



УДК 577.27

© 2008

Г. Л. Гергалова, О. Ю. Лихмус, Л. М. Коваль, В. О. Чернишов,
академік НАН України С. В. Комісаренко, М. В. Скок

Вплив нікотину на функції мітохондрій

By fluorescent flow cytometry and immunoenzyme techniques, it is shown that nicotine influences the calcium influx into mitochondria through nicotinic acetylcholine receptors expressed on the outer mitochondria membrane.

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (нАХР) — це лігандозалежні іонні канали, які опосередковують швидку синаптичну передачу і регулюють активність інших рецепторів та вивільнення медіаторів у нервовій системі [1]. Експресію нАХР знайдено також у незбудливих клітинах ссавців, де ці рецептори є провідниками дії ендogenous ацетилхоліну і нікотину, що потрапляє в організм при палінні тютюну [2, 3]. Крім того, подібні рецептори знаходять у нижчих тваринах, рослинах і навіть бактеріях [4], це свідчить про універсальну роль ацетилхоліну як еволюційно давнього медіатора.

Нікотин справляє багато негативних ефектів на тканини і органи людей: викликає стан залежності, порушує метаболізм кератиноцитів шкіри, пружність судин, викликає патології дихальних шляхів, знижує імунну реактивність. Разом з цим при деяких нейродегенеративних захворюваннях, таких як хвороби Паркінсона і Альцгеймера, нікотин має позитивний вплив, регулюючи рівень допаміну в мозку та уповільнюючи процеси дегенерації [5]. Було припущено, що одним із протективних механізмів дії нікотину є вплив на функції мітохондрій мозку [6].

Важливими функціями мітохондрій є забезпечення клітин енергією АТФ, що утворюється в ланцюзі окисно-відновних реакцій, та запуск процесів апоптозу шляхом звільнення цитохрому *c*. Було показано, що нікотин підтримував відновно-окиснювальний стан мітохондрій, запобігав появі вільного цитохрому *c* [7], знижував продукцію супероксидних радикалів, прямо зв'язуючись з комплексом **I** дихального ланцюга мітохондрій, та інгібував активність НАДН-убіхінон редуктази [8]. Ці ефекти нібито не залежали від рецептора до нікотину. Однак в роботі [9] холінергічний антагоніст мекаміламін зменшував протективну дію нікотину на активацію каспази-3 і нагромадження радикалів кисню. В інших дослідженнях специфічний агоніст $\alpha 7$ -вмісного субтипу нАХР 2,4-диметоксибензіліден анабазеїн запобігав зниженню мембранного потенціалу мітохондрій гіпокампу під дією етанолу, і його дія блокувалась антагоністом $\alpha 7$ нАХР метиллікаконітином (МЛА) [10]. Ці дані свідчили

про можливу участь nAHP в діяльності мітохондрій. Однак експресію цих рецепторів так щільно пов'язують виключно з плазматичною мембраною, що детальні дослідження їх наявності на субклітинних органелах не проводилися.

Згідно з ендосимбіонтною гіпотезою, мітохондрії походять із прадавніх бактерій, що зберегли певну автономію у складі вищих організмів [11]. Зважаючи на знаходження nAHP-подібного рецептора в бактеріальних клітинах [4], ми поставили питання про можливу експресію nAHP у мітохондріях вищих тварин.

Для з'ясування цього мітохондрії було виділено із печінки мишей лінії C57Bl/6 за стандартною методикою [12]. Чистоту виділення контролювали протоковою цитофлуориметрією на приладі EPICS-XL (Coulter-Beckman) за включенням ноніл акридин оранжу (НАО) — специфічного ліганду кардіоліпіну, характерного для внутрішніх мембран мітохондрій. Життєздатність мітохондрій оцінювали за показниками мембранного потенціалу при зв'язуванні потенціалчутливого флуоресцентного зонду тетраметилпродамін метилу (ТМРМ). Наявність nAHP у виділеному препараті мітохондрій визначали методами протокової цитофлуориметрії та сендвіч-імуноферментного аналізу (ІФА) за зв'язуванням антитіл, специфічних до різних субодиниць nAHP. У сендвіч-ІФА використовували детергентні лізати мітохондрій, виділених з печінки мишей дикого типу та нокаутних за генами $\alpha 7$ або $\beta 2$ субодиниць nAHP. Планшети для ІФА покривали кролячими антитілами проти великого позаклітинного фрагменту $\alpha 7(1-207)$, а зв'язування $\alpha 7$ -вмісного рецептора детектували за допомогою біотинільованих антитіл проти $\alpha 7(179-190)$ і кон'югата екстравідину з пероксидазою (Sigma, USA). Включення іонів Ca^{2+} до мітохондрій оцінювали за зниженням мембранного потенціалу та за флуоресценцією Ca^{2+} -чутливого зонду Fluo 3-AM.

За зв'язуванням НАО чистота виділеного препарату мітохондрій становила 95%. Величина мембранного потенціалу мала середнє значення флуоресценції ТМРМ у межах 10–15 ум. од. та знижувалась на 90–95% при додаванні 0,1 мкмоль іонофори *СССР*. За даними електронної мікроскопії препарат містив мітохондрії з цілісними зовнішніми і добре вираженими внутрішніми мембранами (рис. 1).

За даними протокової цитофлуориметрії, виділені мітохондрії зв'язували антитіла проти $\alpha 7$, але не $\beta 2$ субодиниці nAHP (рис. 2, а). У сендвіч-ІФА мітохондрії мишей, нокаутних за геном $\alpha 7$ субодиниці nAHP, давали значно нижчий сигнал, ніж мітохондрії мишей дикого типу (див. рис. 2, б). Нікотин, доданий до суспензії мітохондрій, знижував мембранний потенціал на 10–12%. При цьому значно знижувалась відповідь мітохондрій на Ca^{2+} (рис. 3). Додавання МЛА не впливало на мембранний потенціал, але пригнічувало відповідь на Ca^{2+} . Як показано на рис. 4, і нікотин, і МЛА знижували кількість Ca^{2+} , що надходив усередину мітохондрій при додаванні його ззовні. Очевидно, ефект нікотину міг бути пов'язаний із зниженням ним мембранного потенціалу, в той час як дія антагоністу була вочевидь пов'язана з nAHP. Ефект, подібний до дії нікотину, спостерігався також при додаванні до мітохондрій холіну, який є ефективним агоністом $\alpha 7$ nAHP. Це означало, що в препараті присутні $\alpha 7$ -вмісні nAHP, які регулюють процеси входу Ca^{2+} до мітохондрій.

Поряд з окисно-відновними процесами, нагромадження Ca^{2+} і його вивільнення є однією із важливіших функцій мітохондрій. За сучасними уявленнями, Ca^{2+} потрапляє всередину мітохондрій за допомогою двох транспортних систем, локалізованих на внутрішній мембрані: так званого уніпортеру і механізму швидкого нагромадження (rapid accumulation mode, RaM) [12]. Незважаючи на велику кількість публікацій, будова і детальні механізми дії цих

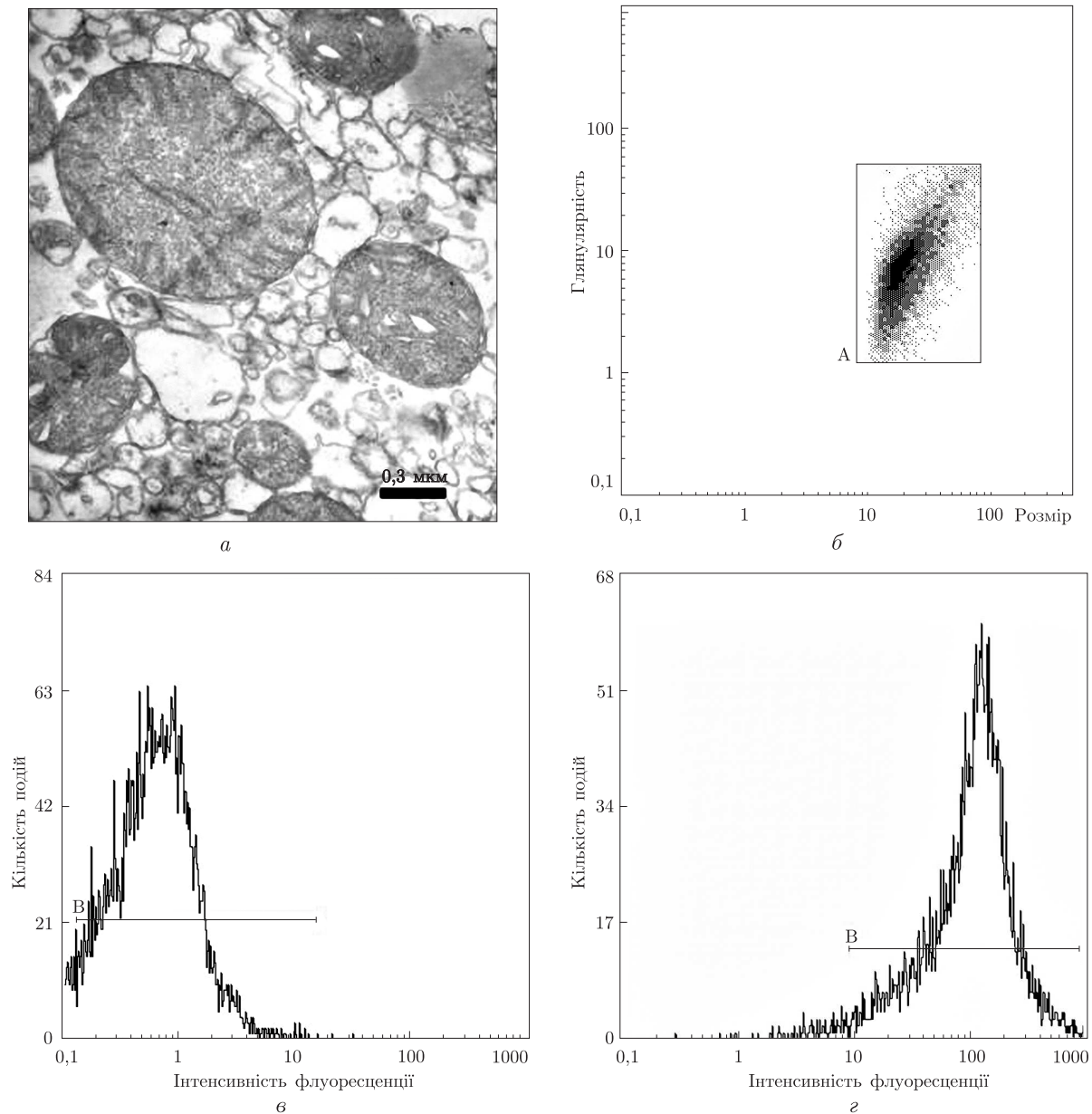


Рис. 1. Характеристики виділеного препарату мітохондрій:
a — за даними електронної мікроскопії; *б* — за розміром та гранулярністю в протоковій цитофлуориметрії;
в, г — за інтенсивністю флуоресценції у відсутності (*в*) або присутності (*г*) НАО

систем досі не визначені. Зокрема, фізіологічні концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі нормальних клітин у 2–3 рази нижчі, ніж необхідно для функціонування уніпортеру. Тому вважають, що існують додаткові механізми збільшення локальної концентрації Ca^{2+} між зовнішньою та внутрішньою мембранами мітохондрій. Отримані нами дані дозволяють припустити, що таким механізмом може бути транспорт Ca^{2+} , прямо чи непрямо опосередкований $\alpha 7$ nAHP, локалізованими на зовнішній мембрані.

Зовнішню мембрану мітохондрій довго вважали вільно проникною для Ca^{2+} завдяки наявності в ній потенціалзалежних аніонних каналів, які утворюють пори, достатні для

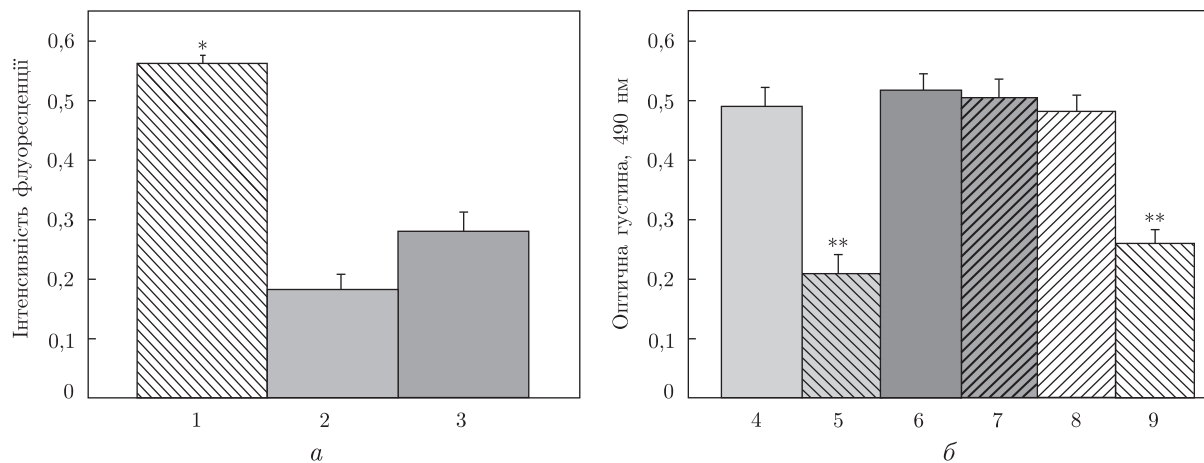


Рис. 2. Зв'язування антитіл проти нАХР з мітохондріями: *a* – в протоковій цитофлуориметрії: 1 – антитіла проти $\alpha 7$ субодиниці, 2 – антитіла проти $\beta 2$ субодиниці, 3 – неспецифічні імуноглобуліни; *б* – у сендвіч-ІФА: 4 – лізат мозку мишей дикого типу, 5 – лізат мозку $\alpha 7$ -нокаутів, 6, 7 – лізати мітохондрій мишей дикого типу, 8, 9 – лізати мітохондрій $\beta 2$, $\alpha 7$ нокаутів відповідно; $n = 5$; * – $p < 0,005$ відносно IgG; ** – $p < 0,005$ відносно дикого типу

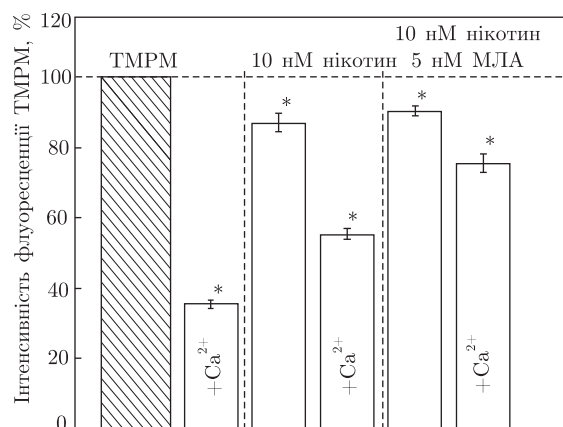


Рис. 3. Вплив нікотину та метиллікаконітіну на мембранний потенціал мітохондрій та його зниження при додаванні 0,8 мкмоль CaCl_2 ; $n = 5$; * – $p < 0,005$ відносно контролю з TMPM

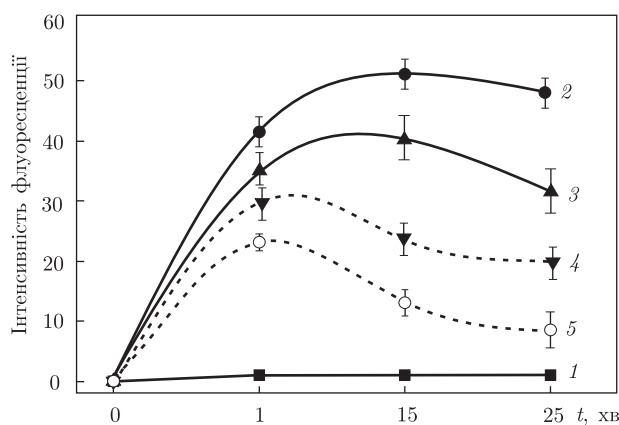


Рис. 4. Зміни флуоресценції мітохондрій, завантажених зондом Fluo-3AM, при додаванні різних комбінацій Ca^{2+} та лігандів нАХР: 1 – контроль; 2 – 0,8 мкмоль CaCl_2 ; 3 – 0,8 мкмоль CaCl_2 та 1 мкмоль нікотин; 4 – 5 нмоль МЛА та 0,8 мкмоль CaCl_2 ; 5 – 5 нмоль МЛА, 0,8 мкмоль CaCl_2 та 1 мкмоль нікотин; $n = 3$

проходження молекул невеликого розміру. Однак останні дані показують, що транспорт Ca^{2+} через зовнішню мембрану – це контрольований процес [13]. нАХР $\alpha 7$ субтипу є високо проникними для Ca^{2+} , а також здатними регулювати функціонування інших іонних каналів [14]. У мембранах електричного органу морського вугра *Torpedo*, багатих на ацетилхолінові рецептори, знайдено гомологи мітохондріальних потенціалзалежних аніонних каналів та транспортного білка для АТФ/АДФ [15]. Ці дані свідчать на користь можливого зв'язку нАХР і мітохондріальних Ca^{2+} -транспортних систем, що підтверджує нашу гіпотезу.

Автори висловлюють подяку проф. Ж.-П. Шанже, докт. І. Клоез-Тайарані (Інститут Пастера, Париж) за надання можливості використання органів нокаутних мишей в межах досліджень за підтримки стипендії ЕМВО (Л. Коваль) і докт. Л. Г. Бабіч за консультативну підтримку.

1. Paterson D., Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain // *Progress in Neurobiology*. – 2000. – **61**. – P. 75–111.
2. Grando S. A. Cholinergic control of epidermal cohesion // *Experimental Dermatology*. – 2006. – **15**, No 4. – P. 265–282.
3. Kawashima K., Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function // *Life Sciences*. – 2003. – **72**. – P. 2101–2109.
4. Bosquet N., Prado de Carvalho L., Cartaud J. et al. A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family // *Nature*. – 2007. – **445**. – P. 116–119.
5. Picciotto M. R., Zoli M. Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease // *Front Biosci*. – 2008. – **13**. – P. 492–504.
6. Aliev G., Sevidova D., Lamb B. T. et al. Mitochondria and vascular lesions as a central target for the development of Alzheimer disease-like pathology in transgenic mice // *Neurol. Res.* – 2003. – **25**, No 6. – P. 665–674.
7. Xie Y. X., Bezard E., Zhao B. L. Investigating the receptor-independent neuroprotective mechanisms of nicotine in mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, No 37. – P. 32405–32412.
8. Cormier A., Morin C., Zini R. et al. In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation // *Brain Res.* – 2001. – **900**, No 1. – P. 72–79.
9. Liu Q., Zhao B. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – **141**, No 4. – P. 746–754.
10. Li Y., Meyer E. M., Walker D. W. et al. Alpha7 nicotinic receptor activation inhibits ethanol-induced mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and neurotoxicity in primary rat hippocampal neuronal cultures // *J. Neurochem.* – 2002. – **81**, No 4. – P. 853–858.
11. Karlberg O., Cauback B., Kurland C. G., Andersson S. G. The dual origin of the yeast mitochondrial proteome // *Yeast*. – 2000. – **17**. – P. 170–187.
12. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K. et al. Calcium and mitochondria // *FEBS Lett.* – 2004. – **53**. – P. 96–102.
13. Csordás G., Madesh M., Antonsson B., Hajnóczky G. tcBid promotes Ca(2+) signal propagation to the mitochondria: control of Ca(2+) permeation through the outer mitochondrial membrane // *EMBO J.* – 2002. – **21**, No 9. – P. 2198–2206.
14. Wheeler D. G., Barrett C. F., Tsien R. W. L-type calcium channel ligands block nicotine-induced signaling to CREB by inhibiting nicotinic receptors // *Neuropharmacology*. – 2006. – **51**, No 1. – P. 27–36.
15. Blanton M. P., Lala A. K., Cohen J. B. Identification and characterization of membrane-associated polypeptides in Torpedo nicotinic acetylcholine receptor-rich membranes by hydrophobic photolabeling // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – **1512**, No 2. – P. 215–224.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 04.03.2008