

Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi z wyrazami podziwu dla osiągnięć naukowych

EWA LENARTOWICZ, JOLANTA WUDARCZYK
*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

UPRZEPUSZCZALNIENIE BŁONY MITOCHONDRIALNEJ PODCZAS STRESU OKSYDACYJNEGO

WSTĘP

Stres oksydacyjny jest stanem, w którym materiał biologiczny ulega uszkodzeniom przez reaktywne postaci tlenu. Nadmiar reaktywnych postaci tlenu występuje przy podwyższonej ich generacji (hyperoksja, niedotlenienie, reperfuzja po niedokrwieniu, napromieniowanie) lub ograniczonego ich usuwania (obniżenie aktywności enzymów katalizujących ich metabolizm, niedomiar biologicznych wymiataczy rodników lub glutationu).

Jednym z najgroźniejszych efektów stresu oksydacyjnego w komórce jest niespecyficzne uprzepuszczalnienie wewnętrznej błony mitochondrialnej. Nieprzepuszczalność tej błony dla kationów jest warunkiem wytwarzania gradientu protonów po obu jej stronach. Tak wytworzony potencjał elektrochemiczny stanowi formę zachowania energii niezbędną dla syntezy ATP.

Podczas stresu oksydacyjnego uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej może nastąpić dwiema drogami, przez otworzenie specyficznych kanałów i przez peroksydację lipidów błonowych. Głównym mechanizmem jest otwarcie kanałów o średnicy około 3 nm przepuszczających cząsteczki do 1,5 kDa (GUNTER i PFEIFFER 1990, ZORATTI i SZABO 1995). Kanały te zostały po raz pierwszy zauważone w 1979 roku przez HUNTERA i HAWORTHA. Dziesięć lat później metodą elektrofizjologiczną (patch clamping) zaobserwowano ich ogromne przewodnictwo dochodzące do 1,5 nS i nazwano je mitochondrialnymi megakanałami (KINALLY i współaut. 1989). Budowa ich nie jest dotychczas wyjaśniona. Przypuszczalnie składają się one, podobnie jak receptory diazepinowe, z dimerów zawierających porynę (zależny od potencjału kanał w błonie zewnętrznej), translokazę nukleo-

tydów adeninowych oraz białko o masie 18–20 kDa (prawdopodobnie cyklofilinę). Jednak przewodnictwo charakterystyczne dla megakanałów wykryto również u mutantów drożdży pozabawionych translokazy nukleotydów adeninowych (LOHRET i współaut. 1996).

Otworzenie megakanałów następuje w wyniku współdziałania szeregu czynników (tab. 1). Niezbędne jest spełnienie trzech warunków: 1) napływ jonów wapnia do mitochondriów, 2) obniżenie potencjału elektrochemicznego błony mitochondrialnej, 3) związanie z błoną mitochondriów cyklofiliny, białka z matriks mitochondrialnej (ZORATTI i SZABO 1995, BERNARDI 1996). Podczas stresu oksydacyjnego czynnikiem stymulującym otwarcie megakanałów jest utlenienie mitochondrialnych nukleotydów nikotynamidowych i grup -SH. Źródłem tych wszystkich zmian są reakcje inicjowane przez reaktywne formy tlenu (CASTILHO i współaut. 1995a).

Tabela 1. Efektory megakanałów mitochondrialnych

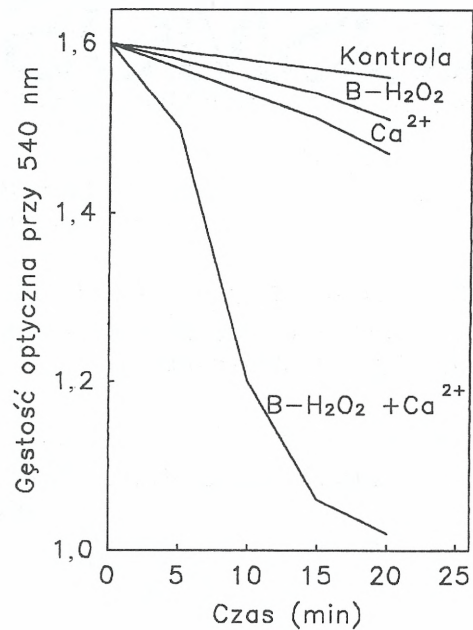
Otwierające	Zamykające
Deenergizacja błony	potencjał elektrochemiczny
Napływ Ca^{2+} do matriks	zakwaszenie do $pH < 6,9$
Utlenianie lub sieciowanie grup -SH	ADP i ATP w matriks
Utlenianie NADPH i NADH	potencjał powierzchniowy błony
Związanie cyklofiliny z błoną	Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} cyklosporyna A

Otworzenie megakanałów prowadzi do spadku mitochondrialnego potencjału elektrochemicznego (co uniemożliwia syntezę ATP)

oraz do wypływu z mitochondriów jonów, nukleotydów, glutationu i niektórych białek (INOUE i współaut. 1993). Wydaje się, że zasadniczym elementem zagrażającym życiu komórek w tych warunkach jest utrata ATP (MEHENDEALE i współaut. 1994).

Po uprzepuszczalnienu błony mitochondriów w komórce, ze względu na różnicę ciśnień osmotycznych między mitochondriami i cytoplazmą następuje napływ wody do mitochondriów, co powoduje ich pęcznienie. Izolowane mitochondria po otworzeniu megakanałów również mogą pęcznieć na skutek napływu wody i drobnocząsteczkowych składników medium. Tracą one wówczas gęstość optyczną (następuje spadek rozproszenia światła), co jest wykorzystywane do pomiaru frakcji mitochondriów ulegających uprzepuszczalnienu (rys. 1).

W normalnych warunkach fizjologicznych megakanały pozostają zamknięte (NIEMINEN i współaut. 1995). Otworzeniu ich przeciwdziałają wysoki potencjał błonowy. Uprzepuszczalnienu błony mitochondrialnej jest hamowane ponadto przez zakwaszenie matriks mitochondrialnej, ADP i jony Mg^{2+} (BERNARDI 1996). Najsilniejszym farmakologicznym inhibitorem megakanałów, działającym w stężeniach submikromolarnych, jest cyklosporyna A, znany lek immunosupresyjny. Hamuje ona przewodnictwo megakanałów wiążąc się z mitochondrialną cyklofiliną (NICOLLI i współaut. 1996). W izolowanych



Rys. 1. Pęcznienie izolowanych mitochondriów wymaga Ca^{2+} i czynnika utleniającego. Mitochondria inkubowano z substratami oddechowymi (glutaminianem i jabłczanem) i, gdzie pokazano, z $50 \mu M$ $CaCl_2$ i $100 \mu M$ butylovanym nadtleniem wodoru.

mitochondriach megakanały otworzone pod wpływem stresu oksydacyjnego mogą być zamknięte przez dodatek EGTA (chelatującego Ca^{2+}) i ditiotretolu (redukującego disulfidy) (VALLE i współaut. 1993).

OTWIERANIE MEGAKANAŁÓW JEST PROCESEM ZALEŻNYM OD WAPNIA

Warunkiem otworzenia megakanałów mitochondrialnych jest napływ Ca^{2+} do mitochondriów (GUNTER i PFEIFFER 1990, CHERNYAK i współaut. 1995). Jednakże izolowane mitochondria nie pęcznieją pod wpływem dodatku Ca^{2+} w mikromolarnych stężeniach, gdyż jest on szybko wyprowadzany na zewnątrz przy jednoczesnym napływie protonów, które zakwaszają matriks mitochondrialną, co przeciwdziałają otwieraniu megakanałów. Dopiero zatrzymanie Ca^{2+} w mitochondriach przez kilka minut prowadzi do uprzepuszczalnienu błony mitochondrialnej, co sugeruje, że megakanały są w tym czasie wytwarzane.

Przewodnictwo megakanałów zależy od potencjału błonowego mitochondriów (BERNARDI 1996). W normalnych warunkach fizjologicznych, przy potencjale 180–200 mV, kanały pozostają zamknięte (NIEMINEN i współaut. 1995). Dopiero depolaryzacja błony wprowadza warunki sprzyjające ich otworzeniu. Wrażliwość megakanałów na spadek potencjału błonowego jest podwyższana przez wiele różnych czynni-

ków, wśród których najistotniejszym jest wzrost stężenia Ca^{2+} w mitochondriach. Oznacza to, że przy tym samym potencjale frakcja pęczniejących mitochondriów wzrasta wraz ze stężeniem Ca^{2+} (PETRONILLI i współaut. 1993). Stymulatorem otwierania megakanałów mitochondrialnych jest jedynie Ca^{2+} zakumulowany wewnątrz mitochondriów, podczas gdy jego działanie od zewnątrz jest, przeciwnie, hamujące, podobnie jak innych kationów dwuwartościowych (BERNARDI i współaut. 1993).

Dodatek Ca^{2+} do mitochondriów uaktywnia procesy utleniające przez stymulację produkcji reaktywnych form tlenu (KOWALTOWSKI i współaut. 1996). Jednocześnie wrażliwość mitochondrialnych megakanałów na Ca^{2+} ulega addytywnemu podwyższeniu przez utlenienie lub sieciowanie krytycznego ditiolu, przez utlenienie nukleotydów nikotynamidowych oraz przez przyłączenie cyklofiliny do błony mitochondrialnej (CHERNYAK i BERNARDI 1996, CONNERN i HALESTRAP 1994). W obecności Ca^{2+} w stężeniach mikromolarnych szereg różnych zwią-

ków indukuje uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej. Pod względem fizjologicznym najważniejszymi z nich są fosforan i długołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz ich estry z CoA (PETRONILLI i współaut. 1993, BERNARDI i współaut. 1994). Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mitochondriach wzrasta podczas stresu oksydacyjnego (BROEKEMEIER i PFEIFFER 1995). Czynnikiem stymulującym otwarcie megakanałów jest ich ujemny ładunek powierzchniowy. Wrażliwość megakanałów na Ca^{2+} jest obniżana przez sperminę i inne poliaminy, związki o dodatnim ładunku powierzchniowym (LAPIDUS i SOKOLOVE 1994).

Na szczególną uwagę zasługuje otwieranie megakanałów mitochondrialnych przez ligandy translokazy nukleotydów adeninowych stabilizujące jej konformację „c”, jak na przykład karboksyatratktylozyd. Przypuszczalnie jest to związane ze spadkiem ładunku powierzchniowego błony mitochondrialnej przy przejściu translokazy z konformacji „m” do „c” (BERNARDI

i współaut. 1994). W komórce konformacja „m” zamykająca megakanały jest utrzymywana przez wiązanie wewnątrzmitochondrialnego ADP. Wzrost stężenia Ca^{2+} osłabia to wiązanie i prowadzi do wytworzenia konformacji „c” (LAPIDUS i SOKOLOWE 1994). W mitochondriach wątroby może to być związane z zahamowaniem pirofosfatazy przez Ca^{2+} i nagromadzeniem pirofosforanu, który reagując z translokazą powoduje wypływ ADP (GRIFFITHS i HALESTRAP 1993).

Od kilku lat wiadomo, że translokaza nukleotydów adeninowych może zmieniać swoje własności przekształcając się z antyportera ATP/ADP w kanał o obniżonej specyficzności (DIERKS i współaut. 1990). Co więcej, interakcja Ca^{2+} z kardiolipiną związaną z translokazą otwiera kanał kationowy o własnościach podobnych do megakanału (BRUSTOVETSKY i KLINGENBERG 1996). Jednakże udział translokazy w wytwarzaniu megakanałów może być udowodniony dopiero po ich rekonstrukcji.

UTLENIE NIE GRUP -SH STYMULUJE OTWORZENIE MEGAKANALÓW

Wrażliwość megakanałów na depolaryzację błony w obecności Ca^{2+} jest podwyższana przez utlenienie lub sieciowanie krytycznego ditiolu (CHERNYAK i BERNARDI 1996). Wytworzenie disulfidu otwiera megakanały w 50% mitochondriów przy obniżeniu potencjału do 160 mV, podczas gdy zachowany ditiol chroni przed ich otwieraniem nawet przy potencjale obniżonym do 130 mV (COSTANTINI i współaut. 1996). Wzrost drażliwości megakanałów na spadek potencjału obserwowano w izolowanych mitochondriach przy utlenieniu grup -SH diamidem lub menadionem i przy wytworzeniu merkaptydów z arseninem lub tlenkiem fenylarsyny (PETRONILLI i współaut. 1994). Uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej w obecności tych związków zapobiegały ditiotretiol (redukujący disulfidy), monobromobiman i N-etylo-maleimid (związki reagujące z grupami -SH), trifluoperazyna (inhibitor fosfolipazy o własnościach przeciwdziałających utlenieniu grup -SH) oraz butylohydroksytoluen (wymiatacz rodników tlenowych) (COSTANTINI i współaut. 1996). Traktowanie związkami utleniającymi grupy -SH nie tylko *in vitro* ale również *in vivo* powodowało wzrost drażliwości mitochondriów zarówno na deenergizację, jak i na Ca^{2+} (SAXENA i współaut. 1995). Podczas stresu oksydacyjnego *in vivo* błona mitochondrialna może być chroniona przed uprzepuszczalnieniem przez witaminę E oraz przez mitochondrialne białka szoku ciepłego, które są wówczas indukowa-

ne (HARAMAKI i współaut. 1995, POLLA i współaut. 1996).

Podobnie jak stężenie Ca^{2+} , również reakcje grup ditiolowych translokazy nukleotydów adeninowych wpływają na jej konformację (DIERKS i współaut. 1990). Co więcej, modyfikacja ditioli tego transportera jonami Hg^{2+} prowadzi do zahamowania antyportu ATP/ADP i wypływu tych nukleotydów.

Główną drogą utleniania komórkowych ditioli jest reakcja wymiany z utlenionym glutationem (LENARTOWICZ i współaut. 1996). W badaniach CHERNYAKA i BERNARDIEGO (1996) szybkość pęcznienia mitochondriów w obecności Ca^{2+} i nadtlenków spadała aż o 80% po usunięciu glutationu drogą koniugacji z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem. Ditirole mogą być również utleniane bezpośrednio przez reaktywne formy tlenu i metale przejściowe do rodników tyloowych S[•], które asocjują wytwarzając disulfidy. Podczas stresu oksydacyjnego w komórkach szczególnie groźny jest nadtlenoazotyn, ONO_2^- , który reaguje z grupami -SH wytwarzając grupy -SNO i SNO₂ (PACKER i MURPHY 1995). Stymulacja generacji nadtlenoazotynu w mitochondriach przez podanie jego prekursorów już po kilku minutach powodowała uprzepuszczalnienie ich błony.

In vivo mitochondrialne grupy -SH ulegające utlenieniu są redukowane przez tioredoksynę, białko o masie 12 kDa zawierające reaktywny ditiol/disulfid w centrum aktywnym (LENARTO-

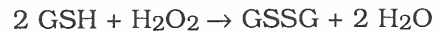
wicz i współaut. 1996). Zachowanie normalnej objętości izolowanych mitochondriów w warunkach utleniających jest skorelowane z utrzymaniem redukcji białkowych grup -SH i z aktyw-

nością redukującą disulfidy (WUDARCZYK i współaut. 1996). Wskazuje to na udział tioredoksyny w ochronie mitochondriów przed otwarciem megakanałów.

UTLENIE NUKLEOTYDÓW NIKOTYNAMIDOWYCH JEST OSOBNYM STYMULATOREM OTWIERANIA MEGAKANAŁÓW

Uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej jest związane z jej deenergizacją, która powoduje utlenienie nukleotydów nikotynamidowych w mitochondriach. Jednakże utlenienie tych nukleotydów jest nie tylko konsekwencją ale również czynnikiem indukującym otwarczenie megakanałów niezależnie od utlenienia krytycznego ditiolu i glutationu (COSTANTINI i współaut. 1996).

W komórce utlenienie mitochondrialnych nukleotydów nikotynamidowych jest następstwem wzrostu stężeń reaktywnych postaci tlenu. Stan ten jest inicjowany przez podwyższoną generację anionorodnika nadtlenkowego, O_2^- , produkowanego głównie w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym (BARTOSZ 1995). Generacja tego rodniaka zależy od stężenia tlenu i od redukcji związków reagujących z nim. Dlatego wzrasta ona przy redukcji komponent łańcucha oddechowego i hyperoksji, a zwłaszcza przy natlenieniu po niedotlenieniu. Anionorodnik nadtlenkowy ulega dysmutacji do nadtlenku wodoru, H_2O_2 , który jest redukowany przez peroksydazę glutationową w reakcji z glutationem:

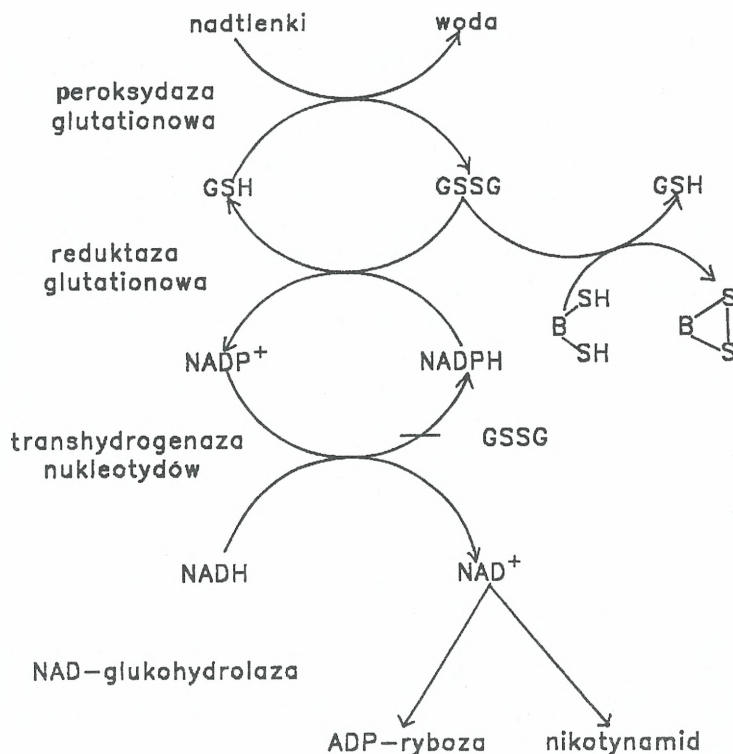


Utleniony glutation jest redukowany kosztem NADPH w reakcji reduktazy glutationowej przy jednoczesnej alkalizacji środowiska:



W mitochondriach NADP^+ jest redukowany głównie przez NADH w reakcji zależnej od energii transhydrogenacji nukleotydów nikotynamidowych. Jednakże utleniony glutation hamuje tę reakcję i, w konsekwencji, podczas stresu oksydacyjnego NADPH nie może zostać odtworzony (PERSSON i RYDSTRÖM 1987). Wpływa to na utlenienie NADH drogą transhydrogenacji niezależnej od energii, która wówczas funkcjonuje normalnie. Reakcje prowadzące do utlenienia nukleotydów nikotynamidowych i białkowych ditioli są przedstawione na rysunku 2.

W izolowanych mitochondriach możliwe jest utlenienie nukleotydów nikotynamidowych przy zachowaniu pełnej redukcji glutationu. Stan ten wprowadzono stosując acetoctan, który utlenia NADH w reakcji dehydrogenazy β -hydroksymaślanowej, albo deenergizując mi-



Rys. 2. Reakcje prowadzące do utlenienia mitochondrialnych nukleotydów nikotynamidowych i białkowych ditioli.

tochondria protonoforem (COSTANTINI i współaut. 1996). W obu przypadkach następowało podwyższenie progowego potencjału błonowego dla uprzepuszczalnienia błony mitochondrialnej. W obecności protonoforu zmianie tej przeciwdziałał rotenon, inhibitor dehydrogenazy NADH, zapobiegający utlenieniu tego nukleotydu. Otworzenie megakanałów przez utlenienie nukleotydu nikotynamidowych nie było hamowane przez czynniki redukujące disulfidy, a zatem nie było rezultatem utlenienia grup -SH.

Utrzymanie redukcji nukleotydu nikotynamidowych podczas stresu oksydacyjnego zależy od utlenianych substratów. Redukcja tych nukleotydu jest znacznie wyższa podczas utleniania bursztynianu redukującego NAD⁺ przez odwrotny transport elektronów niż przy substratach redukujących NAD⁺ bezpośrednio (GOGWADZE i współaut. 1996). W ten sposób substraty oddechowe mogą wpływać na właściwości błony mitochondrialnej podczas stresu oksydacyjnego w komórce.

UPRZEPUSZCZALNIENIE SPECYFICZNE DLA KATIONÓW

Utlenienie nukleotydu nikotynamidowych początkowo prowadzi do uprzepuszczalnienia błony mitochondrialnej specyficznego dla kationów, mierzonego najczęściej przez wpływ Ca²⁺. Nie dochodzi wówczas do deenergizacji mitochondriów ani do ich pęcznienia (SCHLEGEL i współaut. 1992). Wpływ Ca²⁺ jest hamowany przez cyklosporynę A, podobnie jak megakanały i również przez ditiotreitól, co sugeruje udział utlenienia grup -SH w tym procesie. SCHWEIZER i RICHTER (1996) zaobserwowali, że NAD⁺ ulega hydrolizie stymulowanej przez nadtlendiozyn, rodnik aktywnie reagujący z grupami -SH. Hydroliza NAD⁺ jest hamowana przez cyklosporynę A, ATP i ditiotreitól. Powstała ADP-ryboza jest wiązana przez specyficzną transferazę z białkami błony mitochondrialnej, co indukuje jej uprzepuszczalnienie dla Ca²⁺ (SCHWEIZER i współaut. 1993). Wpływ Ca²⁺ z mitochondriów jest hamowany przez witaminę E, biologiczny antyoksydant (GUIDOUX i współaut. 1993). Następnym kationem po Ca²⁺, który wpływa z mitochondriów w okresie poprzedzającym pęcz-

nienie jest Mg²⁺ (RILEY i PFEIFFER 1985). Cyklizacja Ca²⁺ przez błonę mitochondrialną powoduje jej deenergizację, ponieważ Ca²⁺ wchodzi do mitochondriów elektroforetycznie a wychodzi przez elektroneutralną wymianę z Na⁺ lub H⁺. Deenergizacja błony w obecności kilkumikromolarnego stężenia Ca²⁺ prowadzi do otworzenia megakanałów.

Uprzepuszczalnianie błony mitochondrialnej dla Ca²⁺ drogą hydrolizy NAD⁺ było obserwowane w kilku pracowniach, jednakże mechanizm ten nie jest powszechnie akceptowany. YAMAMOTO i FARBER (1992) nie zauważyli hydrolizy NAD⁺ podczas stresu oksydacyjnego w hepatocytach a NOVGORODOV i GUDZ (1996) przypisują specyficzne uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej dla Ca²⁺ specjalnemu stanowi megakanałów, w którym są one przepuszczalne jedynie dla H⁺, co deenergizuje błonę i pozwala na wpływ Ca²⁺. Co więcej, REED i SAVAGE (1995) zauważyli, że również glutation, podobnie jak Ca²⁺, może wpływać z mitochondriów w czasie poprzedzającym ich intensywne pęcznienie.

OTWIERANIE MEGAKANALÓW WYMAGA INTERAKCJI Z CYKLOFILINĄ

Cyklofilina jest izomerą cis-trans peptydyloprolinową. Aktywność ta jest hamowana przez cyklosporynę A. Mitochondria zawierają specyficzną izoformę cyklofiliny o masie 18,5 kDa w stężeniu około 50 pmoli/mg białka (CONNERN i HALESTRAP 1996). Pod wpływem czynników utleniających lub sieciujących grupy -SH białko to wiąże się do translokazy nukleotydu adeninowych w wewnętrznej błonie mitochon-

drialnej tracąc jednocześnie swoją aktywność enzymatyczną (CONNERN i HALESTRAP 1994). To wiązanie stymuluje otwarcie megakanałów przez podwyższenie ich wrażliwości na Ca²⁺. Odłączenie cyklofiliny od błony mitochondrialnej zamyka megakanały. Cyklofilina oddysocjuje od błony pod wpływem zakwaszenia i w wyniku interakcji z cyklosporyną A (NICOLLI i współaut. 1996).

MEGAKANALY MITOCHONDRIALNE BADANE W KOMÓRKACH I PERFUNDOWANYCH ORGANACH

Uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej w pojedynczych hepatocytach było obserwowane przez NIEMINEN i współautorów (1995) z zastosowaniem sond fluorescencyjnych (kalcei-

ny i metylowanej rodaminie) i mikroskopu konfokalnego. W normalnych warunkach fizjologicznych kalceina znakowała jedynie cytoplazmę. Po wprowadzeniu stresu oksydacyjnego przez

dodatek nadtlenu wodoru kalceina wypełniała szybko mitochondria, co było dowodem uprzepuszczalności ich błony. Rodamina znakowała mitochondria zależnie od polaryzacji ich błony. Wpływała ona z mitochondriów podczas napływu kalceiny, co wskazywało na depolaryzację błony mitochondrialnej po otwarciu megakanałów. Uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej w hepatocytach pod wpływem stresu oksydacyjnego prowadziło do śmierci tych komórek. Zarówno uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej, jak i śmierci hepatocytów w tych warunkach zapobiegała trifluoperazina, inhibitor fosfolipazy o własnościach przeciwdziałających utlenianiu grup -SH (PEREIRA i współaut. 1992).

W perfundowanym sercu uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej badano przez po-

miar napływu do mitochondriów znakowanej izotopowo dezoksyglukozy (GRIFFITHS i HALESTRAP 1995). Zaobserwowano, że dezoksyglukoza nie wnikała do mitochondriów podczas ischemii, natomiast wnikała w czasie następującej po niej reoksygenacji. Przy reperfuzji serca mitochondria pęczniały, ulegały deenergizacji i następował wypływ z nich glutationu, co świadczyło o otwieraniu megakanałów. Zmianom tym przeciwdziałały witamina E (antyoksydant biologiczny), kwas dihydroliponowy (redukujący tioredoksynę) oraz cynk w stężeniach ponadfizjologicznych (przeciwdziałający utlenieniu grup -SH) (POWELL i współaut. 1994, HARAMAKI i współaut. 1995). Dane te sugerują, że czynnikiem decydującym o uprzepuszczalności błony mitochondrialnej podczas stresu oksydacyjnego w komórce jest utlenienie grup -SH.

ZNACZENIE FIZJOLOGICZNE MEGAKANALÓW

Fizjologiczna rola megakanałów mitochondrialnych nie jest dotychczas wyjaśniona. Wyszukane dotychczas hipotezy wiążą funkcję megakanałów z regulacją poziomu Ca^{2+} w komórce (GUNTER i PFEIFFER 1990, BERNARDI i PETRONILLI 1996) oraz z eliminacją komórek produkujących nadmiar reaktywnych postaci tlenu (SKULACHEV 1996).

Podczas stresu oksydacyjnego w wyniku utlenienia komórkowych grup -SH dochodzi do znacznego wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie, co powoduje różne zaburzenia metaboliczne. Są one łagodzone przez mitochondria, których uniporter wprowadzający Ca^{2+} do matriksu jest aktywowany przy podwyższeniu stężenia tego kationu (KASPARINSKY i VINOGRADOV 1996). W mitochondriach Ca^{2+} jest wiązany z białkami i anionami i dopiero po wysyceniu miejsc wiążących następuje wzrost jego stężenia. Po obniżeniu stężenia Ca^{2+} wypływ jego z mitochondriów na antyporterach Na^+/Ca^{2+} i H^+/Ca^{2+} jest powolny i wymaga dużego nakła-

du energii. W tej sytuacji uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej dla Ca^{2+} pozwala na szybki jego wypływ bez wydatku energetycznego. Otworzenie megakanałów znosi potencjał błonowy, co zapobiega dalszemu napływowi Ca^{2+} do matriksu. Po usunięciu Ca^{2+} następuje zamknięcie megakanałów i repolaryzacja błony mitochondrialnej.

Ostatnio SKULACHEV (1996) wysunął interesującą hipotezę o roli megakanałów w usuwaniu komórek produkujących nadmiar reaktywnych postaci tlenu. Otworzenie megakanałów obniża produkcję anionorodnika nadtlenu przez wzrost zużycia tlenu i utlenienie komponent łańcucha oddechowego. Mitochondria gromadzące reaktywne postaci tlenu mogą ulegać degradacji, gdyż synteza i import białek zależą od potencjału błonowego. Pęcznienie mitochondriów prowadzi do rozerwania ich zewnętrznej błony i wypływu z przestrzeni międzybłonowej do cytoplazmy białka indukującego apoptozę komórki.

UPRZEPUSZCZALNIENIE POWODOWANE PRZEZ PEROKSYDACJĘ BŁONY

W obecności metali przejściowych, takich jak Fe^{2+} i Cu^{1+} , lipidy i białka błony mitochondrialnej mogą ulegać peroksydacji. Proces ten nie wymaga obecności Ca^{2+} , ale jest przez ten kation stymulowany ze względu na wzrost produkcji rodników tlenowych (CARINI i współaut. 1992). Na skutek peroksydacji błona mitochondrialna traci część białek i lipidów co wpływa na destabilizację jej struktury i wzrost przepuszczalności. Zależnie od stopnia peroksydacji, błona staje się przepuszczalna tylko dla katio-

nów lub również dla metabolitów i niektórych białek (CARINI i współaut. 1992, HERMES-LIMA i współaut. 1995).

Uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej wywołane przez peroksydację i otwarcie megakanałów może być łatwo rozróżnione, gdyż tylko to drugie jest hamowane przez cyklosporynę A. W przeciwieństwie do megakanałów uprzepuszczalnienie powodowane peroksydacją jest hamowane przez chelatory Fe^{2+} i wrażliwe na redukcję koenzymu Q przez burszty-

nian (CASTILHO i współaut. 1995b). Co więcej, niezbędnym warunkiem dla intensywnej peroksydacji lipidów w mitochondriach jest utlenienie CoQ9 (NOACK i współaut. 1994). *In vivo* mitochondrialna peroksydacja lipidów jest stymulowana przez niedobór cynku w diecie (BURKE i FENTON 1985).

Uprzepuszczalność w wyniku peroksydacji jest nieodwracalna, podczas gdy megakanaly

można zamknąć stosując chelatory Ca^{2+} i czynniki redukujące (KOWALTOWSKI i współaut. 1996). Niezależnie od mechanizmu wywołującego uprzepuszczalność błony mitochondrialnej elementem zagrażającym życiu komórek jest wówczas deenergizacja mitochondriów i utrata ATP (CARINI i współaut. 1992, MEHENDELE i współaut. 1994).

MITOCHONDRIAL MEMBRANE PERMEABILITY TRANSITION DURING OXIDATIVE STRESS

Summary

Increased concentration of reactive oxygen species promotes the permeability of the inner mitochondrial membrane for ions and small solutes. This membrane transition is stimulated by influx of Ca^{2+} to mitochondria, the oxida-

tion of mitochondrial -SH groups and nicotinamide nucleotides as well as by binding of cyclophilin, a matrix protein to the mitochondrial membrane. The mechanisms inducing the permeability and its physiological role are discussed.

LITERATURA

- BARTOSZ G., 1995. *Druga twarz tlenu*. Warszawa, PWN.
- BERNARDI P., 1996. *The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death*. Biochim. Biophys. Acta 1275, 5-9.
- BERNARDI P., BROEKEMEIER K. M., PFEIFFER D. R., 1994. *Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane*. J. Bioenerg. Biomembr. 26, 509-517.
- BERNARDI P., PETRONILLI V., 1996. *The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: critical appraisal*. J. Bioenerg. Biomembr. 28, 131-138.
- BERNARDI P., PERONESE P., PETRONILLI V., 1993. *Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore*. J. Biol. Chem. 268, 1005-1010.
- BROEKEMEIER K. M., PFEIFFER D. R., 1995. *Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: Relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases*. Biochemistry 34, 16440-16449.
- BRUSTOVETSKY N., KLINGENBERG M., 1996. *Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+}* . Biochemistry 35, 8483-8488.
- BURKE J. P., FENTON M. R., 1985. *Effect of zinc-deficient diet on lipid peroxidation in liver and tumor subcellular membranes*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 179, 187-191.
- CARINI R., PAROLA M., DIANZANI M. U., ALBANO E., 1992. *Mitochondrial damage and its role in causing hepatocyte injury during stimulation of lipid peroxidation by iron nitroacetate*. Arch. Biochem. Biophys. 297, 110-118.
- CASTILHO R. F., KOWALTOWSKI A. Lj., MEINICKE A. R., BECHARAM E. J., VERCESI A. E., 1995a. *Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butylhydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria*. Free Rad. Biol. Med. 18, 479-486.
- CASTILHO R. F., KOWALTOWSKI A. J., MEINICKE A. R., VERCESI A. E., 1995b. *Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(III)citrate or t-butyl hydroperoxide in the presence of Ca^{2+} : effect of coenzyme Q redox state*. Free Rad. Biol. Med. 18, 55-59.
- CHERNYAK B. V., BERNARDI P., 1996. *The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites*. Eur. J. Biochem. 238, 623-630.
- CHERNYAK B. V., DEDOV V. N., CHERNYAK V. Ya., 1995. *Ca^{2+} -triggered membrane permeability transition in deenergized mitochondria from rat liver*. FEBS Lett. 365, 75-78.
- CONNERN C. P., HALESTRAP A. P., 1994. *Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel*. Biochem. J. 302, 321-324.
- CONNERN C. P., HALESTRAP A. P., 1996. *Chaotropic agents and increased matrix volume enhance binding of mitochondrial cyclophilin to the inner mitochondrial membrane and sensitize the mitochondrial permeability transition to $[\text{Ca}^{2+}]$* . Biochemistry 35, 8172-8180.
- COSTANTINI P., CHERNYAK B. V., PETRONILLI V., BERNARDI P., 1996. *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites*. J. Biol. Chem. 271, 6746-6751.
- DIERKS T., SALENTIN A., HEBERGER C., KRÄMER R., 1990. *The mitochondrial aspartate/glutamate and ADP/ATP carrier switch from obligate counterexchange to unidirectional transport after modification by SH-reagents*. Biochim. Biophys. Acta 1028, 268-280.
- GOGVADZE V., SCHWEIZER M., RICHTER Ch., 1996. *Control of the pyridine nucleotide-linked Ca^{2+} release from mitochondria by respiratory substrates*. Cell Calcium 19, 521-526.
- GRIFFITHS E. J., HALESTRAP A. P., 1993. *Pyrophosphate metabolism in the perfused heart and isolated heart mitochondria and its role in regulation of mitochondrial function by calcium*. Biochem. J. 290, 489-495.
- GRIFFITHS E. J., HALESTRAP A. P., 1995. *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia but open upon reperfusion*. Biochem. J. 307, 93-98.
- GUIDOUX R., LAMBELET P., PHOENIX J., 1993. *Effects of oxygen and antioxidants on the mitochondrial Ca-retention capacity*. Arch. Biochem. Biophys. 306, 139-147.
- GUNTER T. E., PFEIFFER D. R., 1990. *Mechanism by which mitochondria transport calcium*. Am. J. Physiol. 258, C755-C786.
- HARAMAKI N., ASSADNAZARI H., ZIMMER G., SCHEPKIN V., PACKER L., 1995. *The influence of vitamin E and dihydrolipoic acid on cardiac energy and glutathione status under hypoxia-reoxygenation*. Biochem. Mol. Biol. Inter. 37, 591-597.

- HERMES-LIMA M., CASTILHO R. F., MEINICKE A. R., VERCESI A. E., 1995. Characteristics of Fe(II)ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biochem.* 145, 53–60.
- HUNTER D. R., HAWORTH R. A., 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 453–459.
- INOUE T., YOSHIDA Y., NISHIMURA M., KUROSAWA K., TAGAWA K., 1993. Ca²⁺-induced, phospholipase-independent injury during reoxygenation of anoxic mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1140, 313–320.
- KASPARINSKY F. O., VINOGRADOV A. D., 1996. Slow Ca²⁺-induced inactive/active transition of the energy-dependent Ca²⁺ transporting system of rat liver mitochondria: clue for Ca²⁺ influx cooperativity. *FEBS Lett.* 389, 293–296.
- KINNALLY K. W., CAMPO M. L., TEDESCHI H., 1989. Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21, 497.
- KOWALTOWSKI A. J., CASTILHO R.F., VERCESI A. E., 1996. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 378, 150–152.
- LAPIDUS R. G., SOKOLOVE P. M., 1994. The mitochondrial permeability transition. Interactions of spermine, ADP and inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* 269, 18931–18936.
- LENARTOWICZ E., WUDARCZYK J., DEBSKA G., 1996. Regulacja stopnia oksydoredukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych. *Post. Biochem.* 42, 154–161.
- LOHRET T. A., MURPHY R. C., DRGON T., KINNALLY K. W., 1996. Activity of the mitochondrial multiple conductance channel is independent of the adenine nucleotide translocator. *J. Biol. Chem.* 271, 4846–4849.
- MEHENDELE H. M., ROTH R. A., GANDOLFI A. J., KLAUNING J. E., LEMASTERS J. J., CURTIS L. R., 1994. Novel mechanism in chemically induced hepatotoxicity. *FASEB J.* 8, 1285–1295.
- NICOLLI A., BASSO E., PETRONILLI V., WENGER R. M., BERNARDI P., 1996. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 271, 2185–2192.
- NIEMINEN A. -L., SAYLOR A. K., TESFAI S. A., HERMAN B., LEMASTERS J. J., 1995. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem. J.* 307, 99–106.
- NOACK H., KUBE U., AUGUSTIN W., 1994. Relations between tocopherol depletion and coenzyme Q during lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Free. Radic. Res.* 20, 375–386.
- NOVGORODOV S. A., GUDZ T. I., 1996. Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 139–146.
- PACKER M. A., MURPHY M. P., 1995. Peroxynitrite formed by simultaneous nitric oxide and superoxide generation causes cyclosporin-A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarisation. *Eur. J. Biochem.* 234, 231–239.
- PEREIRA R. S., BERTOCCHI A. P. F., VERCESI A. E., 1992. Protective effect of trifluoperazine on the mitochondrial damage induced by Ca²⁺ plus prooxidants. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1795–1801.
- PERSOON B., RYDSTRÖM J., 1987. Evidence for a role of a vicinal dithiol in catalysis and proton pumping in mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 573–578.
- PETRONILLI V., COLA C., MASSARI S., COLONNA R., BERNARDI P., 1993. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive transition pore of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 268, 21939–21945.
- PETRONILLI V., COSTANTINI P., SCORRANO L., COLONNA R., PASSAMONTI S., BERNARDI P., 1994. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. *J. Biol. Chem.* 269, 16638–16642.
- POLLA B. S., KATENGWA S., FRANCOIS O., SALVIOLI S., FRANCESCHI C., MARSAC C., COSSARIZZA A., 1996. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 6458–6463.
- POWELL S.R., HALL D., AIUTO L., WAPNIR R. A., TEICHBERG S., TORTOLANI A. J., 1994. Zinc improves postischemic recovery of isolated rat hearts through inhibition of oxidative stress. *Am. J. Physiol.* 266, H2497–H2507.
- REED D. J., SAVAGE M. K., 1995. Influence of metabolic inhibitors on mitochondrial permeability transition and glutathione status. *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 43–50.
- RILEY W. W., PFEIFFER JR. D. R., 1985. Relationships between Ca²⁺ release, Ca²⁺ cycling, and Ca²⁺-mediated permeability changes in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260, 12416–12425.
- SAXENA K., HENRY T. R., SOLEM L. E., WALLACE K. B., 1995. Enhanced induction of the mitochondrial permeability transition following acute menadione administration. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 79–84.
- SCHLEGEL J., SCHWEIZER M., RICHTER Ch., 1992. 'Pore' formation is not required for the hydroperoxide-induced Ca²⁺ release from rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 285, 65–69.
- SCHWEIZER M., RICHTER Ch., 1996. Peroxynitrite stimulates the pyridine nucleotide-linked Ca²⁺ release from intact rat liver mitochondria. *Biochemistry.* 35, 4524–4528.
- SCHWEIZER M., SCHLEGEL J., BAUMAGARTNER D., RICHTER Ch., 1993. Sensitivity of mitochondrial peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, pyridine nucleotide hydrolysis and Ca²⁺ release to cyclosporine A and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 45, 641–646.
- SKULACHEV V. P., 1996. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett.* 397, 7–10.
- VALLE V. G. R., FAGIAN M. M., PARENTONI L. S., MEINICKE A. R., VERCESI A. E., 1993. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 1–7.
- WUDARCZYK J., DEBSKA G., LENARTOWICZ E., 1996. Relation between the activities reducing disulfides and the protection against membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 215–221.
- YAMAMOTO K., FARBER J. L., 1992. Metabolism of pyridine nucleotides in cultured rat hepatocytes intoxicated with tert-butyl hydroperoxide. *Biochem. Pharmacol.* 43, 1119–1126.
- ZORATTI M., SZABO I., 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139–176.