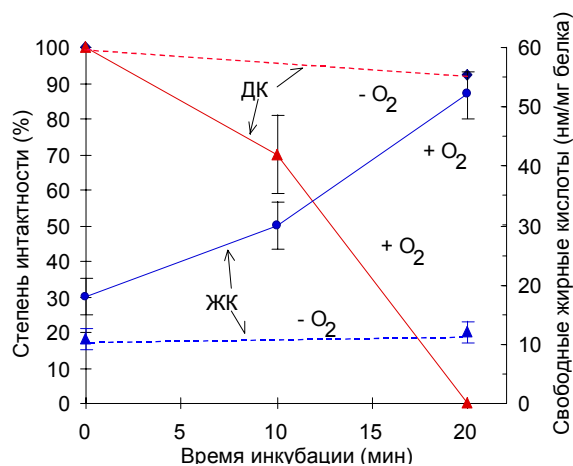


Рис.4. Влияние инкубации митохондрий в течение различного времени в отсутствие ($-O_2$) и в присутствии ($+O_2$) кислорода воздуха на изменение содержания свободных жирных кислот (ЖК) в суспензии и дыхательный контроль (ДК).

+ O_2 – в присутствии кислорода
 - O_2 – в отсутствие кислорода

Инкубационная среда содержала 110 мМ КС1 (А), 110 мМ NaCl (Б), 100 мкМ MgCl₂(Б), 500 мкМ сукцината, 10 мМ трис-НС1, рН 7,4, 35 мкМ CaCl₂. Концентрация митохондрий 2,5—3,0 мг/мл. Во всех пробах содержалось небольшое количество ионов кальция.

Результаты опыта очевидны: в аэробных условиях не накапливаются жирные кислоты, и митохондрии не повреждаются, а в анаэробных условиях происходит и то и другое.

Отчетливый параллелизм между глубиной гидролиза фосфолипидов и поражения митохондрий проявляется также при ингибировании фосфолипазы местными анестетиками или ионами меди. Эти данные приведены на рис. 5. На этом рисунке можно видеть, что исходные митохондрии печени крысы имели степень интактности 100% и содержали около 20 нмоль свободных жирных кислот (ЖК) на мг белка. Степень интактности определялась как $(ДК - 1) \times 100\%$, где ДК – коэффициент дыхательного контроля, т. е. отношение скоростей потребления кислорода митохондриями в третьем и четвертом функциональных состояниях. После 20 мин инкубации в анаэробных условиях в присутствии 35 мкМ CaCl₂ митохондрии содержали 54 нмоль ЖК на мг белка и имели нулевую степень интактности (ДК = 1). ЕГТА, связывая кальций, полностью сохраняла и содержание ЖК, и интактность митохондрий на исходном уровне неповрежденных органелл. Ингибиторы фосфолипазы: ионы меди и местный анестетик совкаин, – уменьшали степень гидролиза фосфолипидов (ЖК) и снижали повреждение митохондрий (сохраняли СИ).

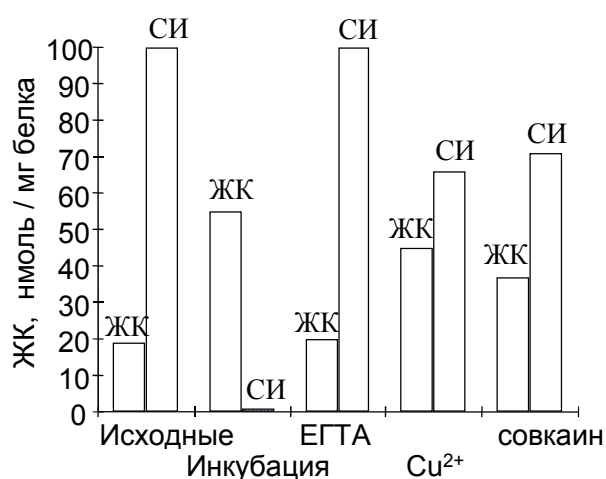


Рис. 5. Влияние ингибиторов фосфолипазы A_2 на на накопление свободных жирных кислот (ЖК) и интактность митохондрий (СИ)

Митохондрии печени крысы инкубировались 20 мин в отсутствие кислорода воздуха, но в присутствии 35 мкМ CaCl₂ (Инкубация). Там, где указано, к пробам добавляли ингибиторы фосфолипазы A_2 : 1 мМ ЕГТА, 1 мкМ Cu²⁺ или 20 мкМ местного анестетика совкаина.

Данные, полученные в такого рода опытах можно представить в виде зависимости степени интактности митохондрий от содержания свободных жирных кислот (образующихся в результате гидролиза фосфолипидов фосфолипазой A_2), как это показано на рис. 6. Можно видеть, что между этими величинами имеется четкая обратная зависимость: чем выше степень гидролиза фосфолипидов, тем сильнее повреждены митохондрии (т.е. тем меньше степень интактности).

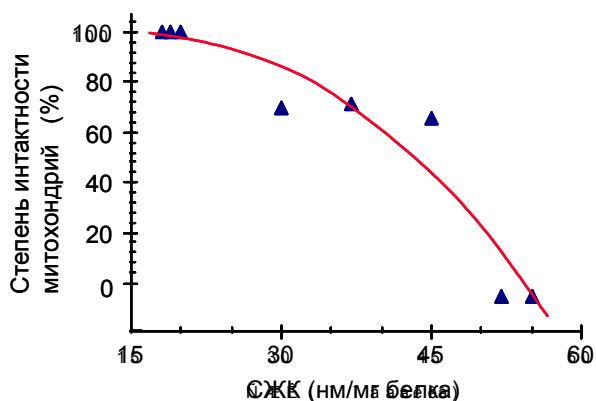


Рис. 6. Корреляция между содержанием СЖК и интактностью митохондрий

Построено по данным опытов типа приведенного на рис. 5.

Все эти результаты подтверждают вывод о том, что именно гидролиз фосфолипидов внутренней мембраны митохондрий, катализируемый фосфолипазой A_2 в результате ее активации ионами кальция, находящимися вне митохондрий, приводит к повреждению органелл при гипоксии.

Последовательность событий при тканевой гипоксии

Опыты с изолированными митохондриями всем хороши, кроме того, что нет никакой уверенности в том, что мы создаем для них точно такие же условия, как в целой ткани. Поэтому представляют интерес эксперименты, в которых за накоплением кальция митохондриями следили по флуоресценции срезов печени, пропитанных раствором, содержащим хлортетрациклин. Пользуясь флуоресцентным микроскопом, можно увидеть, что в такой ткани ярко флуоресцируют митохондрии на практически черном фоне. Как видно на рис. 7, флуоресценция ткани изменяется в ходе анаэробной инкубации печени, из которой эти кусочки затем готовятся. В свежеснятой печени флуоресценция относительно слабая (первая точка на кривой), притом, что митохондрии обладают хорошей способностью аккумулировать кальций (первый столбик). Это понятно: в неповрежденных клетках печени концентрация кальция мала, и митохондриям нечего накапливать. Заметим, что в момент измерения флуоресценции (т. е. в кювете флуориметра) кусочки печени всегда оказываются уже в **азрируемых** условиях.

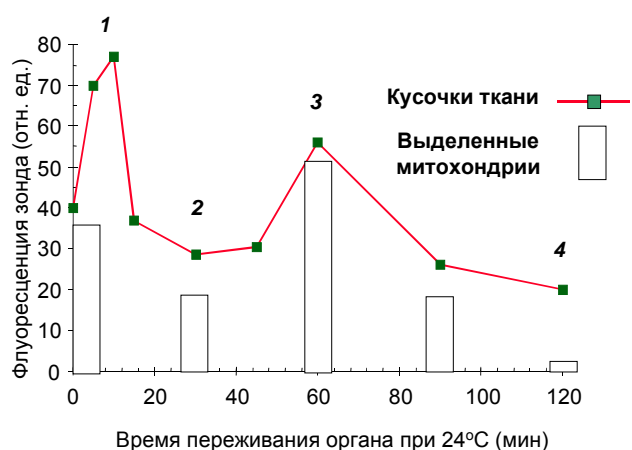


Рис. 7. Изменение количества Ca^{2+} в митохондриях срезов печени (кривая) и кальций-аккумулирующая способность изолированных митохондрий (столбики), полученных из органа, инкубированного в условиях аноксии.

1 – 4 – стадии процесса повреждения митохондрий в клетках.

Через 10 – 15 мин анаэробной инкубации печени количество кальция в митохондриях резко возрастает; вероятно, это говорит о том, что кальций вошел в клетки, а митохондрии пока еще способны его аккумулировать. Через 30 мин кальций-аккумулирующая способность митохондрий падает (см. второй столбик) и количество кальция в митохондриях внутри ткани снижается (кривая). К 60-й минуте происходит временное восстановление способности митохондрий аккумулировать кальций (третий столбик) и количество кальция в митохондриях срезов печени увеличивается. Это временное восстановление функций митохондрий (причина

которого пока неясна) сменяется окончательным повреждением органелл на 90-120 мин аноксии (столбцы) и соответствующим падением флуоресценции митохондрий в ткани (кривая).

С учетом всех данных (см. предыдущую лекцию, [рис. 2](#), а также [рис. 1](#) и [7](#) в этой лекции), можно представить себе **последовательность событий** в клетке после прекращения доступа кислорода следующим образом:

0-5 мин аноксии: снижение уровня АТФ в клетке в 2-4 раза, несмотря на активацию гликолиза;

5-15 мин: появление Ca^{+2} в цитоплазме клетки. Активация гидролитических ферментов, в том числе фермента фосфолипазы A_2 митохондрий. При реоксигенации содержание Ca^{+2} в митохондриях повышается, т. к. они еще не повреждены (стадия 1 на [рис. 7](#)).

15-30 мин: гидролиз митохондриальных фосфолипидов фосфолипазой A_2 и нарушение барьерных свойств митохондриальной мембраны. Реоксигенация ткани на этой стадии приводит к активному набуханию митохондрий. Дыхательный контроль в митохондриях нарушен, окислительное фосфорилирование разобщено, способность митохондрий накапливать ионы кальция снижена (стадия 2 на [рис. 7](#)).

30-60 мин: частичное восстановление функций митохондрий, временное повышение дыхательного контроля, способности накапливать кальций. (стадия 3 на [рис. 7](#)) Механизм компенсаторных процессов, приводящих к временному улучшению функций митохондрий, неизвестен, но связан с функцией клетки в целом, так как при анаэробной инкубации изолированных митохондрий это явление не наблюдается;

90-120 мин: необратимое повреждение митохондрий и полная гибель клеток (стадия 4 на [рис. 7](#)).

При температуре тела человека все эти процессы протекают в 2 – 3 раза быстрее; кроме того, в разных тканях они протекают с разной скоростью: быстрее всего в мозге, медленнее – в печени, еще медленнее – в мышцах.

Порочный круг клеточной патологии

Увеличение внутриклеточного содержания кальция и нарушение биоэнергетических функций митохондрий являются общими признаками для клеток, поврежденных в результате действия самых различных неблагоприятных факторов. Эти два события – не простое следствие других изменений в поврежденных клетках: они лежат **в основе нарушения** функций поврежденных клеток и могут рассматриваться как **главные звенья** в цепи событий, приводящих к развитию неспецифической реакции клеток на повреждение. Схематически, взаимоотношение между первичным повреждением клеточных структур, процессами биоэнергетики и содержанием кальция в цитоплазме приведены на [рис. 8](#).

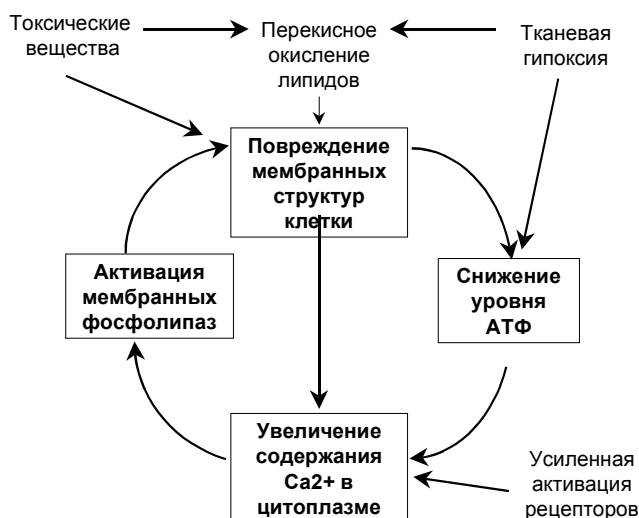


Рис. 8. Порочный круг в патологии клетки

Согласно этой схеме, первичными мишенями действия повреждающих агентов служат **мембранные структуры** клетки, в которых может подвергаться разрушению липидный бислой, рецепторы, белковые переносчики ионов и молекул (каналы), а также встроенные в мембраны ферменты, включая ионные насосы. Увеличение проницаемости мембран и подавление работы насосов, непосредственное вызванное действием повреждающих факторов (токсических соединений, свободных радикалов и продуктов липидной перекисидации, недостаток источника энергии – АТФ), приводят к увеличению концентрации натрия и кальция в цитоплазме. Последнее сопровождается дисбалансом внутриклеточной регуляции и активацией деструктивных ферментов, таких как фосфолипаза А₂ и эндонуклеазы. Гидролиз фосфолипидов мембран фосфолипазой приводит к дальнейшему нарушению барьерных свойств липидного бислоя, что приводит к еще большему росту уровня кальция в цитоплазме, набуханию митохондрий и их дальнейшему повреждению. Порочный круг замыкается и клетка скорее всего погибнет.

Вопросы для самоконтроля и к зачету

1. Расскажите об опытах, показывающих, какую роль играют ионы кальция в повреждении митохондрий при гипоксии.
2. Как было доказано, что фосфолипаза (а) активируется при гипоксии и (б) участвует в посреждении митохондрий?
3. Последовательность событий при тканевой гипоксии
4. Порочный круг клеточной патологии. Что Вы о нем знаете?