

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ИОНОВ Pr^{3+} И La^{3+} НА КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ ЛЯГУШКИ И В МИТОХОНДРИЯХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ

© 2016 г. С.М. Коротков, К.В. Соболев, И.В. Шемарова, В.В., Фураев, А.Р. Шумаков, В.П. Нестеров

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

E-mail: korotkov@SK1645.spb.edu

Поступила в редакцию 11.06.16 г.

Исследовано инотропное действие ионов Pr^{3+} и La^{3+} на сердечную мышцу лягушки *Rana ridibunda*, а также их влияние на дыхание, набухание и потенциал ($\Delta\psi_{\text{мито}}$) на внутренней мембране нагруженных Ca^{2+} митохондрий сердца крысы, энергизованных глутаматом и малатом или сукцинатом в присутствии ротенона. Установлено, что 2 мМ Pr^{3+} в растворе Рингера достоверно снижает силу сердечных сокращений как спонтанных, так и вызванных электрической стимуляцией, а также обладает отрицательным хронотропным действием, снижая частоту спонтанных сокращений. Pr^{3+} и La^{3+} препятствовали снижению дыхания энергизованных митохондрий сердца крысы, разобщенных 2,4-динитрофенолом, набуханию этих органелл в солевых средах и уменьшению $\Delta\psi_{\text{мито}}$ на их внутренних мембранах, которые были индуцированы ионами Ca^{2+} . Торможение ионами La^{3+} и Pr^{3+} этих кальций-индуцированных эффектов может свидетельствовать о том, что эти металлы ингибируют открытие кальций-зависимого неспецифического канала во внутренней мембране митохондрий, открывающегося вследствие Ca^{2+} -перегрузки митохондрий. Полученные данные важны для лучшего понимания механизмов повреждающего действия редкоземельных элементов на Ca^{2+} -зависимые процессы в миокарде позвоночных.

Ключевые слова: миокард, инотропное действие, сокращение, редкоземельные металлы, Pr^{3+} , La^{3+} , Ca^{2+} , дыхание митохондрий, $\Delta\psi_{\text{мито}}$, позвоночные.

Празеодим (Pr^{3+}) и лантан (La^{3+}) принадлежат к цериевой группе редкоземельных элементов, действие которых на животных и человека изучено недостаточно [1–4]. В настоящее время значительно расширилась область применения лантаноидов в промышленности и медицине, включая диагностические исследования и брахитерапию [1,5]. Более того, по крайней мере два препарата, созданные на основе солей редкоземельных элементов и полиоксисоединений, а именно дималь (смесь салициловокислых солей празеодима и неодима) и эплан (на основе смеси солей лантана, глицерина и других сопутствующих компонентов) нашли широкое медицинское применение в качестве ранозаживляющих и антисептических средств [6,7]. Эти препараты требуют длительного применения, однако механизмы их возможного токсического действия на организм при пролонгированном режиме применения до конца не изучены. В

частности, в литературе отсутствуют сведения о влиянии веществ, в состав которых входят Pr^{3+} и La^{3+} , на сердечно-сосудистую систему. В связи с этим возникает необходимость исследовать механизмы возможной кардиотоксичности Pr^{3+} и La^{3+} и их влияния на сократимость миокарда и митохондрии клеток сердца, входящие в систему энергообеспечения миокарда.

Редкоземельные металлы обладают большим сродством к фосфолипидам и «фиксируют» мембраны клеток, блокируя ионные каналы, в том числе и потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы. Pr^{3+} и La^{3+} , наряду с изученными редкоземельными металлами, являются антагонистами Ca^{2+} [8], что позволяет рассматривать эти элементы в качестве возможных конкурентных блокаторов кальциевых каналов, локализованных в плазматической мембране и во внутренней мембране митохондрий кардиомиоцитов. Наличие высокой химической активности лантаноидов, особенно в форме наносоединений, и их способность образовывать прочные комплексные соединения [9] может служить осно-

Сокращение: МСК – митохондрии сердца крысы.

ванием для предположения о возможном цитотоксическом действии Pr^{3+} и La^{3+} на кардиомиоциты. К настоящему времени установлено, что некоторые соединения редкоземельных металлов, нашедшие применение в медицине, оказывают токсическое действие на клетки [10,11]. Некоторые авторы полагают, что механизм цитотоксического действия соединений этих металлов может быть связан с их повреждающим действием на плазматическую мембрану и мембраны митохондрий [12].

Ранее мы установили, что La^{3+} снижал амплитуду электростимулируемых сокращений препаратов сердца лягушки и стимулировал транспорт ионов K^+ в матрикс изолированных митохондрий сердца крысы (МСК) [13]. Однако до сих пор недостаточно изучено влияние ионов La^{3+} на набухание и дыхание митохондрий, а также на потенциал ($\Delta\Psi_{\text{мито}}$) на их внутренней мембране, т. е. на процессы, которые отражают работу потенциал-управляемых Ca^{2+} -каналов кардиомиоцитов и состояние кальциевых митохондриальных транспортеров. Не было изучено и влияние на сократимость миокарда и митохондрий ионов Pr^{3+} , аналога La^{3+} . Данная работа посвящена изучению действия Pr^{3+} на электростимулируемые и спонтанные сокращения миокарда лягушки, а также влияния Pr^{3+} и La^{3+} на набухание митохондрий сердца крысы в солевых средах, на $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ на внутренней мембране митохондрий, а также на скорости дыхания МСК, энергизованных глутаматом и малатом или сукцинатом в присутствии ротенона и находящихся в различных энергетических состояниях (базальном, третьем по Чансу или разобщенном 2,4-динитрофенолом).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрация и анализ параметров сокращения. Для изучения сокращений, вызванных электрической стимуляцией, использовали препараты сердца лягушки *Rana ridibunda*, как описано ранее [14]. Препараты из сердца лягушки представляли собой кольцо, иссеченное из средней и нижней частей желудочка сердца, используемых для электрической стимуляции, а также сегменты предсердий, используемых для спонтанного сокращения. Препараты растягивали до оптимальной длины и регистрировали сокращения в изометрическом режиме. Стимуляцию проводили электрическими импульсами сверхпороговой амплитуды (7–10 В) с частотой один импульс в две минуты (0,008 Гц), длительностью импульса 1–2 мс, через платиновые электроды. Препараты помещали в стеклянную термостатированную ячейку при 10°C, ориен-

тировали вертикально, и растягивали с помощью стальных крючков, сделанных из мандрена. Один стальной крючок присоединяли к фиксированному платиновому крючку, второй – к тензодатчику. Сигналы обрабатывали с помощью компьютерной программы WinPulse, силу сокращения определяли в ньютонах. Оценивали следующие параметры сокращения: максимальное усилие, развиваемое мышечным препаратом (F_{max} , мН), и период полурасслабления ($t_{1/2}$, с). В экспериментах использовали нормальный раствор Рингера, содержащий 110 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ CaCl_2 , 0,75 мМ NaH_2PO_4 , 0,5 мМ NaHCO_3 , 5 мМ глюкозы (рН 7,4). Хлорид празеодима (Pr^{3+}) готовили в виде 100 мМ сток-раствора и вносили в экспериментальный раствор до конечных концентраций 1–2 мМ непосредственно перед экспериментом. Действие Pr^{3+} прекращали путем отмывания препарата нормальным раствором Рингера. Применяли стандартные способы статистической обработки результатов с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Изоляция митохондрий. Для выделения митохондрий сердца крысы использовали самцов линии Вистар массой 200–250 г. Изоляцию МСК проводили на льду согласно разработанной нами методике [15]. На завершающем этапе МСК суспендировали в 3 мл среды, содержащей 300 мМ сахарозы и 10 мМ трис-HCl (рН 7,3). Концентрацию митохондриального белка, находящуюся в пределах 20–30 мг/мл, определяли по методу Бредфорда. В работе использовали сахарозу, очищенную от примесей катионов на ионообменной колонке со смолой КУ-2-8; 2,4-динитрофенол марки ч.д.а.; маннитол, CaCl_2 , PrCl_3 , LaCl_3 , NH_4NO_3 , К-ацетат и H_3PO_4 марки х.ч. Сафранин, трис-ОН, KCl, олигомицин, ротенон, АДФ, глутамат, малат, сукцинат, MgCl_2 , MOPS и ЭГТА были получены от фирмы Sigma (США).

Измерение поглощения кислорода. Скорости дыхания митохондрий (нг-атом О/мин-мг белка) измеряли полярографическим методом с применением закрытого платинового электрода Кларка на анализаторе Эксперт-001 (НПО «Эконикс эксперт», Москва, Россия) в ячейке объемом 1,4 мл при 26°C. Митохондрии (1 мг белка в 1 мл) добавляли в среду, содержащую 125 мМ KCl, 20 мМ трис-MOPS (рН 7,3), 3 мМ трис- PO_4 , 5 мкМ ЭГТА, а также 10 мМ глутамата и 2 мМ малата (рис. 3а) или 5 мМ сукцината и 2 мкМ ротенона (рис. 3б). После митохондрий в среду добавляли (показано стрелками) вещества до следующих конечных концентраций: 100 мкМ Ca^{2+} , 25 мкМ Pr^{3+} ,

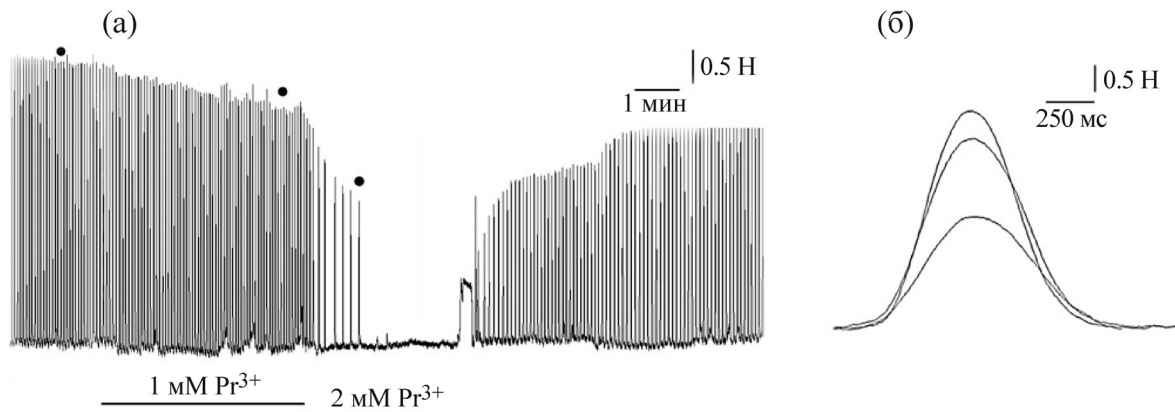


Рис. 1. Влияние 1 и 2 мМ Pr^{3+} на спонтанное сокращение предсердий лягушки. Регистрация сокращения при различных временных интервалах. Полная схема опыта (а), одиночные сокращения (б). Время действия и концентрации Pr^{3+} обозначены горизонтальными линиями под регистрацией сокращения. Черными кружками на рис. (а) отмечены одиночные сокращения, представленные на рис. (б).

25 мкМ La^{3+} , 300 мкМ АДФ и 15 мкМ динитрофенола.

Спектрофотометрическая оценка изменения объема митохондрий. Ионную проницаемость внутренней митохондриальной мембраны изучали на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 540 нм по стандартной методике [9]. Набухание митохондрий, обусловленное поступлением электролитов в матрикс и сопровождающееся уменьшением оптической плотности митохондриальной суспензии, регистрировали при температуре 20°C. Митохондрии (1 мг белка на мл) вносили в среду, содержащую 5 мМ трис-НСI (рН 7,3) и 125 мМ NH_4NO_3 (рис. 4) или 100 мМ сахарозы, 10 мМ трис-НСI (рН 7,3) и 25 мМ К-ацетата (рис. 5), а также 2 мкМ ротенона (рис. 4а,5) и 1 мкг/мл олигомицина. До митохондрий вносили вещества до следующих концентраций: 50 мкМ Pr^{3+} и 200 мкМ Ca^{2+} (рис. 4а,5) или 35 мкМ Pr^{3+} , 35 мкМ La^{3+} и 150 мкМ Ca^{2+} (рис. 4б). После митохондрий в среду вносили: 5 мМ сукцината (рис. 4а, 5) или 10 мМ глутамата и 2 мМ малата (рис. 4б).

Определение митохондриального потенциала. Потенциал на внутренней мембране МСК (рис. 6) измеряли по стандартной методике [15] при 20°C на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (Shimadzu, Япония) по изменению интенсивности флуоресценции сафранина при возбуждающей длине волны 485 нм и регистрируемой длине 590 нм. Митохондрии (0,5 мг белка в 1 мл) добавляли в кварцевую кювету с 3 мл среды, содержащей 125 мМ КСI, 10 мМ трис-НСI (рН 7,3), 50 мМ сахарозы, 3 мМ трис- PO_4 , 3 мМ MgCl_2 , 3 мкМ сафранина, 2 мкМ ротенона (рис. 6а) и 1 мкг/мл олигомицина. После митохондрий (показано стрелками) в среду добавляли вещества до следующих конечных концен-

траций: 10 мМ глутамата и 2 мМ малата, 5 мМ сукцината, 250 мкМ Ca^{2+} , 60 мкМ Pr^{3+} , 60 мкМ La^{3+} и 30 мкМ динитрофенола. На рис. 3–6 показан типичный результат, полученный для трех независимых экспериментов. Выбор используемых в настоящей работе концентраций Pr^{3+} и Ca^{2+} основывался на результатах наших опытов с препаратами желудочков сердца лягушки и изолированными митохондриями сердца крысы [12–16]. Применяли стандартные способы статистической обработки результатов с использованием статистической программы «Microsoft Origin 6.0». Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие Pr^{3+} на силу сердечных сокращений. Инотропное действие хлорида празеодима определяли на изолированных препаратах предсердия сердца лягушки в условиях спонтанного возбуждения/сокращения. Установлено, что ионы Pr^{3+} в концентрациях 1 и 2 мМ в растворе Рингера снижали амплитуду спонтанных сердечных сокращений (F_{max}) на $12 \pm 4\%$ ($n = 4$) и на $33 \pm 5\%$ ($n = 4$, $p < 0.01$) соответственно (рис. 1). При этом период полурасслабления увеличивался незначительно; на $4 \pm 3\%$ и $10 \pm 5\%$ соответственно. В двух из четырех экспериментов Pr^{3+} (2 мМ) полностью блокировал спонтанные сокращения предсердий (рис. 1а). Инотропное действие Pr^{3+} определяли также на изолированных препаратах желудочка сердца лягушки в условиях электрической стимуляции. Установлено, что Pr^{3+} в концентрации 2 мМ в растворе Рингера достоверно снижал амплитуду электростимулируемых сокращений желудочка (рис. 2). Как видно из рис. 2а, после добавления

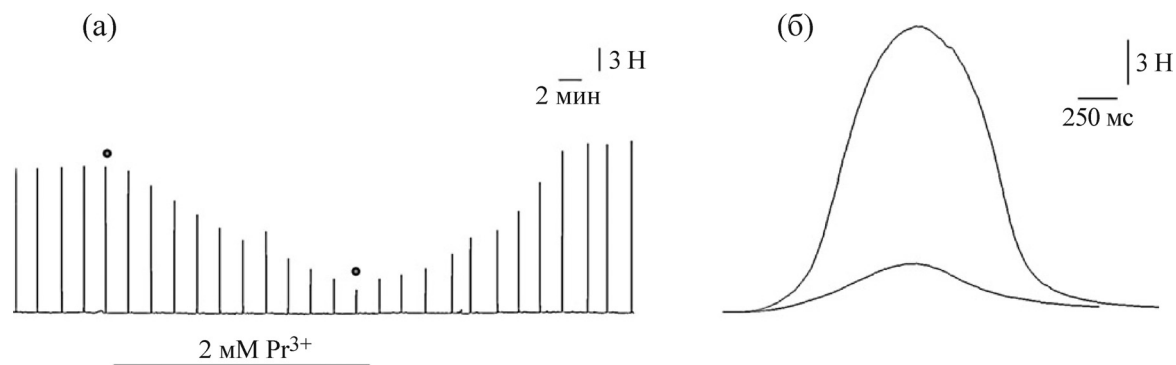


Рис. 2. Влияние 2 мМ Pr^{3+} на сокращение препаратов, выделенных из желудочка сердца лягушки и подвергнутых электрической стимуляции. Регистрация сокращения при различных временных интервалах. Полная схема опыта (а), одиночные сокращения (б). Время действия и концентрация Pr^{3+} обозначены горизонтальной линией под регистрацией сокращения. Черными кружками на рис. (а) отмечены сокращения, представленные на рис. (б).

Pr^{3+} в раствор амплитуда сокращений значительно снижалась и через 20 мин она составляла 17% от первоначальной величины, наблюдавшейся до аппликации Pr^{3+} . Среднее снижение амплитуды сокращений для четырех независимых экспериментов в течение 20–30 мин составляло $69 \pm 8\%$ ($n = 4$, $p < 0,01$) от первоначальной величины. При этом период полурасслабления в растворе с Pr^{3+} уменьшался на $20 \pm 15\%$. При отмывании препарата нормальным раствором Рингера наблюдали восстановление амплитуды сокращения. Полученные данные (рис. 1 и 2) свидетельствуют о том, что Pr^{3+} оказывает отрицательное инотропное действие на миокард. Следует отметить, что в условиях электрической стимуляции величина снижения амплитуды при действии 2 мМ Pr^{3+} была больше таковой при действии 2 мМ La^{3+} , для которого она составляла $48 \pm 8\%$ ($n = 5$) от максимальной [13]. Однако спонтанные сокращения в наших экспериментах оказались более устойчивыми к отрицательному инотропному действию Pr^{3+} , поскольку амплитуда сокращений снижалась меньше. Кроме того, во всех экспериментах было обнаружено дозозависимое урежение ритма сердечных сокращений. При этом в конечных концентрациях 1 и 2 мМ Pr^{3+} снижал частоту спонтанных сокращений на $14 \pm 8\%$ ($n = 4$) и $26 \pm 13\%$ ($n = 4$) соответственно. Выявленный отрицательный хронотропный эффект Pr^{3+} может быть обусловлен его ингибирующим действием на потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы пейсмекерных кардиомиоцитов синоатриального узла.

Известно, что концентрация свободных ионов кальция в цитозоле [Ca^{2+}], а также динамика его изменения внутри сердечной клетки определяют величину развиваемого напряжения и скорость сокращения/расслабления [17]. В на-

ших экспериментах Pr^{3+} подавлял сократимость миокарда, что, вероятно, является следствием уменьшения концентрации Ca^{2+} в цитозоле при аппликации хлорида празеодима. В кардиомиоцитах вход внеклеточного Ca^{2+} осуществляется преимущественно через потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы L-типа ($\text{Ca}_v1.2$) [17]. Блокирование этих каналов с помощью специфических блокаторов (верапамила, нифедипина) приводит к нарушению механизма запуска сокращения в сердечной мышце [18], осуществляемого по принципу Ca^{2+} -индуцированного высвобождения Ca^{2+} , к падению амплитуды F_{\max} и в результате к нарушению сердечной деятельности. В нашем случае 5 мкМ нифедипина полностью подавляло спонтанные сокращения предсердий (не показано), в то время как Pr^{3+} и другие представители группы лантаноидов даже в миллимолярных концентрациях подавляли спонтанные сокращения лишь частично.

В имеющейся литературе нет указаний на механизм действия Pr^{3+} как на кальциевые каналы плазматической мембраны в кардиомиоцитах, так и на сокращение кардиомиоцитов. Предполагается, что в электровозбудимых клетках лантаноиды блокируют входящие Ca^{2+} -токи, активируемые деполяризацией поверхностной мембраны [19]. Сравнение влияния хлорида празеодима и хлористого лантана на параметры сокращения кардиомиоцитов выявило сходство в ингибирующем действии этих соединений, что может свидетельствовать об общем механизме их блокирующего действия на $\text{Ca}_v1.2$. Полученные результаты могут свидетельствовать о возможном действии Pr^{3+} на потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы сократительных и пейсмекерных кардиомиоцитов, что выражается в уменьшении F_{\max} как спонтанно сокращающихся, так и электрически стимулируемых пре-

паратов, а также в снижении частоты спонтанных сокращений. Ионы Pr^{3+} практически не влияли на время полурасслабления сердечной мышцы, что может свидетельствовать о том, что Pr^{3+} не влияет на реабсорбцию кальция из цитозоля.

Не исключено, что отрицательный инотропный эффект Pr^{3+} мог быть обусловлен не только его конкурентным действием на кальциевые каналы плазматической мембраны, но и влиянием на кальциевые транспортеры митохондрий кардиомиоцитов. В этой связи представлялось важным определить влияние Pr^{3+} на функциональное состояние митохондрий и установить его действие на катионный транспорт через внутренние мембраны митохондрий.

Ранее мы обнаружили, что иттрий не оказывал заметного влияния на дыхание изолированных митохондрий кардиомиоцитов [20]. Однако учитывая физико-химические различия этих двух металлов [21], можно предположить и наличие у них разной биологической активности.

Учитывая наши экспериментальные данные и данные литературы о блокирующем действии лантаноидов на потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы [12,13,20,22], мы предположили, что в кардиомиоцитах празеодим, подобно действию Y^{3+} и La^{3+} [12,13], может оказывать заметное влияние на кальций-зависимые процессы в митохондриях и, в частности, ингибировать митохондриальный Ca^{2+} -унипортер и влиять на дыхание митохондрий, находящихся в различных энергетических состояниях.

Действие Pr^{3+} и La^{3+} на дыхание митохондрий. На рис. 3 можно видеть, что Pr^{3+} и La^{3+} незначительно активировали базальное дыхание МСК, энергизованных глутаматом и малатом (рис. 3а, кривые 2, 3, 5 и 6) или сукцинатом в присутствии ротенона (рис. 3б, кривые 2 и 4). При этом данные элементы не влияли на дыхание МСК, находящихся в состоянии 3 или разобщенных динитрофенолом (рис. 3а, кривые 2 и 3 и рис. 3б, кривая 2), по сравнению с контролем (рис. 3а и 3б, кривая 1). После добавления ионов Ca^{2+} в среду (рис. 3а, кривая 4 и рис. 3б, кривая 3) наблюдалась кратковременная активация базального дыхания, связанная с потенциал-зависимым поступлением Ca^{2+} в матрикс, с последующим снижением дыхания МСК в состоянии 3 или разобщенных динитрофенолом. В опытах, когда Pr^{3+} (рис. 3а, кривая 5 и рис. 3б, кривая 4) или La^{3+} (рис. 3а, кривая 6) вносили до Ca^{2+} , упомянутое выше снижение дыхания МСК, находящихся в состоянии 3 или разобщенных динитрофенолом, было не столь значительно по сравнению с

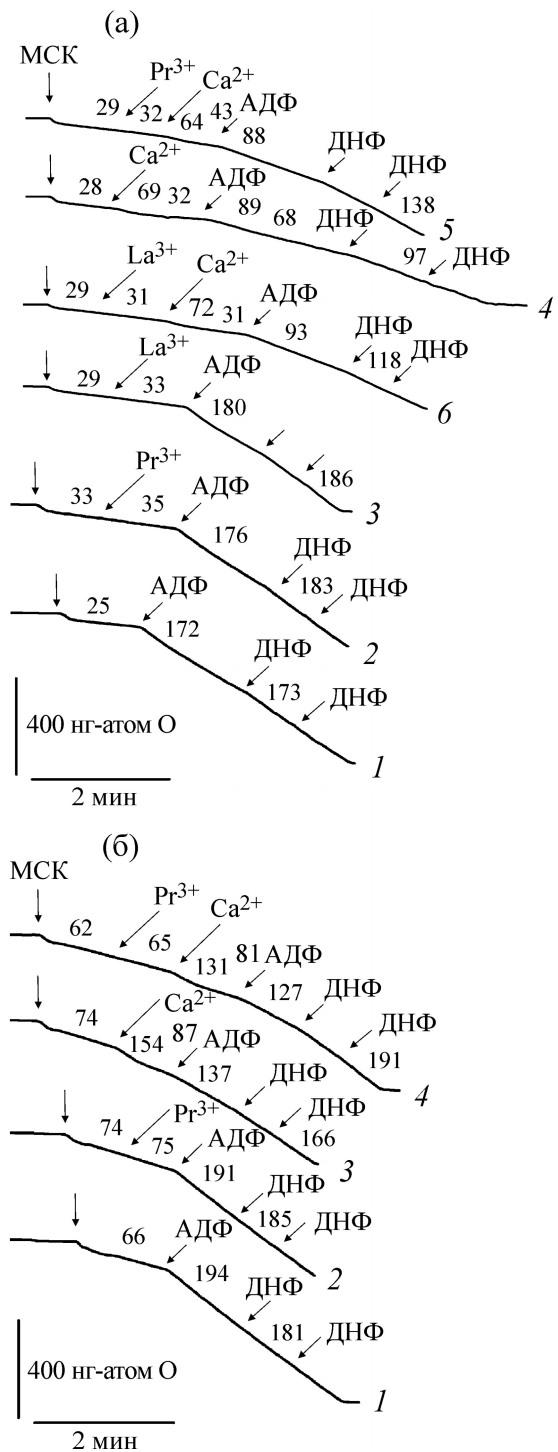


Рис. 3. Влияние Pr^{3+} , La^{3+} и Ca^{2+} на скорости поглощения кислорода митохондриями сердца крысы, энергизованными глутаматом и малатом (а) или сукцинатом (б). Стрелками показаны добавки митохондрий, АДФ, Pr^{3+} , La^{3+} , Ca^{2+} и 2,4-динитрофенола (ДНФ). Цифрами над кривыми обозначены скорости поглощения кислорода (нг-атом О/мин-мг белка). Состав среды и концентрации добавок более подробно указаны в тексте. Среднеквадратичное отклонение скоростей было в пределах 5% ($p < 0,05$).

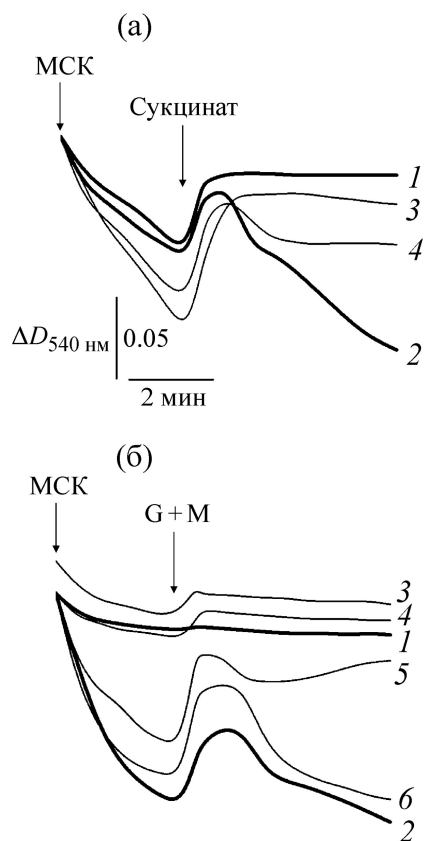


Рис. 4. Влияние Pr^{3+} , La^{3+} и Ca^{2+} на набухание митохондрий сердца крысы в среде с NH_4NO_3 . Митохондрии (1 мг/мл белка) добавляли в среду, содержащую 125 мМ NH_4NO_3 и 2 мкМ ротенона (рис. 4а). Вертикальными стрелками показаны добавки митохондрий, сукцината, глутамата и малата (G + M). Цифрами справа от кривых показаны добавки до митохондрий на рис. (а): 1 – без добавок (контроль), 2 – Ca^{2+} , 3 – Pr^{3+} , 4 – Ca^{2+} и Pr^{3+} ; на рис. (б): 1 – без добавок (контроль), 2 – Ca^{2+} , 3 – Pr^{3+} , 4 – La^{3+} , 5 – Ca^{2+} и Pr^{3+} , 6 – Ca^{2+} и La^{3+} . Состав среды и концентрации добавок более подробно указаны в тексте.

действием одного Ca^{2+} (рис. 3а, кривая 4 и рис. 3б, кривая 3). Полученные результаты позволяют сделать предположение о различных механизмах действия лантаноидов (Pr^{3+} и La^{3+}) и Ca^{2+} на МСК. Обнаруженное нами некоторое ускорение базального дыхания МСК в опытах с Pr^{3+} и La^{3+} , как и в опытах с Y^{3+} и Ni^{2+} [12,20,22], связано, по-видимому, с активацией этими металлами транспорта ионов K^+ и Tl^+ (калиевого суррогата) в матрикс митохондрий [13,23]. Отсутствие эффекта Pr^{3+} и La^{3+} на дыхание митохондрий в состоянии 3 или в присутствии динитрофенола в опытах без кальция (рис. 3) не позволяет говорить о каком-либо токсическом эффекте этих лантаноидов на МСК в отличие от действия Cd^{2+} , заметно угнетающего дыхание фосфорилирующих митохондрий

в подобных экспериментах [16]. С другой стороны, снижение скоростей дыхания митохондрий, находящихся в состоянии 3 по Чансу или разобщенных динитрофенолом, в опытах с Ca^{2+} , скорее всего, связано с набуханием митохондрий [15] и с активацией кальций-зависимого неспецифического канала в их внутренней мембране [15,24,25]. Для того чтобы проверить это предположение, мы исследовали влияние Pr^{3+} и La^{3+} на набухание митохондрий в солевых средах (рис. 4 и 5).

Действие Pr^{3+} и La^{3+} на набухание митохондрий. Набухание неэнергизованных митохондрий в среде с NH_4NO_3 позволяет оценить пассивную протонную проницаемость их внутренней мембраны [26]. По сравнению с контролем (рис. 4а, кривая 1) набухание неэнергизованных МСК в присутствии ротенона было сильнее в среде с NH_4NO_3 , содержащей Pr^{3+} (рис. 4а, кривая 3) или La^{3+} [13]. Подобное ускорение набухания в этих средах было нами показано для нагруженных ионами Na^+ неэнергизованных митохондрий печени [27] и сердца крысы [28]. Отсутствие такого эффекта Pr^{3+} и La^{3+} в этой среде без ротенона (рис. 4б) может быть связано с наличием в МСК эндогенных субстратов, препятствующих набуханию митохондрий за счет откачки протонов из матрикса. Далее независимо от использованного субстрата и наличия или отсутствия в среде Pr^{3+} или La^{3+} энергизованные МСК сжимались (рис. 4а, кривая 3 и рис. 4б, кривые 3 и 4) из-за откачки протонов из матрикса [26] и объем этих оргanelл практически не отличался от контроля (рис. 4а и 4б, кривая 1). Набухание деэнергизованных митохондрий в среде с Ca^{2+} соответственно не отличалось от контроля в присутствии ротенона (рис. 4а, кривые 1 и 2). Однако набухание деэнергизованных МСК заметно возросло в среде без ротенона (рис. 4б, кривая 2), очевидно, из-за открытия кальций-зависимых неспецифических каналов во внутренних мембранах митохондрий, что, в свою очередь, может быть связано с поступлением Ca^{2+} в матрикс из-за наличия эндогенных субстратов в матриксе этих митохондрий. Энергизация МСК в среде с Ca^{2+} и ротеноном (рис. 4а, кривая 2) или с Ca^{2+} без ротенона (рис. 4б, кривая 2) стимулировала массивное набухание митохондрий. Pr^{3+} (рис. 4а, кривая 4 и рис. 4б, кривая 5) и в меньшей степени La^{3+} (рис. 4б, кривая 6) препятствовали стимулируемому ионами Ca^{2+} набуханию энергизованных митохондрий в среде с NH_4NO_3 . С другой стороны, набухание энергизованных митохондрий в гипоосмотической среде с K^+ -ацетатом и сахарозой происходит вследствие энергозависимого транспорта

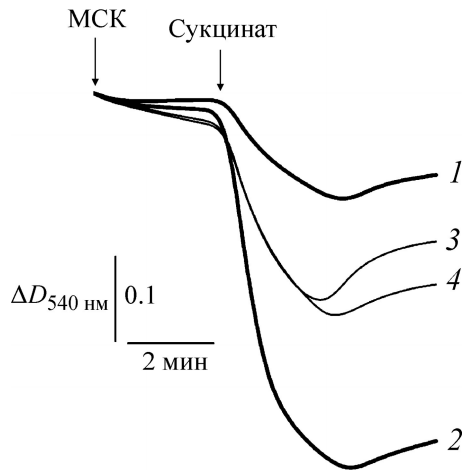


Рис. 5. Влияние Pr^{3+} и Ca^{2+} на набухание митохондрий сердца крысы в среде с К-ацетатом и сахарозой. Митохондрии (1 мг/мл белка) добавляли в среду, содержащую 25 мМ К-ацетат, 100 мМ сахарозы и 2 мкМ ротенона. Вертикальными стрелками показаны добавки митохондрий и сукцината. Цифрами справа от кривых показана добавки до митохондрий: 1 – без добавок (контроль), 2 – Ca^{2+} , 3 – Pr^{3+} , 4 – Ca^{2+} и Pr^{3+} . Состав среды и концентрации добавок более подробно указаны в тексте.

K^+ в матрикс, идущего по механизму электрофоретического унипорта [13]. В этом случае свободно проникающая через внутреннюю мембрану уксусная кислота диссоциирует в матриксе на анион ацетата и ионы водорода, которые удаляются из матрикса протонными помпами электрон-транспортной цепи. На рис. 5 можно видеть, что набухание энергизованных сукцинатом МСК заметно ускорилось в среде с Ca^{2+} (кривая 2) по сравнению с контролем (кривая 1). Набухание этих митохондрий было сильнее в среде с Pr^{3+} независимо от наличия в ней Ca^{2+} (рис. 5, кривые 3 и 4), но оно было меньше набухания в опытах с одним Ca^{2+} (рис. 5, кривая 2). Полученные данные позволяют предположить, что стимулированное ионами Pr^{3+} ускорение набухания дезэнергизованных МСК в среде с NH_4NO_3 и набухания энергизованных митохондрий в среде К-ацетатом может быть соответственно связано с увеличением протонной и калиевой проницаемости внутренних мембран под действием этого элемента. Торможение ионами Pr^{3+} и La^{3+} набухания энергизованных МСК в этих средах с Ca^{2+} может быть обусловлено конкурентным ингибированием митохондриального кальциевого унипортера этими ионами. Это, в свою очередь, может уменьшать поступление Ca^{2+} в матрикс митохондрий и снижать вероятность открытия кальций-зависимого неспецифического канала во внутренней мембране.

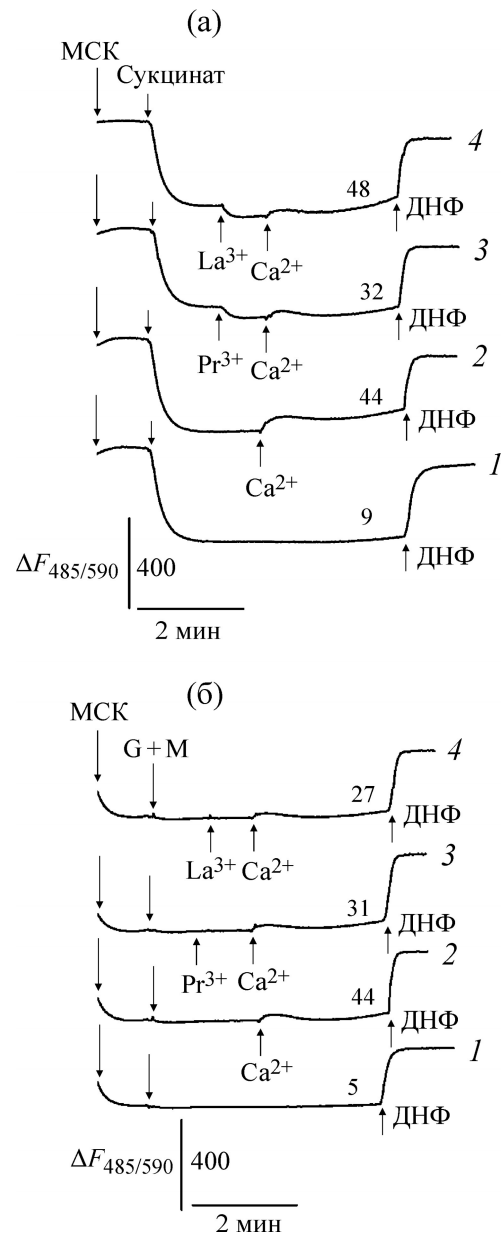


Рис. 6. Действие Pr^{3+} , La^{3+} и Ca^{2+} на интенсивность флуоресценции сафранина в суспензии митохондрий сердца крысы, энергизованных сукцинатом (а) или глутаматом и малатом (б). Митохондрии (0,5 мг/мл белка) добавляли в среду, содержащую 125 мМ КСl, 3 мкМ сафранина и 2 мкМ ротенона (рис. 6а). Стрелками показаны добавки сукцината, глутамата с малатом (G+M), Pr^{3+} , La^{3+} , Ca^{2+} и 2,4-динитрофенола (ДНФ). Над кривыми показаны скорости Ca^{2+} -индуцированного рассеивания флуоресценции (усл. ед./мин). Среднеквадратичное отклонение величины флуоресценции было в пределах 8% ($p < 0,05$).

Действие Pr^{3+} и La^{3+} на митохондриальный потенциал. На рис. 6 показаны результаты экспериментов по изучению влияния Pr^{3+} и La^{3+} на Ca^{2+} -индуцированное снижение $\Delta\Psi_{\text{мито}}$. Из

представленных на рисунке данных видно, что последующая добавка в среду сукцината (рис. 6а) или наличие эндогенных субстратов с последующей добавкой глутамата с малатом (рис. 6б) стимулировали потенциал-зависимое поглощение сафранина митохондриями, что доказывает развитие потенциала на внутренней мембране (кривые 1). Последующая добавка Pr^{3+} (рис. 6а и 6б, кривая 3) или La^{3+} (рис. 6а и 6б, кривая 4) не оказывала никакого влияния на этот потенциал. После добавки в среду Ca^{2+} (рис. 6а и 6б, кривая 2) происходило кратковременное повышение флуоресценции сафранина, связанное с потенциал-зависимым поглощением Ca^{2+} энергизованными митохондриями [23]. Далее наблюдалось Ca^{2+} -индуцированное снижение $\Delta\psi_{\text{мито}}$, связанное с выходом сафранина в среду из-за открытия кальций-зависимого неспецифического канала во внутренних мембранах митохондрий [15,20,23,29]. Внесенные в среду до Ca^{2+} празеодим (рис. 6а и 6б, кривая 3) и лантан (рис. 6а и 6б, кривая 4) нивелировали кратковременное Ca^{2+} -индуцированное снижение потенциала, а также тормозили за исключением La^{3+} в опытах с сукцинатом (рис. 6а, кривая 4) последующий выход сафранина из митохондрий, что хорошо видно при сравнении скоростей Ca^{2+} -индуцированного увеличения сигнала сафранина опытных и контрольных проб (рис. 5а и 5б, кривые 2). Торможение Pr^{3+} и La^{3+} кальций-зависимого кратковременного снижения потенциала и скорости Ca^{2+} -индуцированного выхода сафранина из митохондрий можно объяснить уменьшением транспорта Ca^{2+} в матрикс МСК за счет конкурентного ингибирования этими лантаноидами митохондриального Ca^{2+} -унипортера и, как следствие, последующего ингибирования Ca^{2+} -индуцированного открытия кальций-зависимого неспецифического канала во внутренней мембране МСК [12,13,15,20,23,24,29].

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что ионы Pr^{3+} и La^{3+} обладают отрицательным инотропным и хронотропным эффектами при спонтанном сокращении миокарда (предсердия) и сокращении, вызванном электрической стимуляцией (желудочек). Кроме того, Pr^{3+} и La^{3+} увеличивают ионную проницаемость внутренней мембраны митохондрий, оказывают блокирующее действие на энергозависимый транспорт Ca^{2+} в митохондрии, но при этом не оказывают заметного влияния на дыхание изолированных митохондрий. Сочетание этих эффектов Pr^{3+} и La^{3+} на функции кардиомиоцитов может послужить причиной снижения сократимости сердечной мышцы

при попадании солей празеодима и лантана в организм.

Исследования по определению митохондриального потенциала проводили на базе Центра коллективного пользования в ИЭФБ РАН.

Авторы благодарят с.н.с. И.В. Брайловскую за помощь при выделении митохондрий, а также при исследовании скоростей поглощения кислорода на внутренней митохондриальной мембране, вед. инж. А. Бурдыгина за создание программы для регистрации и обработки данных по сокращению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Bakht, H. Jabal-Ameli, S. Ahmadi, et al., *Ann. Nucl. Med.* **26**, 412 (2012).
2. A. Schwabe, U. Meyer, G. Flachowsky, and S. Dänicke, *Arch. Anim. Nutr.* **65**, 55 (2011).
3. W. Hill, R. Rivers, and M. Zeidel, *J. Gen. Physiol.* **114**, 405 (1999).
4. D. Godin and J. Frohlich, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **31**, 555, (1981).
5. Г. Барашков, *Медицинская бионеорганика. Основы, аналитика, клиника* (Москва, 2011).
6. А. Зимаков, *Казанский мед. журн.* **57**, 268, (1976).
7. Ю. Перламутров, *Автореф. дис. докт. мед. наук*, (Санкт-Петербург, 2005).
8. А. В. Амелин, Ю. Д. Игнатов, Н. Н. Петрищев, и др. *Нарушения системы гемостаза и их фармакологическая коррекция* (Санкт-Петербург, 2000).
9. D. D. Perrin, *Stability Constants of Metal-ion Complexes, Organic ligands* (Pergamon Press, 1979).
10. V. Selvaraj, S. Bodapati, E. Murray, et al., *Int. J. Nanomedicine* **9**, 1379, (2014).
11. J. D. Sisler, S. V. Pirela, J. Shaffer, et al., *Cells Toxicol. Sci.* **150**, 418, (2016).
12. И. В. Шемарова, К. В. Соболев, С. М. Коротков и В. П. Нестеров, *Журн. эволюц. биохимии и физиологии* **50**, 196, (2014).
13. И. В. Шемарова, С. М. Коротков и В. П. Нестеров, *Журн. эволюц. биохимии и физиологии* **49**, 285, (2013).
14. К. В. Соболев, С. М. Коротков и В. П. Нестеров, *Биофизика* **59**, 959, (2014).
15. С. М. Коротков, Л. В. Емельянова, И. В. Брайловская и В.П. Нестеров, *Докл. РАН* **443**, 632, (2012).
16. И. В. Шемарова, С. М. Коротков и В. П. Нестеров, *Журн. эволюц. биохимии и физиологии* **47**, 306, (2011).
17. D. M. Bers, *Nature* **415**, 198, (2002).
18. R. L. Talbert and H. I. Bussey, *Clin. Pharm.* **2**, 403, (1983).
19. B. A. Biagi and J. J. Eneyart, *Am. J. Physiol.* **259**, 515 (1990).

20. С. М. Коротков, К. В. Соболев, И. В. Шемарова и др., Журн. эволюц. биохимии и физиологии **52**, 177, (2016).
21. K. A. Gschneidner, J. C. G. Bünzli, and V. K. Pecharsky, *Handbook of the Physics and Chemistry of Rare Earths* (North Holland, 2011).
22. И. В. Шемарова, С. М. Коротков, И. Н. Демина и В. П. Нестеров, Журн. эволюц. биохимии и физиологии **46**, 138, (2010).
23. S. Korotkov, S. Konovalova, L. Emelyanova, and I. Brailovskaya, *J. Inorg. Biochem.* **141**, 1, (2014).
24. I. Szabo and M. Zoratti, *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 111, (1999).
25. J. Hüser and L.A. Blatter, *Biochem. J.* **343**, 311, (1999).
26. G. P. Brierley, M. Jurkowitz, K. M. Scott, and A. J. Merola, *J. Biol. Chem.* **245**, 5404, (1970).
27. С. М. Коротков, В. В. Глазунов и Е. Р. Никитина, Цитология **39**, 1046, (1997).
28. С. М. Коротков, В. П. Нестеров и И. Н. Демина, Докл. РАН **424**, 827, (2009).
29. S. M. Korotkov, V. P. Nesterov, I. V. Brailovskaya, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.* **45**, 531, (2013).

Comparative Study of Effect of Pr³⁺ and La³⁺ Ions on Calcium-Dependent Processes in Frog Cardiac Muscle and Rat Heart Mitochondria

S.M. Korotkov, K.V. Sobol, I.V. Shemarova, V.V. Furaev,
A.R. Shumakov, and V.P. Nesterov

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
prosp. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

The inotropic effect of Pr³⁺ and La³⁺ ions on heart muscle of frog *Rana ridibunda* as well as the ions influence on respiration, swelling and potential ($\Delta\Psi_{\text{mito}}$) on the inner membrane of Ca²⁺-loaded rat heart mitochondria, energized by glutamate and malate or succinate in the presence of rotenone were studied. It was found that 2 mM Pr³⁺, injected in Ringer solution, reduces the force of spontaneous and induced by electrical stimulation contractions in the heart and also has a negative chronotropic effect decreasing the frequency of spontaneous contractions. Pr³⁺ and La³⁺ prevented a decrease in 2,4-dinitrophenol (DNP)-uncoupled respiration rate of energized rat heart mitochondria, swelling of these organelles in salt media and a reduction in $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ on the inner mitochondrial membrane which were induced by Ca²⁺ ions. Retardation by Pr³⁺ and La³⁺ ions of these calcium-induced effects may suggest that these metals inhibit in the inner mitochondrial membrane the opening of a calcium-dependent nonspecific channel caused by Ca²⁺ overload of mitochondria. Data obtained are important for a better understanding of mechanisms in the damaging action of rare earth elements on Ca²⁺-dependent processes in vertebrate myocardium.

Key words: myocardium, inotropic effect, contraction, rare earth metals, Pr³⁺, La³⁺, Ca²⁺, mitochondrial respiration, $\Delta\Psi_{\text{mito}}$, vertebrates