

ВЛИЯНИЕ ТАЛЛИЯ НА СПОНТАННОЕ СОКРАЩЕНИЕ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ И НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ КАРДИОМИОЦИТОВ

© 2019 г. С.М. Коротков, В.П. Нестеров, К.В. Соболев

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 18.06.2019 г.

После доработки 18.06.2019 г.

Принята к публикации 08.07.2019 г.

Исследованы эффекты ионов Tl^+ на спонтанное сокращение препаратов сердечной мышцы лягушки и на митохондрии сердца крысы. Ионы Tl^+ в концентрациях 1,0, 2,5 и 5 мМ в растворе Рингера снижали все параметры спонтанных сердечных сокращений. Наибольшие изменения наблюдались для частоты сокращений, а также амплитуды и скоростей нарастания и падения напряжения однократного сокращения. Нагрузка митохондрий кальцием в среде с $TiNO_3$ и $NaNO_3$ индуцировала открытие митохондриальной кальций-зависимой поры в их внутренней мембране, что проявлялось в увеличении набухания этих органелл, снижении потенциала их внутренней мембраны и дыхания в состоянии 3 по Чансу или в состоянии разобшения 2,4-динитрофенолом. Эти эффекты ионов Tl^+ ингибировались АДФ и циклоспорином А. Таким образом, стимулированное ионами Tl^+ поступление Ca^{2+} в кардиомиоциты может индуцировать перегрузку митохондрий сердца ионами Ca^{2+} и Na^+ и стимулировать открытие митохондриальных кальций-зависимых пор в их внутренней мембране. Полученные результаты могут дать объяснение большей таллиевой токсичности *in vivo* для сердечной мышцы. Применение ионов Tl^+ для исследования миокарда может быть нежелательно при сердечных патологиях, включающих нарушения ритма, и при сердечной недостаточности, особенно при диастолической дисфункции.

Ключевые слова: Tl^+ , Ca^{2+} , Na^+ , сокращение миокарда, пейсмекерная активность, интоксикация, митохондрии сердца крысы, митохондриальная кальций-зависимая пора.

DOI: 10.1134/S0006302919050181

Изотопы таллия используются в медицине, например в диагностике заболеваний миокарда (сцинтиграфия), а его неорганические соединения применяются в различных отраслях промышленности [1,2]. Повышенная концентрация таллия наблюдается вокруг металлургических заводов, а также в районе электростанций, работающих на угле.

Tl^+ может стехиометрически замещать K^+ в препаратах сердца и диафрагмы крыс [3]. Проникший в организм человека таллий в основном накапливается в мозге и миокарде, в меньшей степени — в печени и почках [1]. У отравленных таллием крыс этот металл в основном концентрировался в сердце и скелетных мышцах и в мень-

шей степени в печени и почках [4–6]. При этом были обнаружены значительные структурные повреждения миофибрилл, ядер и мембран саркоплазматического ретикула и митохондрий. Токсическое действие Tl^+ на биологические организмы связано с его способностью легко проникать через внутреннюю митохондриальную мембрану (ВММ) и замещать K^+ в калий-зависимых биохимических реакциях или ионотранспортных процессах [2,7]. Однако химическое поведение Tl^+ может быть отличным от поведения ионов K^+ , что может нарушать некоторые жизненно важные K^+ -зависимые процессы.

Известно, что умеренная кальциевая нагрузка митохондрий приводит к открытию митохондриальной кальций-зависимой поры (МКЗП) во внутренней мембране, которая становится проницаемой для небольших катионов (H^+ , K^+ , Na^+ и Ca^{2+}) [8,9]. В этом случае наблюдается массив-

Сокращения: ВММ — внутренняя митохондриальная мембрана, МКЗП — митохондриальная кальций-зависимая пора, МСК — митохондрии сердца крысы, CsA — циклоспорин А, ДНФ — 2,4-динитрофенол, ДК — дыхательный контроль.

ное набухание митохондрий, снижение потенциала ВММ ($\Delta\Psi_{\text{мито}}$) и уменьшение дыхания митохондрий в различных энергетических состояниях. Действие Ti^+ на изолированные гепатоциты крысы сопровождалось увеличением концентраций Ca^{2+} и Na^+ в их цитоплазме [10]. Нагрузка кальцием энергизованных сукцинатом митохондрий печени крысы (МПК) в среде, содержащей TiNO_3 и нитраты (KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3), индуцировала зависящее от концентрации Ti^+ открытие МКЗП в их внутренней мембране [11]. Подобный результат был достигнут в аналогичных опытах с митохондриями сердца крысы (МСК) в среде с TiNO_3 и KNO_3 [12]. Открытие МКЗП, ингибируемой АДФ и циклоспорином А (CsA), во внутренней мембране этих митохондрий [11,12] сопровождалось массивным набуханием этих органелл, а также снижением $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ и скоростей дыхания в состоянии 3 и в разобленном 2,4-динитрофенолом (ДНФ) состоянии. В настоящее время отсутствуют данные о совместном действии Ca^{2+} и Na^+ на индуцированное ионами Ti^+ открытие МКЗП во внутренней мембране нагруженных Ca^{2+} МСК.

Ранее было описано действие Ti^+ на сердечные сокращения и нервно-мышечные препараты [3,13–18]. Однако полученные данные были несколько противоречивы. Отмечался как положительный, так и отрицательный инотропный эффект таллия на сердечные сокращения. Более того, не исследовались изменения скоростных характеристик одиночного сокращения сердца при воздействии Ti^+ . Для исследования пейсмерной активности сердца нами была получена модель спонтанного сокращения предсердий. Поэтому в данной работе мы исследуем, как влияет таллий на скоростные характеристики спонтанных сокращений предсердий сердца лягушки. Другой целью нашей работы было изучение влияния Ti^+ на натриевую проницаемость ВММ и индукцию таллием МКЗП в нагруженных кальцием МСК. В связи с этим мы исследовали набухание, $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ и дыхание энергизованных сукцинатом МСК в состоянии 3 и состоянии, стимулированном ДНФ, в средах, содержащих TiNO_3 и NaNO_3 в присутствии Ca^{2+} и ингибиторов МКЗП (АДФ и CsA).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрация и анализ параметров сокращения. Для изучения пейсмерной активности сердца иссекали предсердия с фрагментом венозного синуса из сердца лягушки *Rana ridibunda*. Для изучения сокращений, вызванных электрической стимуляцией, использовали кольцевые препараты,



Рис. 1. Схема определения скорости нарастания (dP/dt) и падения напряжения ($-dP/dt$) для одиночного сердечного сокращения.

иссеченные из средней и нижней части желудочков сердца лягушки *Rana ridibunda*, как описано ранее [19]. Во время опыта такой препарат стимулировали через платиновые электроды электрическими импульсами сверхпороговой амплитуды с длительностью импульса 1–2 мс. Препараты помещали в стеклянную термостатированную ячейку при 10°C , ориентировали вертикально и растягивали с помощью стальных крючков, сделанных из мандрена, до оптимальной длины. Один стальной крючок присоединяли к фиксированному платиновому крючку, второй — к тензодатчику. Сокращения регистрировали в изометрическом режиме. Сигналы обрабатывали с помощью компьютерной программы WinPulse, силу сокращения определяли в ньютонах. Оценивали следующие параметры сокращения: максимальное усилие, развиваемое мышечным препаратом (P_0); частоту сокращения (в Гц); максимальные скорости нарастания напряжения (dP/dt) и расслабления ($-dP/dt$) определялись по касательной в точках перегиба одиночного сокращения (рис. 1).

В экспериментах по мышечному сокращению использовали нормальный раствор Рингера, содержащий: NaCl — 110 мМ, KCl — 2,5 мМ, MgCl_2 — 1 мМ, CaCl_2 — 2,5 мМ, NaH_2PO_4 — 0,75 мМ, NaHCO_3 — 0,5 мМ, глюкоза — 5 мМ (рН 7,4). При аппликации 1 мМ Ti^+ в физиологическом растворе уменьшали концентрацию KCl до 1,5 мМ. При аппликации 2,5 и 5 мМ Ti^+ использовали физиологический раствор без KCl . Нитрат таллия готовили в виде 125 мМ stock-раствора и вносили в экспериментальный раствор до конечных концентраций 1,0, 2,5 и 5 мМ непосредственно перед экспериментом. Действие Ti^+ прекращали путем отмывания препарата нормальным раствором Рингера. Применяли стандартные способы статистической обработки результатов с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Снижение параметров спонтанных сокращений предсердий после инкубации в растворах с солями таллия по сравнению с контрольными сокращениями

Параметр	[Tl], мМ		
	1 (n = 3)	2.5 (n = 5)	5 (n = 3)
P_0	$-20 \pm 5\%$	$-27 \pm 3\%$	$-37 \pm 6\%$
Частота, Гц	$-47 \pm 6\%$	$-30 \pm 7\%$	$-52 \pm 8\%$
dP/dt	$-27 \pm 5\%$	$-23 \pm 6\%$	$-33 \pm 4\%$
$-dP/dt$	$-33 \pm 6\%$	$-38 \pm 8\%$	$-65 \pm 7\%$

Примечание. P_0 — максимальное усилие, развиваемое мышечным препаратом; частота, Гц — частота сокращений; dP/dt — максимальная скорость нарастания напряжения; $-dP/dt$ — максимальная скорость расслабления. Данные представлены для трех-пяти экспериментов. Различия достоверны ($p < 0.05$).

Изоляция митохондрий. Для выделения митохондрий сердца крысы использовали самцов крыс линии Вистар массой 200–250 г. Изоляцию МСК проводили на льду согласно разработанной нами методике [20]. На окончательном этапе МСК суспендировали в 3 мл среды, содержащей сахарозу — 300 мМ и трис-НСl — 10 мМ (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 (ДНФ) квалификации ч.д.а.; маннитол, $Mg(NO_3)_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, H_3PO_4 , $TiNO_3$, NaCl, $NaNO_3$ квалификации х.ч. Сафранин, трис-ОН, KCl, олигомицин, ротенон, АДФ, сукцинат, бычий сывороточный альбумин, NEPES, MOPS, CsA и этилендиаминтетрауксусная кислота были получены от фирмы Sigma (США).

Измерение поглощения кислорода. Скорости дыхания митохондрий (нг-атом O/(мин · мг белка)) измеряли полярографическим методом с применением закрытого платинового электрода Кларка на анализаторе Эксперт-001 (НПО «Эко-никс эксперт», Москва, Россия) при 26°C в ячейке объемом 1,4 мл. Митохондрии (1 мг белка в 1 мл) добавляли в юстируемую сахарозой 400 мОсм среду, содержащую $TiNO_3$ — 0–75 мМ, $NaNO_3$ — 125 мМ, трис- NO_3 — 5 мМ (рН 7,3), сукцинат — 5 мМ и ротенон — 2 мкМ, а также (где указано) $Mg(NO_3)_2$ — 3 мМ и трис- PO_4 — 3 мМ или 1 мкг/мл олигомицина. Концентрации агентов ($CaCl_2$, АДФ, ДНФ, CsA), добавляемых в среду после митохондрий (показано стрелками), указаны в подписи к рис. 3. Дыхательные контроли (ДК) вычисляли по формулам: $ДК_{АДФ}$ = состояние 3 по Чансу (АДФ и субстрат в среде)/базальное

дыхание (субстрат в среде); $ДК_{ДНФ}$ = ДНФ активированное дыхание (ДНФ и субстрат в среде)/базальное дыхание.

Спектрофотометрическая оценка изменения объема митохондрий. Набухание митохондрий (рис. 4), сопровождающееся уменьшением оптической плотности их суспензии, изучали на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», Россия) при длине волны 540 нм и температуре 20°C. Митохондрии (1 мг белка на мл) вносили в 400 мОсм среду, содержащую $TiNO_3$ — 0–75 мМ, $NaNO_3$ — 125 мМ, трис- NO_3 — 5 мМ (рН 7,3), ротенон — 2 мкМ и олигомицин — 1 мкг/мл, трис- PO_4 — 1 мМ, а также (где указано) $CaCl_2$ — 200 мкМ, АДФ — 500 мкМ и CsA — 1 мкМ. После митохондрий в среду вносили сукцинат до концентрации 5 мМ.

Определение митохондриального потенциала. Потенциал на внутренней мембране МСК (рис. 5) измеряли по стандартной методике [21] 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 400 мОсм среды, содержащей $TiNO_3$ — 15 мМ, сахарозу — 120 мМ, $NaNO_3$ — 125 мМ, трис- NO_3 — 5 мМ (рН 7,3), трис- PO_4 — 1 мМ, сафранин — 3 мкМ, ротенон — 2 мкМ и олигомицин — 1 мкг/мл, а также (где указано) АДФ — 500 мкМ и CsA — 1 мкМ. На рис. 3–5 показаны типичные результаты, полученные для трех независимых экспериментов. Применяли стандартные способы статистической обработки результатов с использованием программы Origin 6.0. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Действие Tl^+ на силу и скорость сердечных сокращений. Инотропное действие таллия определяли на изолированных препаратах предсердия сердца лягушки в условиях спонтанного возбуждения/сокращения. Установлено, что ионы Tl^+ в концентрациях 1,0, 2,5 и 5 мМ в растворе Рингера снижали все параметры спонтанных сердечных сокращений (таблица, рис. 2). Наибольшие изменения наблюдались для частоты сокращений, а также амплитуды и скоростей нарастания и падения напряжения одиночного сокращения (таблица). Отрицательный инотропный и хронотропный эффекты Tl^+ проявлялись сразу после его добавления в раствор (рис. 2). В некоторых случаях (в трех опытах из пяти) частота сокращений до некоторой степени восстанавливалась, однако

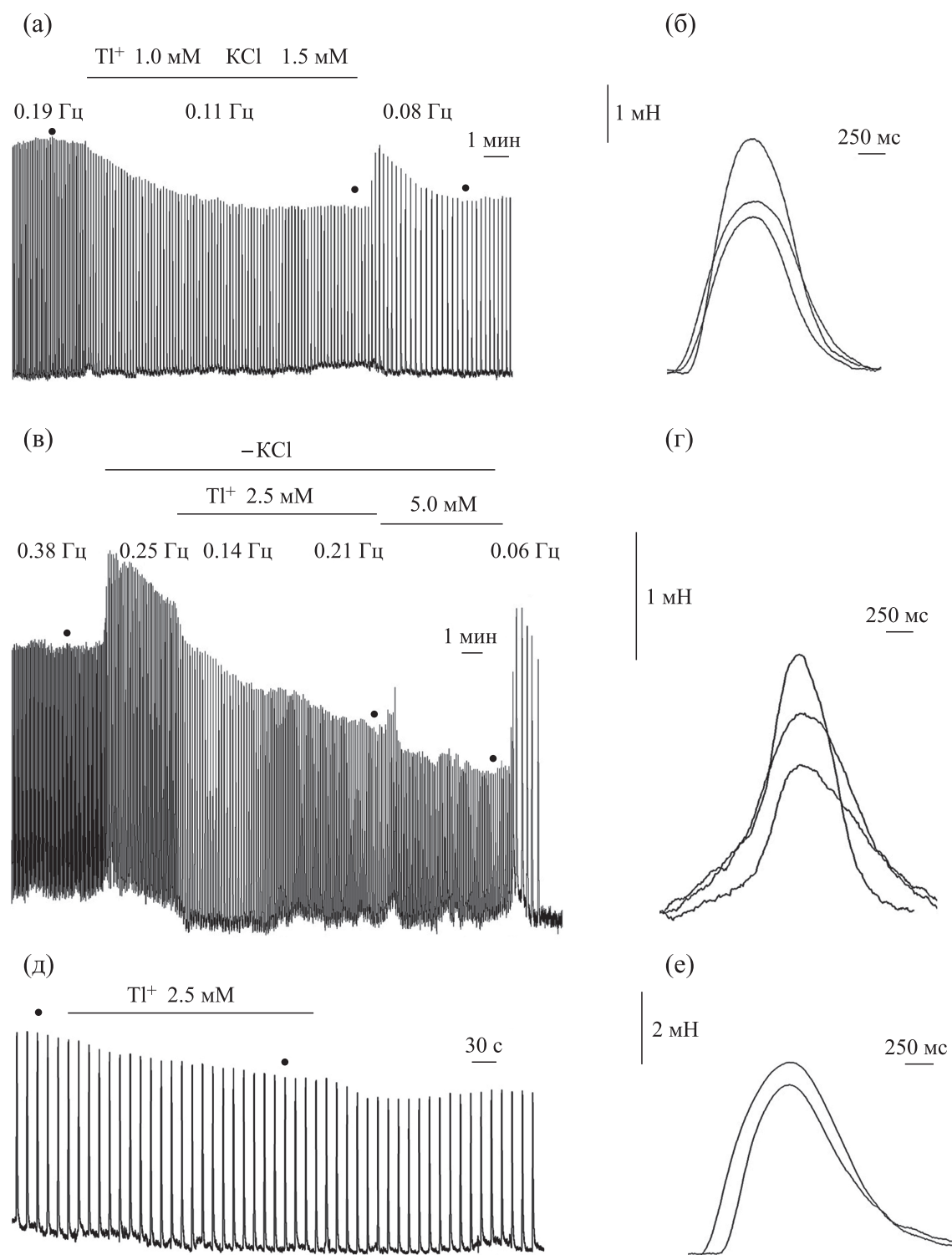


Рис. 2. Влияние таллия на спонтанное сокращение предсердий и сокращение препарата желудочка сердца лягушки в условиях электрической стимуляции. Полная схема опыта показана слева (а, в, д), а соответствующие им одиночные сокращения при другой временной шкале — справа (б, г, е); они также помечены черными кружками на записях (а, в, д). Время действия, частота сокращения (в Гц) и концентрации Tl⁺ обозначены горизонтальными линиями над регистрацией сокращения. На рисунках (а) и (в) — спонтанное сокращение предсердий, (д) — сокращение препарата желудочка сердца лягушки в условиях электрической стимуляции с частотой 0,07 Гц.

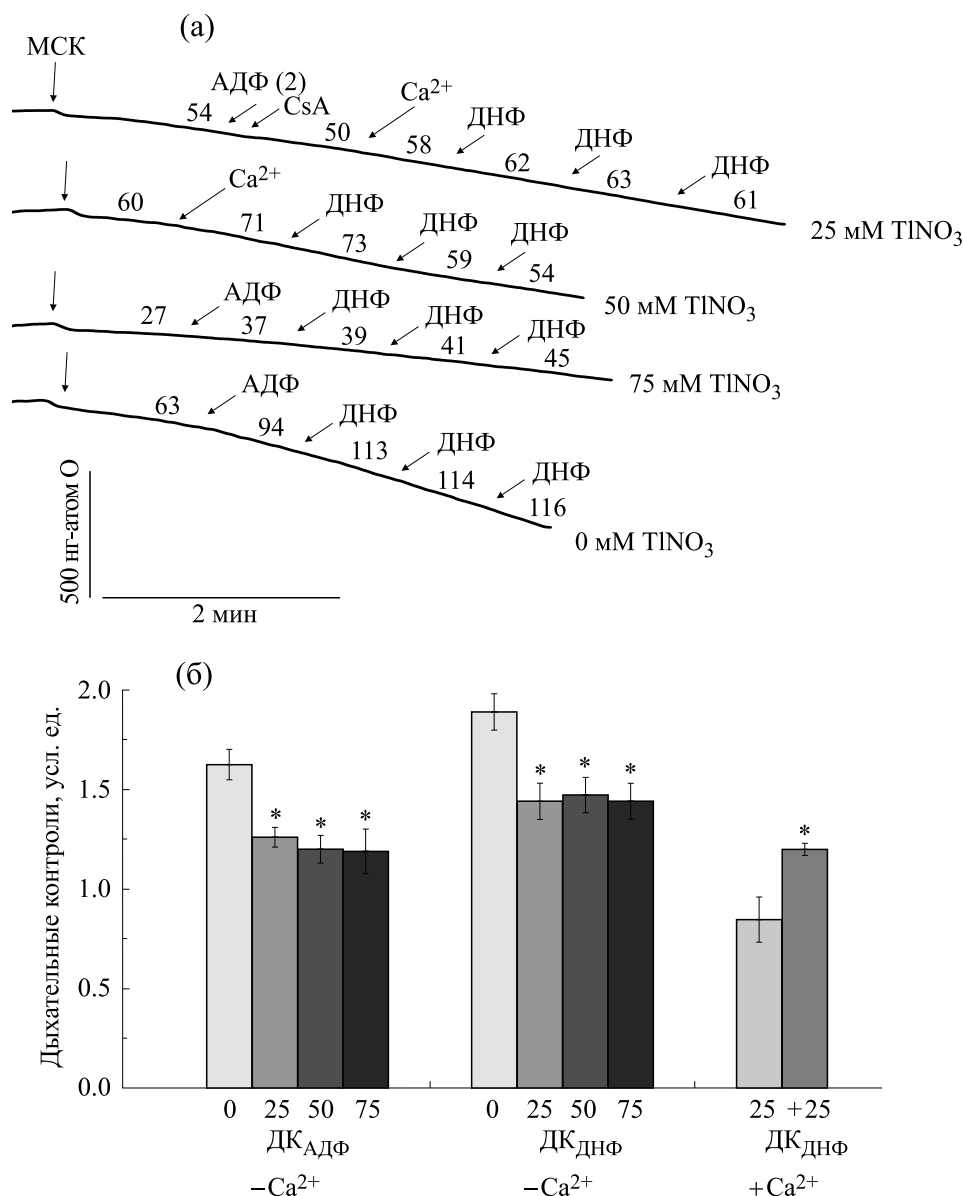


Рис. 3. Скорости поглощения кислорода энергизованными сукцинатом митохондриями сердца крысы. Митохондрии (1,0 мг/мл белка) добавляли в 400 мОсм среду, содержащую 0–75 мМ TiNO_3 , 125 мМ NaNO_3 , 5 мМ трис- NO_3 (рН 7,3), 5 мМ сукцината и 2 мкМ ротенона, а также 3 мМ трис- PO_4 и 3 мМ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (опыты без Ca^{2+}) или 1 мкг/мл олигомицина (опыты с Ca^{2+}). Стрелками показаны добавки: митохондрий сердца крысы (МСК), 75 мкМ Ca^{2+} (Ca^{2+}), 500 мкМ АДФ (АДФ), 1 мкМ CsA (CsA) и 15 мкМ 2,4-динитрофенола (ДНФ) по сумме трех добавок. Цифрами над кривыми на рисунке (а) обозначены скорости поглощения кислорода (нг-атом О/мин·мг белка). Цифрами справа от кривых отмечено наличие в среде TiNO_3 (мМ). По оси ординат на рисунке (б) показаны величины ДК и ДК_{ДНФ}. Цифрами под осью абсцисс показано наличие в среде TiNO_3 (мМ), а знаком (+) – присутствие в среде до митохондрий 500 мкМ АДФ (АДФ) и 1 мкМ CsA (CsA). Звездочкой показаны достоверные различия от контроля – опыты без Ca^{2+} (– Ca^{2+}) или с предварительно (до митохондрий) добавленным 75 мкМ Ca^{2+} (+ Ca^{2+}). Среднеквадратичное отклонение скоростей и величин дыхательных контролей было в пределах 5% ($p < 0,05$).

оставалась намного меньше, чем до добавления Ti^+ . Иногда Ti^+ обратимо блокировал спонтанные сокращения при концентрации 1 мМ (в одном опыте из пяти), а при концентрации 5 мМ блокировал во всех трех опытах. Более того, вос-

становление параметров одиночного сокращения после отмывания больших концентраций таллия из раствора происходит достаточно длительно. В то время как амплитуда сокращения имеет тенденцию к восстановлению, частота сокращения

практически не восстанавливается и может продолжать падать. Особенно это было заметно при больших концентрациях таллия (более 2,5 мМ) и при отмывании таллия из раствора (рис. 2) Скорости нарастания и падения напряжения одиночного сокращения также практически не восстанавливались до контрольного значения в течение нескольких часов наблюдения.

Вызванные сокращения более устойчивы к влиянию таллия. На рис. 2д и 2е показано сокращение сегментов желудочка сердца лягушки при концентрации Tl^+ 2,5 мМ и стимуляции с частотой 0,07 Гц. Скорость нарастания напряжения практически не зависит от ингибирующего влияния таллия (рис. 2е). Уменьшение амплитуды (на $18 \pm 3\%$) и скорости падения напряжения (на $16 \pm 4\%$) были меньше, чем для спонтанных сокращений (см. таблицу). Можно предположить, что кардиомиоциты желудочка (или электростимулируемые препараты сердца) более устойчивы к повреждающему действию Tl^+ , чем кардиомиоциты и пейсмекерные клетки спонтанно сокращающихся предсердий. Данные, представленные выше, указывают на то, что Tl^+ может влиять на процессы сопряжения возбуждения—сокращения в сердечной мышце.

Действие Ca^{2+} на дыхание, набухание и потенциал внутренней мембраны митохондрий сердца крысы в среде с $TiNO_3$ и $NaNO_3$. На рис. 3а видно что дыхание энергизованных сукцинатом МСК в базальном состоянии, состоянии 3 и стимулированном ДНФ состоянии заметно снижалось в среде с 75 мМ $TiNO_3$ и 125 мМ $NaNO_3$ в сравнении с опытами без таллия. После инъекции 100 мкМ Ca^{2+} в среду с 25 мМ $TiNO_3$ и 125 мМ $NaNO_3$ произошло заметное снижение стимулированного ДНФ дыхания (рис. 3а) и величины $DK_{ДНФ}$ (рис. 3б). При этом данный эффект ослаблялся в присутствии АДФ и CsA.

Пассивную натриевую проницаемость ВММ можно оценить по набуханию деэнергизованных МСК в среде с $NaNO_3$ [22]. Ранее мы показали, что Tl^+ увеличивал пассивную натриевую проницаемость внутренней мембраны МПК [23]. На рис. 4 можно увидеть, что набухание деэнергизованных МСК увеличивалось с ростом концентрации $TiNO_3$ в среде с $NaNO_3$. Это доказывает что Tl^+ , как и в опытах с МПК, стимулирует пассивную натриевую проницаемость внутренней мембраны этих органелл. Набухание деэнергизованных митохондрий не зависело от наличия Ca^{2+} , АДФ и CsA в среде с 25 мМ $TiNO_3$ и 125 мМ $NaNO_3$ (рис. 4б). Инъекция сукцината в среду стимулировала сжатие митохондрий, которое было не столь выражено в среде с 75 мМ $TiNO_3$ (рис. 4).

Как мы показали ранее в аналогичных опытах с МПК [23], такое сжатие энергизованных органелл связано с удалением избытка Na^+ из их матрикса при участии митохондриального K^+/H^+ -обменника с последующим удалением протонов комплексами электрон-транспортной цепи ВММ. До этого мы обнаружили [11], что набухание энергизованных сукцинатом МПК в среде с $TiNO_3$, 125 мМ нитратами (KNO_3 , NH_4NO_3 , $NaNO_3$) и 100 мкМ Ca^{2+} было обусловлено открытием МКЗП во внутренней мембране. После внесения сукцината в аналогичную среду с 25 мМ $TiNO_3$, 125 мМ $NaNO_3$ и 200 мкМ Ca^{2+} (рис. 4) происходило набухание митохондрий, которое сменялось, как и в случае аналогичных опытов с МПК [11], сжатием этих органелл.

В опытах без Ca^{2+} (рис. 5а) после введения сукцината в среду, содержащую $TiNO_3$ — 15 мМ, сахарозу — 110 мМ и $NaNO_3$ — 125 мМ, уменьшение $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ внутренней мембраны МСК было не столь значительным. Снижение $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ резко усилилось в опытах с Ca^{2+} что выразилось в обратном поступлении в среду поглощенного митохондриями сафранина (рис. 5а). Это хорошо видно при сравнении соответствующих скоростей изменения флуоресценции сафранина (рис. 5б), которые увеличились почти в три раза после внесения Ca^{2+} в среду. Однако данные эффекты Ca^{2+} практически полностью исчезли при наличии в среде АДФ и CsA, добавленных до митохондрий.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Tl^+ может ингибировать Na/K -АТФазу [24] и увеличивать внутриклеточную концентрацию Na^+ [16], что, в свою очередь, приводит к увеличению внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и повышению как амплитуды сокращения, так и скорости нарастания напряжения. Однако мы наблюдаем обратные процессы, что может свидетельствовать о сильных ингибирующих свойствах самого таллия, подавляющих положительный инотропный эффект, вследствие увеличения внутриклеточного натрия. При этом наибольшее ингибирующее влияние Tl^+ оказывает на спонтанное сокращение предсердий, обнаруживая выраженный отрицательный хронотропный эффект [3,18] и наши данные. Однако электростимулируемые препараты сердца могут быть более устойчивы к ингибирующему влиянию ионов таллия и обнаруживать значительный положительный инотропный эффект [16].

Данные, приведенные в работах [25,26], указывают на то, что Tl^+ снижает синтез АТФ в клетках. Сердце весьма чувствительно к содержанию концентрации макроэргов. Основными энерго-

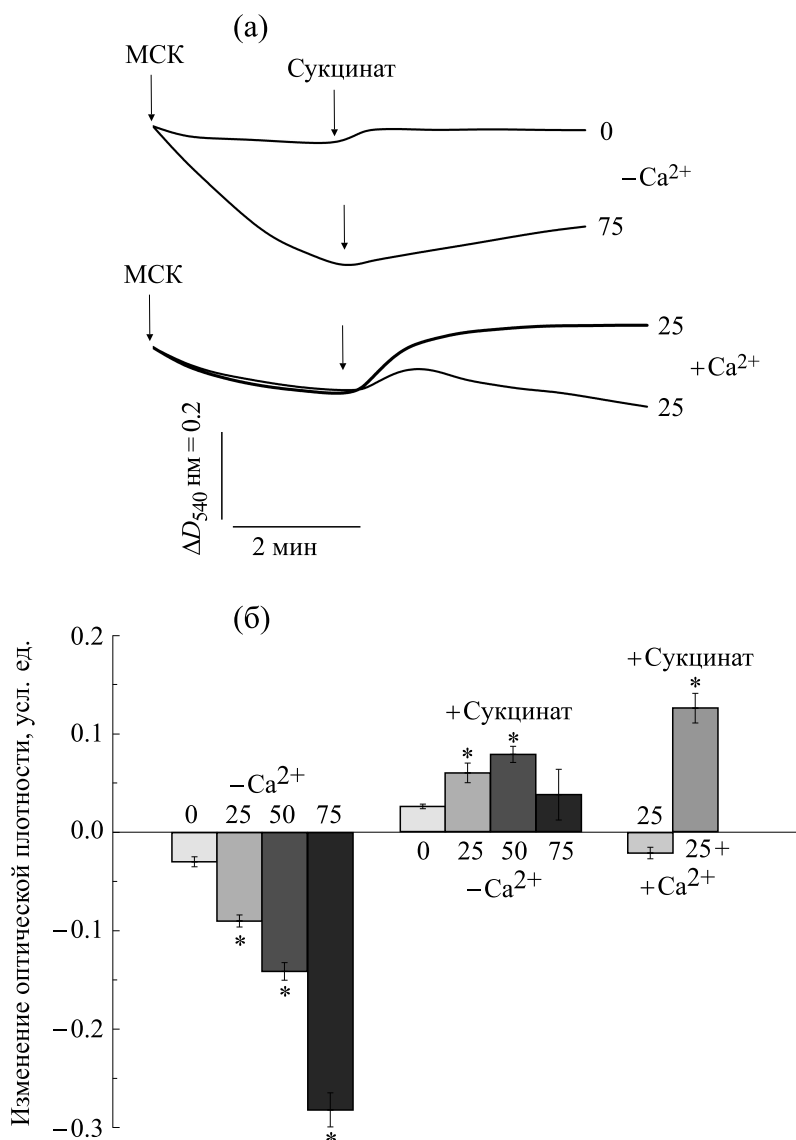


Рис. 4. Набухание митохондрий сердца крысы в среде с NaNO_3 . Митохондрии (1 мг/мл белка) добавляли в среду, содержащую TiNO_3 – 0–75 мМ, NaNO_3 – 125 мМ, трис- NO_3 – 5 мМ (рН 7,3), ротенон – 2 мкМ и олигомицин – 1 мкМ/мл, а также трис- PO_4 – 1 мМ (опыты с Ca^{2+}). Вертикальными стрелками показаны следующие добавки: митохондрии сердца крысы (МСК) и сукцинат – 5 мМ (+ Сукцинат). Цифрами справа от кривых на рисунке (а) либо вблизи оси абсцисс на рисунке (б) отмечено наличие в среде TiNO_3 (мМ). Жирной кривой на рисунке (а) показано присутствие 1 мкМ CsA в среде. По оси ординат на рисунке (б) показано изменение оптической плотности через 3 мин после добавки митохондрий (– Ca^{2+}) либо через 3 мин после внесения сукцината в среду (+ Сукцинат). Наличие 200 мкМ Ca^{2+} в среде обозначено на рисунке (б) как (+ Ca^{2+}). Знаком (+) у концентрации 25 мМ TiNO_3 под осью абсцисс отмечено присутствие в среде до митохондрий 500 мкМ АДФ и 1 мкМ CsA. Звездочкой на рисунке (б) показаны достоверные различия ($p < 0,05$) от контроля – опыты без Ca^{2+} (– Ca^{2+}) или с предварительно (до митохондрий) добавленным 200 мкМ Ca^{2+} (+ Ca^{2+}).

емкими процессами являются развитие силы и частота сокращений сердца. Сократительный аппарат за счет АТФазной активности миозина потребляет до 80% общей энергии кардиомиоцита. Поэтому, с целью экономии энергии в сердце, сила и частота сокращения сразу реагируют даже на

незначительное падение концентрации макроэргов в сердце. Наряду с уменьшением количества мостиков между актиновыми и миозиновыми миофибриллами возникают неразмыкающиеся связи между ними из-за накопления АДФ, повышается ригидность сердца, затрудняющая его на-

полнение кровью, падает его насосная функция. Помимо этого, снижение АТФазной активности саркоплазматического ретикулула приводит к уменьшению его реабсорбционной способности и, как следствие, к снижению скорости релаксации одиночного сокращения (отрицательный лузитропный эффект).

Не исключено, что таллий оказывает на сердечную мышцу двойственное влияние. При малых концентрациях таллия, когда ингибирование синтеза АТФ незначительно, увеличение внутриклеточного натрия и, соответственно, кальция, может приводить к положительному инотропному эффекту, как описано в работах [3,15–17]. Однако при больших концентрациях таллия или увеличении времени инкубации начинает превалировать эффект ингибирования синтеза АТФ, приводящий к отрицательному инотропному/хронотропному [3,13–15,17,18] и лузитропным эффектам, а также к снижению скорости нарастания напряжения одиночных сокращений сердца, которое мы наблюдали в наших экспериментах. Подтверждением может служить также тот факт, что увеличение частоты стимуляции сердца (быстрое истощение пула макроэргов) в растворе с таллием приводило к большему отрицательному инотропному эффекту [15].

Таллий плохо выводится из клеток и имеет свойство в них накапливаться [3], поэтому токсические эффекты малых концентраций таллия могут проявляться в отдаленном периоде. При запуске процессов апоптоза Ti^+ увеличивает проницаемость плазматической мембраны кардиомиоцитов для ионов Ca^{2+} . Происходит неуправляемый вход кальция через поры плазматической мембраны [27].

Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызванное таллием, дополнительно стимулирует открытие МКЗП во внутренней мембране митохондрий. Ti^+ вызывает выраженную дисфункцию митохондрий [28–30]. В этой связи представлялось важным определить влияние Ti^+ на функциональное состояние митохондрий кардиомиоцитов и установить его действие на катионный транспорт через внутренние мембраны митохондрий.

Воздействие Ti^+ на изолированные гепатоциты и клетки РС12 индуцировало в них апоптотические процессы, приводило к уменьшению концентрации восстановленного глутатиона и к увеличению продукции активных форм кислорода и H_2O_2 в цитоплазме, а также стимулировало процессы перекисного окисления липидов [29,30]. Транспорт Ti^+ в клетки НЕК-293 и мышечные клетки крысы происходит при участии потенци-

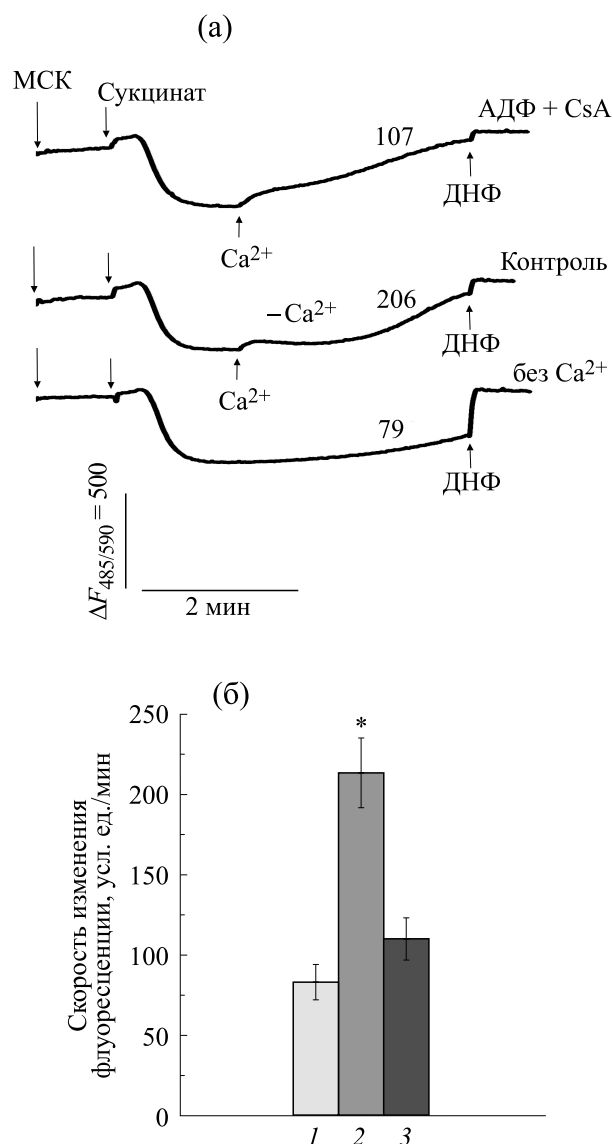


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции сафранина в суспензии энергизованных сукцинатом митохондрий сердца крысы в среде с NaNO_3 . Митохондрии (0,5 мг/мл) помещали в среду, содержащую TiNO_3 – 20 мМ, сахарозу – 110 мМ, NaNO_3 – 125 мМ, трис- NO_3 – 5 мМ (pH 7,3), трис- PO_4 – 1 мМ, ротенон – 2 мкМ, сафранин – 3 мкМ и олигомицин – 1 мкг/мл. Стрелками показаны добавки: митохондрий сердца крысы (МСК), 5 мМ сукцината (Сукцинат) и 40 мкМ 2,4-динитрофенола (ДНФ). Над кривыми на рисунке (а) либо по оси ординат на рисунке (б) показаны скорости изменения флуоресценции сафранина (усл. ед./мин) за 1 минуту до внесения в среду ДНФ. Цифрами под осью абсцисс отмечены опыты: (1) – без Ca^{2+} , (2) – с 40 мкМ Ca^{2+} , (3) – с Ca^{2+} и внесенными до митохондрий 500 мкМ АДФ и 1 мкМ CsA. Звездочкой на рисунке (б) отмечены достоверные различия от контроля – опыты без Ca^{2+} ($p < 0,05$).

ал-зависимых и кальций-индуцируемых калиевых каналов [31,32]. Основной причиной токсичности таллиевых соединений является способность Tl^+ замещать K^+ в калий-зависимых биохимических процессах, легко проникать через внутреннюю митохондриальную мембрану и способствовать увеличению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и Na^+ [2,7,10]. Транспорт Tl^+ в митохондрии сердца крысы осуществляется при участии АТФ-зависимых или кальций-активируемых калиевых каналов ВК-типа [33–35]. При изучении набухания деэнергизованных митохондрий в средах с нитратами (KNO_3 , $NaNO_3$, NH_4NO_3 , $TlNO_3$) обнаружили, что внутренняя митохондриальная мембрана (ВММ) оказалась низкопроницаема для K^+ , Na^+ , H^+ и высокопроницаема для Tl^+ соответственно [7,22]. В аналогичных опытах с митохондриями печени крысы в 400 мОсм среде, содержащей смесь $TlNO_3$ с нитратом (KNO_3 или NH_4NO_3 или $NaNO_3$), либо в опытах с митохондриями сердца крысы в среде, содержащей смесь $TlNO_3$ с нитратом (KNO_3 или NH_4NO_3), было показано, что Tl^+ соответственно увеличивал пассивную проницаемость ВММ для K^+ , H^+ и Na^+ [12,23]. Увеличение набухания деэнергизованных МСК в среде с 25–75 мМ $TlNO_3$ и 125 мМ $NaNO_3$ (рис. 4) указывает на стимулирование таллием пассивной проницаемости внутренней мембраны этих органелл для Na^+ . Полученные результаты позволяют сделать вывод, что Tl^+ , подобно Cd^{2+} [36], увеличивает пассивную проницаемость ВММ митохондрий сердца и печени крысы. Энергизация сукцинатом МСК, предварительно набухших в среде с $TlNO_3$ и $NaNO_3$ (рис. 4а) или с $TlNO_3$ и нитратами (KNO_3 , NH_4NO_3) [12], стимулировала их сжатие, что согласуется с аналогичными результатами с МПК в этой среде [23] и связано с удалением избыточных ионов Na^+ посредством митохондриального K^+/H^+ -обменника.

Цитотоксические эффекты Tl^+ в опытах с изолированными гепатоцитами крысы значительно снижались в присутствии ингибиторов МКЗП (CsA и карнитина) [30]. В настоящее время считают, что основными компонентами МКЗП являются фосфатный симпортер, циклофилин D и некоторые элементы протонной АТФ-синтазы, также ранее относимую к основным компонентам транслоказа адениновых нуклеотидов [37] теперь классифицируют как регуляторный компонент этой поры [38,39]. Ранее мы показали, что

открытие МКЗП во внутренней мембране нагруженных кальцием МПК становилось возможным только в среде с $TlNO_3$ [11]. В наших опытах с энергизованными сукцинатом МСК в среде с $TlNO_3$ и $NaNO_3$ ингибиторы МКЗП (АДФ и CsA) заметно тормозили вызываемое кальцием снижение $\Delta\Psi_{\text{мито}}$ (рис. 5) и уменьшение разобщенного ДНФ дыхания и величины ДК_{ДНФ} (рис. 3), также они препятствовали индуцированному кальцием набуханию этих органелл (рис. 4). Ранее подобное торможение открытия этой поры наблюдалось в присутствии ингибиторов МКЗП (АДФ, CsA, Mg^{2+}) и ингибитора фосфатного симпортера – мерсалила [11,40]. В этом случае также заметно снижалось вызываемое кальциевой нагрузкой набухание митохондрий, а снижение разобщенного ДНФ дыхания митохондрий и потенциала ВММ ($\Delta\Psi_{\text{мито}}$) после инъекции Ca^{2+} в среду в присутствии этих ингибиторов в значительной степени нивелировалось в аналогичных экспериментах с нагруженными кальцием МСК в среде с $TlNO_3$ и нитратом (KNO_3 или NH_4NO_3) [12] и с нагруженными кальцием МПК в среде с $TlNO_3$ и нитратом (KNO_3 или $NaNO_3$ или NH_4NO_3) [11]. Обнаруженное сжатие нагруженных кальцием МСК, предварительно набухших в среде с $TlNO_3$ и $NaNO_3$ (рис. 4а) либо с $TlNO_3$ и нитратом (KNO_3 или NH_4NO_3) [12], а также нагруженных кальцием МПК [11] в присутствии АДФ и CsA согласуется с предполагаемым ранее [41] кооперативным взаимодействием этих ингибиторов с расположенными вблизи транслоказы адениновых нуклеотидов Ca^{2+} -связывающими сайтами. Эксперименты с нагруженными кальцием как МСК (рис. 3–5) [12], так и МПК [11] позволяют предположить, что нагрузка кальцием митохондрий в среде, содержащей смесь $TlNO_3$ с нитратами (KNO_3 , $NaNO_3$, NH_4NO_3), может быть обусловлена открытием CsA-ингибируемой АДФ-зависимой поры во внутренней мембране этих органелл. Снижение базального и ДНФ-стимулированного дыхания митохондрий в этих средах может быть связано с уменьшением активности дыхательных ферментов, вызванным искажением пространственной структуры внутренней мембраны вследствие набухания митохондрий [11].

Таким образом, на основании полученных данных и наших предыдущих исследований можно сделать вывод, что более интенсивная стимуляция ионной проницаемости ВММ и Tl^+ -индуцированного МКЗП в экспериментах с МСК по сравнению с МПК может объяснять большую чувствительность сердечной мышцы по сравнению с печенью к интоксикации солями таллия. Более того, применение Tl^+ для исследования

миокарда может быть нежелательно при сердечных патологиях, включающих нарушения ритма, таких как аритмия и/или брадикардия, а также при сердечной недостаточности, особенно при диастолической дисфункции.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

Авторы благодарят И.В. Брайловскую за помощь при выделении митохондрий, а также при исследовании скоростей поглощения кислорода суспензией митохондрий сердца крысы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального агентства научных организаций России (тема № АААА-А18-118012290142-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Blain and G. Kazantzis, in *Thallium, Handbook on the Toxicology of Metals*, Ed. by G. F. Nordberg, B. A. Fowler, and M. Nordberg (Elsevier, Amsterdam, 2015), p. 1229.
2. J. P. Mulkey and F. W. Oehme, *Vet. Hum. Toxicol.* **35**, 445 (1993).
3. M. N. Hughes, W. K. Man, and B. C. Whaler, *Chem.-Biol. Interact.* **23**, 85 (1978).
4. M. M. Herman and K. G. Bensch, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **10**, 199 (1967).
5. J. S. Woods and B. A. Fowler, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **83**, 218 (1986).
6. M. Fukumoto, D. Yoshida, and S. Yoshida, *Ann. Nucl. Med.* **11**, 291 (1997).
7. N. E. Saris, I. A. Skulskii, M. V. Savina, and V. V. Glasunov, *J. Bioenerg. Biomembr.* **13**, 51 (1981).
8. F. Ichas and J. P. Mazat, *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 33 (1998).
9. P. Bernardi, *Physiol. Rev.* **79**, 1127 (1999).
10. K. Zierold, *Toxicol. In Vitro.* **14**, 557 (2000).
11. S. M. Korotkov and N. E. Saris, *J. Bioenerg. Biomembr.* **43**, 149 (2011).
12. S. M. Korotkov, V. P. Nesterov, I. V. Brailovskaya, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.* **45**, 531 (2013).
13. R. Ziskoven, C. Achenbach, J. Wiemer, and U. Winter, *Z. Naturforsch.* **37c**, 995 (1982).
14. C. Achenbach, J. Wiemer, R. Ziskoven, and U. Winter, *Z. Naturforsch.* **37c**, 1006 (1982).
15. W. Lameijer and P. A. van Zwieten, *Arch. Toxicol.* **35**, 49 (1976).
16. D. D. Ku, T. Akera, M. K. Olgaard, and T. M. Brody, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **304**, 167 (1978).
17. J. Wiemer, R. Ziskoven, and C. Achenbach, *Z. Naturforsch.* **37c**, 1015 (1982).
18. I. Rusznyák, L. György, S. Ormai, and T. Millner, *Experientia* **24**, 809 (1968).
19. К. В. Соболев, С. М. Коротков и В. П. Нестеров, *Биофизика* **59**, 959, (2014).
20. С. М. Коротков, Л. В. Емельянова, И. В. Брайловская и В. П. Нестеров, *Докл. РАН* **443**, 632 (2012).
21. P. C. Waldmeier, J. J. Feldtrauer, T. Qian, and J. Lemasters, *J. Mol. Pharmacol.* **62**, 22 (2002).
22. G. P. Brierley and M. Jurkowitz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 82 (1976).
23. S. M. Korotkov, *J. Bioenerg. Biomembr.* **41**, 277 (2009).
24. I. A. Skulskii, V. Manninen, and J. Järnefelt, *Biochim. Biophys. Acta* **394**, 569 (1975).
25. A. Skulskii, M. V. Savina, V. V. Glasunov, and N. E. L. Saris, *J. Membrane Biol.* **44**, 187 (1978).
26. R. L. Melnick, L. G. Monti, and S. M. Motzkin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 68 (1976).
27. К. В. Соболев, В. П. Нестеров, Г. Б. Белостоцкая и С. М. Коротков, *Биофизика* **62**, 81 (2017).
28. E. Bramanti, M. Onor, and L. Colombaioni, *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 451 (2019).
29. C. E. Hanzel and S. V. Verstraeten, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**, 59 (2009).
30. J. Pourahmad, M. R. Eskandari, and B. Daraei, *Environ. Toxicol.* **25**, 456 (2010).
31. A. L. Blatz and K. L. Magleby, *J. Gen. Physiol.* **84**, 1 (1984).
32. C. D. Weaver, D. Harden, S. I. Dworetzky, et al., *J. Biomol. Screen.* **9**, 671 (2004).
33. A. P. Wojtovich, D. M. Williams, and M. K. Karcz, et al., *Circ. Res.* **106**, 1190 (2010).
34. A. P. Wojtovich, S. M. Nadtochiy, W. R. Urciuoli, et al., *Peer J.* **1**, e48, 1 (2013).
35. L. Testai, A. Martelli, A. Marino, et al., *Biochem. Pharmacol.* **85**, 1634 (2013).
36. S. M. Korotkov, V. V. Glazunov, E. V. Rozengart, et al., *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **13**, 149 (1999).
37. A. P. Halestrap and A. P. Richardson, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 129 (2015).
38. P. Varanyuwatana and A. P. Halestrap, *Mitochondrion* **12**, 120 (2012).
39. M. Bonora, C. Morganti, G. Morciano, et al., *EMBO Rep.* **18**, 1077 (2017).
40. S. M. Korotkov, S. A. Konovalova, V. P. Nesterov, and I. V. Brailovskaya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**, 1716 (2018).
41. A. P. Halestrap and C. Brenner, *Curr. Med. Chem.* **10**, 1507 (2003).

The Effects of Thallium on the Spontaneous Contraction of Heart Muscle and Energetic Processes in Cardiomyocyte Mitochondria

S.M. Korotkov, V.P. Nesterov, and K.V. Sobol

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

We investigated the effects of Tl^+ ions on the spontaneous contraction of the frog heart muscle and on rat heart mitochondria. Tl^+ ions at concentrations of 1.0, 2.5 and 5 mM in the Ringer's solution caused reductions in all parameters of the spontaneous contraction in cardiac muscle preparations. The greatest declines were observed for the frequency of contractions, as well as for the amplitudes and the rate of rise and the rate of relaxation of the twitch-type contraction. The addition of Ca^{2+} to mitochondria into the medium with $Tl-NO_3$ and $NaNO_3$ resulted in the opening of permeability transition pore in the inner mitochondrial membrane which followed by an increase in mitochondrial swelling, a reduction in its inner membrane potential, and a decline in respiration rate in 3 or 2,4-dinitrophenol states. These effects of Tl^+ were inhibited by ADP and cyclosporine A. Thus, the Tl^+ -stimulated Ca^{2+} entry into cardiomyocytes may induce heart mitochondria overload by Ca^{2+} and Na^+ ions and stimulate the opening of mitochondrial permeability transition pore in the inner membrane. These findings may provide additional information on explanation of thallium toxicity in the cardiac muscle. The use of Tl^+ for myocardial studies may be undesirable during arrhythmia and for heart failure, especially, for diastolic dysfunction.

Keywords: Tl^+ , Ca^{2+} , Na^+ , myocardial contraction, pacemaker activity, intoxication, rat heart mitochondria, mitochondrial permeability transition pore