

ORIGINAL ARTICLE

**Functional Status of Mitochondrial Pore in the Brain of
Laboratory Rats Subjected to Prolonged Emotional Stress**

**Burjanadze G., Menabde K., Gavashelidze M., Kuchukasvili Z.,
Koshoridze N.**

*Faculty of Exact and Natural Sciences, Iv. Javakishvili Tbilisi State University, Tbilisi,
University St. 13, 0128, Georgia*

E-mail: ketimenabde@yahoo.com

Received August 21, 2011

We have studied the functional status of the mitochondrial membrane pore in the brain of laboratory rats under the stress caused by 30-day isolation and violation of diurnal cycles. It has been established that the functional status of the MMTP changes under the stress. Particularly, the MPTP is activated as the pore opens affected by an increased concentration of cytoplasmic Ca^{2+} and reduced content of mitochondrial Ca^{2+} . It has been suggested that the Ca^{2+} -induced opening of the pore is a result of the intensified oxidative processes in the brain, as a result of energy deficiency and a reduced activity of anti-oxidative enzymes.

Key words: emotional stress / brain / mitochondrial membrane pore

ORIGINAL ARTICLE

**Функциональное состояние митохондриальной поры
головного мозга белых крыс в условиях длительного
эмоционального стресса**

**Бурджанадзе Г., Менабде К., Гавашелидзе М., Кучукашвили З.,
Кошоридзе Н.**

*Тбилисский Государственный Университет им. И. Джавахишвили, Факультет точных
и естественных наук, 0128, Тбилиси, Университетская 13, Грузия*

E-mail: ketimenabde@yahoo.com

Поступила в редакцию 21 Августа 2011 г.

Изучено функциональное состояние митохондриальной мембранной поры в головном мозге белых лабораторных крыс на фоне стресса, вызванного 30-дневной изоляцией животных и нарушением суточного ритма. Выявлено, что функциональное состояние МРТР в условиях стресса меняется. В частности, наблюдается процесс активации митохондриальной поры, что является следствием открытия поры под влиянием увеличения концентрации цитоплазматического Ca^{2+} и уменьшения содержания митохондриального Ca^{2+} . Предполагается, что Ca^{2+} -индуцированное открытие поры является результатом увеличения оксидантных процессов в мозге, как следствие энергодефицита и понижения активности антиоксидантных ферментов.

*Ключевые слова: эмоциональный стресс / головной мозг / митохондриальная
мембранная пора.*

1979 г. Гантер и Гаворс обнаружили, что избыточная концентрация Са-ионов вызывала набухание митохондрии, причиной которой являлось открытие митохондриальных мембранных пор (mitochondrial permeability transition pore - МРТР), что в свою очередь

повышало проницаемость митохондриальных мембран (Alano *et et.*, 2002). Последующие опыты показали, что следствием набухания митохондрии и повышения мембранной проводимости, являлся выход в цитоплазму митохондриальных компонентов. Этот процесс

играет существенную роль в развитии целого ряда патологии, в том числе провоцирует клеточный апоптоз (Crompton *et al.*, 1999).

Установлено, что МРТР представляет неспецифичный канал высокой проводимости, который состоит из различных макромолекулярных компонентов и образуется в местах соприкосновения наружной и внутренней митохондриальной мембраны (Sullivan *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 2000). Универсальным активатором поры являются Ca^{2+} -ионы, а ингибитором – пептид Циклоспорин А. Известно, что многие факторы активируют митохондриальную пору. Кроме Ca^{2+} -ионов, активаторами также являются жирные кислоты, ионы неорганического фосфора и т.д. (Brand, Nicholls, 2011). Активация поры также осуществляется при уменьшении мембранного потенциала митохондрии и повышением концентрации свободных радикалов. Из литературных данных известно, что активация МРТР происходит под влиянием разных стресс-факторов (Eliseev *et al.*, 2009; Gunter *et al.*, 2010).

Многие исследования показали, что активация митохондриальных пор является причиной разных патологий, таких как, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, апоптоз, некроз и др. (Friberg, Wieloch, 2002). Итогом активации пор является повышение интенсивности образования активных форм кислорода (ROS) и выход в цитоплазму ферментов антиоксидантной системы, что в значительной степени снижает процесс обезвреживания ROS. Повышение проводимости митохондриальных мембран вызывает не только выход митохондриальных компонентов в цитоплазму, но и проникновение в митохондрии молекул воды, что вызывает резкое повышение осмотического давления,

набухание митохондрии и их разрушение (Wang *et al.*, 2007; Baranov *et al.*, 2008).

Имеются данные о взаимосвязи между МРТР, разными ферментативными системами и белковыми молекулами. Известно, что белок Вах играет роль “пробки” в процессе функционирования МРТР. Разные ферментативные системы, например гексокиназа и креатинкиназа участвуют в модификации активности МРТР. Однако, многое о функционировании МРТР остается невыясненным и требует тщательного исследования.

Целью наших исследований является выяснение роли МРТР в процессе снижения активности антиоксидантной системы и энергодефицита в митохондриях головного мозга белых крыс, в условиях длительного эмоционального стресса, вызванного изоляцией и нарушением суточного ритма животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на половозрелых, белых лабораторных крысах мужского пола. Крысы содержались в индивидуальных вольерах и подвергались социальной изоляции в условиях темноты (соотношение темнота/свет 23,5/0,5 час). В указанных условиях крысы содержались в течение 30 дней. Контрольная группа состояла из животных, находящихся в общем вольере, в естественных условиях (соотношение темнота/свет 10,00/14,00 час). Животные усыплялись хлороформом и декапитировались..

Митохондриальную фракцию головного мозга получали методом дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы (De Robertis, 1967).

Для определения степени открытия

митохондриальной поры, 2 мл суспензии митохондрий (0,5 мг белка) добавляли в 1 мл инкубационной среды, которая содержала KCl (120мМ), KH_2PO_4 (3 мМ), Na-сукцинат (5 мМ) и трис - HCl (25мМ. pH-7,4). Стимуляцию открытия поры производили добавлением в инкубационную среду CaCl_2 (420 μM), а блокирование - циклоспорином А (1.0 μM). Изменения светопоглощения реакционной смеси измеряли спектрофотометрически (λ -520 нм). Об открытии митохондриальных пор судили по изменению экстинкции реакционной смеси (BrookesS, Darley-USmar, 2004). Изменение концентрации Ca^{2+} в инкубационной среде определяли в присутствии 70 мкМ арсеназо-III, с помощью спектрофотометра USB-2000 (Ocean Optics, США), используя методику двухволновой регистрации светопоглощения при длине волны 654 нм и 690 нм (Акопова, 2008).

Белок определяли по Лоури (Lowry *et al.*, 1951). Для статистического анализа данные обрабатывали по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первой стадии эксперимента было исследовано функциональное состояние МРТР

головного мозга контрольных и стрессированных белых крыс. С этой целью была изучена зависимость активации МРТР от присутствия в инкубационной среде Ca -ионов (рис. 1). Как видно из рисунка, митохондрии головного мозга контрольных животных, по сравнению со стрессированными животными, проявляют более высокую чувствительность к Ca^{2+} -индуцированному открытию МРТР, в то время, как митохондрии головного мозга стрессированных животных на добавление в реакционную среду ионов Ca , почти не реагируют. Полученный эффект предположительно обусловлен повреждением митохондриальных мембран, вызванным повышением оксидативных процессов и понижением активности антиоксидантной системы клетки на фоне длительного эмоционального стресса. Этому свидетельствуют ранее полученные нами данные, что при изоляции животных и нарушении суточного ритма в митохондриях снижается активность окислительного фосфорилирования и ферментов антиоксидантной системы, что в свою очередь, становится причиной повреждения митохондриальных мембран (Zhuravliova *et al.*, 2009; Кошоридзе и др., 2010).

Таблица 1. Активность СОД и каталазы головного мозга белых крыс при 30-дневной изоляции и нарушении суточного ритма

ферменты	Контроль	30-дневный стресс
Митохондриальная СОД (U/мг белка)	16,79 ± 1,09	8,42 ± 3,43*
Цитозольная СОД (U/мг белка)	5,41 ± 0,59	3,72 ± 0,26*
Митохондриальная Каталаза (U/мг белка)	12,9 ± 3,00	9,8 ± 0,8*
Цитозольная Каталаза (U/мг белка)	21,8 ± 1,96	14,67 ± 3,06**

$P \leq 0.05$, $**P \leq 0.001$

$n = 5$

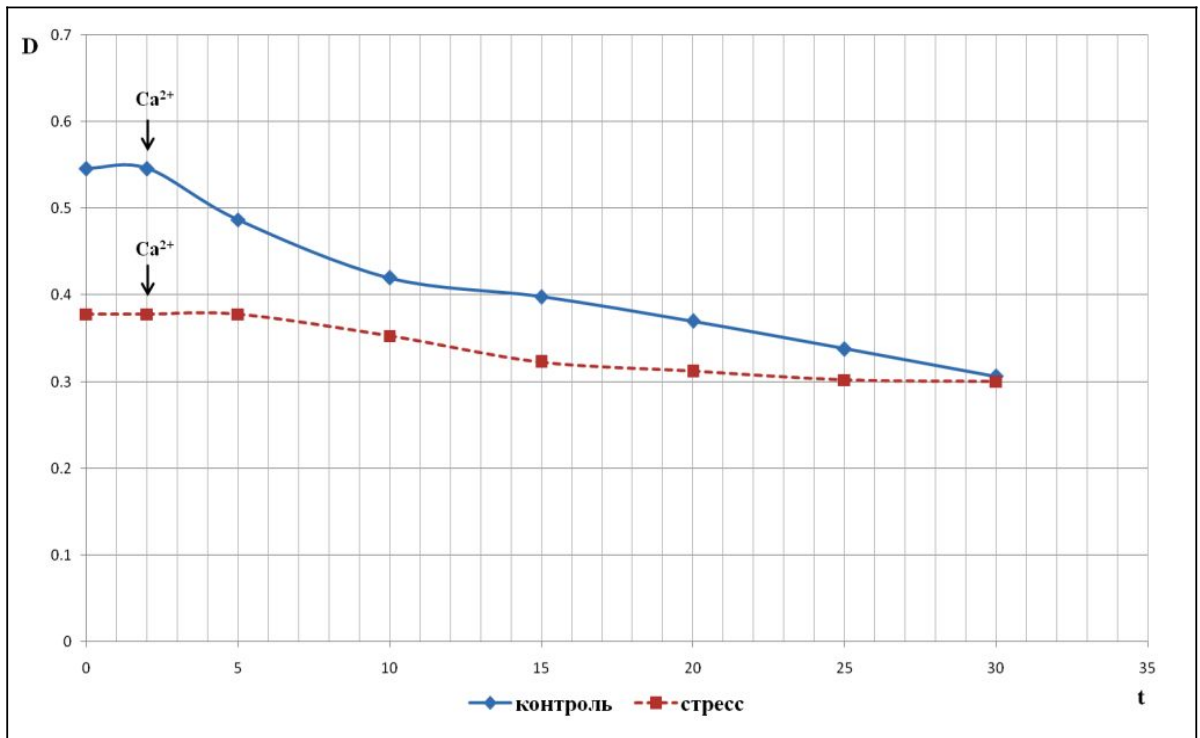


Рисунок 1. Ca²⁺-индуцированное открытие МРТР головного мозга белых крыс в условиях 30-дневного эмоционального стресса.

По оси абсцисс – степень набухания митохондрии, выраженная изменением светопоглощения на λ -540 нм (D). По оси ординат – время эксперимента (мин)

Таблица 2. Изменения количественного содержания ионов Ca²⁺ (моль/л) в митохондриальной и цитозольной фракции головного мозга при длительном эмоциональном стрессе

Группа животных	Митохондрии	Цитозоль
контрольная	$2,4 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-7}$
стрессированная	$1,1 \times 10^{-5*}$	$1,9 \times 10^{-7*}$

$P \leq 0.05$, $**P \leq 0.001$

$n = 5$

Получены данные об активности некоторых ферментов антиоксидантной системы, в частности, супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, после длительной изоляции животных и нарушения суточного ритма (табл. 1). Из таблицы видно что, активность как СОД, так и каталазы после 30-дневного стресса значительно снижается. Известно, что уменьшение активности ферментов антиоксидантной системы способствует накоплению активных

радикалов, которые вызывают нарушение целостности мембран, падение мембранного потенциала и изменение проницаемости мембран.

Для подтверждения данного предположения, было изучено влияние ингибитора МРТР - Циклоспорина А на степень открытия МРТР при отсутствии в реакционной среде ионов Ca. Из полученных данных, представленных на рисунке 2, следует, что показатель набухания

митохондрии головного мозга опытной группы животных, под действием Циклоспорина А, по сравнению с контрольными животными, явно возрастает в значительной степени, что говорит об уменьшении проводимости

митохондриальных мембран. В отличие от опытных животных, митохондрии контрольной группы не проявляют чувствительность к Циклоспорину А.

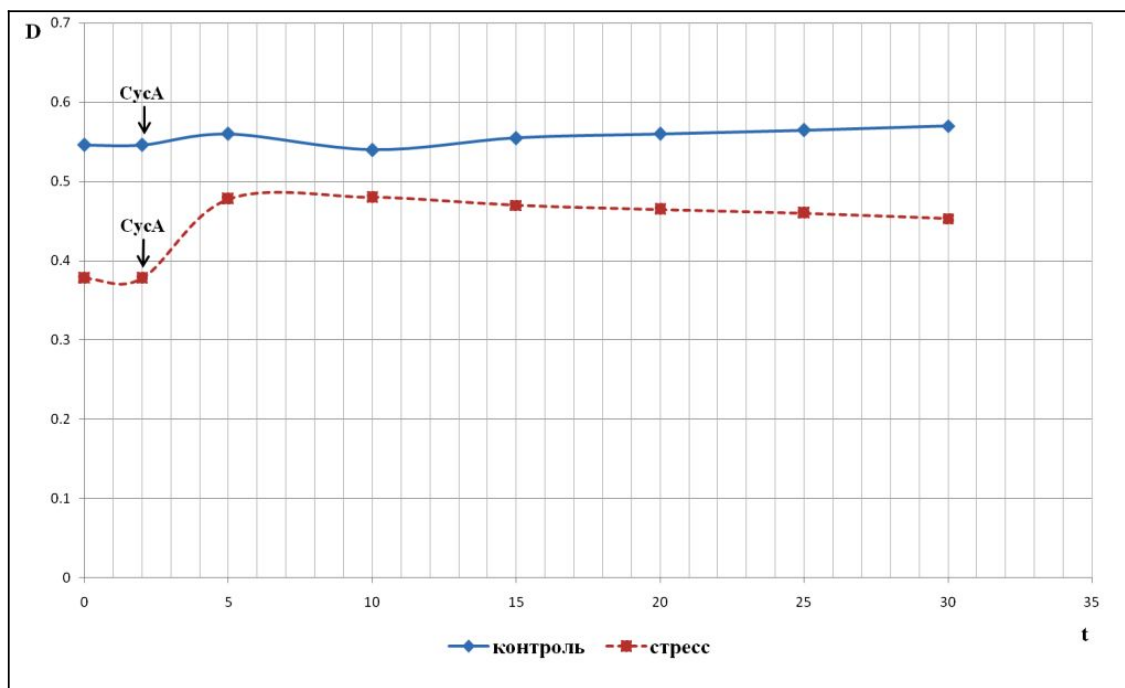


Рисунок 2. Циклоспорин А- индуцированное ингибирование МРТР в условиях 30-дневного эмоционального стресса

По оси абсцисс – степень набухания митохондрии, выраженная изменением светопоглощения на λ -540 нм (D). По оси ординат – время эксперимента (мин)

Полученные данные о чувствительности митохондрий контрольной группы к Ca^{2+} -индуцируемому открытию и неэффективное влияние циклоспорина А на этот процесс, совпадают с данными литературы (Eliseev *et al.*, 2009). Можно предположить, что изменения проводимости митохондриальных мембран зависит от функционального состояния митохондрии, которые, должно быть, в стрессовом состоянии в значительной степени открыты. Это предположение подтверждается также данными о количественном изменении ионов кальция в митохондриальной и цитозольной фракциях головного мозга как

контрольных, так и стрессированных белых крыс (таб. 2). Из таблицы следует, что под действием длительного эмоционального стресса, как в митохондриях, так и в цитоплазме наблюдаются изменения количественного содержания Ca^{2+} . В частности, в условиях стресса в митохондриях уменьшается содержание ионов, а в цитоплазме наоборот, возрастает. Как известно из данных литературы, активация МРТР происходит за счет увеличения концентрации кальция с наружной стороны митохондрии, в частности в цитоплазме (Brookes, Darley-Usmar, 2004). Уменьшение содержания Са-иона в митохондриях при стрессе, объясняется нарушением целостности

митохондриальных мембран, что приводит к ухудшению процесса аккумуляции и депонирования Ca^{2+} . Этим можно объяснить тот факт, что митохондрии контрольной группы животных, в отличие от митохондрии стрессированных животных, проявляют значительную чувствительность к Ca^{2+} -

индуцированному открытию МРТР и практически нечувствительны к действию Циклоспорина А. В то же время, митохондрии подвергавшихся стрессу животных, наоборот, проявляют чувствительность к Циклоспорину А и не реагируют на добавление в инкубационную среду ионов кальция.

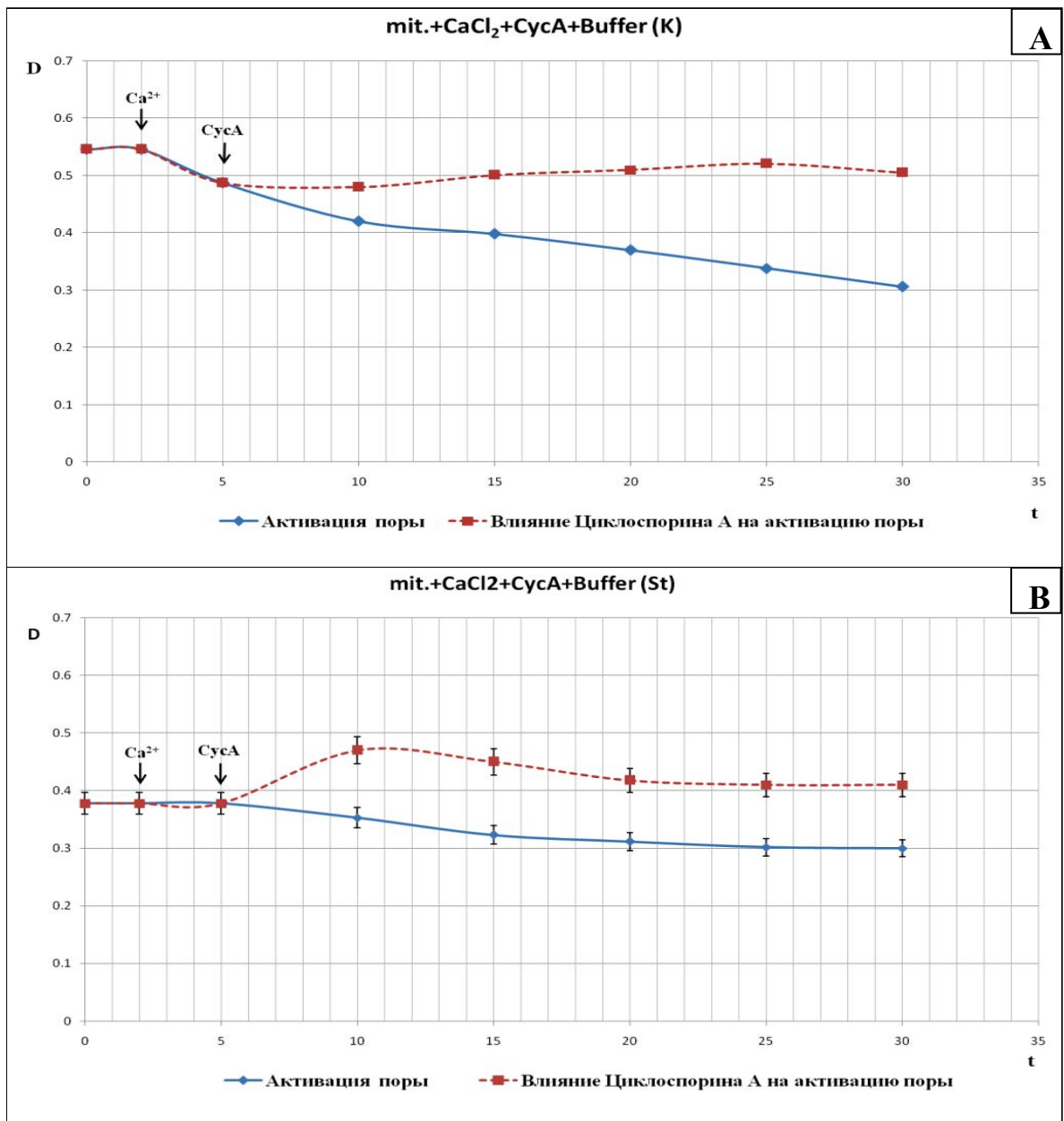


Рисунок 3. Влияние циклоспорина А на Ca^{2+} -индуцированное открытие МРТР головного мозга белых крыс

По оси абсцисс – степень набухания митохондрии, выраженная изменением светопоглощения на λ -540 нм (D). По оси ординат – время эксперимента (мин)

А – контрольные животные; **В** – стрессированные животные

В следующих сериях опытов изучали влияние Циклоспорина А на действие МРТР в присутствии в реакционной среде иона Са (рис. 3). Как следует из представленных данных, митохондрии головного мозга контрольной группы белых крыс в присутствии Са²⁺-иона и ингибитора действуют в том-же режиме, которое характерно для неповрежденных митохондрий. В отличие от контрольной группы, характер ответного поведения митохондрии головного мозга стрессированных животных на присутствие в реакционной среде одновременно активатора и ингибитора, неоднозначный. В частности, наблюдается значительное продление времени действия Циклоспорина А, что дает основание предполагать, что в условиях 30-дневного стресса увеличивается количество открытых МРТР.

Таким образом, выясняется, что продолжительный эмоциональный стресс, вызванный изоляцией и нарушением суточного ритма животных, который провоцирует в клетках головного мозга острый энергодефицит и подавляет активность антиоксидантной системы, проявляется нарушением функционирования митохондрии. Последнее выражается в возрастании проводимости митохондриальной мембраны, что является следствием открытия МРТР. Открытие МРТР, в свою очередь, вызывает набухание митохондрий, начало апоптоза и формирование нейродегенеративных процессов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящий проект выполнен при финансовой поддержке Национального Научного Фонда Грузии (Грант № GNSF/ST08/2-375). Все идеи в статье принадлежат авторам и могут не

совпадать с мнением Национального Научного Фонда Грузии.

ЛИТЕРАТУРА

- Alano CC, Beutner G, Dirksen RT, Gross RA, Sheu SS. (2002) Mitochondrial permeability transition and calcium dynamics in striatal neurons upon intense NMDA receptor activation. *J. Neurochem.* **3**, :531-8.
- Baranov SV, Stavrovskaya IG, Brown AM, Tyryshkin AM, Kristal BS. (2008) Kinetic model for Ca²⁺-induced permeability transition in energized liver mitochondria discriminates between inhibitor mechanisms. *J. Biol. Chem.* **283**, 665-676.
- Brand MD, Nicholls DG. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **5(2)**, 297-312.
- Brookes PS, Darley-USmar VM. (2004) Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, 39-46.
- Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, Ward JM. (1999) The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem. Soc. Symp.* **66**: 167-79.
- De Robertis E. (1967) Structural components of the synaptic region. *Handbook of Neurochem.* **2**, 365-372.
- Eliseev RA, Malecki J, Lester T, Zhang Y, Humphrey J, Gunter TE. (2009) Cyclophilin D interacts with Bcl2 and exerts an anti-apoptotic effect. *J. Biol. Chem.* **10**, 9692-9699.
- Friberg H, Wieloch T. (2002) Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie* **84**, 241-250.

- Gunter TE, Gerstner B, Lester T, Wojtovich AP, Malecki J, Swartz SG, Brookes PS, Gavin CE, Gunter KK. (2010) An analysis of the effects of Mn²⁺ on oxidative phosphorylation in liver, brain, and heart mitochondria using state 3 oxidation rate assays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **15**, 65-75.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Sullivan PG, Thompson MB, Scheff SW (1999) Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* **1**, 226-234.
- Sullivan PG, Thompson M, Scheff SW. (2000) Continuous infusion of cyclosporin A postinjury significantly ameliorates cortical damage following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* **2**, 631-637.
- Wang H, Guan Y, Wang X, Smith K, Cormier K, Zhu S, Stavrovskaya IG, Huo C, Ferrante RJ, Kristal BS, Friedlander RM. (2007) Nortriptyline delays disease onset in models of chronic neurodegeneration. *Eur. J. Neurosci.* **26(3)**: 633-641.
- Zhuravliova, E., Barbakadze, T., Zaalishvili, E., Chipashvili, M., Koshoridze, N., Mikeladze, D. (2009) Social isolation in rats inhibits oxidative metabolism, decreases the content of mitochondrial K-Ras and activates mitochondrial hexokinase. *Behav. Brain Res.* **205(2)**, 377-383.
- Акопова О. А. (2008) роль митохондриальной поры в трансмембранном обмене кальция в митохондриях. *Укр. біохім. журн.* 80, 3, 40-47.
- Кошоридзе Н.И., Менабде К.О., Кучукашвили З.Т., Чачуа М.В., Чипашвили М.Д. (2010) Количественные изменения продуктов перекисного окисления липидов в условиях стресса. *J. Stress Physiol. Biochem.* **6(2)**, 4-9.