

О «НАБУХАНИИ» МИТОХОНДРИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПАЛЬМИТИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КАЛЬЦИЯ И ГИПОТОНИИ

© 2016 г. Д.Н. Курдюков, Н.Л. Векшин

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.04.16 г.

Рассмотрен вопрос о высокоамплитудном набухании митохондрий. В отличие от утверждений многих авторов о высокоамплитудном набухании изолированных митохондрий под действием пальмитиновой кислоты, ионов кальция или гипотонии, показано, что митохондрии не подвержены сильному набуханию. По данным оптической микроскопии даже при длительной инкубации в полной гипотонии (дистиллированная вода) размер митохондрий печени (около 1 мкм) возрастает не более чем на 40%. При кратковременной гипотонии или обработке пальмитиновой кислотой диаметр митохондрий либо увеличивается всего на 20%, либо вообще не возрастает. При этом светорассеяние суспензии митохондрий, измеренное на фотометре по падению оптической плотности, снижается в 2,5 раза. Падение светорассеяния суспензии митохондрий в гипотонии или при добавлении пальмитиновой кислоты, а также при добавлении кальция (в изотонии) возникает не из-за набухания, как считалось ранее, а из-за повреждения (вплоть до разрушения) наружной мембраны митохондрии. При этом внутренняя мембрана расширяется мало. Разрушение наружной мембраны снижает вероятность рассеяния света каждой митохондрией на границе вода/мембрана. Выход веществ из матрикса, приводящий к уменьшению показателя преломления, может давать дополнительный вклад в снижение светорассеяния. Пальмитиновая кислота и кальций (в концентрациях 10–100 мкм) вызывают пермеабиллизацию и разрушение наружной мембраны постепенно, за несколько минут. Полная гипотония активирует этот процесс очень быстро, за доли секунды. При низкой ионной силе добавление кальция, нейтрализующего отрицательные заряды на поверхности мембран, инициирует агрегацию митохондрий, что, наоборот, усиливает светорассеяние и может создавать иллюзию их набухания.

Ключевые слова: митохондрии, кальций, пальмитиновая кислота, гипотония, набухание, светорассеяние, агрегация.

Одной из физиологических реакций митохондрий на внутриклеточный стресс может являться их набухание – некоторое увеличение объема [1,2]. При помещении изолированных митохондрий в гипотоническую среду (ниже 90 мОсм) или под действием жирных кислот и многих других веществ объем якобы увеличивается многократно. Одним из главных оснований для утверждения о таком высокоамплитудном набухании служил факт резкого уменьшения светорассеяния суспензии [3]. Заметное снижение светорассеяния митохондрий может происходить в течение нескольких минут даже в изотонической среде, спонтанно. В присутствии ЭГТА (кальцийсвязывающего агента) эффект исчезает [4]. Было предположено, что набухание возникает за счет кальций-зависимой фосфолипазы А2, находящейся в митохондриях.

С другой стороны, в работах [5–8] сообщалось о том, что насыщенные жирные кислоты, например пальмитиновая кислота, могут вызы-

вать образование в липидном бислое митохондрий неспецифических пор, независимо от активации фосфолипазы А2. Аналогичные поры возникают в искусственных фосфолипидных мембранах, в отсутствие какой-либо фосфолипазы [8–10].

Обе группы авторов ([3,4] и [5–8]) интерпретировали резкое уменьшение мутности суспензии митохондрий как доказательство того, что насыщенные жирные кислоты и ионы кальция способны вызывать сильное набухание митохондрий с вхождением воды внутрь. Они отождествили снижение светорассеяния митохондрий с высокоамплитудным набуханием, не получив прямых морфологических ультраструктурных доказательств на нативных митохондриях. При этом данные электронной микроскопии, представленные, например, в работе [8], не выявляют, на наш взгляд, кардинальных различий в диаметре митохондрий до и после

их обработки с помощью пальмитиновой кислоты.

Утверждение о высокоамплитудном набухании митохондрий под действием жирных кислот, кальция и других веществ проистекает из давних нефелометрических, фотометрических и электронномикроскопических исследований середины прошлого века (см. монографию [3] и ссылки в ней). Предполагалось, что сильное снижение светорассеяния суспензии митохондрий в ответ на добавление пальмитиновой кислоты или кальция является следствием именно высокоамплитудного набухания. Но нам нигде не удалось найти прямых данных, полученных с помощью оптической микроскопии. Более того, согласно законам оптики мутных сред [11,12], при увеличении диаметра частиц светорассеяние должно возрастать, но в случае митохондрий оно падает. Именно поэтому исследователи прибегли к предположению о том, что митохондрии набухают столь сильно, что в матрикс входит много воды, вследствие чего каждая митохондрия становится прозрачной.

Если исходить из законов оптики мутных сред [11,12], снижение светорассеяния суспензии может возникать по трем причинам: а) из-за уменьшения площади поверхности частиц, рассеивающих свет, б) из-за уменьшения показателя преломления частиц, в) из-за уменьшения количества частиц.

Целью нашей работы является проверка утверждения о высокоамплитудном набухании митохондрий с помощью фотометрии светорассеяния и прямых оптических методов – фазово-контрастной и квазитемнопольной микроскопии (мы не используем здесь флуоресцентную микроскопию, так как флуоресцентные зонды по-разному связываются с наружной и внутренней мембранами и по-разному флуоресцируют снаружи и внутри нативных или поврежденных митохондрий [13]). Важно было установить основные причины изменения светорассеяния в суспензии митохондрий под действием пальмитиновой кислоты, кальция и гипотонии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий. Фракцию митохондрий из печени крысы выделяли по методике, описанной в работе [8], с небольшими модификациями. Выделение проводили при температуре 4°C, все растворы охлаждали на льду. Печень крысы помещали в 20 мл ледяной среды выделения, содержащей 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 10 мМ HEPES (pH 7,4), 0,5 мМ ЭДТА (и вариант без ЭДТА), после чего печень продавливали через пресс и про-

изводили гомогенизацию разрушенной ткани в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пес-тиком. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения неразрушенных клеток и эритроцитов. Осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали 15 мин при 3000 g (тяжелая фракция митохондрий) или при 6000 g (общая фракция митохондрий). Осадок ресуспендировали в 8 мл среды выделения. Суспензию митохондрий разделяли на алиquotы, хранили на льду и использовали для опытов в течение нескольких часов. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы и 10 мМ HEPES (pH 7,4).

Дыхание митохондрий в среде инкубации (в присутствии 2 мМ фосфата и 5 мМ сукцината) регистрировали полярографически по скорости потребления кислорода, используя электрод Кларка с термооксиметром «Эксперт-001» (ООО «ЭкониКС», Москва, Россия).

Фотометрия. Светорассеяние митохондрий в среде инкубации измеряли на фотометре КФК-2 (Загорский оптико-механический завод, Россия) по оптической плотности суспензии при 540 нм в кювете толщиной 0,5 или 0,1 см. Поглощением при 540 нм можно было пренебречь. Концентрацию белка определяли при 286 нм с помощью УФ-экспресс-метода [14] на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ООО «Пром-ЭкоЛаб», Санкт-Петербург, Россия).

Оптическая микроскопия. Размер частиц определяли методами квазитемнопольной и фазово-контрастной оптической микроскопии на микроскопах ЛЮМАМ И2 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия) и DM 6000 (Leica Microsystems, Германия). Средний размер частиц получали по 5–10 микрофотографиям с помощью программы ImageJ по единому сценарию с помощью инструментов «Threshold» и «Analyze particles». Количество митохондрий в поле зрения подсчитывали при небольшом увеличении ($\times 600$), а средний диаметр – при максимально большом ($\times 2000$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

подавляющий вклад ($> 95\%$) в оптическую плотность суспензии митохондрий печени, измеряемую на стандартном фотометре (без сферического детектора) при 540 нм, вносит светорассеяние. Поглощением света цитохромами можно пренебречь, так как оно не превышает 5% (см. спектр митохондрий в работе [12]). Оптическая плотность рассеяния D , детектируемая на фотометре, описывается аналогично известному закону поглощения [12]:

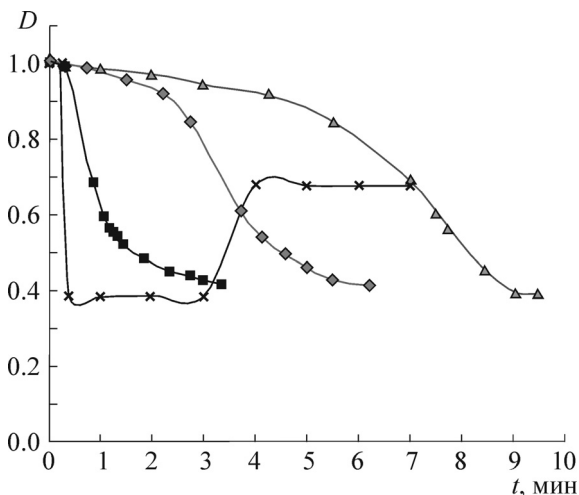


Рис. 1. Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий в среде инкубации без добавок (ромбы), в присутствии 5 мМ сукцината (треугольники) или 30 мкМ пальмитиновой кислоты (квадраты), а также митохондрии в воде (крестики) с добавкой 60 мкМ хлористого кальция на 3-й минуте. По оси ординат – нормированная оптическая плотность при 540 нм, по оси абсцисс – время в минутах. Измерено на фотометре КФК-2 в кювете толщиной 0,5 см. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы и 10 мМ HEPES (pH 7,4).

$$D = \sigma CL, \quad (1)$$

где σ – коэффициент светорассеяния (оптическое сечение рассеяния), L – длина оптического пути, C – концентрация частиц, которую легко определить с помощью оптического микроскопа.

Формула (1) применима для экспериментов на стандартных фотометрах и спектрофотометрах (без светосбора рассеянного света с помощью сферического или полусферического детектора), функционирующих по сути в режиме турбидиметра – измерителя мутности. Хорошая применимость формулы для фотометрического определения величины светорассеяния была показана нами для разных суспензий, в частности для митохондрий [12].

Спонтанное медленное уменьшение величины D суспензии митохондрий в среде инкубации (без фосфата и сукцината) возникало в наших опытах не сразу, а после небольшого лаг-периода, на 2-й минуте регистрации (рис. 1). Этот результат отличается от кинетик из работ [4,8], где лаг-период отсутствовал. Наличие лаг-периода может косвенно свидетельствовать в пользу постепенной активации фосфолипазного пути. Предварительное внесение в инкубацион-

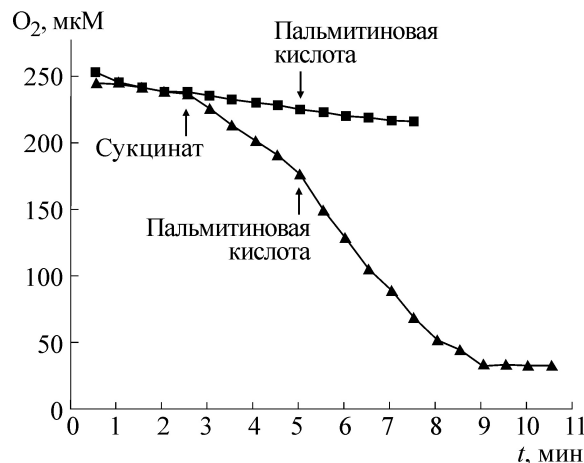


Рис. 2. Потребление кислорода в суспензии митохондрий (1 мг/мл) при добавлении 5 мМ сукцината и затем 60 мкМ пальмитиновой кислоты (треугольники) и при добавлении только пальмитиновой кислоты (квадраты). Измерено в полярографической кювете толщиной 1,5 см с электродом Кларка. Среда инкубации содержала 2 мМ фосфата, 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы и 10 мМ HEPES (pH 7,4).

ную среду сукцината (5 мМ) приводит к существенному удлинению лаг-периода (рис. 1).

Добавление пальмитиновой кислоты (или хлористого кальция, см. [3]) к митохондриям на фоне сукцината (или без него) сопровождалось постепенным просветлением суспензии (рис. 1), как в работах [3,4,8]. В присутствии ЭГТА или ЭДТА никакого просветления суспензии после добавления кальция или пальмитиновой кислоты не возникало (см. также работу [4]). ЭГТА и ЭДТА имеют гораздо более высокое сродство к кальцию, чем пальмитиновая кислота. Поэтому эндогенный кальций не может быть связан пальмитиновой кислотой в их присутствии. Пермеабиллизацию мембран вызывает не только сама пальмитиновая кислота, но и ее комплексы с эндогенным кальцием [8].

Ранее предполагалось, что защитный эффект сукцината от пермеабиллизующего действия пальмитиновой кислоты на митохондрии обусловлен энергизацией дыхательной цепи. Однако нужно обратить внимание, что сходный эффект оказывают кальцийсвязывающие агенты – ЭГТА и ЭДТА. Поскольку сукцинат имеет две отрицательно заряженные COOH-группы, то он, вероятно, действует подобно ЭГТА или ЭДТА – связывает эндогенный кальций, предотвращая повреждение митохондрий этим кальцием.

Пальмитиновая кислота активирует сукцинат-зависимое дыхание митохондрий (рис. 2). Можно предположить, что пальмитиновая ки-

Таблица 1. Скорость потребления кислорода суспензией митохондрий (1 мг/мл)

	Митохондрии					
	Без добавок	60 мкМ CaCl ₂	30 мкМ пальмитиновой кислоты	5 мМ сукцината	5 мМ сукцината и 60 мкМ CaCl ₂	5 мМ сукцината и 30 мкМ пальмитиновой кислоты
Скорость дыхания (O ₂ , мкМ/мин)	5,4	5,5	5,5	24	46	47

слота, создавая дефекты в липидной фазе, повышает мембранную проницаемость для сукцината (или активирует дикарбоксилатный переносчик). При этом пальмитиновая кислота стимулирует сукцинат-зависимое дыхание митохондрий по величине столь же сильно, как и кальций (табл. 1). Без сукцината пальмитиновая кислота и кальций на дыхание не действуют.

И в изотонии, и в 80%-й гипотонии, и после добавления пальмитиновой кислоты, и даже в присутствии сукцината величина D в итоге уменьшается практически одинаково – в 2,5 раза (рис. 1). Это означает, что везде падение D вызвано одними и теми же причинами.

При добавлении хлорида кальция к митохондриям (в изотонии) величина D снижается, но не столь сильно (на рис. не показано). Это связано с тем, что катионы кальция, нейтрализуя отрицательный заряд митохондрий, вызывают не только пермеабиллизацию мембран, но и частичную агрегацию митохондрий, что сопровождается противоположным эффектом – усилением рассеяния. Особенно хорошо агрегация заметна при полной гипотонии (в воде), когда другие катионы и анионы не мешают кальцию связываться на поверхности митохондрий (после добавки кальция на 3-й минуте величина D возрастает, рис. 1). Крупные агрегаты размером 5–10 мкм (на рис. не показано) некоторые авторы, по-видимому, ошибочно принимали за набухшие митохондрии.

При помещении митохондрий в дистиллированную воду просветление суспензии происходит мгновенно – за доли секунды (рис. 1), что делает маловероятным возможность фосфолипазного механизма, ибо для гидролиза липидов фосфолипазой требуется время. В гипотонических условиях высокое осмотическое давление изнутри приводит к механическому повреждению мембран, особенно наружной, не способной расправляться. Наружная мембрана разрывается и даже частично слетает в воду [1,2]. Это должно приводить к резкому снижению светорассеяния, так как в этих условиях отражение и преломление светового пучка происходит всего на одной мембране, в отличие

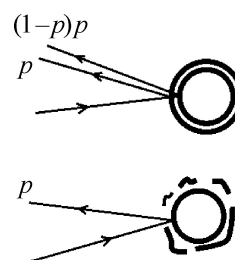
от целых митохондрий, где свет рассеивается сразу на двух мембранах – наружной и внутренней.

Вероятность рассеяния фотонов (p) одиночными митохондриями при фиксированной длине волны можно представить в виде отношения двух площадей [12]:

$$p = \sigma / \pi R^2, \quad (2)$$

где πR^2 – поперечная площадь одной митохондрии. По формуле (2) для суспензии митохондрий печени ранее было найдено, что $p = 0,32$ [12] (при 540 нм), т.е. 32% фотонов, попадающих на каждую митохондрию, рассеиваются в стороны, а 68% проходят в неизменном направлении.

Основной вклад в светорассеяние дает раздел границы фаз вода/мембрана (рис. 3), так как на ней наблюдается максимальный перепад показателей преломления (в воде – 1,33, в мембране – около 1,6). Пусть вероятность рассеяния фотонов на внешней мембране равна P_{out} . Тогда для внутренней мембраны она окажется меньше, а именно $(1 - P_{out})P_{in}$, где P_{in} – вероятность без учета внешней мембраны. Поскольку межмембранное расстояние не превышает 20 нм, а толщина наружной мембраны составляет 10 нм [2], то для внутренней мембраны «наружный» показатель преломления будет чем-то средним между 1,33 и 1,6, поэтому P_{in} должно быть меньше, чем P_{out} . Но так как внутренняя мембрана складчатая, то это должно, наоборот, увеличивать величину P_{in} . Поскольку указанные два фактора разнонаправлены, то для простоты можно в первом приближении принять $P_{out} =$

**Рис. 3.** Схема рассеяния света на мембранах нативной и поврежденной митохондрий.

$P_{in} = P$. Тогда суммарная вероятность рассеяния фотонов на двух мембранах будет равна $2P - P^2$. Как уже было сказано, из всех фотонов, падающих на митохондрии, 32% рассеиваются в стороны, т.е. $2P - P^2 = 0,32$. Из решения этого квадратного уравнения следует, что $P = 0,18$. Отношение суммарной вероятности рассеяния на двух мембранах к вероятности рассеяния на одной мембране составляет $(2P - P^2)/P$, что при подстановке дает 1,8. Примерно во столько раз (в рамках сделанных допущений) должна уменьшаться величина D после удаления наружной мембраны.

Дополнительный вклад в снижение D может дать выход веществ из митохондрий, так как показатель преломления матрикса выше, чем у воды. По данным электронной микроскопии в матриксе каждой митохондрии печени крысы помимо крист внутренней мембраны имеются темные пятна, места повышенной электронной плотности, соответствующие скоплению гранул фосфата кальция [2], которые тоже могут вносить существенный вклад в светорассеяние.

Тиндалевское светорассеяние суспензий, когда размер каждой частицы существенно больше длины световой волны λ , не слишком сильно зависит от показателя преломления, размера частиц и длины волны [11,12], т.е. $\sigma \sim nR/\lambda$. Релеевское молекулярное светорассеяние резко возрастает при агрегации молекул или при увеличении n , а именно: $\sigma \sim n^4 R^4 / \lambda^4$. В промежуточном же случае, когда размер частиц соизмерим с длиной волны (диаметр митохондрии ~ 1 мкм, $\lambda = 0,54$ мкм), светорассеяние может быть приближенно описано следующей квадратичной зависимостью:

$$\sigma \sim n^2 R^2 / \lambda^2. \quad (3)$$

При инкубации митохондрий в условиях изотонии и особенно гипотонии из их мембран и матрикса постепенно спонтанно выходят флавины [15], кальций [4], а также некоторые белки [2,3], в результате чего n может снизиться с $\sim 1,6$ (гранулы матриксного фосфата кальция, белков и ДНК) до 1,33 (вода), т.е. в 1,2 раза. Из формулы (3) следует, что при этом σ уменьшится в 1,44 раза. Значит, согласно формуле (1), во столько же раз снизится величина D .

Если учесть обе причины (одна мембрана вместо двух и опустошение матрикса), то итоговое падение D суспензии митохондрий может составлять 2,6 раза, что хорошо согласуется с опытом – 2,5 раза (рис. 1).

В работах [16,17], где утверждалось наличие высокоамплитудного набухания, рассматривались вероятные зависимости оптической плот-

ности суспензии митохондрий от объема их матрикса с помощью нескольких косвенных методов, но оптическая микроскопия не была использована. В работе [18] были представлены электронномикроскопические данные о чрезвычайно сильном набухании митохондрий в условиях гипотонии. Однако эти данные вызывают сомнения: диаметр каждой митохондрии при попадании в воду увеличивался в пять–шесть раз, это означало, что объем возрастал как минимум в сотню раз, что трудно себе представить и чего не наблюдалось впоследствии ни в одном электронно-микроскопическом исследовании (все изменения диаметра митохондрий не превышали 20–40%). Нужно подчеркнуть, что электронная микроскопия имеет дело с фиксированными, а не нативными образцами, а применение глутарового альдегида или формальдегида при изготовлении срезов могло сшивать белки митохондрий между собой (см. о таком действии глутарового альдегида на белки в работе [13]), создавая иллюзию укрупнения. В работах [19–21] утверждалось, что изменения в светорассеянии митохондрий напрямую связаны с изменением объема матрикса. Но и там не приводилось данных нативной оптической микроскопии. В современных работах [22,23] опять-таки применяется фотометрия и делаются расчеты объемов, но не используется прямой метод – оптическая микроскопия.

В связи с этим мы провели тщательные опыты с использованием оптической микроскопии. Контуры каждой митохондрии при микроскопии в квазитемнопольном режиме при максимальном увеличении ($\times 2000$) были близки контурам в фазово-контрастном режиме.

На рис. 4 представлены снимки суспензии тяжелой фракции митохондрий при микроскопии в квазитемнопольном режиме исходно и после инкубации с пальмитиновой кислотой, а также митохондрий при 80%-й гипотонии. Никаких высокоамплитудных изменений размеров митохондрий не наблюдается. Это неудивительно. Наружная мембрана повреждается, но объем митохондрий остается прежним, так как внутренняя мембрана ничуть не подобна резиновому шару, способному раздуваться (количество белка во внутренней мембране в три раза больше, чем липидов). Судя по данным квазитемнопольной микроскопии, при 80%-й гипотонии средний диаметр митохондрий даже немного уменьшается (рис. 4в, табл. 2). По-видимому, это связано с удалением внешней мембраны. Если же говорить о набухании митохондрий под действием пальмитиновой кислоты

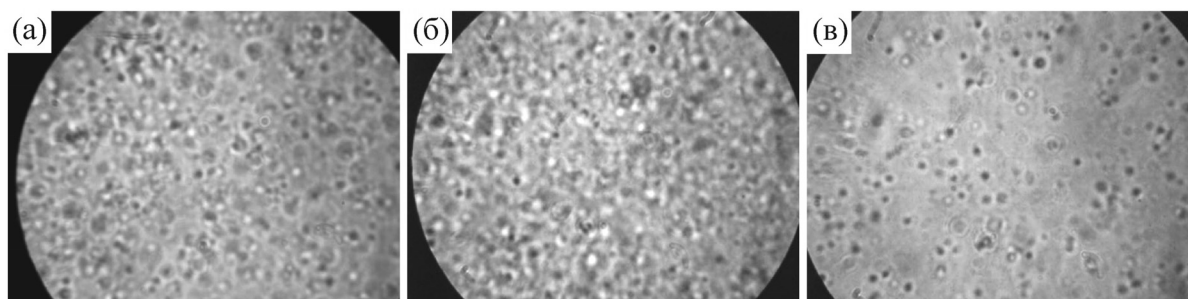


Рис. 4. Митохондрии (тяжелая фракция) сразу после их добавления в среду (а), через 3 мин инкубации в среде с пальмитиновой кислотой (б) и в гипотонической среде, полученной при пятикратном разбавлении среды с митохондриями дистиллированной водой (в). Среда инкубации содержала 5 мМ сукцината. Микроскоп ЛЮМАМ И2, квазитемнопольный режим, водная иммерсия, увеличение $\times 2250$.

(рис. 4б, табл. 2), то оно наблюдается, но не высокоамплитудное, а совсем незначительное.

На рис. 5 показаны микрофотографии общей фракции митохондрий при микроскопии в фазово-контрастном режиме: а) исходно, б) после самоинкубации в течение 37 мин, в) после инкубации с пальмитиновой кислотой в течение 20 мин, г) при 100%-й гипотонии (дистиллированная вода) через 2 мин. Никаких высокоамплитудных изменений митохондрий не наблюдается ни в присутствии пальмитиновой кислоты, ни даже в условиях полной гипотонии. Лишь через 12 мин в воде диаметр митохондрий увеличивается в среднем на 42% (табл. 3) и возникает некоторое просветление каждой митохондрии. При этом в случае самоинкубации и инкубации с пальмитиновой кислотой плотность каждой митохондрии заметно не меня-

лась. Небольшое (на 16–22%) увеличение диаметра в этих опытах не может являться причиной двух–трехкратного падения мутности, измеряемой фотометрически по снижению оптической плотности.

Таким образом, есть основание полагать, что гипотония или индукция неспецифических пор в митохондриях кальцием и пальмитиновой кислотой не приводят к полному расправлению внутренней мембраны и к высокоамплитудному набуханию, но вызывают повреждение наружной мембраны, вплоть до ее разрушения.

В заключение нужно отметить следующий биомедицинский аспект наших результатов. Высокие концентрации пальмитиновой кислоты необратимо повреждают митохондрии. Это означает, что постоянное использование в питании человека больших количеств пальмового

Таблица 2. Среднестатистические результаты по квазитемнопольной микроскопии тяжелой фракции митохондрий

	Митохондрия		
	исходно	с пальмитиновой кислотой	в воде
Средний диаметр \pm стандартное отклонение, мкм	1,03 \pm 0,23	1,14 \pm 0,22	0,94 \pm 0,15

Примечание. Среда выделения митохондрий не содержала ЭДТА. Диаметр – среднее арифметическое из 200–300 частиц.

Таблица 3. Среднестатистические результаты по фазово-контрастной микроскопии общей фракции митохондрий

	Митохондрии				
	в изотонии исходно	в изотонии через 37 мин	в изотонии + пальмитиновая кислота через 20 мин	в воде через 2 мин	в воде через 12 мин
Средний диаметр, мкм	0,72	0,84	0,88	0,88	1,02
То же, %	100	116	122	122	142

Примечание. Среда выделения митохондрий содержала 0,5 мМ ЭДТА. Диаметр – среднее арифметическое из 400–2000 частиц. Микроскоп Leica DM 6000, фазовый контраст, масляная иммерсия, объектив 100 \times 1,3.

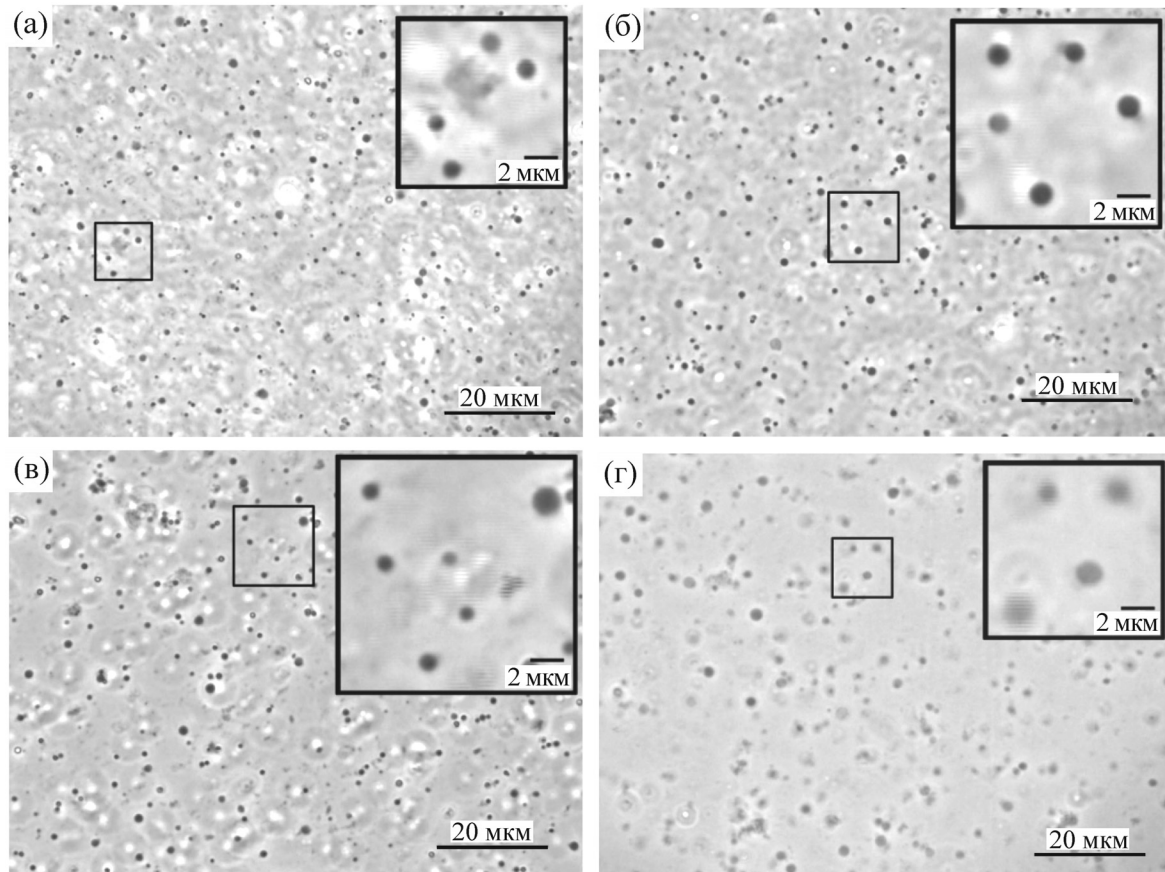


Рис. 5. Митохондрии (общая фракция) сразу после их добавления в среду инкубации (а), через 37 мин самоинкубации (б), через 20 мин инкубации с пальмитиновой кислотой (в) и через 2 мин в воде (г). Микроскоп Leica DM 6000, фазовый контраст, масляная иммерсия, объектив 100×/1,3. На врезках частицы показаны в увеличенном масштабе.

масла и других масел и продуктов, содержащих много свободных жирных кислот, может нанести большой вред организму человека (речь идет в первую очередь о свободной пальмитиновой кислоте или ее комплексах с кальцием, а не о пальмитиновой кислоте, входящей в состав триглицеридов).

Авторы выражают признательность к.б.н. Е.А. Бегуновой, аспирантам М.С. Фроловой и В.И. Ковалеву (ИБК РАН) за помощь в работе, а также А.В. Браславскому (BRL Inc., Тайвань) за оказанную финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Б. Альбертс, *Молекулярная биология клетки* (Мир, М., 2013), т. 2.
2. А. Ленинджер, *Биохимия* (Мир, М., 1974).
3. А. Ленинджер, *Митохондрия* (Мир, М., 1966).
4. V. I. Olenov, T. B. Suslova, and Yu. A. Vladimirov, *Stud. Biophys.* **2**, 147 (1976).
5. P. Bernardy and V. Petronelly, *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 131 (1996).
6. M. Crompton, *Biochem. J.* **341**, 233 (1999).
7. P. Bernardy, *Physiol. Rev.* **79**, 1127 (1999).
8. К. Н. Белослудцев, Дис. ... канд. биол. наук (Пушино, 2005).
9. В. Ф. Антонов, А. С. Иванов и Е. А. Крепанова, в кн. *Свободнорадикальное окисление в норме и патологии* (Наука, М., 1976).
10. G. Mironova, O. Gateau-Roesch, C. Levrat, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 319 (2001).
11. В. Н. Лопатин, *Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред* (Физматлит, М., 2004).
12. Н. Л. Векшин, М. С. Фролова, В. И. Ковалев и Е. А. Бегунова, *Биофизика* **60**, 129 (2015).
13. Н. Л. Векшин, *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров* (Фотон-век, Пушино, 2006).
14. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, Berlin, 2002).
15. M. S. Frolova and N. L. Vekshin, *J. Fluores.* **24**, 1061 (2014).
16. H. Tedeschi and D. Harris, *Arch. Biochem. Biophys.* **58** (1), 52 (1955).
17. H. Tedeschi and D. Harris, *Biochim. Biophys. Acta* **28** (2), 392 (1958).

18. C. Stoner and H. Sirak, *J. Cell Biol.* **43** (3), 521 (1969).
19. A. Beavis, R. Brannan, and K. Garlid, *J. Biol. Chem.* **260** (25), 13424 (1985).
20. K. Garlid and A. Beavis, *J. Biol. Chem.* **260** (25), 13434 (1985).
21. G. Gotterer, T. Thompson, and A. Lehninger, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, 15 (1961).
22. S. Massari, *J. Biol. Chem.* **271**, (50), 31942 (1996).
23. M. Reiss, A. Costa, R. Carlson, et al., *Anesthesia and Analgesia* **106** (4), 1049 (2008).

On the “Swelling” of Mitochondria under Palmitic Acid, Calcium, and Hypotension

D.N. Kurdukov and N.L. Vekshin

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The high-amplitude swelling of mitochondria is critically considered. In contrast to the numerous statements of some authors about a marked swelling of isolated liver mitochondria under the influence of palmitic acid, calcium ions or hypotension, we have shown that mitochondria are generally not subject to high-amplitude swelling. According to optical microscopy data even during long-lasting incubation when fully hypotension (distilled water) takes place, the size of liver mitochondria (approximately 1 μm) can be enlarged no more than by 40%. Under short-lasting hypotension or adding palmitic acid, mitochondrial diameter becomes greater only by 20% or remains virtually unchanged. The light scattering of the mitochondrial suspension measured using a photometer as to the fall of optical density goes down by 2.5 times. A decrease in the light scattering in hypotension or adding palmitic acid or calcium (in isotonic medium) occurs not due to the swelling of mitochondria, as previously thought, but because of the damage (even destruction) of their outer membrane. The inner membrane is not significantly expanded. The destruction of the outer membrane reduces the probability of light scattering by each mitochondrion at the boundary layer of water/membrane interface. Release of substances from the matrix, resulting in a decrease of its refractive index, may additionally contribute to the drop in light scattering. Palmitic acid and calcium (at concentrations of 10–100 μM) cause permeabilization and disruption of the outer membrane gradually, for several minutes. Full hypotension activates this process very rapidly, within a fraction of a second. Under low ionic strength conditions, the addition of calcium leads to neutralization of negative charges on the membrane surface that induces aggregation of mitochondria, thus enhancing the light scattering and creating an illusion of mitochondrial swelling.

Key words: mitochondria, calcium, palmitic acid, hypotension, swelling, light scattering, aggregation