

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АКОНИТАЗЫ ФТОРАЦЕТАТОМ

© В. П. Зинченко,¹ Н. В. Гончаров,^{2,*} В. В. Теплова,³ В. А. Касымов,¹ О. И. Петрова,¹ А. В. Березнов,¹ Е. В. Сенченков,² И. В. Миндукушев,⁴ Р. О. Дженкинс,⁵ А. С. Радилков²

¹ Институт биофизики клетки РАН, Пущино,

² НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, Санкт-Петербург,

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,

⁴ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург,

и ⁵ Демонфортский университет, Лейстер, Великобритания;

* электронный адрес: nvgoncharov@mail.ru

Митохондриальная аконитаза инактивируется при действии многих химических соединений и критических состояний. Фторацетат (ФА) — наиболее известное токсическое соединение, ингибирующее аконитазу. Биохимия токсического действия ФА довольно хорошо изучена, однако за 60 лет исследований не найдено эффективной терапии. С целью поиска новых подходов к разработке возможных антидотов были проведены эксперименты *in vitro* с митохондриями печени крысы, клетками асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и кардиомиоцитами при действии ФА или фторцитрата (ФЦ). ФА вызывает эффекты при более высоких концентрациях по сравнению с ФЦ, а в экспериментах с митохондриями эти эффекты зависят от дыхательных субстратов: с пируватом в качестве дыхательного субстрата ФА вызывает медленное окисление и (или) утечку пиридиновых нуклеотидов (ПН) и ингибирование дыхания. Окисление ПН предотвращается циклоспорином А. Исследование уровня ПН и динамики $[Ca^{2+}]$ в клетках АКЭ при активации АТФ также выявили утечку ПН из митохондрий, которая приводит к смещению баланса митохондриального и цитозольного NAD(P)H при воздействии ФА. Кроме того, выявлено повышение $[Ca^{2+}]$ в цитозоле при действии на клетки ФА, которое объясняется активацией Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны; этот механизм может иметь влияние на амплитуду и скорость кальциевых волн в кардиомиоцитах при действии ФА. Подчеркивая взаимосвязь динамики и баланса внутриклеточных ПН и кальция, мы обсуждаем пути возможной модуляции метаболизма в контексте разработки эффективной терапии при интоксикации ФА и другими ингибиторами аконитазы.

Ключевые слова: фторацетат, внутриклеточный кальций, пиридиновые нуклеотиды, митохондрии, мембранный потенциал.

Митохондриальная аконитаза (мАк) — весьма уязвимое звено цикла Кребса. Было показано, что она инактивируется активными формами кислорода (АКФ) и оксидом азота (NO) (Gardner et al., 1994; Andersson et al., 1998), кислородно-глюкозным голоданием и избытком нейромедиаторов (Li et al., 2001), а также косвенным путем при действии тетрафторэтилена (James et al., 2002). Однако наиболее известным и хорошо изученным ингибитором аконитазы является фторацетат (ФА). Изучение биохимии и токсикологии ФА поможет понять особенности гибели клеток и возникновения патологии на системном уровне.

ФА — это большой ряд высокотоксичных химических соединений с общей формулой CH_2FCOOR . Механизм токсического действия ФА изучен достаточно хорошо (Goncharov et al., 2006). Превращение ФА во фторцитрат (ФЦ) ведет к ингибированию мАк с последующим накоплением цитрата (Pattison, 1959; Buffa et al., 1973). Повышение уровня клеточного цитрата приводит к нарушениям метаболизма глюкозы вследствие ингибирования

фосфофруктокиназы (Bowman, 1964; Peters, 1972). Цитрат ингибирует гуанилатциклазу в гепатоцитах крысы (Dohi, Murad, 1981). В жировой ткани ФА уменьшает базальный и гормонстимулированный уровни циклического АМФ посредством ингибирования аденилатциклазы и не влияет на активность фосфодиэстеразы (Taylor et al., 1977). В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что при остром отравлении ФА уменьшается уровень АТФ в сердце и других органах и тканях (Bowman, 1964; Koenig, Patel, 1970; Cremer-Lacuara et al., 1980). Изменения концентрации АТФ не связаны с разобщением дыхания и фосфорилирования (Fairhurst et al., 1958; Stewart et al., 1970). Имеются данные о подавлении глюконеогенеза в гепатоцитах отравленных животных (Dickson, Langslow, 1977; Bannister, O'Neil, 1981); этот эффект связывают с уменьшением активности цикла Кребса, подавлением активности лактатдегидрогеназы, блокадой малатного челнока, накоплением NADH в цитоплазме и уменьшением щавелево-уксусной кислоты. При воздействии ФА наблюдаются структурные изменения различных органелл, прежде все-

го митохондрий (МХ): набухание МХ и потеря электронной плотности митохондриального матрикса, которые развиваются в течение нескольких минут; эти повреждения объясняются накоплением цитрата и ростом осмотического давления (Corsi, Granata, 1967), а также уменьшением производства энергии (Buffa, Pasquali-Ronchetti, 1977). Однако имеются данные о параметрах, на которые ФА не влияет. Например, ФА не изменяет содержания АТФ, ГТФ и циклических нуклеотидов в гепатоцитах *in vitro* (Dohi, Murad, 1981). МХ, выделенные из различных тканей крыс при интоксикации ФА, по-разному изменяли дыхательную активность в зависимости от того, какие дыхательные субстраты были добавлены в среду инкубации (Corsi, Granata, 1967; Buffa et al., 1973). В наших ранних экспериментах на МХ печени крысы *in vitro* было показано, что ФЦ полностью ингибировал поглощение кислорода на эндогенных субстратах (метаболическое состояние v_1) и сильно ингибировал поглощение кислорода в присутствии АДФ, Ca^{2+} и динитрофенола (Теплова и др., 1992). Синтез АТФ был также подавлен. Изменение редокс-состояния пиридиновых нуклеотидов (ПН), т. е. нарушение баланса окисленных и восстановленных форм ПН, мы считали главной причиной нарушения дыхания МХ. В присутствии ФЦ МХ лишь частично захватывали добавляемый кальций, после чего он высвобождался посредством электронейтрального $2H^+/Ca^{2+}$ -обменника.

В дальнейших экспериментах мы впервые продемонстрировали явление гиперчувствительности тромбоцитов к активатору пуриновых рецепторов АДФ при воздействии ФА, когда процесс агрегации развивается при очень низких концентрациях АДФ (10—15 нМ), с последующим переходом тромбоцитов в рефрактерное (нечувствительное) состояние (Mindukshev et al., 2006).

Несмотря на имеющиеся литературные и собственные данные, взаимоотношения сигнальных и метаболических путей клеток в норме и патологии остаются неясными. Ингибирование мАк приводит, с одной стороны, к ингибированию цикла Кребса, что может стать причиной дезэнергизации и гибели клеток, с другой — к накоплению цитрата, который может изменить баланс внутриклеточного Ca^{2+} и тем самым нарушить внутриклеточную сигнализацию, поэтому сложно предсказать первичную реакцию клеток разного типа и тем более организма. Это является главной причиной того, что до сих пор не решена одна из главных задач токсикологических исследований ФА — разработка эффективной терапии острых отравлений.

Цель настоящей работы — изучение внутриклеточных механизмов, которые могут быть связаны с нарушением баланса ПН и внутриклеточного кальция при действии ФА и ФЦ — ингибиторов цикла Кребса.

Материал и методика

Использованы следующие реактивы: натриевая соль ФА (синтезирована в НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, Санкт-Петербург); среда DMEM, солевой раствор Хенкса, эмбриональная телячья сыворотка (FBS), АДФ, АТФ и ФЦ (Sigma, США); ацетат натрия и ICN—HEPES (Merck, Германия); циклоспорин А, ротенон, олигомицин, carbonyl cyanide 4-trifluoro-methoxyphenylhydrazone (FCCP) и хлортетрациклин (ХТ) (Fluka, Швейцария); дигитонин (Calbiochem, США); Fluo-4 асе-

toxymethyl ester (Fluo-4AM), Indo-1AM, tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) и Pluronic (Molecular Probes, США); соли и глюкоза отечественного производства.

Выделение и исследование митохондрий печени крысы. Эксперименты были выполнены на МХ, выделенных из печени крысы по известному методу (Schneider, 1948). Дыхательные характеристики МХ были получены методом полярографии (Франк и др., 1973). Измерения проводили в термостатируемой ячейке (37 °С) со встроенным кислородным электродом. МХ инкубировали в среде, содержащей (в мМ): KCl — 120, KH_2PO_4 — 2, HEPES — 10, pH 7.4, а также дыхательные субстраты. Для изучения состояния ПН измеряли флуоресценцию NAD(P)H на флуориметре Hitachi F4000 при длинах волн возбуждения и эмиссии соответственно 340 и 460 нм. Величину EC_{50} (концентрацию действующего соединения, вызывающую 50%-ное действие) рассчитывали с использованием программы «Origin 7».

Изолирование и исследование клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). Клетки АКЭ выделяли на 7-е или 8-е сут после внутрибрюшинной трансплантации мышам NMRI/BALB. Клетки ($2 \cdot 10^7$ — $5 \cdot 10^7$ кл./мл) инкубировали с 2 мкМ Indo-1AM и 0.005 % Pluronic при 37 °С в течение 40 мин в растворе Хенкса, содержащем 10 мМ HEPES, pH 7.2. Затем клетки дважды промывали свежей средой, ресуспендировали до прежней концентрации в среде без красителя и использовали в экспериментах в течение 1 ч. Для измерения концентрации кальция в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_i$) клетки в концентрации $5 \cdot 10^6$ кл./мл помещали в термостатируемую (28 °С) кювету спектрофлуориметра с магнитной мешалкой в растворе Хенкса, содержащем (в мМ): NaCl — 140, KCl — 5, $CaCl_2$ — 1.3, $MgSO_4$ — 1, KH_2PO_4 — 1, Na_2HPO_4 и $NaHCO_3$ — по 1, глюкоза — 6, HEPES — 20, pH 7.4. Длина волны возбуждения 365 нм, эмиссию измеряли при длинах волн 405/490 нм. Флуоресценцию эндогенного NAD(P)H измеряли при длинах волн возбуждения и эмиссии соответственно 365 и 465 нм. Ca^{2+} -чувствительный краситель хлортетрациклин (ХТ) использовали для регистрации изменений $[Ca^{2+}]_i$ в эндоплазматическом ретикулуме. В этих экспериментах суспензию клеток АКЭ инкубировали 40 мин в присутствии 12 мкМ ХТ при 37 °С. Затем клетки, нагруженные ХТ, помещали в кювету спектрофлуориметра без предварительной промывки. Длины волн возбуждения и эмиссии 405 и 530 нм соответственно.

Изолирование кардиомиоцитов. Кардиомиоциты выделяли из крыс Wistar массой 150—180 г с помощью раствора коллагеназы, содержащего следующие компоненты (в мМ): NaCl — 120, KCl — 5.8, $MgSO_4$ — 1.5, KH_2PO_4 — 1.4, $NaHCO_3$ — 4.3, глюкоза — 14, HEPES — 10, pH 7.0, при 37 °С по описанному методу (Rowell et al., 1980). Получали 85—90 % жизнеспособных кальций-толерантных клеток характерной прямоугольной формы. Суспензию кардиомиоцитов помещали в чашки Петри, покрытые коллагеном. По истечении 60 мин неприкрепившиеся клетки убирали. Прикрепившиеся клетки использовали в экспериментах.

Измерение $[Ca^{2+}]_i$ и мембранного потенциала МХ. Перед измерением $[Ca^{2+}]_i$ кардиомиоциты инкубировали в течение 40 мин при 37 °С в среде, содержащей 5 мкМ флуоресцентного зонда Fluo-4AM и 0.005 % Pluronic в растворе Хенкса. Для одновременного измерения мембранного потенциала МХ за 15 мин до окончания ин-

кубации добавляли 20 нМ TMRM (флуоресцентный зонд для измерения мембранного потенциала МХ). При такой (малой) концентрации TMRM увеличение его флуоресценции соответствует увеличению потенциала. Клетки промывали 3 раза HBSS и чашку Петри закрепляли на предметном столике конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 510. Рабочий объем составлял 1.5 мл. Измерения выполняли, используя воздушно-иммерсионный объектив Zeiss PlanNeofluar 20× и водно-иммерсионный объектив Zeiss PlanNeofluar 63×. Флуоресценцию Fluo-4 возбуждали аргоновым лазером (488 нм) и регистрировали, используя отсекающий фильтр BP500—550 нм. Для измерения мембранного потенциала МХ флуоресценцию TMRM возбуждали гелий-неоновым лазером (543 нм) и регистрировали с помощью пропускающего фильтра LP560 нм. Обработку и анализ изображения осуществляли, используя программное обеспечение Kinetic Imaging (Liverpool, Великобритания) и OriginPro 7.0.

Результаты

Влияние ФА на функциональные характеристики МХ печени крысы. Эффекты ФА развиваются при более значительных концентрациях, чем эффекты ФЦ, и зависят от дыхательного субстрата. На рис. 1 показано влияние ФА на редокс-потенциал ПН и окислительное фосфорилирование МХ печени крысы с пируватом в качестве дыхательного субстрата. ФА в концентрации 4 мМ индуцирует медленное спонтанное окисление ПН и ингибирование ОФ (рис. 1, а). Время окислительного фосфорилирования и уровень окисления ПН возрастают линейно с увеличением концентрации ФА в среде (рис. 1, б). На рис. 2 видно резко выраженное ингибирование АДФ-индуцированного и особенно разобщенного дыхания МХ. Эффективные концентрации ФА и ФЦ различаются на три порядка, но ингибирование окислительного фосфорилирования также обусловлено ингибированием дыхательной цепи, как было показано нами ранее при действии ФЦ (Теплова и др., 1992). В присут-

вии сукцината или глутамата в качестве дыхательного субстрата мы либо не наблюдали функциональных изменений МХ, либо они были незначительны (здесь не показано).

На рис. 3 показано, что влияние ФА (10 мМ) на окисление ПН предотвращается инкубацией МХ с циклоспорином А, ингибитором митохондриальной транзитной поры. Это означает, что при действии ФА пиридиновые нуклеотиды могут вытекать из МХ через пору, но этот процесс обратим и предотвращение окисления и (или) выхода ПН из МХ может вернуть их в нормальное функциональное состояние.

Действие ФА на клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). Эксперименты на МХ печени крыс давали основание предполагать, что действие ФА на клетки будет в первую очередь связано с влиянием на мембранный потенциал МХ, уровень NAD(P)H и баланс внутриклеточного Ca^{2+} . Измерение мембранного потенциала осуществляли с помощью флуоресцентного зонда TMRM при малых концентрациях, когда накопление зонда в МХ и увеличение потенциала вызывают увеличение флуоресценции.

Клетки АКЭ являются удобной моделью для исследования. Ранее было показано, что около 80 % собственной флуоресценции клеток при длинах волн возбуждения и эмиссии соответственно 350 и 470 нм обусловлено флуоресценцией митохондриального NADH (Зинченко и др., 1982). Мы исследовали уровень ПН и кальциевый ответ, генерируемый в клетках АКЭ при активации метаболитического рецептора P2Y добавлением АТФ. Так как ФА не вызывает немедленных изменений флуоресценции NAD(P)H в клетках АКЭ (здесь не показано), мы решили исследовать клетки после длительной инкубации с ФА (2—5 ч). На рис. 4 видны изменения флуоресценции NAD(P)H в контрольных клетках и клетках, инкубированных с 30 мМ ФА в течение 3.5 ч, в ответ на ингибирование окислительного фосфорилирования олигомицином, частичное разобщение МХ различными дозами разобщителя FCCP и блокирование окисления NADH ротеноном. Уровень флуоресценции ниже в присутствии ФА при

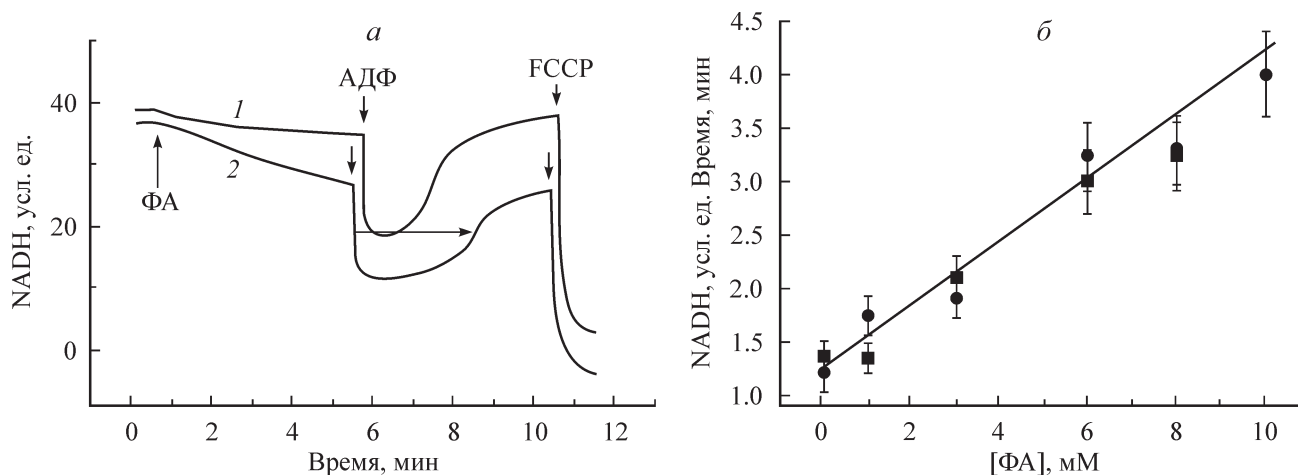


Рис. 1. Влияние фторацетата (ФА) на дыхание митохондрий (МХ) печени крысы.

а — влияние ФА (кривая 2) на окислительное фосфорилирование (ОФ) и редокс-состояние пиридиннуклеотидов при использовании пирувата в качестве дыхательного субстрата; кривая 1 — контроль; состав среды инкубации: KCl — 120 мМ, KH_2PO_4 — 2, HEPES — 10 (pH 7.2) и пируват — 5 мМ; белок МХ — 1 и ФА — 4 мг/мл; АДФ — 120 и разобщитель ОФ FCCP — 1 мкМ. б — зависимость времени фосфорилирования (черные кружки) и степени окисления NADH (черные квадраты) от концентрации ФА; субстраты — пируват и малат; изменения обоих измеряемых параметров пропорциональны концентрации ФА и отражают ингибирование дыхания на уровне цикла Кребса. Вертикальные стрелки — внесение добавок в среду инкубации, горизонтальная стрелка — увеличение времени ОФ.

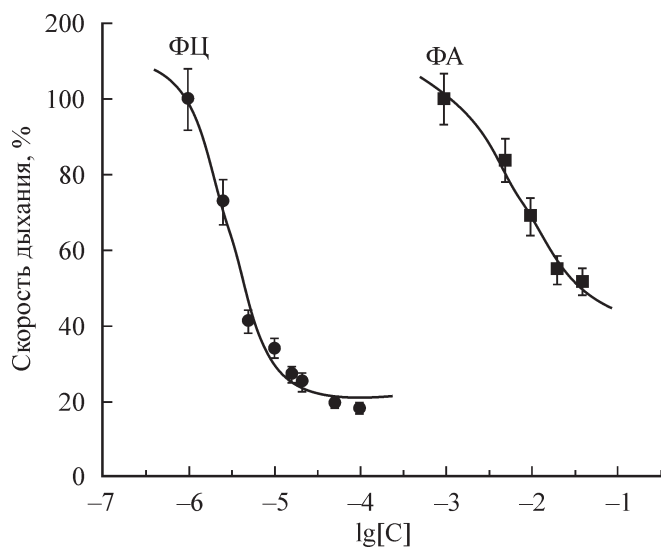


Рис. 2. Зависимость интенсивности дыхания МХ от концентрации фторацетата (ФА) или фторцитрата (ФЦ) в присутствии 1 мкМ FCCP.

Субстраты — пируват и малат. Величины EC_{50} составляют 7—10 мкМ и 7—13 мМ для ФЦ и ФА соответственно.

сравнении с контрольными клетками. Первоначальное падение интенсивности сигнала обусловлено переносом клеток в насыщенную кислородом среду и отражает повышение нагрузки на внутриклеточную АТФазу (флуоресценция в присутствии АДФ). После этого уровень флуоресценции в контрольных клетках не изменяется, тогда как при действии ФА флуоресценция медленно снижается. Это согласуется с экспериментами на изолированные МХ и, очевидно, связано с частичным ингибированием цикла Кребса. Ингибирование окислительного фосфорилирования олигомицином лишь незначительно восстанавливает NAD(P)H в клетках, инкубированных с ФА, по сравнению с контрольными клетками, что сви-

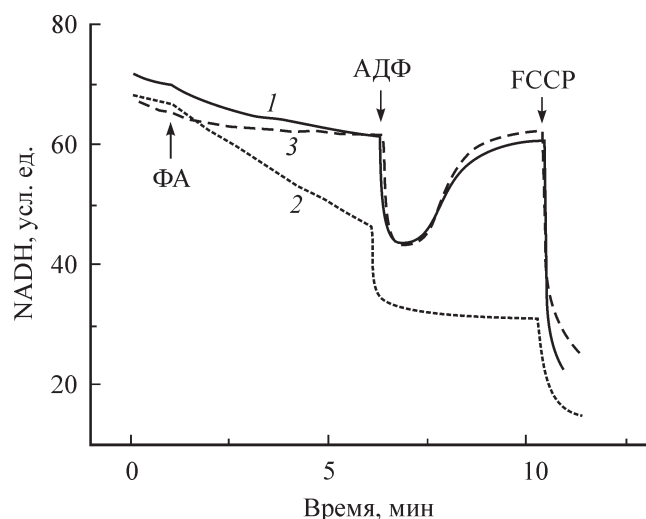


Рис. 3. Влияние ФА на редокс-состояние пиридиновых нуклеотидов и окислительное фосфорилирование МХ печени крыс и предотвращение эффекта циклоспоринном А.

В качестве дыхательного субстрата использовали пируват; состав среды инкубации с добавками см. в подписи к рис. 1. 1 — контрольный эксперимент, 2 — 10 мМ ФА, 3 — 10 мМ ФА в присутствии 1 мкМ циклоспорина А.

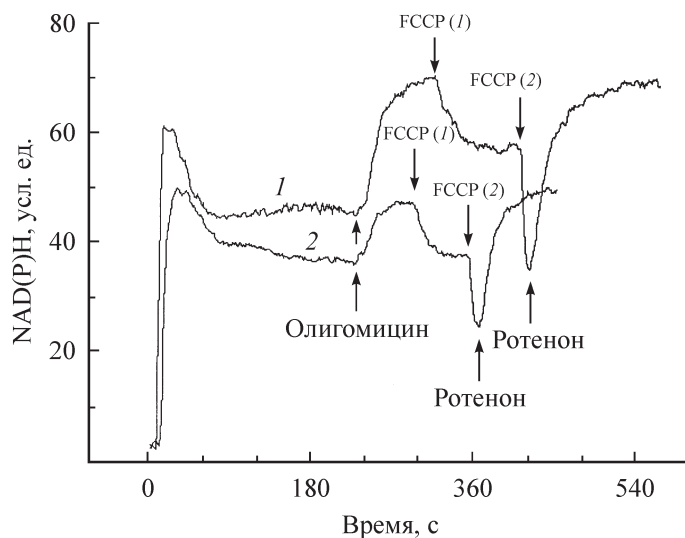


Рис. 4. Изменения флуоресценции NAD(P)H в клетках АКЭ в ответ на действие 1 мкг/мл олигомицина, 5 нМ или 1 мкМ FCCP (1 и 2 соответственно) и 1 мкг/мл ротенона.

1 — контроль, 2 — 30 мМ ФА (3.5 ч, 28 °С).

детельствует о предшествующем ингибировании окислительного фосфорилирования и уменьшении мембранного потенциала МХ в результате действия ФА. Введение небольшого количества разобщающего агента (FCCP, 5 нМ) приводит к частичному окислению NAD(P)H, при этом относительный уровень окисления выше в присутствии ФА по сравнению с контрольным разобщением без воздействия ФА, что также указывает на предшествующее ингибирование дыхательной цепи МХ и, очевидно, является причиной вышеупомянутого ингибирования окислительного фосфорилирования. Полное окисление митохондриального NAD(P)H при действии FCCP с последующим восстановлением с помощью ротенона выя-

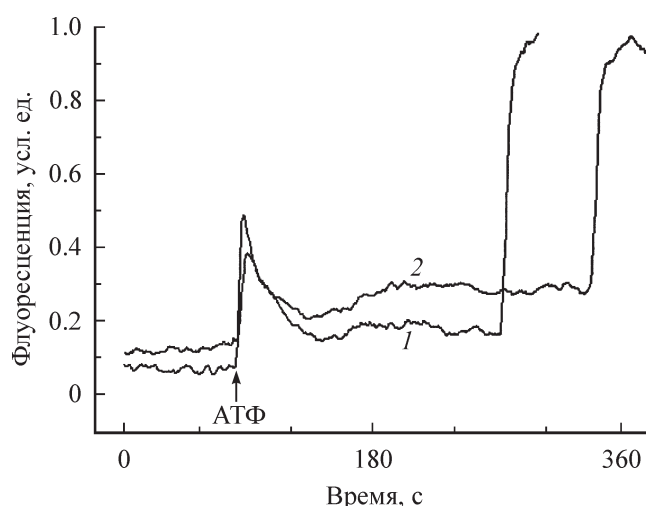


Рис. 5. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках АКЭ при активации пуриновых рецепторов 10 мкМ АТФ. Измерения интенсивности флуоресценции Ca^{2+} -зависимого зонда Indo-1AM.

1 — контрольные клетки; 2 — клетки, инкубированные с 10 мМ ФА в течение 2.5 ч.

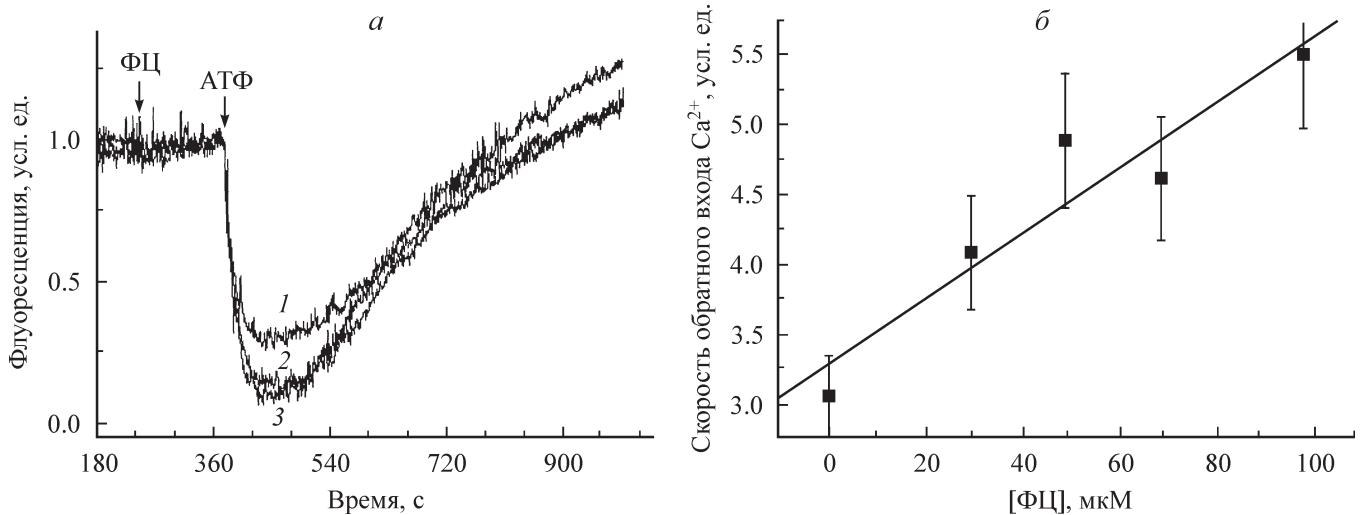


Рис. 6. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) клеток АКЭ в ответ на действие АТФ (4.5 мкМ) в присутствии ФЦ, полученные с помощью флуоресцентного хлортетрациклина.

а: 1 — контроль, 2 — на фоне 10 мкМ ФЦ, 3 — на фоне 20 мкМ ФЦ; б — зависимость скорости обратного входа Ca^{2+} в ЭР от концентрации ФЦ; повышение скорости возврата Ca^{2+} при действии ФЦ имеет дозозависимый характер.

вило общее уменьшение пула митохондриального NAD(P)H в клетках, инкубированных с ФА. Это свидетельствует о потере или утечке ПН из МХ, что приводит к изменениям в балансе митохондриального и цитозольного NAD(P)H.

На рис. 5 показаны изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках АКЭ в ответ на стимуляцию пуринарецепторов добавлением АТР. По сравнению с контрольными клетками без воздействия ФА исходный уровень $[Ca^{2+}]_i$ был несколько выше в клетках, инкубированных с 10 мМ ФА в течение 2.5 ч (рис. 5). Уровень плато после импульсного подъема Ca^{2+} также повышен; эффект наблюдался при концентрациях ФА 5, 10, 15 и 20 мМ. Действие ФА, вероятно, приводит к истощению внутриклеточных Ca^{2+} -депо и активации входа внутриклеточного Ca^{2+} через депозависимые каналы. Главной особенностью этих каналов является то, что они активируются в результате снижения Ca^{2+} внутри депо, но не в результате повышения $[Ca^{2+}]_i$ (Parekh, Penner, 1997; Parekh, Puthey, 2005). Более того, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ не обязательно связано с опустошением внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Открытие других кальциевых каналов, таких как TRPV5 и TRPV6 (Hoenderop et al., 2003; Van Abel et al., 2005; Van de Graaf et al., 2006), которые остаются инактивированными при увеличении $[Ca^{2+}]_i$, и, наоборот, активируются при понижении $[Ca^{2+}]_i$, побудило нас к измерениям уровня кальция в ретикулярных структурах клетки.

Для этого мы использовали метод регистрации Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) посредством хлортетрациклина (ХТ). Измерив $[Ca^{2+}]_i$ в ЭР, можно получить информацию об активности P2Y- и (или) IP₃-рецепторов (по скорости уменьшения флуоресценции ХТ), о количестве кальция, выходящего из ЭР (по амплитуде понижения сигнала), а также о скорости и времени возвращения кальция в ЭР (по скорости увеличения сигнала к исходному уровню). Прежде всего мы исследовали действие микромолярных концентраций ФЦ, привнесенных в суспензию АКЭ перед добавлением АТФ. Использование ХТ в качестве флуоресцентного зонда для регистрации $[Ca^{2+}]_i$ в ЭР позволило выявить, что АТФ вызывает циклические изменения концентрации Ca^{2+} в этих органеллах: сначала

происходит выход Ca^{2+} из ЭР, затем медленный вход обратно (рис. 6). На рис. 6 показаны изменения концентрации Ca^{2+} в ЭР клеток АКЭ после внесения АТФ (4.5 мкМ) в контрольном эксперименте (рис. 6, 1) и при действии 10 и 20 мкМ ФЦ (рис. 6, 2 и 3 соответственно). Видно, что ФЦ не влияет на скорость выхода Ca^{2+} из ЭР; таким образом, система передачи сигнала от P2Y-рецептора через G-белок, скорее всего, не ингибируется в клетках АКЭ при действии ФЦ. Однако ФЦ незначительно увеличивает амплитуду выхода Ca^{2+} и скорость его закачки обратно в ЭР. В другом эксперименте клетки были инкубированы с 20 мМ ФА или ацетата натрия в течение 2.5 ч. После этого мы регистрировали ответ клеток АКЭ на добавку 4.5 мкМ АТФ. Как и в случае с ФЦ, ФА не влияет на скорость выхода Ca^{2+} из ЭР, но увеличивает амплитуду ответа и скорость закачки Ca^{2+} в ЭР. Скорость обратного транспорта Ca^{2+} в присутствии ацетата натрия была очень медленной, меньше, чем в контроле (здесь не показано).

Следует отметить довольно большой период обратного входа кальция в ЭР (8—10 мин). Это свидетельствует о том, что после мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} и его выхода из ЭР в цитозоль Ca-АТФаза плазматической мембраны быстро выкачивает ионы кальция из клеток, значительно уменьшая $[Ca^{2+}]_i$, при которой ионы кальция транспортируются обратно в ЭР. Ранее мы демонстрировали (Zinchenko et al., 2001), что скорость обратного транспортера Ca^{2+} в ЭР после его мобилизации ограничена входом внешнего Ca^{2+} в клетку, т. е. зависит от активности кальциевых каналов плазматической мембраны. Таким образом, измеряя скорость обратного входа Ca^{2+} в ЭР, можно судить об активности кальциевых каналов плазматической мембраны. Данные, полученные в наших экспериментах, свидетельствуют о том, что ФА индуцирует вход Ca^{2+} в клетки АКЭ через депозависимые каналы.

Действие ФА на кардиомиоциты. На рис. 7, а, б показаны изменения $[Ca^{2+}]_i$ и мембранного потенциала МХ соответственно в кардиомиоцитах, находящихся в поле зрения конфокального микроскопа. ФА вызывает увеличение базальной $[Ca^{2+}]_i$, что стимулирует по-

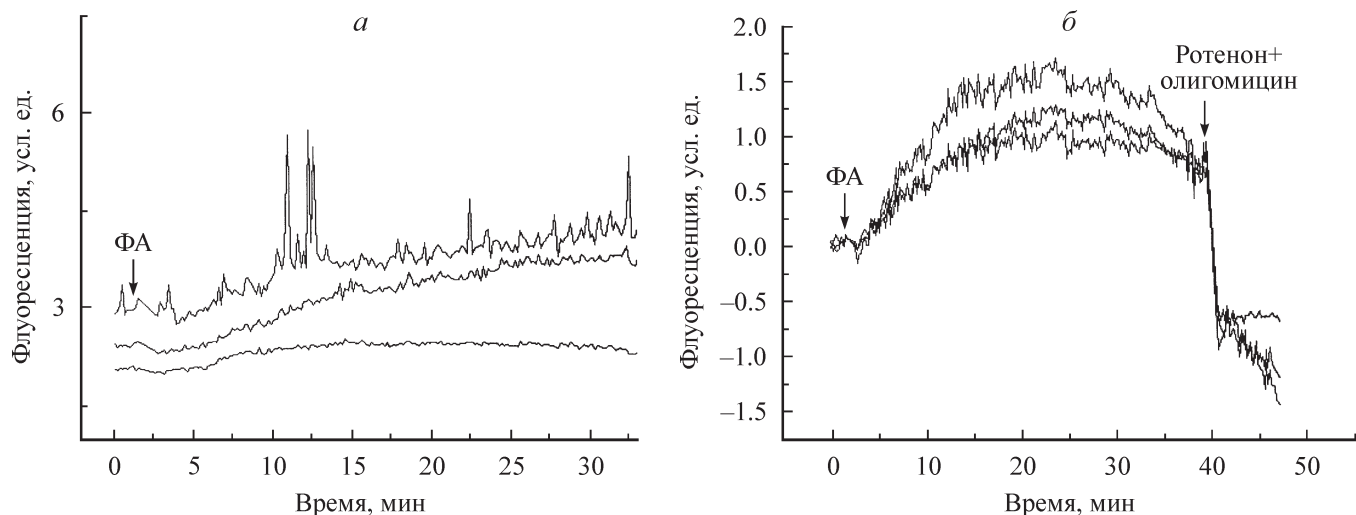


Рис. 7. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и мембранного потенциала МХ кардиомиоцитов при действии 10 мМ ФА, полученные по измерению интенсивности флуоресценции соответствующих зондов.

а — $[Ca^{2+}]_i$, флуоресценция Fluo-4AM; б — мембранный потенциал, флуоресценция TMRM в ответ на 10 мМ ФА или совместное действие 1 мкг/мл ротенона с 1 мкг/мл олигомицина. Приведены кривые для трех клеток, находящихся в поле зрения микроскопа.

явление кальциевых волн, распространяющихся по поверхности саркоплазматического ретикулаума, или же значительное усиление уже существующих волн и скорость их распространения. Одновременно наблюдали медленное увеличение мембранного потенциала МХ. Олигомицин и ротенон уменьшают флуоресценцию TMRM, что соответствует уменьшению мембранного потенциала МХ (рис. 7, б). Добавление одного олигомицина к контрольным клеткам приводит к повышению мембранного потенциала МХ (то же относится к клеткам АКЭ), но эффект снимается добавлением FCCP или совокупным действием ротенона и олигомицина (здесь не показано). Вероятно, повышение $[Ca^{2+}]_i$ обуславливает его транспорт в МХ с последующим ингибированием протонной АТФазы, что приводит к увеличению мембранного потенциала. В наших ранних работах было показано, что МХ печени и сердца крысы по-разному отвечают на небольшое повышение $[Ca^{2+}]_i$: транспорт Ca^{2+} из цитозоля в МХ усиливал АДФ-зависимое окислительное фосфорилирование в МХ печени, но ингибировал этот ответ в МХ сердца. Эти эффекты сопровождалась небольшим уменьшением мембранного потенциала МХ печени, но увеличением его в МХ сердца и мозга (Terlova et al., 1985; Караджов и др., 1988). Механизм этого явления был раскрыт позже и объясняется действием Ca^{2+} -зависимого белка, ингибирующего H^+ -АТФазу (Hubbard, McNugh, 1996; Евтодиенко и др., 2000).

Повышение мембранного потенциала МХ при активации входа Ca^{2+} в цитозоль и (или) в условиях гипоксии было показано другими исследователями, но только на нейронах мозга и на кардиомиоцитах. Так, первичной реакцией кардиомиоцитов на гипоксию было увеличение мембранного потенциала МХ с последующим нарастанием активных форм кислорода (АФК) (Zorov et al., 2000). Вслед за тем уровень цитозольного Ca^{2+} медленно уменьшался. Кроме того, на нейронах гиппокампа в культуре показано, что при действии глутамата и увеличении $[Ca^{2+}]_i$ сначала возникает кратковременное уменьшение, а затем увеличение мембранного потенциала МХ, которое, вероятно, связано с накоплением Ca^{2+} в МХ и ингибированием H^+ -АТФазы (Khodorov, 2004). В этом случае эф-

фект был гораздо более выражен, поскольку глутамат добавляли на фоне некоторой дезэнергизации МХ, вызванной с помощью дезоксиглюкозы.

Обсуждение

Полученные в наших экспериментах данные показывают, что ФА влияет на функции МХ только в присутствии пирувата в качестве дыхательного субстрата. Также мы показали, что изменение редокс-состояния ПН и (или) их утечка из МХ могут быть критическими факторами, нарушающими дыхание МХ и приводящими к гибели клеток. Открытие поры МХ — обратимый феномен: предотвращение окисления и (или) утечки NAD(P)H из МХ приводит к восстановлению нормального функционального состояния МХ. Например, когда в качестве дыхательных субстратов использовали сукцинат или глутамат, ФА не влиял на функции МХ *in vitro*. Это соответствует нашим данным о глутамате как анаперотическом агенте, способном восстанавливать функции тромбоцитов, нарушенные воздействием ФА *in vitro* и *in vivo* (Mindukshev et al., 2006). В более ранних исследованиях других авторов также было выдвинуто предположение о том, что при блокаде мАк фторацетатом глутамат может быть использован в цикле Кребса через глутаматдегидрогеназу или трансминазу (Yu et al., 1976; Liang, 1977).

Что касается других альтернативных субстратов, то им, вероятно, может быть цитрат, накапливающийся в клетках при блокаде мАк. С одной стороны, цитрат оказывает существенное влияние на ряд внутриклеточных процессов, причем не только вследствие сдвига внутриклеточного рН и ингибирования фосфофруктокиназы, но и по причине хелатирования кальция. Известно, что увеличение уровня цитрата прямо связано с дыхательной активностью клеток: метаболически активные ткани, такие как сердце, почки и селезенка, накапливают цитрат в миллимолярных концентрациях (Stewart et al., 1970). Это превышает уровень внеклеточного и тем более внутриклеточного Ca^{2+} , концентрация которого на 3—4 порядка ниже. С другой стороны, печень, дыхательная и метабо-

лическая активность которой также высока, аккумулирует небольшое количество цитрата (Cole et al., 1955; Twigg et al., 1986). Более того, митохондрии клеток мозга и скелетных мышц могут не иметь отрицательных последствий вследствие накопления цитрата (Corsi, Granata, 1967; Buffa et al., 1973).

Более 40 лет назад было показано, что ФЦ не оказывает действия на цитоплазматическую аконитазу (цАк) и что накапливающийся цитрат может перемещаться из МХ в цитозоль с последующей утилизацией посредством цАк и NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) (Max, Purvis, 1965; Buffa et al., 1972). В клеточных культурах астроглии и микроглии активность ИЦДГ примерно поровну распределена между цитозолем и МХ, тогда как в культуре нейронов и олигодендроцитов около 75 % активности ИЦДГ приходится на цитозольную фракцию (Minich et al., 2003). В настоящее время нет данных о соотношении митохондриальной и цитоплазматической аконитазы в клетках нервной системы. Однако следует отметить, что в клетках печени имеет место близкое соотношение митохондриальной и цитоплазматической ИЦДГ (Рахманова, Попова, 2006), при этом активность цАк печени составляет около 65 % активности аконитазы печени (Konstantinova, Russanov, 1996). Поэтому можно предположить довольно эффективный путь утилизации цитрата и синтеза NAD(P)H в нейронах и других клетках в случае ингибирования мАк. Этот альтернативный метаболический путь может играть позитивную роль, выполняя адаптивные функции: потребление кислорода снижается, поскольку образующийся NADPH не нуждается в окислении в дыхательной цепи, но может быть полезен для таких NADPH-зависимых процессов, как анаболические реакции и генерация тепла, восстановление глутатиона и синтез NO, расширение или сужение сосудов посредством генерации АФК (Winkler et al., 1986; Bobyleva et al., 1993; Lee, Yu, 2002; Gupte, Wolin, 2006).

Ранее указывалось на то, что исследования, сфокусированные на пентозном цикле как единственном источнике NADPH, нуждаются в переоценке с учетом метаболической активности и субстратной специфичности той или иной ткани (Winkler et al., 1986). NADP-зависимая цитоплазматическая ИЦДГ наряду с малик-ферментом и никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназой участвует в регенерации NADPH, необходимого для восстановления глутатион-дисульфида в митохондриях мозга (Vogel et al., 1999), но, как было показано в экспериментах с сетчаткой крысы, цитоплазматическая ИЦДГ обеспечивает более чем семикратное производство NADPH по сравнению с малик-ферментом (Winkler et al., 1986). Были получены прямые доказательства связи между активностью цитоплазматической ИЦДГ и редокс-состоянием клеток, что также позволяет предполагать важную роль этого фермента в механизмах защиты (Lee et al., 2002, 2004).

Кроме того, уровень цитоплазматического NADPH может существенно влиять на калиевые каналы и баланс внутриклеточного кальция (Wolin et al., 2005; Gupte, Wolin, 2006). В исследованиях *in vitro* мы показали, что ФА вызывает медленное повышение $[Ca^{2+}]_i$ в различных клетках. Наблюдаемое повышение $[Ca^{2+}]_i$ при воздействии ФА свидетельствует об активации кальциевых каналов плазматической мембраны; этот процесс не подвержен влиянию ФА, следовательно, он не требует АТФ для своей реализации, по крайней мере в глиальных клетках (Lian, Stringer, 2004). Возможно, этот механизм является общим для разных клеток, что могло бы объяснить гиперчувст-

вительность тромбоцитов к АДФ при действии ФА (Mindukshev et al., 2006). Повышение $[Ca^{2+}]_i$ кардиомиоцитов может вызвать повышение их функциональной активности, поскольку за этим повышением следует нарастающий вход Ca^{2+} в ЭР, что, по-видимому, обуславливает наблюдаемое нами усиление амплитуды и скорости кальциевых волн в кардиомиоцитах. Кроме того, это сопровождается повышением мембранного потенциала МХ, что согласуется с результатами других исследователей, показавших особую чувствительность к ионам Ca^{2+} систем окислительного фосфорилирования МХ сердца и мозга.

Что касается модулирующих эффектов Ca^{2+} на биоэнергетику МХ, следует вспомнить о «классической» активации этим ионом дегидрогеназ цикла Кребса с последующим повышением потенциала МХ и генерацией NADH. Как было показано, мишенями для ионов кальция служат три дегидрогеназы: 2-оксоглутаратдегидрогеназа и NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа, которые активируются по аллостерическому механизму, и пируватдегидрогеназа, которая активируется при дефосфорилировании Ca^{2+} -зависимой фосфатазой (McCormack et al., 1990; Hansford, 1994). Роль этих дегидрогеназ в биоэнергетическом статусе МХ при действии ФА требует отдельного исследования, хотя можно предположить, что в условиях блокады мАк особую «выгоду» из такой активации могла бы извлечь 2-оксоглутаратдегидрогеназа, если она будет обеспечена экзогенным и (или) эндогенным субстратом — 2-оксоглутаратом. Остается открытым вопрос о характере и степени модуляции кальциевого баланса в различных клетках некоторыми редокс-агентами, которые могли бы менять направленность метаболических путей изменением соотношения NADH/NADPH в МХ и цитозоле. Эта проблема является предметом наших дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы BioIndustry Initiative Госдепартамента США (МНТЦ ВП-2629).

Список литературы

- Евтодиенко Ю. В., Азарашивили Т. С., Теплова В. В., Одинакова И. В., Сарис Н.-Э. 2000. Регуляция ионами кальция окислительного фосфорилирования во внутренней мембране митохондрий печени крысы. Биохимия. 65 (9) : 1210—1215.
- Зинченко В. П., Теплова В. В., Евтодиенко Ю. В. 1982. Кинетика потребления кислорода, люминесценции пиридиннуклеотодов и цианинового красителя 3',3'-диэтилтиодикарбоцианин-йодида при энергизации клеток асцитной карциномы Эрлиха глюкозой. Бюл. эксперим. биол. мед. 44 (11) : 69—72.
- Караджов Ю. С., Кудзина Л. Ю., Зинченко В. П. 1988. Влияние ионов Ca^{2+} на трансмембранный электрический потенциал, синтез и гидролиз АТФ в митохондриях мозга. Биофизика. 33 (1) : 77—82.
- Рахманова Т. И., Попова Т. Н. 2006. Регуляция метаболизма 2-оксоглутарата под действием NADP-изоцитратдегидрогеназы и аспартаминотрансферазы в печени крысы. Биохимия. 71 (2) : 266—274.
- Теплова В. В., Евтодиенко Ю. В., Холмухамедов Е. И., Сергеев Н. Г., Гончаров Н. В. 1992. Влияние фторцитрата на потребление кислорода и транспорт Ca^{2+} в митохондриях клеток печени. Цитология. 34 (11/12) : 69—73.
- Франк Г. М., Кондрашова М. Н., Мохова Е. Н., Ротенберг Ю. С. 1973. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М.: Наука. 221 с.

- Andersson U., Leighton B., Young M. E., Blomstrand E., Newsholme E. A. 1998. Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle *in vitro* by superoxide anions and/or nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 : 512—516.
- Bannister D. W., O'Neill I. E. 1981. Control of gluconeogenesis in chick (*Gallus domesticus*) isolated hepatocytes: affect of redox state and phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.32) location. *Int. J. Biochem.* 13 : 437—444.
- Bobyleva V., Kneer N., Bellei M., Battelli D., Lardy H. A. 1993. Concerning the mechanism of increased thermogenesis in rats treated with dehydroepiandrosterone. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25 : 313—321.
- Bowman R. H. 1964. Inhibition of citrate metabolism by sodium fluoroacetate in the perfused rat heart and the effect on phosphofructokinase activity and glucose utilization. *Biochem. J.* 93 : 13c—15c.
- Buffa P., Guarriero-Bobyleva V., Costa-Tiozzo R. 1973. Metabolic effects of fluoroacetate poisoning in animals. *Fluoride.* 6 : 224—247.
- Buffa P., Guarriero-Bobyleva V., Pasquali-Ronchetti J. 1972. Biochemical effects of fluoroacetate poisoning in rat liver. In: Carbon-fluorine compounds, associated scientific compounds. Amsterdam. 303—330.
- Buffa P., Pasquali-Ronchetti J. 1977. Biochemical lesions of respiratory enzymes and configurational changes of mitochondria *in vivo*. II. Early ultrastructural modifications correlates to the biochemical lesion induced by fluoroacetate. *Cell Tissue Res.* 183 : 1—23.
- Cole B. T., Engel F. L., Fredericks J. 1955. Sodium fluoroacetate diabetes: correlations between glycemia, ketonemia and tissue citrate levels. *Endocrinology.* 56 : 675—683.
- Corsi A., Granata A. L. 1967. Differential toxicity of fluoroacetate to heart, kidney and brain mitochondria of the living rat. *Biochem. Pharmacol.* 16 : 1083—1989.
- Cremer-Lacuara M. G., Lacuara J. L., Fiol de Cuneo M., Ruiz R. D. 1980. Substrate supply and function of isolated venous smooth muscle under anoxia and metabolic inhibition. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58 : 723—730.
- Dickson A. J., Langslow D. R. 1977. Gluconeogenesis in isolated chicken hepatocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 5 : 983—986.
- Dohi T., Murad F. 1981. Effects of pyruvate and other metabolites on cyclic GMP levels in incubations of rat hepatocytes and kidney cortex. *Biochim. biophys. acta.* 673 : 14—25.
- Fairhurst A. S., Smith R. E., Gal B. M. 1958. The effects of fluorocompounds on oxidative phosphorylation. *Biochem. Pharmacol.* 1 : 273—279.
- Gardner P. R., Nguyen D. D., White C. W. 1994. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 12 248—12 252.
- Goncharov N. V., Jenkins R. O., Radilov A. S. 2006. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research. *J. Appl. Toxicol.* 26 : 148—161.
- Gupte S. A., Wolin M. S. 2006. Hypoxia promotes relaxation of bovine coronary arteries through lowering cytosolic NADPH. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 : H2228—H2238.
- Hansford R. 1994. Role of calcium in respiratory control. *Med. Sci. in Sports and Exercise.* 26 : 44—51.
- Hoenderop J. G., Voets T., Hoefs S., Weidema F., Prenen J., Nilius B., Bindels R. J. 2003. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺-channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* 22 : 776—785.
- Hubbard M. J., McHugh N. J. 1996. Mitochondrial ATP synthase F-1-beta-subunit is a calcium-binding protein. *FEBS Lett.* 391 : 323—329.
- James E. A., Gygi S. P., Adams M. L., Pierce R. H., Fausto N., Aebersold R. H., Nelson S. D., Bruschi S. A. 2002. Mitochondrial aconitase modification, functional inhibition, and evidence for a supramolecular complex of the TCA cycle by the renal toxicant S-(1,1,2,2-tetrafluoroethyl)-L-cysteine. *Biochemistry.* 41 : 6789—6797.
- Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 86 : 279—351.
- Koenig H., Patel A. 1970. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity: the role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. *Arch. Neurol.* 23 : 155—160.
- Konstantinova S. C., Russanov E. M. 1996. Aconitase activity in rat liver. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 113 : 125—130.
- Lee S. H., Jo S. H., Lee S. M., Koh H. J., Song H., Park J. W., Lee W. H., Huh T. L. 2004. Role of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) on cellular defense against oxidative injury by gamma-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 80 : 635—642.
- Lee S. M., Koh H. J., Park D. C., Song B. J., Huh T. L., Park J. W. 2002. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Rad. Biol. Med.* 32 : 1185—1196.
- Lee T. J., Yu J. G. 2002. L-citrulline recycle for synthesis of NO in cerebral perivascular nerves and endothelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962 : 73—80.
- Li Q. Y., Pedersen C., Day B. J., Patel M. 2001. Dependence of excitotoxic neurodegeneration on mitochondrial aconitase inactivation. *J. Neurochem.* 78 : 746—755.
- Lian X. Y., Stringer J. L. 2004. Astrocytes contribute to regulation of extracellular calcium and potassium in the rat cerebral cortex during spreading depression. *Brain Res.* 1012 : 177—184.
- Liang C. 1977. Metabolic control of circulation: effects of iodoacetate and fluoroacetate. *J. Clin. Invest.* 60 : 61—69.
- Max S. R., Purvis J. L. 1965. Energy-linked incorporation of citrate into rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21 : 587—594.
- McCormack J., Halestrap A., Denton R. 1990. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* 70 : 391—425.
- Mindukshev I. V., Goncharov N. V., Shabanova E. Yu., Ermolaeva E. E., Mironova M. O., Radilov A. S., Jenkins R. O., Krivchenko A. I. 2006. A new method for studying platelets, based upon the low-angle light scattering technique. 3. Aggregation hypersensitivity of platelets (ADP agonist) and search for corrective agents. *Spectroscopy.* 20 : 57—66.
- Minich T., Yokota S., Dringen R. 2003. Cytosolic and mitochondrial isoforms of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase are expressed in cultured rat neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells. *J. Neurochem.* 86 : 605—614.
- Parekh A. B., Penner R. 1997. Store-operated calcium influx. *Physiol. Rev.* 77 : 901—930.
- Parekh A. B., Putney J. W., Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 85 : 757—810.
- Pattison F. L. M. 1959. Toxic alifatic fluorine compounds. Amsterdam etc.: Elsevier Publ. Comp. 227 p.
- Peters R. A. 1972. Some metabolic aspects of fluoroacetate especially related to fluorocitrate. In: Carbon fluorine compounds. A Ciba Foundation Symposium. Amsterdam: Associated Sci. Publ. 55—70.
- Powell T., Terrar D. A., Twist V. W. 1980. Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J. Physiol.* 302 : 131—153.
- Schneider W. C. 1948. Intracellular distribution of enzymes. *J. Biol. Chem.* 176 : 259—266.
- Stewart G. G., Abbs E. T., Roberts D. J. 1970. Biochemical effects of fluoroacetate administration in rat brain, heart and blood. *Biochem. Pharmacol.* 19 : 1861—1866.
- Taylor W. M., D'Costa M., Angel A., Halperin M. L. 1977. Insulin-like effects of fluoroacetate on lipolysis and lipogenesis in adipose tissue. *Can. J. Biochem.* 55 : 982—987.
- Teplava V. V., Zinchenko V. P., Evtodienko Yu. V. 1985. The role of membrane-bound calcium in inhibition of oxidative phosphorylation in Ehrlich ascites tumor cells. *Studia biophysica.* 109 : 65—72.
- Twigg L. E., Mead R. J., King D. R. 1986. Metabolism of fluoroacetate in the skink (*Tiliqua rugosa*) and the rat (*Rattus norvegicus*). *Aust. J. Biol. Sci.* 39 : 1—15.

Van Abel M., Hoenderop J. G., Bindels R. J. 2005. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 371 : 295—306.

Van de Graaf S. F., Chang Q., Mensenkamp A. R., Hoenderop J. G., Bindels R. J. 2006. Direct interaction with Rab11 targets the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* 26 : 3—12.

Vogel R., Wiesinger H., Hamprecht B., Dringen R. 1999. The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neurosci. Lett.* 275 : 97—100.

Winkler B. S., De Santis N., Solomon F. 1986. Multiple NADPH-producing pathways control glutathione (GSH) content in retina. *Exp. Eye Res.* 43 : 829—847.

Wolin M. S., Ahmad M., Gupte S. A. 2005. Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts,

current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289 : L159—L173.

Yu H. L., Giammarco R., Goldstein M. B., Stinebaugh D. J., Halperin M. L. 1976. Stimulation of ammonia production and excretion in the rabbit by inorganic phosphate: study of control mechanisms. *J. Clin. Invest.* 58 : 557—564.

Zinchenko V. P., Dolgacheva L. P., Nikiforov E. L., Kim Yu. V. 2001. Regulation of purinoceptor-induced Ca²⁺ changes in mitochondria of Ehrlich ascites tumor cells. In: *Calcium signaling*. New York; Amsterdam: IOS Press, NATO Sci. Ser. Ser. 1: Life and Behavioural Sci. 331 : 217—225.

Zorov D. B., Filburn C. R., Klotz L. O., Zweier J. L., SolloTT S. J. 2000. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J. Exp. Med.* 192 : 1001—1014.

Поступила 27 III 2007

STUDIES OF INTERACTION OF INTRACELLULAR SIGNALLING AND METABOLIC PATHWAYS UNDER INHIBITION OF MITOCHONDRIAL ACONITASE WITH FLUOROACETATE

V. P. Zinchenko,¹ N. V. Goncharov,^{2,*} V. V. Teplova,³ V. A. Kasymov,¹ O. I. Petrova,¹ A. V. Berezhnov,¹ E. V. Senchenkov,² I. V. Mindukshev,⁴ R. O. Jenkins,⁵ A. S. Radilov²

¹ Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, ² Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, St. Petersburg, ³ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino,

⁴ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, and ⁵ School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, UK;

* e-mail: nvgoncharov@mail.ru

Mitochondrial aconitase has been shown to be inactivated by a spectrum of substances or critical states. Fluoroacetate (FA) is the most known toxic agent inhibiting aconitase. The biochemistry of toxic action of FA is rather well understood, though no effective therapy has been proposed for the past six decades. In order to reveal novel approaches for possible antidotes to be developed, experiments were performed with rat liver mitochondria, Ehrlich ascite tumor cells and cardiomyocytes, exposed to FA or fluorocitrate *in vitro*. The effect of FA developed at much higher concentrations in comparison with fluorocitrate and was dependent upon respiratory substrates in experiments with mitochondria: with pyruvate, FA induced a slow oxidation and/or leak of pyridine nucleotides and inhibition of respiration. Oxidation of pyridine nucleotides was prevented by incubation of mitochondria with cyclosporin A. Studies of the pyridine nucleotides level and calcium response generated in Ehrlich ascite tumor cells under activation with ATP also revealed a loss of pyridine nucleotides from mitochondria resulting in a shift in the balance of mitochondrial and cytosolic NAD(P)H under exposure to FA. An increase of cytosolic [Ca²⁺] was observed in the cell lines exposed to FA and is explained by activation of plasma membrane calcium channels; this mechanism, could have an impact on amplitude and rate of Ca²⁺ waves in cardiomyocytes. Highlighting the reciprocal relationship between intracellular pyridine nucleotides and calcium balance, we discuss metabolic pathway modulation in the context of probable development of an effective therapy for FA poisoning and other inhibitors of aconitase.

Key words: fluoroacetate, intracellular calcium, pyridine nucleotides, mitochondria, membrane potential.