

KAUNO MEDICINOS UNIVERSITETAS

Lolita Kuršvietienė

**RIEBALŲ RŪGŠČIŲ VAIDMUO REGULIUOJANT
MITOCHONDRIJŲ KVĖPAVIMĄ**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Kaunas, 2007

Disertacija rengta 2002–2006 metais Kauno medicinos universitete.

Mokslinis vadovas

prof. habil. dr. **Adolfas Toleikis** (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

Konsultantas

doc. dr. **Natalija Ona Stasiūnienė** (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B)

TURINYS

1. Santrumpos.....	5
2. Įvadas	6
3. Literatūros apžvalga	8
3.1. Mitochondrijos ir jose vykstantys procesai.....	8
3.2. Faktoriai, reguliuojantys mitochondrijų kvėpavimą ir oksidacinį fosforilinimą	9
3.3. Išorinė mitochondrijų membrana – difuzijos barjeras	10
3.4. Kreatino kinazės izofermentai ir mitochondrinė kreatino kinazė	14
3.5. Makromolekulių įtaka išorinės membranos pralaidumui ADP. Kinazių poveikis nespecifiniam pralaidumui	20
3.5.1. <i>Dekstrano įtaka nespecifiniam pralaidumui</i>	21
3.6. Riebalų rūgščių oksidacija ir jos kontrolė.....	23
3.6.1. <i>Laisvos riebalų rūgštys veikia kaip skyrikliai</i>	27
4. Darbo tikslas ir uždaviniai	28
5. Medžiagos ir metodai.....	29
5.1. Tirpalai	29
5.2. Reagentai.....	29
5.3. Mitochondrijų išskyrimas	30
5.4. Mitochondrijų baltymo kiekio nustatymas	31
5.5. Širdies raumens skaidulų paruošimas	31
5.6. Mitochondrijų ir skaidulų kvėpavimo registravimas	32
5.7. Izoliuotų mitochondrijų brinkimo matavimas.....	32
5.8. Skaidulų paruošimas elektroninei mikroskopijai	33
5.9. Statistinis duomenų įvertinimas	33
6. Rezultatai ir jų aptarimas	34
6.1. Riebalų rūgščių oksidacijos įtaka mitochondrijų kvėpavimo reguliavimui in situ	34
6.1.1. <i>Riebalų rūgščių koncentracijos įtaka oksidacinio fosforilinio sistemos giminingumui ADP</i>	36

6.1.2. Įvairios cheminės struktūros riebalų rūgščių oksidacijos įtaka širdies mitochondrijų kvėpavimo reguliavimui	38
6.1.3. Riebalų rūgščių poveikio oksidacinio fosforilinimo kinetikai grįžtamumas	43
6.1.4. Riebalų rūgščių poveikis izoliuotų mitochondrijų brinkimui	45
6.1.5. Didelių koncentracijų palmitoil-L-karnitino įtaka izoliuotų žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimui	47
6.1.6. Temperatūros įtaka riebalų rūgšties oksiduojančių mitochondrijų in situ kvėpavimo parametrams	48
6.2. Mitochondrijų in situ kvėpavimo reguliavimo vykstant riebalų rūgščių oksidacijai palyginimas stimuliuojant kvėpavimą egzogeniniu ADP bei ATP	50
6.3. Išorinės mitochondrijų membranos laidumo įvertinimas panaudojant egzogeninę ADP-suvartojančią sistemą. Kreatino efektas: tiesioginio metabolinio ADP tuneliavimo įrodymas	52
6.4. Kreatino įtaka mitochondrijų in situ kvėpavimo reguliavimui	58
6.5. Dekstrano poveikis mitochondrijų in situ kvėpavimui bei morfologijai	63
6.5.1. Makromolekulių įtaka mitochondrijų in situ kvėpavimui	63
6.5.2. Riebalų rūgščių oksidacijos bei dekstrano poveikis mitochondrijų in situ morfologijai.....	71
7. Rezultatų apibendrinimas	76
8. Išvados.....	79
9. Literatūros sąrašas.....	80
10. Paskelbti darbai.....	89
11. Padėka	90

1. SANTRUMPOS

ACC	acetil-CoA karboksilazė
Acil-CoA	acil kofermentas A
ADP	adenozin-5'-difosfatas
AMPK	5'-AMP aktyvuojama proteinkinazė
ANT	adenino nukleotidų nešiklis
ATP	adenozin-5'-trifosfatas
ATP-azė	adenozino trifosfatazė
atr	atraktilozidas
CK	kreatino kinazė
CoA / CoA-SH	kofermentas A
CPT-I	karnitino palmitoil transferazė I /nešiklis
CPT-II	karnitino palmitoil transferazė II /nešiklis
CT	karnitino acilkarnitino nešiklis
GAPDH	gliceraldehido 3-fosfatdehidrogenazė
HK	heksokinazė
JSA	jaučio serumo albuminas
K_m	tariamoji oksidacinio fosforilavimo Michaelis-Menten konstanta
LCAS	ilgos grandinės acil-CoA sintetazė
MCD	malonil-CoA dekarboksilazė
mi-CK	mitochondrinė kreatino kinazė
nmol O	nanomoliai deguonies
PDH	piruvatdehidrogenazė
PDHK	piruvatdehidrogenazės kinazė
PEP	fosfoenolpiruvatas
PGK	fosfogliceratkinazė
PK	piruvato kinazė
s.sk.sv.	sausas skaidulų svoris
UCP	atskiriantysis baltymas
VDAC	įtampa reguliuojamas anijonams atrankus kanalas
V_{max}	maksimalus kvėpavimo greitis
V_o	kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje

2. ĮVADAS

Mechanizmai, kurie kontroliuoja oksidacinį fosforilinimą raumenų ląstelėse *in vivo*, vis dar nėra aiškūs. Pagal klasikinę sampratą citozolinio ADP koncentracija priklauso nuo ATP skilimo ATP-azių katalizuojamoje reakcijoje; tai yra pagrindinis signalas, stimuliuojantis kvėpavimą [Chance and Williams, 1956, Chance et al., 1985]. Eksperimentų, naudojant saponinu permeabilizuotas skaidulas, duomenys parodė, kad glikolitinių greito susitraukimo raumenų (*m.gastrocnemius*) oksidacinio fosforilinimo sistema pasižymi dideliu tariamu giminingumu ADP ($K_m=10-20 \mu M$), kaip ir izoliuotos mitochondrijos. Oksidaciniais lėto susitraukimo raumenims, tokiems kaip širdis ir *m.soleus*, priešingai, būdingas žymiai mažesnis giminingumas ADP ($K_m=200-400 \mu M$) [1] [2-5]. Šie rezultatai rodo, kad ląstelinis kvėpavimas *in vivo* kontroliuojamas priklausomai nuo raumenų tipo. Sutinkamai su tuo neseniai iškelta hipotezė, kad oksidacinių raumenų ląstelėse mitochondrijos ir miofibrilių bei sarkoplazminio tinklo ATP-azės formuoja kompleksus, pavadintus viduląsteliniais energetiniais vienetais (*angl. ICEU - intracellular energetic units*) [6, 7]. Jie įgalina efektyviai stimuliuoti oksidacinį fosforilinimą išvengiant žymių citozolinio adenino nukleotidų ir PCr kiekio svyravimų; tokia būseną pavadinta metaboliniu stabilumu [8]. Nors nėra žinoma šių energetinių vienetų struktūrinė ir molekulinė prigimtis, tačiau įrodyta, kad jie sujungia mitochondrijas ir ATP-azes tarpusavyje per CK- ir AK-fosfatų pernašos sistemą ir per tiesioginius ADP/ATP mainus (tuneliavimą) [9]. Tuo paaiškinamas mažas sistemos giminingumas egzogeniniam ADP, kurio difuzija į mitochondrijas gali būti apribota dėl tokių kompleksų struktūrinės organizacijos ir, galbūt, dėl to, kad mitochondrijų išorinė membrana apriboja šio substrato laidumą. Manoma, kad ADP difuzija gali būti apribota išorinės membranos lygmenyje dėl to, kad porino porų laidumą kontroliuoja citoplazminiai baltymai [2, 3, 10, 11]. Neseniai buvo parodyta [4], kad riebalų rūgščių oksidacija taip pat gali būti svarbi reguliuojant oksidacinį fosforilinimą mitochondrijose. Tačiau nėra aiškus riebalų rūgščių poveikio mechanizmas.

Kreatino/fosfokreatino sistema yra vienas svarbiausių komponentų, dalyvaujančių viduląstelinėje energijos pernašoje ir metabolinių signalų perdavime [12]. Ši sistema per kreatino/fosfokreatino pernašą apjungia mitochondrijas (kur gaminama ATP) ir miofibriles bei sarkoplazminį tinklą (kur panaudojama ATP). Klingenbergo grupė 1964 m. atrado mitochondrinį kreatino kinazės izofermentą (mi-CK). Šis energiją pernešantis fermentas, lokalizuotas mitochondrijų tarpmembraninėje erdvėje, yra funkciškai susietas su porinu išorinėje membranoje ir ANT vidinėje membranoje. Dėl tokių sąveikų prie vidinės mitochondrijų membranos sukuriamas mikrokompartmentas, kur mi-CK tiekia ADP tiesiogiai ANT mainais į ATP ir tokiu būdu kontroliuoja kvėpavimą [10]. Remiantis naujausiais eksperimentiniais duomenimis [13] teigiama,

kad mi-CK ir citozolinės CK izofermentai (taip kaip ir AK izofermentai) sudaro fosfatų pernašos tinklą ir tokiu būdu dalyvauja palaikant ląstelės energetinę homeostazę.

Yra žinoma, kad klasikinėje izotoninėje terpėje izoliuotos mitochondrijos dėl prarasto onkotinio slėgio esti dirbtinai išbrinkusios, lyginant su kondensuota jų konfigūracija *in vivo* [14]. Eksperimentiškai nustatyta, kad modelinėje sistemoje 10 proc. dekstrano pridėjimas į inkubavimo terpę su izoliuotomis mitochondrijomis sukuria panašaus dydžio ADP gradientą abipus porino poros, koks esti intaktiškose ląstelėse [15]. Pirma, buvo parodyta, kad makromolekulės padidina funkcinę sąveiką (*angl.* coupling) tarp mitochondrinių kinazių CK bei AK ir oksidacinio fosforilinimo [15-17]. Antra, pridėdant makromolekulių, didėja ADP dinaminė kompartmentacija abipus išorinės mitochondrijų membranos [16, 18-20]. Be to, būtina sąlyga dekstrano efektams pasireikšti yra intaktinė išorinė membrana [20]. Izoliuotoms mitochondrijoms makromolekulės (dekstranas-20) didino tar. K_m^{ADP} , bet lėtino trečios metabolinės būsenos kvėpavimo greitį [20]. Tačiau iki šiol nebuvo tirta dekstrano įtaka mitochondrijų *in situ* kvėpavimo parametrams.

Taigi, pridėdant į matavimo terpę makromolekulių (šiam darbe dekstrano T-70) buvo bandoma imituoti onkotinį slėgį ir įvertinti jo poveikį žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimui bei išorinės membranos pralaidumui ADP oksiduojantis tiek neriebalinės, tiek riebalinės kilmės substratams.

Kadangi riebalų rūgštys yra vieni pagrindinių širdies raumens energetinių substratų badavimo, išemijos atvejais, esant racione daug riebalų [4], buvo svarbu ištirti jų vaidmenį reguliuojant oksidacinį fosforilinimą mitochondrijose *in situ* ir įvertinti, ar riebalų rūgščių oksidacijos poveikis oksidacinio fosforilinimo sistemai gali pasireikšti *in vivo*. Darbe mitochondrijų *in situ* kvėpavimo substratais naudojome įvairios struktūros riebalų rūgštis.

Be to, šiame darbe buvo tiriamas riebalų rūgščių poveikis tariamajai K_m^{ADP} ir kreatino kinazės bei ADP/ATP nešiklio funkciniai sąveikai: priklausomybė nuo temperatūros, terpės onkotinio slėgio ir kitų faktorių. Riebalų rūgščių oksidacijos vaidmeniui oksidacinio fosforilinimo reguliavime išsiaiškinti tirtas saponinu permeabilizuotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimas. Ši skaidulų tyrimo metodika leidžia įvertinti visą ląstelės mitochondrijų populiaciją *in situ*, t.y. jų neizoliuojant, ir padeda suprasti, kaip mitochondrijų veikla reguliuojama *in vivo*. Dalis darbo (mitochondrijų brinkimo matavimai) buvo atlikta naudojant izoliuotas žiurkės širdies raumens mitochondrijas.

3. LITERATŪROS APŽVALGA

3.1. Mitochondrijos ir jose vykstantys procesai

Mitochondrijos – ląstelės jėgainės, gaminančios ATP. ATP sintezės procesas vadinamas oksidaciniu fosforiliniu. ATP sintezei naudojamas elektrocheminis protonų gradientas, kurį sukuria kvėpavimo grandinės kompleksai, oksiduodami NADH bei FADH_2 [21]. Yra žinoma, kad mitochondrijos vaidina pagrindinį vaidmenį tiek apoptotinėje, tiek nekrotinėje ląstelės mirtyje. Mitochondrijų struktūra įgalina kompartmentalizuoti mitochondrijų metabolizmą. Mitochondrijų išorinė membrana nepralaidi didesnėms nei 1500 Da citozolio molekulėms; ji atskiria mitochondrijų tarpmembraninę erdvę nuo citozolio. Tarpmembraninės erdvės joninis sąstatas panašus į citozolio. Susilieję vidinei ir išorinei membranoms susidaro kontaktinės vietos; tai yra dinaminės struktūros, jos dalyvauja importuojant mitochondrinių baltymų pirmtakus (*angl.* precursor) [22]. Daugelis darbų [23-27] parodė, kad žiurkės kepenų mitochondrijose kontaktinės vietos dalyvauja transportuojant ilgagrandes riebalų rūgštis į matriksą. Taigi, kontaktinių vietų dėka palaikomi ryšiai tarp mitochondrijų ir citozolio [22]. Kontaktinės vietos širdies mitochondrijose yra sudarytos iš porino išorinėje membranoje, mitochondrinės kreatinkinazės bei mitochondrinės heksokinazės tarpmembraninėje erdvėje ir ANT vidinėje membranoje. Kontaktinės vietos palengvina energijos srautą (*angl.* flux) iš mitochondrijų į citozolį [23]. Kontaktinių vietų skaičius kinta oksidacinio metabolizmo metu; jų padaugėja aktyviai kvėpuojančiose mitochondrijose [23].

Pagrindiniai mitochondrijų kvėpavimo substratai yra gaunami iš angliavandenių ir riebalų. Fermentai, dalyvaujantys aktyvuojant ir transportuojant riebalų rūgštis, išsidėstę išorinėje membranoje ir kontaktinėse vietose. Angliavandenių ir riebalų rūgščių oksidacijos tarpusavio reguliavimą kontroliuoja PDH ir CPT-1 fermentai. Padidėjusi piruvato, gauto iš angliavandenių, oksidacija inhibuoja riebalų rūgščių oksidaciją padidėjant malonil-CoA kiekiui, kuris inhibuoja CPT-1. Manoma, kad malonil-CoA yra pagrindinis komponentas, reguliuojantis, kurias atsargas (angliavandenius ar riebalus) naudos mitochondrijos [23]. Nustatyta, kad gali būti ir kitas reguliacinis mechanizmas, kai kepenyse CPT-1 aktyvumą gali keisti citoskeleto baltymai, sąveikaudami su mitochondrijomis [28]. Be to, palmitoil-CoA, CPT-1 substratas, konkuruoja su malonil-CoA dėl prisijungimo šio fermento reguliacinėje srityje.

3.2. Faktoriai, reguliuojantys mitochondrijų kvėpavimą ir oksidacinį fosforilinimą

Mitochondrijos sunaudoja apie 90 proc. ląstelės gaunamo deguonies, iš šio kiekio net 80 proc. – ATP sintezei [29]. Sveikoje širdyje deguonies sunaudojimas priklauso nuo širdies darbo intensyvumo [30]. Kad patenkintų kintančius ląstelių energetinius poreikius, oksidacinio fosforilinimo sistema yra reguliuojama tam tikro jautraus mechanizmo [12]. Pradiniuose eksperimentuose, tiriant izoliuotas mitochondrijas, buvo pastebėta, kad padidėjusi ADP gamyba didina mitochondrijų kvėpavimo greitį, todėl buvo iškelta hipotezė, kad mitochondrijų kvėpavimą reguliuoja:

ADP koncentracija [31]. Vėliau atsirado ir kitų hipotezių, teigiančių, jog mitochondrijų metabolinę būseną reguliuoja :

fosforilinimo potencialas [32],

ATP/ADP santykis [Davis and Lumeng, 1975],

submikromolinės Ca^{2+} koncentracijos [33, 34].

Neseniai buvo gauti eksperimentiniai duomenys, kurie parodė, jog kardiomiocituose ADP difuziją į mitochondrijų vidų, taigi, ir oksidacinio fosforilinimo sistemos aktyvumą, reguliuoja išorinė mitochondrijų membrana [2, 35, 36].

Vertinant intaktiškų izoliuotų mitochondrijų išorinės membranos pralaidumą nustatyta maža tariamoji K_m^{ADP} reikšmė – 17-25 μM [37]. Tai rodo labai aukštą oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumą ADP-ui ir didelį išorinės mitochondrijų membranos laidumą. Mitochondrijų veiklos reguliavimui *in vivo* įvertinti 1987 m. pasiūlyta nauja – saponinu permeabilizuotų širdies raumens skaidulų metodika [38], leidžianti tyrinėti visą ląstelės mitochondrijų populiaciją *in situ*, t.y. jų neizoliuojant. Paskutinio dešimtmečio darbai su saponinu permeabilizuotomis skaidulomis parodė, kad priešingai nei izoliuotose mitochondrijose, išorinė mitochondrijų membrana pasižymi mažu pralaidumu ADP-ui (aukšta tariamąja K_m^{ADP}) ir yra svarbi reguliuojant oksidacinį fosforilinimą [2, 35, 36]. Iš širdies raumens izoliuotos ląstelės ir saponinu permeabilizuotos skaidulos oksiduojant neriebalinės kilmės substratus pasižymėjo silpna kvėpavimo greičio priklausomybe nuo ADP koncentracijos (K_m^{ADP} apie 300 – 400 μM) [38]. Saks ir kt. mokslininkų darbai parodė, kad širdies ir lėto susitraukimo raumenų (*m.soleus*) skaiduloms būdinga K_m^{ADP} reikšmė yra dešimtis kartų didesnė nei izoliuotose mitochondrijose [2, 35, 36]. Tai šių autorių nuomone rodo, jog *in situ* mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas adenino nukleotidams yra mažas. Ankstesni tyrimai atlikti mūsų laboratorijoje su neriebalinės kilmės substratais (glutamatu+malatu, piruvatu,

sukcinatu) patvirtino šį teiginį [5, 39]. Paskutinio dešimtmečio darbai parodė, kad jais galėtų būti ląstelės onkotinis slėgis ir su citoskeletu susiję baltymai [2, 18, 20].

Vėliau buvo atskleistas naujas reiškinys – riebalų rūgščių oksidacija širdies raumens skaidulose esančių mitochondrijų išorinės membranos pralaidumą ADP-ui ženkliai padidina (tariamoji K_m^{ADP} reikšmė sumažėja net iki 10 kartų) lyginant su neriebalinės kilmės substratų sukcinato, piruvato oksidacijai būdinga tariamąja K_m^{ADP} [4]. Tačiau šio reiškinio mechanizmas iki šiol nėra aiškus.

Kadangi riebalų rūgštys yra vieni iš pagrindinių širdies energetinių substratų (esant riebalais turtingam racionui, badavimo, išemijos atvejais), buvo svarbu detaliau ištirti jų vaidmenį reguliuojant oksidacinį fosforilinimą. Žinoma [40], kad riebalų rūgštims patenkant į mitochondrijas, mitochondrijų matrikso tūris padidėja, todėl padaryta prielaida, kad tariamosios K_m^{ADP} reikšmės sumažėjimas gali būti susijęs su riebalų rūgščių sąlygotais morfologiniais mitochondrijų pokyčiais. Iš kitos pusės, yra parodyta [4], kad riebalų rūgščių, jų CoA ir karnitino esterų mikromolinės koncentracijos žymiai padidina išorinės membranos pralaidumą ADP-ui, o didesnės netgi pažeidžia išorinės ir vidinės membranų vientisumą. Tačiau substratinės šių junginių koncentracijos nepažeidžia išorinės membranos (citochromo c testas) [41]. Be to, yra žinoma, kad išorinės membranos pralaidumas ADP-ui padidėja, kai skaidulos esti paveiktos proteazėmis [2, 3, 36, 39], arba kai tokiais faktoriais, kaip hiperosmotinis šokas [14, 17, 42] arba išemija [43], yra pažeidžiamas išorinės membranos vientisumas.

3.3. Išorinė mitochondrijų membrana – difuzijos barjeras

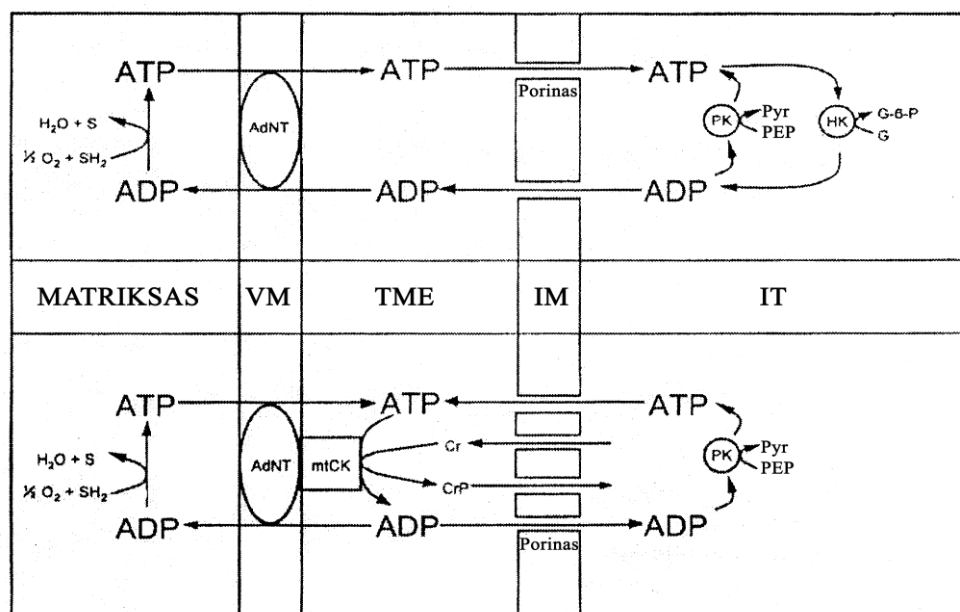
Aerobinėse sąlygose dirbant ląstelei susidaręs ADP yra refosforilinamas oksidacinio fosforilinimo būdu. Termodinaminiais sumetimais (didelio našumo) yra naudinga maža ADP koncentracija ATP skilimo vietose ir didelė ADP koncentracija ATP sintezės stimuliavimui mitochondrijose. Todėl būtina erdvėskyra tarp ATP panaudojimo ir ADP refosforilinimo (homogeniniai srautai ląstelėje). Morfologinė struktūra, galinti realizuoti tokią erdvėskyrą, yra mitochondrijų išorinė membrana [15].

Greitai kvėpuojančiose mitochondrijose ADP išsikvojimas prie jų paviršiaus dėl lėtos ADP difuzijos gali būti lemiamu faktoriumi, limituojančiu oksidacinį fosforilinimą. Ląstelėse su dideliu energijos poreikiu (aerobinėse) ši problema išsprendžiama kinazių (heksokinazė smegenyse, kreatino kinazė raumenyse), kurios dėl specifinių sąveikų (žinduolių HK su išorine membrana) arba lokalizacijos (mitochondrinė kreatinkinazė) esti labai arti mitochondrijų [44]. Mitochondrinė CK

keletą kartų padidina adenino nukleotidų apyvartą mitochondrijų tarpmembraninėje erdvėje, palaikydama aukštą aerobinį fosfokreatino gamybos lygį ir metabolinį pastovumą ląstelėje [45].

Eksperimentiškai buvo parodyta [44], kad tarpmembraninėje erdvėje dėl kreatinkinazės ir adenilatkinazės generuojamo ADP susidaro didesnės, nei citozolyje vietinės ADP koncentracijos. Ši dinaminė ADP kompartmentacija gali būti paaiškinama tuo, kad išorinė mitochondrijų membrana veikia kaip difuzijos barjeras, apsunkinantis adenino nukleotidų mainus per porino porą, tuo pačiu sąlygodamas adenino nukleotidų koncentracijos gradientus tarp tarpmembraninės erdvės ir citozolio.

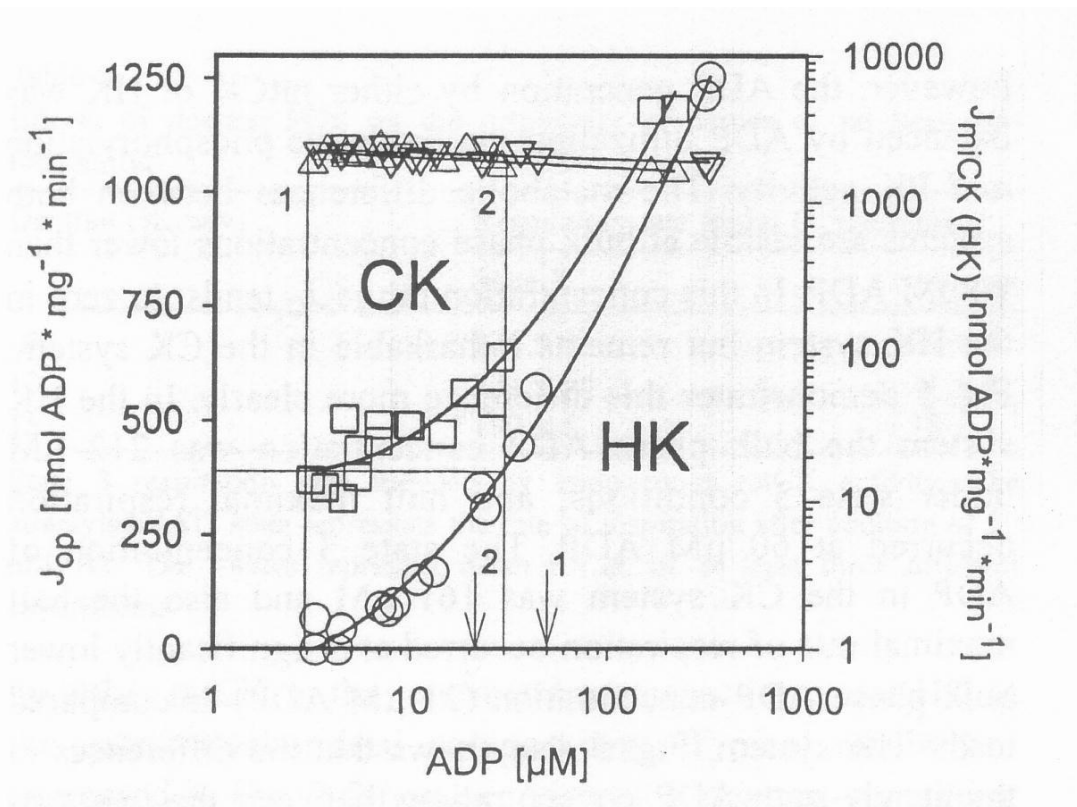
Naudojant rekonstruotas sistemas (1 pav.) nustatyta, kad ADP oksidaciniam fosforilinimui pirmenybiškai tiekiamas per mitochondrinę kreatinkinazę (miCK) lyginant su ADP tiekimu pridėjus ekstramitochondrinės mielių heksokinazės (HK). Šis fenomenas buvo pavadintas dinamine ADP kompartmentacija (ADP koncentracijos gradientas abipus išorinės mitochondrijų membranos) [44]. Eksperimentai su rekonstruotomis sistemomis (HK ir CK) [44] tiesiogiai įrodė, kad egzistuoja ADP gradientas abipus išorinės membranos širdies mitochondrijose.



1 pav. Rekonstruotų sistemų, naudojamų eksperimentiniam išorinės membranos difuzijos gradientų nustatymui izoliuotose žiurkės širdies mitochondrijose, metabolinė schema. HK sistema (paveiksle viršuje), CK sistema (apačioje). VM-vidinė membrana, TME-tarpmembraninė erdvė, IM-išorinė membrana, IT-inkubavimo terpė.

2 pav. pavaizduota oksidacinio fosforilinimo greičio priklausomybė nuo ekstramitochondrinio ADP koncentracijų CK bei HK sistemose. Esminis momentas yra tas, kad

oksidacinio fosforilinio greičio priklausomybė nuo ekstramitochondrinio ADP koncentracijos yra žymiai perstumta link žemesnių ADP koncentracijų mi-CK atveju, lyginant su HK sistema. Minimalus kvėpavimas CK sistemoje vyko esant 3 μM ADP inkubavimo terpėje (vertikali linija 1), tuo tarpu kad mitochondrijos pasiektų tokį pat aktyvumą HK sistemoje, reikėjo 30 μM ADP (vertikali linija 2).



2 pav. Tiesioginis išorinės membranos ADP gradiento širdies mitochondrijose įrodymas. Tiek ADP srautai į oksidacinį fosforilinimą J_{OP} CK sistemoje ($\square$) ir HK sistemoje ($\circ$), tiek ADP regeneruojantys srautai HK J_{HK} ($\triangle$) ir mi-CK, J_{CK} (∇) pavaizduoti priklausomai nuo ADP koncentracijos inkubavimo terpėje. Plonos vertikalios linijos (1,2) žymi ADP koncentracijas inkubavimo terpėje abiejose sistemose esant minimaliam kvėpavimo greičiui, matuotam CK sistemoje su piruvatkinazės pertekliumi. Rodyklės žymi K_{ADP} reikšmes HK (1) bei CK (2) sistemose.

Manoma [2, 3, 36, 46], kad mitochondrijų izoliavimo metu prarandamas citoplazminis baltymas arba faktorius x (hipotetiškai susijęs su citoskeletu), kuris fiksuoja mitochondrijų padėtį bei galbūt kontroliuoja VDAC laidumą ADP-ui bei ATP-ui *in vivo*. Šis 27,5 kDa baltymas aptiktas elektroforezės būdu poliakrilamido gelyje širdies ir lėto susitraukimo skeleto raumenyse [11]. Taigi, nuo sąveikos tarp išorinės membranos ir citoskeleto elementų priklauso išorinės membranos pralaidumas ADP-ui.

Didelį išorinės membranos pralaidumą *in vitro* molekulėms iki 6 kDa nulemia jau minėtas specifinis baltymas, vadinamas mitochondrinio porinu arba VDAC (įtampa reguliuojamas anijonams atrankus kanalas), kuris rastas visose tirtose eukariotinėse ląstelėse. Per šį kanalą atviroje būsenoje difuzijos būdu gali praeiti tokios molekulės, kaip kreatinas, kreatinfosfatas bei adenino nukleotidai. Uždaroje būsenoje šis kanalas tampa atrankiu katijonams, jis tampa pralaidus vienvalečiams jonams, tačiau visiškai nepralaidus adenino nukleotidams. Kanalo pralaidumą lemia keletas faktorių, tokių, kaip membraninis potencialas, onkotinis slėgis, mitochondrinis baltymas-kanalo modulatorius [47]. Be to, ADP difuzija gali būti apribota išorinės membranos lygmenyje dėl to, kad porino poras kontroliuoja citoplazminiai baltymai [2, 3, 10].

Būtina sąlyga efektyviai metabolitų (ADP, ATP, kreatinfosfato ir kreatino) pernašai tarp mitochondrijų ir kitų ląstelės struktūrų yra tarpmembraninės erdvės vientisumas, t.y. nepažeista išorinė ir vidinė mitochondrijų membranos bei kontaktinės sritys, susiejančios oksidacinį fosforilinimą su kinazėmis. Šis vientisumas yra pažeidžiamas ne tik išemijos, bet ir mitochondrijų išskyrimo metu [19, 48], todėl mitochondrijų funkcijas geriau tirti *in situ*, t.y. mitochondrijų neišskiriant iš ląstelių [38, 39]. V.Saks ir F.N.Gellerich grupių tyrimų duomenys leidžia daryti prielaidą, kad išorinė širdies mitochondrijų membrana fiziologiškai nėra pakankamai pralaidi adenino nukleotidams ir tai priklauso nuo faktorių, reguliuojančių joje esančio porino kanalo pralaidumą. Be to, parodyta, kad VDAC dalyvauja esterifikuotų riebalų rūgščių pernašoje į mitochondrijas [26, 49]. Taigi, iškelta prielaida, kad išorinės mitochondrijų membranos pralaidumas ADP gali būti reguliuojamas ne tik su citoskeletu susijusių baltymų, bet ir riebalų rūgščių arba jų oksidacijos fermentinės sistemos komponentų [26].

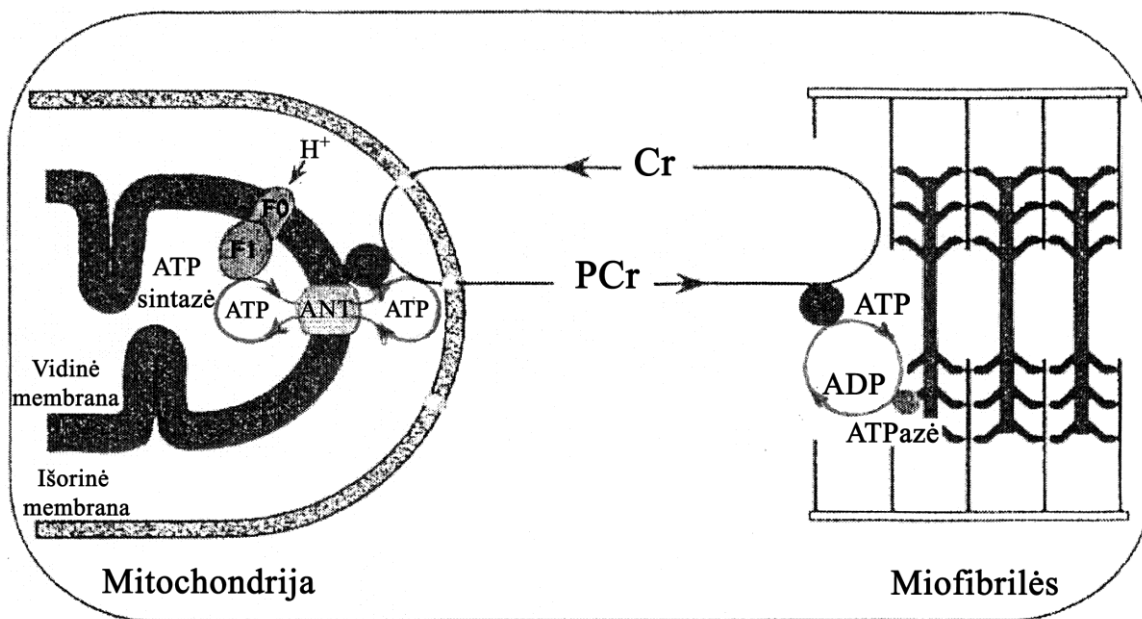
Mitochondrijų išorinė membrana vaidina lemiamą vaidmenį mitochondrijų kvėpavimo reguliavimo mechanizme *in vivo*. Parodyta, kad priešingai izoliuotoms mitochondrijoms, permeabilizuotose skaidulose išorinė membrana yra mažai pralaidi ADP-ui (didelė tariamoji K_m reikšmė saponinu permeabilizuotoms skaiduloms). Manoma, kad keletas širdies ląstelės citoskeleto komponentų fiksuoja mitochondrijas, sarkoplazminį retikulumą ir vieną sarkomerą į funkcinį kompleksą, kur endogeninis ADP yra tuneliuojamas į mitochondrijas per organizuotą metabolinį tinklą [7, 35, 50] tam, kad būtų tiksliai reguliuojami laisvosios energijos virsmai sutinkamai su širdies darbo intensyvumu. Tokiu būdu paaiškinamas mažas oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumas egzogeniniam ADP, kurio difuzija į mitochondrijas gali būti apribota dėl tokių kompleksų struktūrinės organizacijos ir, galbūt, dėl to, kad mitochondrijų išorinė membrana apriboja šio substrato laidumą. Kai kurių tyrėjų nuomone [51, 52], didelę K_m^{ADP} *in situ* daugiausia nulemia difuzijos gradientai mitochondrijų išorėje, o mitochondrijų išorinės membranos įnašas į šiuos gradientus yra nedidelis.

Kvėpavimo lygis, manoma, yra priklausomas nuo citoplazminio ADP koncentracijos [31] ir daugeliu atvejų K_m^{ADP} bandoma nustatyti intaktinėse ląstelėse. Yra apskaičiuota, kad citozolyje laisvo ADP koncentracija yra tos pačios eilės, kaip ir nustatytos oksidacinio fosforilavimo K_m^{ADP} reikšmės 30-50 μ M. Taigi, ląstelėje ADP negali patekti į mitochondrijas pasyvios difuzijos būdu. ADP praėjimą per išorinę membraną palengvina jo pernaša per kanalą VDAC (*angl.* voltage dependent anion channel), kitaip vadinamą porinu, dalyvaujant prie kanalo prisijungusioms ar tarpmembraninėje erdvėje esančioms kinazėms. Tokie kanalai rasti visose iki šiol tirtose eukariotinėse ląstelėse.

Yra žinoma, kad riebalų rūgštys esti pagrindiniai substratai širdies ląstelėse. Ankstesni darbai parodė, kad riebalų rūgštys padidina išorinės mitochondrijų membranos pralaidumą ADP-ui, t.y sumažina tariamąją K_m [4]. Iš kitos pusės yra parodyta, kad riebalų rūgščių, jų CoA ir karnitino esterių įprastos koncentracijos žymiai padidina išorinės membranos pralaidumą ADP-ui, o didesnės koncentracijos netgi pažeidžia išorinės ir vidinės membranų vientisumą [53].

3.4. Kreatino kinazės izofermentai ir mitochondrinė kreatino kinazė

Kreatino kinazės izofermentai per kreatino/fosfokreatino sistemą apjungia procesus tarp mitochondrijų (kur gaminamas makroerginis ATP) ir miofibrilių bei sarkoplazminio tinklo ir sarkolemos ATP-azių (kur ATP panaudojamas). 3 pav. parodyta, kaip kreatino/fosfokreatino sistema apjungia mitochondrijas (ATP gaminama) ir miofibriles (ATP panaudojama/hidrolizuojama) [12]. Modelis apima reakcijas trijuose pagrindiniuose širdies ląstelės kompartmentuose: miofibrilėse kartu su mioplazma, mitochondrijų tarpmembraninėje erdvėje ir mitochondrijų matrikse. Tarpmembraninėje erdvėje mi-CK yra susieta (*angl.* coupled) su ANT [12].



3 pav. Schema demonstruojanti, kaip kreatino/fosfokreatino sistema apjungia mitochondrijas su miofibrilėmis.

40–50 proc. visuminio CK kiekio ląstelėje lokalizuota citoplazmoje (MM, MB ir BB izofermentai), 30 proc. CK yra mitochondrijose kaip specifinis izofermentas mi-CK, 10-20 proc. sujungta su miofibrilėmis, sarkoplazminio tinklo membrana, sarkolema ir branduolio membrana [54].

CK izofermentai visų pirma randami audiniuose, kuriems būdingi dideli energijos poreikiai, tokiuose kaip skeleto bei širdies raumuo, smegenys, fotoreceptorių ląstelės, spermatozoidai, kur jie, manoma, įtraukti į [ATP] bei [ADP] „buferinimą“ (glikolitiniuose audiniuose), taip pat į didelės energijos fosfatų pernašą iš ATP gamybos vietų (mitochondrija, glikolizė) į ATP suvartojimo vietas (oksidaciniuose audiniuose) [45].

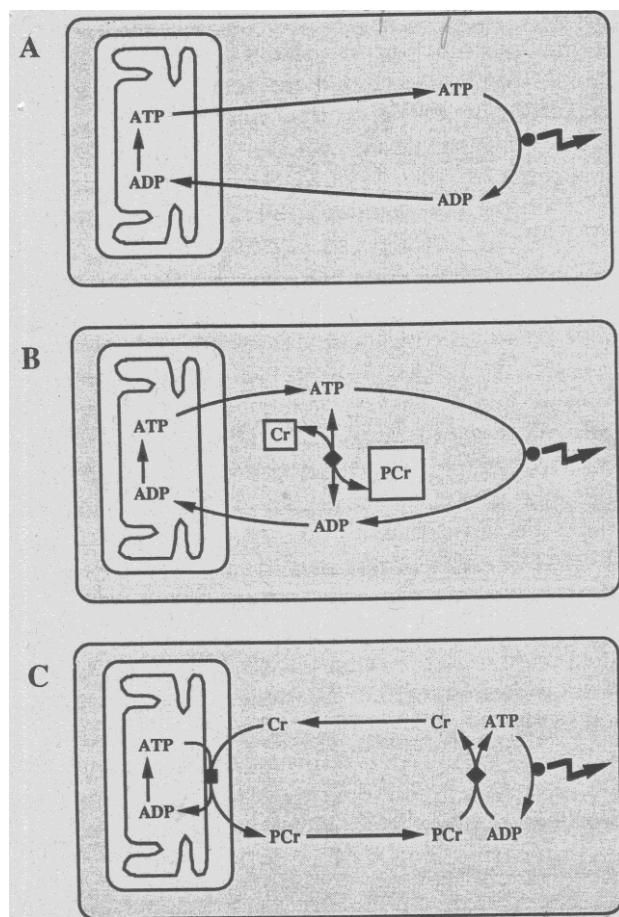
Mitochondrinė kreatinkinazė yra lokalizuota tarpmembraninėje erdvėje ir grįžtamai prisijungusi prie vidinės membranos. Buvo parodyta, kad teigiamai įkrauta mi-CK yra fiksuota prie neigiamai įkrauto kardiopolipino vidinės mitochondrijų membranos išorinėje pusėje, dalyvaujant teigiamai įkrautoms Arg19, Lys20 ir His11 fermento liekanoms [45, 55]. Neatmetamos hidrofobinės sąveikos bei specifinių receptorių (baltymų) egzistavimas. Tokių sąveikų dėka sukuriamas mikrokompartmentas prie vidinės mitochondrijų membranos, kur mi-CK tiesiogiai tiekia ADP adeninnukleotidų nešikliui mainais į ATP [10, 45]. Per kontaktines sritis, kurios, manoma, yra dinaminės struktūros, mi-CK papildomai sąveikauja su išorine membrana VDAC vietose. Manoma, kad kinazės, esančios tarpmembraninėje erdvėje, gali funkciškai susieti adenilatų

nešiklį ir vidinę membraną su porinu ir išorine membrana. Be to, aptikta, kad dalis mi-CK yra lokalizuota kristų membranose.

Mitochondrijų subfrakcionavimo eksperimentuose daugiau kaip 50 proc. mi-CK buvo rasta kontaktinių sričių frakcijoje. Kontaktinės sritys, manoma, įtrauktos į baltymų pirmtakų importą į mitochondrijas, taip pat į lipidų transportą tarp abiejų mitochondrijų membranų. Jų skaičius išauga stimuliuojant mitochondrijų kvėpavimą, taigi, šios sritys yra įtrauktos arba į oksidacinio fosforilinimo reguliavimą arba, labiau tikėtina, į didelės energijos fosfatų eksportą iš mitochondrijų [45].

Mi-CK mitochondrijų tarpmembraninėje erdvėje katalizuoja ATP (generuoto mitochondrijų matrikse) ir kreatino transfosforilinimą į ADP ir fosfokreatiną. Pastarasis palieka mitochondrijas kaip oksidacinio fosforilinimo produktas ir difunduoja per citozolį į ATP suvartojimo vietas. Ten citozolinės CK izofermentai nenutrūksta regeneruoja ATP tam, kad būtų palaikomas aukštas ATP/ADP lygis, kuris, atrodo, yra lemiamas daugelio ATP-azių veiklai. Kreatino difuzija atgal į mitochondrijas uždaro ciklą. Dėl CK izofermentų specifinės subląstelinės kompartmentacijos skirtingi CK izofermentų šeimos nariai yra įtraukti į skirtingus metabolinius kelius. Iš CK izomerų tik mi-CK yra susieta su oksidaciniu fosforiliniu. Citozolinės CK izofermentai gali būti tiek laisvi citozolyje, tiek susieti su viduląstelinėmis struktūromis, tokiomis, kaip sarkolema, sarkoplazminis tinklas arba miofibrilės, kur jie funkciškai susieti su Na^+/K^+ -ATP-aze, Ca^{2+} -ATP-aze ir miozino ATP-aze atitinkamai [45]. Kadangi ADP ir ATP reguliuoja daugelį fundamentaliųjų metabolinių kelių, tai dideli jų koncentracijų pokyčiai keičiantis darbo intensyvumui (*angl.* workload) gali stipriai sutrikdyti visos ląstelės metabolizmą. Taigi, greitai subalansuodama ATP sunaudojimo ir ATP pagaminimo greičius, CK sistema padeda išvengti energijos išbarstymo ir garantuoja reikiamą ląstelės ATP-azių funkcionavimą [45].

Iškelta hipotezė apie skirtingą CK sistemos vaidmenį „oksidaciniuose“ (lėto susitraukimo) ir „glikolitiniuose“ (greito susitraukimo) audiniuose [56] (4 pav.).



4 pav. Kreatinkinazės funkcijų modeliai (A) Klasikinis energijos transporto modelis tarp vietų, gaminančių ATP (mitochondrijos, glikolizė) ir ATP suvartojančių vietų (visos ATPazių rūšys). (A) Šis modelis grubiai atspindi situaciją audiniuose, neturinčiuose CK, PCr ir Cr, pvz., kepenyse. (B) CK/PCr buferio funkcija. PCr yra tiesiogiai regeneruojamas hidrolizuojantis ATP intensyviai dirbant. Dėl didelio citozolinės CK aktyvumo CK reakcija išlieka arti pusiausvyrinės būsenos, tokiu būdu palaiko [ADP] ir [ATP] beveik pastovias. (C) Transportinė CK/PCr sistemos funkcija. Ši sistema veikia kaip šuntas tarp ATP gaminto ir ATP sunaudojimo vietų. Tuo tarpu kai buferio funkcijai nėra reikalingi mi-CK izofermentai, transporto funkcijai iš esmės būtina sąlyga yra mi-CK, ypač jei apribota adeninnukleotidų difuzija per išorinę mitochondrijų membraną. Reikia pažymėti, kad modeliai (B) ir (C) aprašo kraštutinius, iš tiesų audinyje ar ląstelėje esti tarpinė situacija tarp šių kraštutinių. Skrituliukais pažymėtos ATP hidrolizės vietos, kvadratėliais–mi-CK, rombais–citozolinė CK.

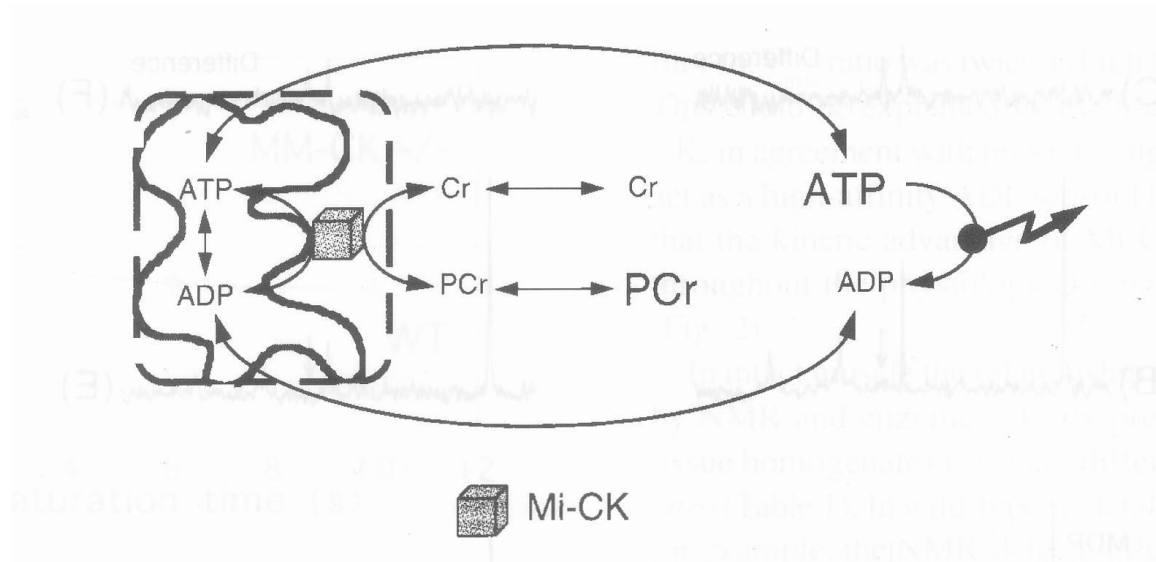
Pagal šią hipotezę oksidaciniuose audiniuose pagrindinis CK sistemos vaidmuo yra užtikrinti energijos pernašą; būtina sąlyga čia yra mi-CK. Pastaroji funkciškai susijusi su adeninnukleotidų nešiklio vidinėje mitochondrijų membranoje ir porinu išorinėje membranoje. Oksidacinio fosforilavimo būdu generuotas ATP, perėjęs vidinę mitochondrijų membraną, transfosforilinamas į PCr. Tai vyksta kreatino, difunduojančio iš PCr panaudojimo vietų (kur

lokalizuota citozolinė CK), sąskaita. Eksperimentiškai nustatyta, kad mi-CK ir adenino nukleotidų nešiklis širdies mitochondrijose esti ekvimoliariniais kiekiais.

Manoma, kad glikolitiniuose audiniuose CK sistema atlieka „energijos buferinimo“ funkciją. Didelis citozolinės CK, lokalizuotos šalia ATP glikolitinės gamybos vietų ir galbūt funkciškai susietos su glikolize, aktyvumas tarnauja kaip didelės energijos fosfatų laikinas buferis; mi-CK izofermentai tam nėra būtini. Tai leidžia ATP ir ADP koncentracijoms išlikti pastovioms padidėjusio raumenų susitraukimo aktyvumo trumpais periodais. Be to, CK reakcijoje sunaudojami protonai, taigi, ATP hidrolizė bei glikolizės aktyvinimas dirbančiuose skeleto raumenyse nėra lydimi viduląstelinės terpės parūgštėjimo. Eksperimentų su transgeniniais gyvūnais duomenys [57] patvirtino hipotezę, kad mi-CK didina išorinės membranos pralaidumą ADP (mažina oksidacinio fosforilavimo K_m^{ADP}) ir palaiko didelę vietinę ADP koncentraciją prie adenino nukleotidų nešiklio ANT. Kai sąlygose *in vivo* turi būti palaikoma didelė ATP koncentracija, aukštas kvėpavimo lygis (*angl.* flux) gali būti palaikomas dėka mi-CK, kuri lokaliai regeneruoja ADP tarpmembraninėje erdvėje [57].

Reikia pažymėti, kad aukščiau paminėti du modeliai aprašo kraštutinius atvejus, o šių dviejų funkcijų santykinę svarbą nulemia audinio fiziologiniai poreikiai.

Eksperimentiniai darbai su neturinčios citozolinės CK (*angl.* knock-out) pelės širdies raumens audiniu [58] (5 pav) parodė, kad šiuo atveju CK sistemos transportinis vaidmuo panaikintas, mi-CK buferina laisvąją energiją esant dideliame ląstelės aktyvumui.



5 pav. Neturinčios citozolinės CK (*angl.* knock-out) pelės širdies raumens ląstelės modelis. Mitochondrinis ATP generuojantis aparatas (paveiksle kairėje) ir citoplazminiai ATP suvartojantys komponentai (dešinėje) gali būti sujungti tik per tiesioginę adenino nukleotidų difuziją, bet ne per PCr ir Cr difuziją.

Faktas, kad sintetinis polianijonas, blokuojantis poriną, taip pat inhibuoja mi-CK kontaktinėse vietose, netgi jei membrana pažeista digitoninu, rodo, kad mitochondrinė kreatinkinazė funkciškai susieta su adenino nukleotidų nešikliu [46]. Ryšys pagrįstas adenino nukleotidų metabolismu tuneliavimu (tiesioginiu perdavimu), todėl tarpmembraninės erdvės ir išorinės membranos pokyčiai, pvz., išemijos metu, ypač mitochondrijų brinkimas ir kreatinkinazės atsijungimas nuo vidinės membranos, gali sumažinti kreatinkinazės vaidmenį mitochondrijų kvėpavimo kontrolėje.

Visa eilė kinetinių bei termodinaminių eksperimentų, o taip pat eksperimentai naudojant žymėtus γ -[^{32}P]-ATP ar [^{33}P]-neorganinį fosfatą taip pat parodė, kad mi-CK yra funkciškai susieta su adenino nukleotidų nešikliu ANT [12].

Priešingai dimeriniams citozolinės CK izofermentams, mi-CK formuoja oktamerus. Tokia ketvirtinė simetrinė struktūra gali būti kaip kanalas molekulėje, pro kurį tuneliuojami metabolitai.

Mi-CK sąveikauja su porinu iš išorinės membranos vidinės pusės tik būdama oktamerinėje būsenoje, kadangi dimeras pasižymi mažu giminingumu porinui [59]. Asociacijos – disociacijos pusiausvyra tarp oktamero ir dimero nulemia oktamero – VDAC kompleksų susidarymą. Taigi, pirma, kreatino kinazė apriboja sąveiką tarp VDAC ir ANT, antra, keičia VDAC struktūrą, mažindama giminingumą heksokinazei ir baltymui Bax. Kai, pavyzdžiui, laisvieji radikalai sukelia kreatino kinazės oktamerų disociaciją, VDAC sąveikauja su ANT, dėl to sukeliamas nuo Bax priklausomas citochromo c išėjimas iš mitochondrijų ir gali atsidaryti nespecifinio pralaidumo pora [60]. Taigi, postuluoja, kad oktamerinė mi-CK, funkciškai susieta su tetrameriniu adenino nukleotidų nešikliu vidinėje membranoje ir oligomeriniu porinu išorinėje membranoje, kontaktinėse srityse formuoja sudėtingą multif fermentinį kompleksą, įgalinantį labai efektyviai sintezuoti fosfokreatiną iš citoplazminio kreatino bei mitochondrinio ATP, esant dideliu citozolinio ATP/ADP santykiui.

Akivaizdu, kad kreatino kinazės sistema svarbi ląstelės viduje pernešant energiją tarp laisvosios energijos gamybos ir panaudojimo vietų. Pridėjus kreatino *in vitro* dėl nuolatinės vietinės ADP regeneracijos tarpmembraninėje erdvėje, katalizuojamos mitochondrinės kreatinkinazės, tariamoji K_m^{ADP} egzogeniniam ADP sumažėja keletą kartų [2, 10, 35, 46]. Panašus K_m^{ADP} sumažėjimas *in vivo* gautas proteolitiškai paveikus permeabilizuotas ląsteles arba hipoosmotiškai paveikus skaidulas [14, 17, 42]. Taigi, tiek ADP difuzija, tiek energijos pernaša yra palengvinama aktyvinant energijos pernašos tinklą – kreatino kinazės sistemą [35]. Visuotinai pripažinta, kad sveikoje širdyje fosfatų pernaša per kreatino kinazės sistemą yra vyraujanti energijos transdukcijos forma [61, 62]. Tačiau greta šios sistemos yra ir AK-fosfatų pernašos sistema, kurią veikti įgalina sąveika (*angl. coupling*) tarp mi-AK ir ANT bei AK2 izoformos sąveika su ATP-azėmis [61]. Daugeliu eksperimentinių darbų buvo pademonstruota, kad lokaliai mitochondrinių kreatinkinazių

gaminamas ADP yra žymiai efektyvesnis stimuliuojant mitochondrijų kvėpavimą, nei terpėje esantis (*angl.* bulk) ADP. Šios sistemos, veikdamos drauge, įgalina efektyviai suderinti energijos gamybą su išaugusiais energijos poreikiais padidėjus darbo intensyvumui.

Genų inžinerija įgalina eliminuoti kreatinkinazės izofermentus (*angl.* knock-out) ir įvertinti jų svarbą fiziologinei širdies funkcijai [12]. Darbuose su knock-out pelėmis, neturinčiomis citozolinės ir/arba mitochondrinės kreatinkinazės parodyta, kad CK izoformų trūkumas keičia viduląstelinį ryšį, bendrą ATP metabolinį srautą (*angl.* flux), energetinį našumą ir, galiausiai, metabolinio streso toleravimą. Toks trūkumas sukelia padidėjusį adenilatkinazės, heksokinazės ir GAPDH/PGK susietų reakcijų funkcinį aktyvumą [13].

Taigi, šiame darbe pabandėme įvertinti, kaip funkcionuoja kreatino kinazės sistema mitochondrijose *in situ* oksiduojantis riebalų rūgštims; ar riebalų rūgštys keičia funkcinę sąveiką tarp ADP/ATP nešiklio ir mitochondrinės kreatino kinazės.

3.5. Makromolekulių įtaka išorinės membranos pralaidumui ADP. Kinazių poveikis nespecifiniam pralaidumui

Nustatyta, kad biocheminių procesų mechanizmai ir kinetika priklauso nuo terpės, kurioje šie procesai vyksta, savybių [17–20]. Manoma, kad intaktinėse raumeninėse ląstelėse mitochondrijos esti apie 20 proc. baltymų tirpale, tai atitinka 200 mg/ml citozolio baltymų koncentraciją [63].

Yra žinoma [14, 64], kad klasikinėje izotoninėje terpėje izoliuotos mitochondrijos dėl prarasto onkotinio slėgio esti dirbtinai išbrinkusios, lyginant su kondensuota jų konfigūracija *in vivo*, o padidėjusi tarpmembraninė erdvė gali būti sumažinta, pridėdant makromolekulių (albumino, dekstrano, fikolio, F-aktino). Eksperimentiškai nustatyta, kad jau 12–13 proc. fikolio [65] arba dekstrano arba 11–15 proc. jaučio serumo albumino [66, 67] tirpalai savo difuzinėmis savybėmis yra panašūs į citoplazmą. Taigi, terpė, papildyta makromolekulėmis, imituoja viduląstelinį koloidinį-osmosinį slėgį mitochondrijose. Užtenka netgi 1–2 proc. polivinilpirolidono, kad mitochondrijų vaizdas taptų panašus į vaizdą, būdingą *in situ* [14].

Nustatyta, kad į terpę su izoliuotomis mitochondrijomis pridėjus makromolekulių (pvz. dekstrano), jos žymiai sumažina ADP difuziją per išorinę mitochondrijų membraną [20, 68, 69]. Taigi, padidėja ADP dinaminė kompartmentacija, t.y. padidėja ADP gradientas abipus išorinės membranos. Pridėjus 10–15 proc. dekstrano oksidacinio fosforilinimo K_m^{ADP} izoliuotoms žiurkės širdies mitochondrijoms padidėja nuo 20 μM iki 50 μM , o tolesnis dekstrano kiekio didinimas

inkubacijos terpėje iki 25 proc. padidina K_m^{ADP} iki 120 μM [20]. Dėl makromolekulių poveikio padaugėja kontaktinių sričių tarp išorinės ir vidinės mitochondrijų membranų, o tarpmembraninės erdvės tūris sumažėja taip, kad mitochondrijos tampa morfologiškai panašios į mitochondrijas *in vivo* [68]. Manoma, kad dekstrano efektai mitochondrijų funkcijoms priklauso nuo onkotinio slėgio, kuris yra dekstrano koncentracijos funkcija [20].

Dekstrano efektas išorinės membranos laidumui buvo įrodytas izoliuotas porino molekulės perkeliant į dirbtines fosfolipidines membranas [69, 70]. Tokios molekulės, kaip dekstranas, kurios negali pereiti porą, osmosiškai veikia kanalo vidų [70], dėl onkotinio streso sumažėja poros skersmuo ir tokiu būdu padidinamas jautrumas įtampai. Esant dekstranui mažo laidumo katijonams atranki būseną įgaunama jau esant 10 mV [69], tuo tarpu be dekstrano tokia būseną įgaunama esant virš 30 mV įtampai [71]. Taigi, tiek dekstranas, tiek kitos makromolekulės ne tik sumažina išorinės mitochondrijų membranos laidumą, bet ir sukelia pokyčius įtampai jautriose porose [69, 70]. Vadinasi, onkotinis slėgis ląstelėje yra labai svarbus, palaikant mažą išorinės mitochondrijų membranos pralaidumą ADP.

Jau minėta, kad modelinėje sistemoje apie 10 proc. dekstrano pridėjimas į inkubavimo terpę sukuria panašaus dydžio ADP koncentracijos gradientą abipus porino poros, koks esti intaktiškose ląstelėse [15]. Darbai su skirtingos molekulinės masės dekstranu (20, 40, 70 ir 500 kDa) parodė, kad šie 10 proc. tirpalai vienodai didino K_m^{ADP} [20]. Tai leidžia teigti, kad ne terpės klampumas, bet makromolekulių kiekis yra svarbus, apsunkinant ADP patekimą į mitochondrijų tarpmembraninę erdvę [20]. Eksperimentiškai įrodyta, kad būtina sąlyga dekstrano efektui yra intaktinė išorinė membrana [20].

Mitochondrijų morfologinis vaizdas šviežiai paruoštose, bet neinkubuotose matavimo terpėje skaidulose panašus į vaizdą *in vivo* [46], tačiau painkubavus jos tampa gana heterogeniškos ir mažiau panašios į *in vivo* [72]. Tačiau iki šiol nebuvo tyrinėtas makromolekulių, būtent dekstrano, poveikis mitochondrijų *in situ* morfologijai, kaip ir kvėpavimo parametrams bei tariamajai K_m^{ADP} . Todėl tai buvo vienas iš šio darbo uždavinių.

3.5.1. Dekstrano įtaka nespecifiniam pralaidumui

Yra žinoma, kad adenino nukleotidų nešiklis, porino pora (VDAC) ir kinazės (mi-HK arba mi-CK) formuoja multifermentinį kompleksą [45]. Sukaupiti duomenys rodo, kad šis multifermentinis kompleksas yra nespecifinio pralaidumo poros (*angl.* PTP-permeability transition pore) komponentas ir kad šie baltymai dalyvauja mechanizme, paleidžiančiame apoptotinį signalą –

citochromą c. Vienas iš šio multifermentinio komplekso pranašumų yra tas, kad sumažėja metabolitų, tokių kaip ADP, difuzijos atstumai.

Onkotinis slėgis – vienas iš veiksnių, veikiančių išorinės membranos poros (VDAC) pralaidumą [47]. Buvo pastebėta, kad dekstras sustiprina heksokinazės surišimą su išorinės membranos pora ir padidina kontaktų tarp VDAC ir ANT dažnį [68]. Tokiose mitochondrijose (esant dekstranui) ADP, pagamintas heksokinazės, buvo sunkiau prieinamas egzogeninei piruvatkinazei [15]. Be to, buvo parodyta, kad esant gliukozei ir ATP heksokinazė inhibuoja nuo Bax-priklausomą citochromo c paleidimą per VDAC-ANT kompleksą [73]. Tai buvo paaiškinta heksokinazės ir VDAC, kuris yra pagrindinis Bax taikiny, sąveikos stabilumu. Be to, heksokinazė inhibavo nuo Ca^{2+} -priklausomą nespecifinio pralaidumo poros (PTP) atsidarymą [74].

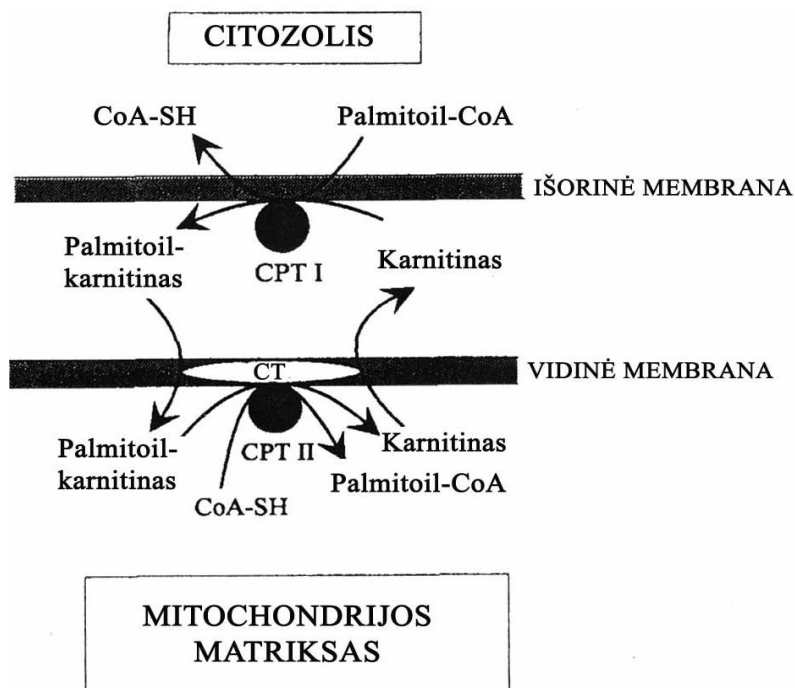
Darbuose su izoliuotomis žiurkės kepenų mitochondrijomis [75, 76] parodyta, kad mitochondrijos brinksta izotoninėje KCl terpėje, tačiau nebrinksta sacharozinėje terpėje. Mitochondrijų struktūra ir funkcijos yra susijusios; išbrinkusioms mitochondrijoms dėl atsidariusios nespecifinio pralaidumo poros yra būdingas sąveikos tarp oksidacijos ir fosforilinimo susilpnėjimas [77]. Nežymiai padidėjus matrikso tūriui, padidėja riebalų rūgščių ir kitų substratų oksidacijos greitis [78]; hiperosmosinis susitraukimas yra lydimas kvėpavimo inhibicijos [79]. Matyt, inkubavimo terpės joninė jėga yra svarbus faktorius dekstrano efektams pasireikšti [75].

Neatmetama, kad dekstras taip pat įtakoja membranų paviršiaus sąveikas ir specifiską citochromo c sorbciją–desorbciją prie/nuo mitochondrijų membranų, citochromas c yra būtinas išorinio NADH oksidacijai [75]. Tyrinėjant citochromo c išėjimą izoosmosinėje KCl terpėje (300 mosmol/l arba 125 mM KCl) buvo parodyta, kad 5 proc. 40 kDa dekstras žymiai sumažino citochromo c išėjimą iš mitochondrijų dėl to, kad stabilizavo išorinės ir vidinės membranų sąveikas kontaktinėse srityse [76]. Manoma, kad kontaktinės sritys dalyvauja sąveikaujant VDAC ir ANT, tai užtikrina ryšį tarp vidinės ir išorinės membranos [68].

Taigi, atrodo, kad dekstras veikia suspausdamas tarpmembraninę erdvę ir padidindamas kontaktinių sričių (*angl.* contact sites), palankių multifermentinių kompleksų formavimuisi, dažnį. ADP, susidaręs šiuose kompleksuose, gali lengvai prieiti prie adeninnukleotidų nešiklio, tačiau ADP, susidaręs šių kompleksų išorėje, yra atskirtas difuzijos barjeru. Sukaupiti eksperimentiniai duomenys rodo, kad minėti baltymai heksokinazė ir kreatinkinazė yra nespecifinio pralaidumo poros komponentai ir jie dalyvauja apoptotinio signalo citochromo c paleidimo mechanizme [80].

3.6. Riebalų rūgščių oksidacija ir jos kontrolė

Riebalų rūgštys, gautos lipolizės metu iš trigliceridų, kraujyje pernešamos surištos su albuminu. Audiniuose jos panaudojamos dalyvaujant transportiniams baltymams, esantiems plazminėje membranoje [81]. Ląstelėje laisvos riebalų rūgštys yra surištos su baltymais, dideliais kiekiais esančiais citozolyje [82]. Priklausomai nuo audinio tipo bei jo metabolinių poreikių riebalų rūgštys yra arba įjungiamos į trigliceridus bei membranų fosfolipidus, arba oksiduojamos mitochondrijose energijai gauti. Kad galėtų būti oksiduojamos mitochondrijų matrikse, jos turi pereiti per abi mitochondrijų membranas. Taigi, pirmiausiai riebalų rūgštys citozolyje paverčiamos į acil-CoA, veikiant riebalų rūgščių CoA sintetazei (LCAS), fermentui, kurio gausu mikrosomose ir mitochondrijose [83, 84]. Mitochondrijose LCAS yra asocijuota su išorine mitochondrijų membrana, manoma, kad tai transmembraninis baltymas, kurio aktyvus centras yra citozolio pusėje [85]. Dėl tokios LCAS orientacijos citozolyje padidėja gamyba ilgagrandžių acil-CoA, kuriems išorinė mitochondrijų membrana nėra laisvai pralaidi [49], tačiau jie pereina išorinę membraną per poriną. Toliau fermentas CPT-I, panaudodamas karnitiną, acil-CoA verčia į acilkarnitiną.



6 pav. Riebalų rūgščių pernašos iš citoplazmos į mitochondrijų matriksą schema

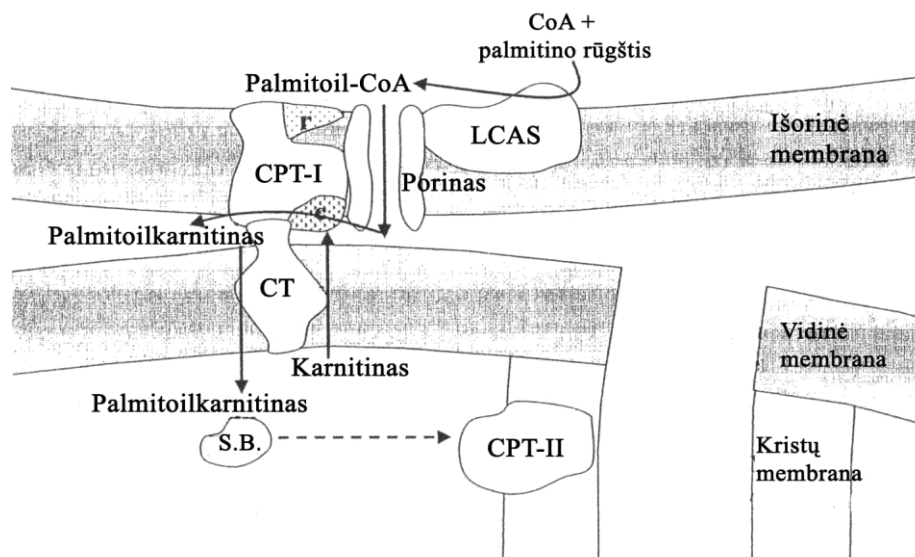
Tarpmembraninėje erdvėje susidaro riebalų rūgščių karnitino esteriai, kurie pernešami (šuntuojami) į mitochondrijas per karnitino/acilkarnitino nešiklio (CACT) sistemą. Šią transporto

sistemą sudaro trys baltymai: karnitino palmitoiltransferazė I (CPT-I), karnitino: acilkarnitino nešiklis (CACT) ir karnitino palmitoiltransferazė II (CPT-II), besiskiriantys lokalizacija mitochondrijose (6 pav). Mitochondrijų matrikse riebalų rūgščių karnitino esteriai vėl verčiami riebalų rūgščių acil-CoA, tada, nuosekliai katalizuojant keturiems fermentams (acil-CoA dehidrogenazei, enoil-CoA hidratazei, 3-hidroksiacyl-CoA dehidrogenazei ir 3-ketoacyl-CoA tiolazei) vyksta β -oksidacija, susidarant acetyl-CoA. Mononesočių riebalų rūgščių oksidacija iš esmės vyksta taip pat, išskyrus tai, kad izomerizuojant dvigubą jungtį dalyvauja specifinis fermentas enoil-CoA izomerazė. Polinesočių riebalų rūgščių oksidacijai be izomerazės dar būtina NADPH-priklausoma reduktazė.

Trumpagrandės ir vidutinio ilgio grandinės (iki 12 anglies atomų) riebalų rūgštys pereina mitochondrijų membranas nedalyvaujant nuo karnitino priklausomai transporto sistemai ir aktyvuojamos mitochondrijų viduje [86].

Pagal vieną iš transporto modelių (V.A. Zammit grupės) [27, 87] teigiama, kad tiek reguliacinė (prijungianti malonil-CoA), tiek katalitinė CPT-I vietos nukreiptos į citozolį. Šiuo atveju palmitoilkarnitinas susidarytų citoplazminiame kompartmente. Taigi, ilgagrandžiai acilkarnitinai turėtų pereiti išorinę membraną, kad pasiektų CACT. Jiems pereiti yra vienintelis kelias – per išorinės membranos baltymą poriną. Nustatyta, kad porinas yra išorinės membranos baltymas ir reguliuoja šios membranos laidumą jonams ir metabolitams [71, 88]. Parodyta, kad neigiamas matrikso pusės krūvis keičia porino atrankumą anijonams arba katijonams [71]. Tačiau 22 kDa polianijono (specifinio VDAC inhibitoriaus, susidedančio iš stireno, maleato ir metakrilato) nanomolinė koncentracija beveik visiškai nuslopina palmitato (+CoA) ir palmitoil-CoA oksidaciją žiurkės kepenų ir širdies mitochondrijose, tuo tarpu kai piruvato, glutamato ir palmitoilkarnitino oksidacijos neveikia [26]. Šie duomenys prieštarauja idėjai, kad palmitoilkarnitinas susidaro citozoliniame kompartmente. Tai, kad polianijonas keičia porino būseną iš anijonams atrankaus į katijonams atrankų [71], neišsprendžia šio prieštaravimo [49].

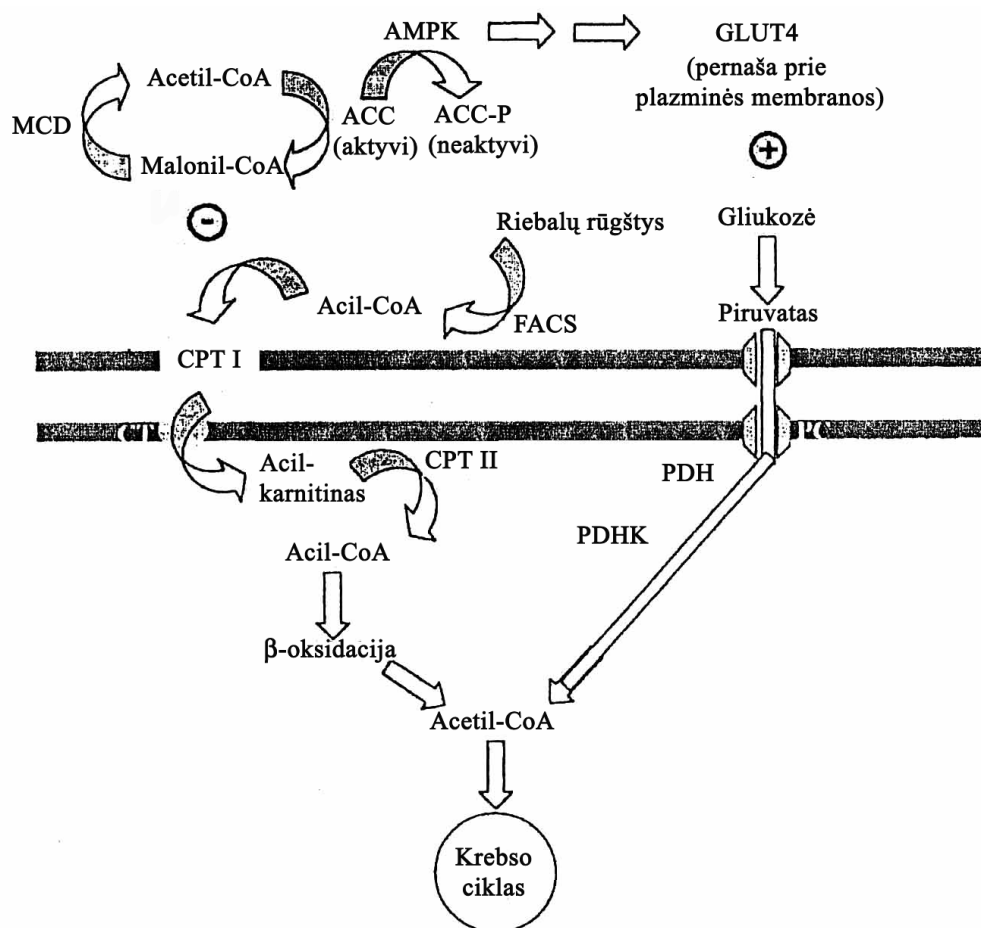
Tolesnės informacijos sintezės pagrindu sukurtas riebalų rūgščių pernašos modelis [49], pagal kurį ilgagrandžiai acil-CoA pereina išorinę membraną per poriną anijonams atrankiu būdu (7 pav). Sutinkamai su šiuo modeliu CPT-I katalitinis centras nukreiptas į tarpmembraninę erdvę. Ilgagrandžiai acil-CoA transportuojami per poriną prie CPT-I katalitinio centro. Reguliacinis CPT-I centras nukreiptas į citozolį; CPT-I jautrumą malonil-CoA ženkliai padidina vidinės membranos komponentas kardiolipinas [89]. Pagal šį modelį perneštas ilgagrandis acilkarnitinas matrikse susiriša su matrikso baltymu ir perduodamas CPT-II, kuris, manoma, yra kristų membranoje. Šio modelio ypatumas yra tas, kad porinas arba CPT-I kontaktinėse vietose gali būti citoskeleto baltymų surišimo vietomis (*angl.* docking site) [49]. Tada vyksta aktyvuotų riebalų rūgščių oksidacija mitochondrijų matrikse [49].



7 pav. Riebalų rūgščių pernašos modelis. CPT-I reguliacinė sritis (r) nukreipta į citozolį, katalitinė sritis (c) nukreipta į tarpmembraninę erdvę, S.B.–palmitoilkarnitiną surišantis matrikso baltymas; kitos santrumpos pateiktos santrumpų puslapyje.

Normaliomis fiziologinėmis sąlygomis vyksta riebalų rūgščių judėjimas į mitochondrijų matriksą. Tačiau CT ir CPT-II/CT sistema gali veikti ir tam tikromis sąlygomis veikia priešinga kryptimi, t.y. pašalindama iš matrikso aktyvuotus trumpos, vidutinės ir ilgos grandinės acilus. Tai buvo parodyta tiek su izoliuotomis mitochondrijomis, imituojančiomis išemines sąlygas [90, 91], tiek su fibroblastų ir limfocitų iš pacientų su mitochondrinės riebalų rūgščių oksidacijos trūkumais, kultūromis [92, 93].

Nustatyta, kad malonil-CoA reguliuoja riebalų rūgščių oksidaciją, inhibuodamas CPT-I, taigi, reguliuojama riebalų rūgščių pernaša į mitochondrijas (8 pav.). CPT-I/malonil-CoA sistema įjungia arba išjungia riebalų rūgščių oksidaciją priklausomai nuo audinio poreikių. CPT-I yra svarbiausias fermentas, kontroliuojantis β -oksidaciją. Šis fermentas egzistuoja mažiausiai dvejose izoformose, žymiai besiskiriančiose kinetinėmis ir reguliacinėmis savybėmis [94]. Kepenų izoformai (L-CPT-I) būdingas didesnis giminingumas karnitinui ir mažesnis giminingumas malonil-CoA, priešingai raumenų izoformai (M-CPT-I) [94].



8 pav. Riebalų rūgščių ir gliukozės oksidacijos reguliavimas aerobinėje širdyje. Schematiškai parodytas ACC, AMPK ir MCD vaidmuo reguliuojant riebalų rūgščių ir gliukozės oksidaciją. CT-karnitino nešiklis, PC-piruvato nešiklis, kitos santrumpos pateiktos santrumpų puslapyje.

Malonil-CoA lygį reguliuoja MCD (Malonil-CoA dekarboksilazė) (degradacija) ir ACC (acetil-CoA karboksilazė) (sintezę iš acetil-CoA). Pastarąją fosforilinimo/defosforilinimo būdu kontroliuoja 5'-AMP-aktyvinama proteinkinazė (AMPK) [94]. Aerobinėse sąlygose tiek riebalų rūgštys, tiek gliukozė įneša savo dalį į ATP gamybą [94].

Išeminėje širdyje AMPK yra aktyvinama, ji fosforilina ir tuo būdu inaktyvina ACC, dėl to sumažėja malonil-CoA. Šis nebeinhibuoja CPT 1, todėl riebalų rūgštys gali netrukdomai patekti į mitochondrijas. Iš riebalų rūgščių β -oksidacijos metu pasigaminęs acetil-CoA aktyvina PDHK, kuri fosforilina ir tuo būdu inhibuoja PDH, todėl sumažinama acetil-CoA gamyba iš piruvato, t.y. sumažinama gliukozės oksidacija. Be to, aktyvuota AMPK stimuliuoja gliukozės nešiklį Glut 4, kuris perneša gliukozę per plazminę membraną, taigi, pagreitinama glikolizė. Suintensyvėjus glikolizei kaupiasi laktatas ir protonai [94].

3.6.1. Laisvos riebalų rūgštys veikia kaip skyrikliai

Atskyrimu vadinamas proporcijos tarp oksidacijos ir fosforilinimo procesų sutrikimas. Atskyrimą sukelia tie veiksniai, kurie pažeidžia membranos vientisumą, ir tam tikri cheminiai junginiai, vadinami skyrikliais [86].

Yra žinoma, kad neesterifikuotos (laisvos) riebalų rūgštys veikia kaip skyrikliai [95-98], t.y. cikliška perneša protonus per mitochondrijų vidinę membraną (*angl.* cycling mechanism), tokiu būdu mažėja potencialas abipus vidinės membranos. Taigi, riebalų rūgštys veikia kaip protonoforai. V.Skulačiovas iškėlė hipotezę apie savaiminę protonizuotos riebalų rūgšties formos pernašą (*angl.* spontaneous traslocation) (flip-flop) link matrikso, o anijoninės formos – priešinga kryptimi [95]. Manoma, kad riebalų rūgštis anijoninėje formoje pernešama per keletą vidinės membranos baltymų, tokių kaip ADP/ATP antiporteris [97, 99, 100] bei atskiriančiuosius baltymus (UCP). Neseni darbai aiškinantis riebalų rūgščių poveikio mechanizmą parodė, kad riebalų rūgščių sukeltame atskyrimo be to dalyvauja tokie anijonų nešikliai, kaip glutamato/aspartato antiporteris [101] ir dikarboksilatų nešiklis [95, 96]. Tikėtina, kad ir kiti iki šiol nežinomi baltymai gali dalyvauti riebalų rūgščių tarpininkaujamoje protonų pernašoje per vidinę membraną [102]. Tolimesnių tyrimų rezultatai [102] parodė, kad riebalų rūgštys protonus gali pernešti ir priešinga kryptimi, t.y. iš matrikso pusės į išorę per vidinę membraną. Taigi, riebalų rūgštys gali cikliška pernešti protonus abiejomis kryptimis. Tokia išvada buvo padaryta tiriant mitochondrijų, suspenduotų kalio acetato terpėje, papildytoje valinomicinu, brinkimą [102]. Be to, remiantis eksperimentinių tyrimų rezultatais, manoma, kad riebalų rūgštys kaip riebalų rūgščių kompleksai arba muilai gali transportuoti ir kitus vienvalečius jonus, pvz. K^+ [102].

Laisvos riebalų rūgštys gali inicijuoti nespecifinį pralaidumą, net nesant egzogeninio Ca^{2+} ir terpėje be fosfatų [102]. Tam tikromis sąlygomis neesterifikuotos ilgagrandės riebalų rūgštys skatina neatrankų (neselektyvų) mitochondrinį laidumą atidarant ciklosporinui A jautrią [103] arba ciklosporinui A nejautrią [104] nespecifinio pralaidumo porą. Šis procesas koreliuoja su padidėjusiu vidinės mitochondrijų membranos laidumu ir citochromo c išėjimu iš mitochondrijų [105].

4. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Tirti riebalų rūgščių oksidacijos vaidmenį reguliuojant oksidacinį fosforilinimą žiurkės širdies raumens skaidulose.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti įvairios struktūros (besiskiriančių pagal grandinės ilgį ir sotumo laipsnį, aktyvuotų ir neaktyvuotų) riebalų rūgščių vaidmenį reguliuojant oksidacinį fosforilinimą saponinu apdorotose žiurkės širdies raumens skaidulose.
2. Nustatyti, ar saponinu apdorotose žiurkės širdies raumens skaidulose esančių mitochondrijų tariamosios oksidacinio fosforilinimo K_m adenino nukleotidams sumažėjimas vykstant palmitoil-L-karnitino oksidacijai priklauso nuo adenino nukleotidų patekimo į mitochondrijas kelio.
3. Naudojant egzogeninę ADP-suvartojančią piruvato kinazės ir fosfoenolpiruvato sistemą įvertinti, ar oksiduojantis riebalų rūgštims kinta išorinės mitochondrijų membranos laidumas ADP-ui.
4. Tirti, ar riebalų rūgščių oksidacija veikia funkcinę sąveiką tarp kreatino kinazės ir ADP/ATP nešiklio.
5. Nustatyti riebalų rūgščių oksidacijos poveikį saponinu apdorotose širdies raumens skaidulose esančių mitochondrijų morfologijai bei įvertinti onkotinio slėgio imitavimui *in vitro* naudojamų makromolekulių (dekstrano T-70) poveikį mitochondrijų *in situ* kvėpavimo parametrams ir morfologijai oksiduojantis skirtingos prigimties substratams.

5. MEDŽIAGOS IR METODAI

5.1. Tirpalai

Mitochondrijų išskyrimo terpė (pH 7,7 su KOH; 2°C): 160 mM KCl, 10 mM NaCl, 20 mM Tris bazė, 5 mM EGTA.

Mitochondrijų suspendavimo terpė (pH 7,3 su KOH; 2°C): 180 mM KCl, 20 mM Tris, 3 mM EGTA.

Skaidulų paruošimo terpė (pH 7,0 su KOH; 2°C): 20 mM imidazolo, 20 mM taurino, 0,5 mM ditioneitolio, 7,1 mM MgCl₂, 50 mM MES, 5 mM ATP, 15 mM kreatinfosfato, 2,62 mM CaK₂EGTA ir 7,38 mM K₂EGTA; tirpalo joninė jėga 160 mM, laisvo Ca²⁺ 0,1 μM, laisvo Mg²⁺ 3 mM.

Mitochondrijų ir skaidulų kvėpavimo matavimo terpė (pH 7,1 su KOH; 20 arba 37°C): 20 mM imidazolo, 20 mM taurino, 0,5 mM ditioneitolio, 1,61 mM MgCl₂, 100 mM MES, 3 mM KH₂PO₄, 2,95 mM CaK₂EGTA ir 7,05 mM K₂EGTA; tirpalo joninė jėga 160 mM, laisvo Ca²⁺ 0,1 μM, laisvo Mg²⁺ 1 mM. Prieš pat eksperimentą į terpę pridedamas reikiamas kiekis jaučio serumo albumino (JSA; 2 mg/ml) ir patikslinamas terpės pH.

Skaidulų paruošimo bei mitochondrijų ir skaidulų kvėpavimo matavimo terpės sudarytos remiantis žiniomis apie raumens ląstelės citozolio joninę sudėtį.

Saponino tirpalas: 2,5 mg saponino ištirpinama 1 ml bidestiliuoto H₂O.

ADP tirpalas: reikiamos koncentracijos ADP tirpalas papildomas MgCl₂ (laisvo Mg²⁺ 0,35 mol/1 mol ADP).

5.2. Reagentai

Eksperimentuose naudoti šių firmų reagentai:

„SIGMA“: 99 proc. grynumo Tris-(hidroksi-metil) amino metanas (Tris), imidazolas, taurinas, DL-ditioneitolas, 2-[N-morfolin]-etansulfonio rūgštis (MES), adenzin-5'-trifosfato dinatrio druska (ATP), gintaro rūgšties dinatrio druska (sukcinatas), D-(+)-gliukozė; 98 proc. grynumo adenzin-5'-difosfato natrio druska (ADP); 97 proc. grynumo etilenglikol-bis-β-amino-

etileterio)-N,N,N',N'-tetraacto rūgštis (EGTA), citochromas *c* iš arklio širdies; 96–99 proc. grynumo jaučio serumo albuminas F-V; 95 proc. grynumo deoksicholio rūgšties natrio druska, okadainės rūgšties kalio druska; 90 proc. grynumo rotenonas; kalio šarmas (KOH), atraktilozido dikalio druska, saponinas iš *Gypsophila* (sapogenino kiekis 17+%), IV tipo kolagenazė, V tipo heksokinazė iš kepmo mielių, palmitoil-L-karnitino chloridas.

„MERCK“: 99 proc. grynumo piruvo rūgšties natrio druska (piruvatas); 98 proc. grynumo kreatinfosfato dinatrio druska; kalio chloridas (KCl), natrio chloridas (NaCl).

„РЕАХИМ“: 99 proc. grynumo kalcio karbonatas (CaCO_3); 91 proc. grynumo magnio chlorido heksahidratas ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$).

„SERVA“: 99 proc. grynumo kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4); 95 proc. grynumo palmitoil-KoA kalio druska; L-obuolių rūgšties natrio druska (malatas).

„LOBA CHEMIE“: kreatinas.

„FLUKA“: 99 proc. grynumo L-karnitinas.

„AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB“: dekstranas T-70.

5.3. Mitochondrijų išskyrimas

Mitochondrijos išskiriamos diferencinio centrifugavimo metodu. Išskyrimo procedūra atliekama šaltoje kameroje 0–4°C temperatūroje (leidimas atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais Nr. 0006). Wistar veislės žiurkė be narkozės užmušama smūgiu į pakaušį, nutraukiami stuburo nervai ir, prakirpus krūtinės ląstą, išimama širdis. Išimta širdis praplaunama atšaldytu 0,9 proc. KCl tirpalu. Nuo kraujo išplauta širdis perkerpama nuo aortos iki širdies viršūnės ir perkeliama į indą su švairiu atšaldytu 0,9 proc. KCl tirpalu. Atšaldyta širdis nusausinama filtriniu popieriumi, nukarpomi riebalai, širdis pasverama ir susmulkinama žirkutėmis ant ledo laikomoje Petri lėkštelėje. Sukarpytas širdies raumuo praplaunamas išskyrimo terpe, perkeliamas į stiklo-teflono homogenizatorių ir užpilamas išskyrimo terpe (10 ml/g audinio). Homogenizuojama 35 s. Po to homogenatas po lygiai išpilstomas į centrifuginius mėgintuvėlius ir 5 min centrifuguojamas esant 750×g. Gautas supernatantas perkošiamas į kitus centrifuginius mėgintuvėlius per dvigubą marlę, nenupilant nuosėdų, ir centrifuguojamas 10 min esant 6750×g. Supernatantas nupilamas, o nusėdusios mitochondrijos praplaunamos suspendavimo terpe ir joje suspenduojamos. Po suspendavimo visų mėgintuvėlių turinys supilamas į vieną mėgintuvėlį ir išmaišomas (galutinė mitochondrijų koncentracija 50–60 mg baltymo/ml terpės). Gauta mitochondrijų suspensija laikoma uždengtime centrifuginiame mėgintuvėlyje leduose viso eksperimento metu.

5.4. Mitochondrijų baltymo kiekio nustatymas

Baltymo kiekis mitochondrijų suspensijoje nustatomas biureto metodu. Į 0,05 ml mitochondrijų suspensijos įpilama 0,95 ml 0,33 proc. deoksicholato tirpalo, gerai sumaišoma, įpilama 4 ml biureto reagento, sumaišoma ir laikoma vandeniniame termostate 37°C temperatūroje 20 min. Po to tirpalo optinis tankis išmatuojamas fotometru ties 536 nm ilgio banga. Baltymo kiekis nustatomas pagal kalibracinę kreivę, kuriai sudaryti naudojamas standartinis baltymo tirpalas, pagamintas iš žmogaus serumo albumino.

5.5. Širdies raumens skaidulų paruošimas

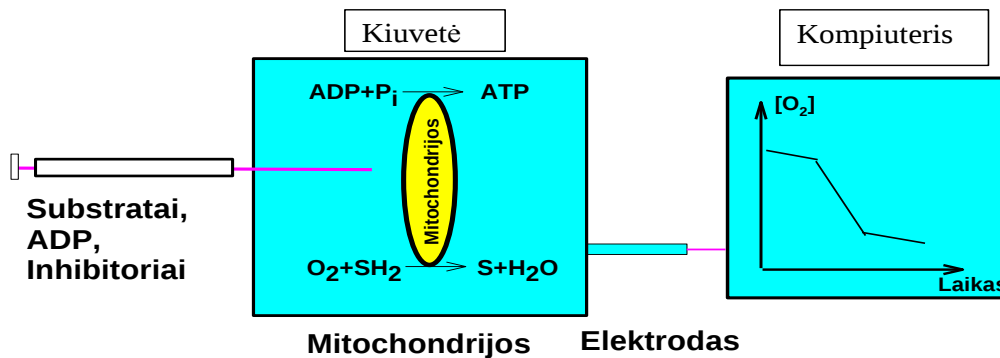
Paruošimas atliekamas šaltoje kameroje (0–4°C temperatūroje). Iš užmuštos Wistar veislės žiurkės išimta širdis praplaunama atšaldytu 0,9 proc. KCl tirpalu. Nuo kraujo išplauta širdis perkerpama išilgai – nuo aortos iki širdies viršūnės, ir perkeliama į indą su švariu atšaldytu 0,9 proc. KCl tirpalu. Atšaldyta širdis dedama į ant ledu laikomą Petri lėkštelę su keletu mililitrų šalto KCl tirpalo. Iš širdies iškerpami papiliarinių ir skilvelio raumenų gabalėliai, kurie laikomi leduose esančiame indelyje su paruošimo terpe. Į ant ledu laikomą Petri lėkštelę įpilami keli mililitrai paruošimo terpės ir įdedamas raumens gabalėlis, kuris adatėlėmis išskirstomas į 0,3–0,4 mm skersmens skaidulų pluoštelius. Skaidulų pluošteliai sudedami į 1,5 ml tūrio Eppendorf mėgintuvėlį su 0,98 ml skaidulų paruošimo terpės. Procedūra kartojama, kol pasiruošiamas reikiamas skaidulų kiekis.

Saponinu apdorotų skaidulų paruošimas. Į 1,5 ml tūrio Eppendorf mėgintuvėlį su 0,98 ml paruošimo terpės ir skaidulomis pridedama 0,2 ml saponino tirpalo (galutinė saponino koncentracija 50 µg/ml) ir laikoma 30 min purtant horizontalioje padėtyje 120 kartų per minutę 2 cm žingsniu. Po to skaidulos perkeliamos į mėgintuvėlį su 1 ml skaidulų kvėpavimo matavimo terpės (be saponino) ir purtomos 10 min. Praėjus šiam laikui skaidulos perkeliamos į kitą mėgintuvėlį su 1 ml matavimo terpės, joje praskalaujamos ir vėl perkeliamos į kitą, leduose esantį, Eppendorf mėgintuvėlį su 1 ml matavimo terpės, kuriame laikomos viso eksperimento metu.

Kolagenaze ir saponinu apdorotų skaidulų paruošimas. Išskirstytos skaidulos perkeliamos į Eppendorf mėgintuvėlį su 1 ml paruošimo terpės, kurioje be 50 µg/ml saponino ištirpinta ir 3 mg kolagenazės. Toliau viskas atliekama taip, kaip ruošiant saponinu apdorotas skaidulas.

5.6. Mitochondrijų ir skaidulų kvėpavimo registravimas

Mitochondrijų ir širdies raumens skaidulų kvėpavimas užrašytas oksimetriniu metodu termostatuojamoje (20°C arba 37°C) stiklinėje kiuvetėje su sienelėje įtaisytu Clark tipo deguonies elektrodu, stipriai maišant magnetine maišykle. Grafiškai pavaizduota oksimetrinio tyrimo schema (9 pav.).



9 pav. Oksimetrinio tyrimo schema.

Iš oksimetrinių kreivių apskaičiuojamas deguonies sunaudojimo greitis įvairiose mitochondrijų metabolinėse būsenose. Jis išreiškiamas nanomoliais deguonies (nmolO) per minutę 1 mg mitochondrijų baltymo arba sausų skaidulų svorio. Sausų skaidulų svoris gautas dalinant drėgnų skaidulų svorį (prieš kvėpavimo matavimą) iš koeficiento 4,85 (koeficientas nustatytas eksperimentiškai; n = 3) [39]. Laikyta, kad 1 ml kvėpavimo matavimo terpės su 2 mg/ml JSA 20°C temperatūroje yra 463 nmolO, o 37°C temperatūroje – 422 nmolO. Apskaičiuota, kad 1 ml kvėpavimo matavimo terpės su 100 mg/ml JSA 37°C temperatūroje yra 401 nmolO (n = 5), o terpėje su 200 mg/ml JSA – 367 nmolO (n = 3).

Eksperimentuose naudojant dekstraną T-70, skaidulų matavimo terpė be JSA dar buvo papildoma 5 arba 10 proc. dekstranu.

5.7. Izoliuotų mitochondrijų brinkimo matavimas

Kvėpuojančių mitochondrijų brinkimas buvo įvertinamas spektrofotometru HELIOS α pagal šviesos sugerties sumažėjimą ties 540 nm ilgio banga naudojant įvairias substrato palmitoil-L-karnitino koncentracijas.

5.8. Skaidulų paruošimas elektroninei mikroskopijai

Saponinu paveiktos skaidulos inkubuotos 5 min kvėpavimo matavimo terpėje esant 37°C temperatūrai stipriai maišant magnetine maišykle su piruvatu ir malatu (po 6 mM kiekvieno)(kontrolė) arba su palmitoil-L-karnitinu 9 μ M arba su palmitoil-L-karnitinu 9 μ M + 5 proc. dekstrano. Tada skaidulos perkeltos į 2,5 proc. glutaraldehido tirpalą 0,1 M kakodilato buferyje (pH 7,4) ir jame švelniai purtytos 5 min (esant kambario temperatūrai). Skaidulos paliktos nakčiai tame pačiame tirpale esant 4°C temperatūrai. Po to jos keletą kartų praplautos kakodilato buferyje ir paliktos 1 h 1% osmio tetraoksido tirpale tame pačiame buferyje esant 4°C temperatūrai. Po šio papildomo grūdinimo skaidulos dehidratuotos palaipsniui didėjančios alkoholio koncentracijos tirpaluose ir acetone bei užlietos Epon 812 ir Araldite mišiniu. Bandinių pjūviai nudažyti uranilo acetatu ir švino citratu, ir tirti PHILIPS EM300 elektroniniu mikroskopu, naudojant AGFA firmos plokšteles, Kauno medicinos universiteto Anatomijos institute, padedant prof. Neringai Paužienei.

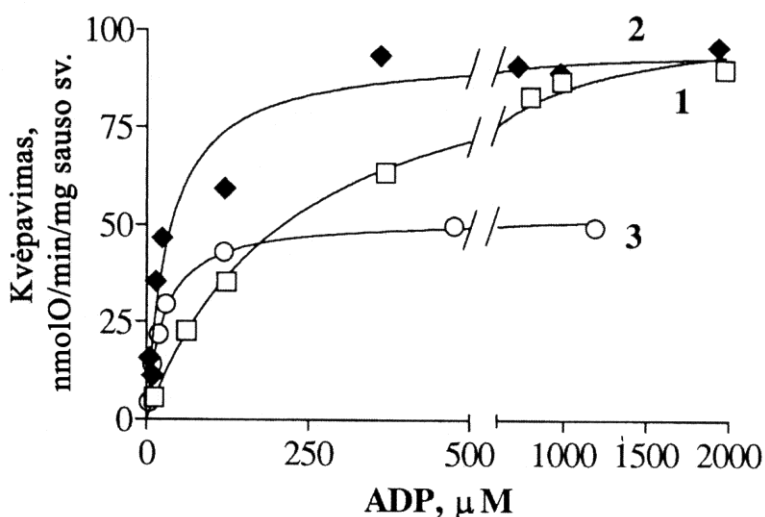
5.9. Statistinis duomenų įvertinimas

Rezultatų vidurkiai pateikiami su jų vidutinėmis kvadratinėmis paklaidomis. Skirtumai tarp vidurkių įvertinti Student *t* testu poriniams arba neporiniams bandymams. Trijų ir daugiau grupių duomenys palyginti dispersine analize (ANOVA). Duomenys statistiškai įvertinti ir netiesinė regresija atlikta naudojant GraphPad Prism 2.01 programą. Skirtumai tarp vidurkių patikimi, jei $p < 0,05$.

6. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

6.1. Riebalų rūgščių oksidacijos įtaka mitochondrijų kvėpavimo reguliavimui *in situ*

Anksčiau kitų autorių gauti rezultatai [4] rodo, jog saponinu apdorotų skaidulų tariamosios K_m^{ADP} reikšmės oksiduojant skirtingo grandinės ilgio sočiąsias riebalų rūgštis (palmitoil-L-karnitiną ir oktanoil-L-karnitiną) esant 37°C yra labai mažos $36 \pm 8 \mu M$ ir $66 \pm 13 \mu M$, atitinkamai, lyginant su tariamąja K_m^{ADP} reikšme $246 \pm 33 \mu M$, būdinga neriebalinės kilmės substratui piruvatui+malatui (10 pav.). Remiantis šiais duomenimis buvo iškelta prielaida, kad riebalų rūgščių oksidacija (tiek mišinyje su piruvatu+malatu, tiek vien riebalų rūgšties) padidina išorinės mitochondrijų membranos laidumą ADP-ui [4]. Buvo manoma, kad tai gali būti susiję su mitochondrijų brinkimu – mitochondrijų morfologiniais pokyčiais. 10 pav. iliustruoja saponinu apdorotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo greičio priklausomybę nuo pridėto ADP koncentracijos naudojant tiek neriebalinės, tiek riebalinės kilmės kvėpavimo substratus.



10 pav. Mitochondrijų kvėpavimo greičio priklausomybė nuo pridėto ADP koncentracijos [4].

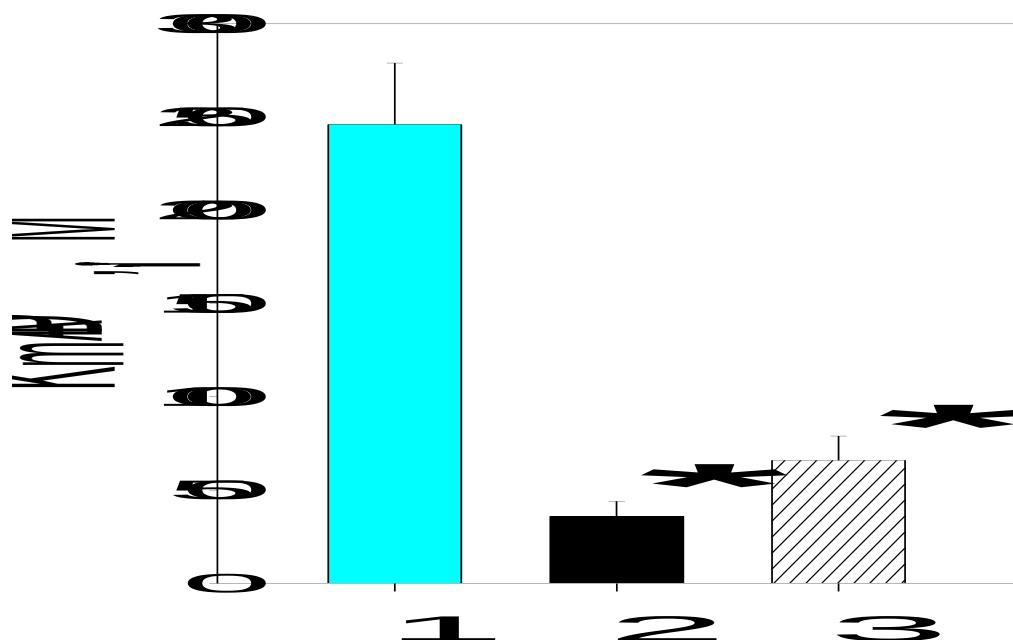
1 – piruvatas+malatas (6 mM+6 mM), n = 5

2 – piruvatas+malatas+oktanoil-L-karnitinas (6 mM+6 mM+0,1 mM), n = 3

3 – palmitoil-L-karnitinas + malatas (9 μM +0,24 mM), n = 5.

Matyti, kad maksimalus kvėpavimo greitis, oksiduojantis tiek palmitoil-L-karnitinui, tiek oktanoil-L-karnitinui, pasiekiamas esant žymiai mažesnėms ADP koncentracijoms, nei

oksiduojantis piruvatui + malatui. K_m^{ADP} reikšmės, gautos titruojant ADP-u, kai buvo oksiduojami skirtingi kvėpavimo substratai, pateiktos 11 pav.



11 pav. Įvairaus grandinės ilgio riebalų rūgščių poveikis saponinu apdorotų žiurkės širdies raumens skaidulų oksidacinio fosforilavimo sistemos giminingumui ADP (tariamajai K_m^{ADP}). Matavimų temperatūra 37°C.

1 – piruvatas +malatas (6 mM + 6 mM), n = 5;

2 – palmitoil-L-karnitinas + malatas (9 μ M + 0,24 mM), n = 5;

3 – oktanoil-L-karnitinas + malatas (0,36 mM + 0,24 mM), n = 5;

*p < 0,05 lyginant su tariamąja K_m^{ADP} su piruvatu+malatu. Duomenys palyginti Dunett kriterijumi.

1 lent. pateikti mitochondrijų kvėpavimo parametrai saponinu permeabilizuotose skaidulose, oksiduojantis tiek riebalinės, tiek neriebalinės kilmės substratams. Kvėpavimo kontrolės koeficientas visais atvejais buvo panašaus dydžio ($3,64 \pm 0,9$ oksiduojant palmitoil-L-karnitiną; $3,40 \pm 0,2$, oksiduojant oktanoil-L-karnitiną ir $3,45 \pm 0,3$, oksiduojant piruvatą+malatą) (1 lent.). Mitochondrijų kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje (V_o), oksiduojant riebalų rūgštis, nežymiai skyrėsi nuo V_o , būdingo piruvatui + malatui. Citochromo c efektas po citochromo c pridėjimo į terpę trečioje mitochondrijų metabolinėje būsenoje taip pat buvo vienodas visais atvejais (kvėpavimo stimuliacija 1,1 karto). Tai rodo, jog riebalų rūgštys esamomis sąlygomis nepasižymėjo detergentinėmis savybėmis ir nesukėlė nei vidinės, nei išorinės mitochondrijų membranos pažeidimo. Taigi, galima manyti, kad mažą K_m^{ADP} reikšmę nulemia ne išorinės mitochondrijų

membranos laidumo padidėjimas, bet kiti veiksniai. Įdomu pažymėti ir tai, kad ir oksiduojant nesočią riebalų rūgštį oleoil-CoA (+L-karnitinas), gauta taip pat maža K_m^{ADP} reikšmė $55,7 \pm 5 \mu M$ ($n = 3$) lyginant su K_m^{ADP} reikšme, gauta oksiduojantis piruvatui + malatui (žiūr. 13 pav.).

1 lentelė. Saponinu permeabilizuotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo parametrai oksiduojant įvairius substratus.

Substratai	n	V_o	V_{ADP}	$V_{ADP+citc}/V_{ADP}$	$V_{atr+citc}/V_{atr}$	V_{ADP}/V_o
Piruvatas + malatas [6 + 6 mM]	5	35 ± 3	126 ± 17	$1,1 \pm 0,0$	$1,24 \pm 0,1$	$3,45 \pm 0,3$
Palmitoil-L-karnitinas + malatas [9 μM + 0,24 mM]	5	24 ± 2	75 ± 11	$1,1 \pm 0,1$	$1,32 \pm 0,2$	$3,64 \pm 0,9$
Oktanoil-L-karnitinas + malatas [0,36 mM + 0,24 mM]	5	44 ± 1	144 ± 7	$1,1 \pm 0,0$	$1,22 \pm 0,1$	$3,40 \pm 0,2$

V_o - kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje (nesant ADP); V_{ADP} - kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje (esant 1 mM ADP); $V_{ADP+citc}/V_{ADP}$, $V_{atr+citc}/V_{atr}$ - citochromo efektas (kartais) po citochromo c (30 μM) pridėjimo; V_{ADP}/V_o - kvėpavimo kontrolės koeficientas. Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio.

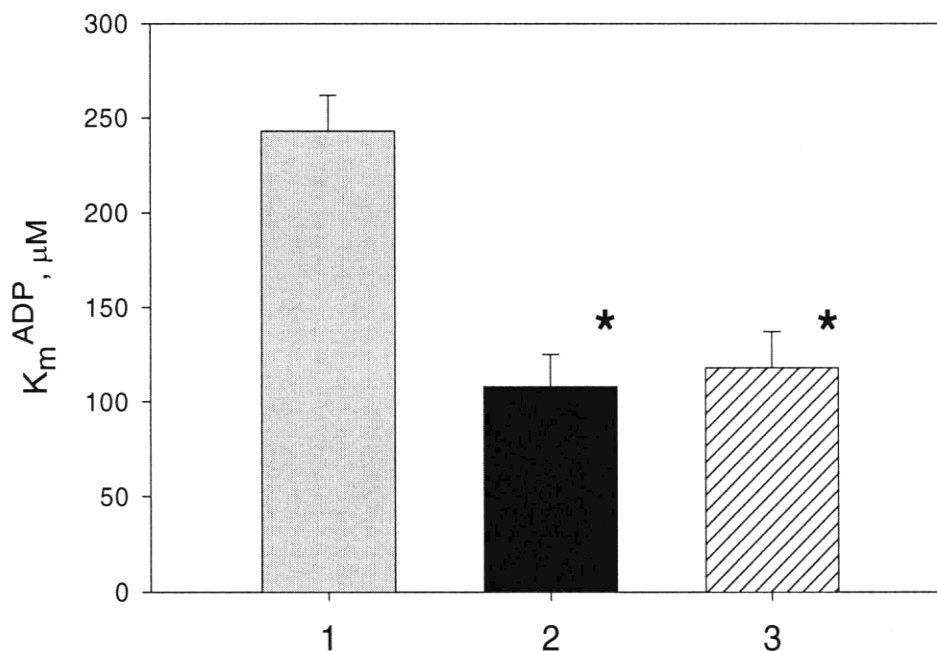
6.1.1. Riebalų rūgščių koncentracijos įtaka oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumui ADP

Paaiškėjus, kad riebalų rūgščių oksidacija žymiai keičia, t.y. mažina tar. K_m^{ADP} , įdomu buvo nustatyti, ar taip pat veikia ir mažos riebalų rūgščių koncentracijos mišinys su piruvatu + malatu, t.y. buvo oksiduojamas substratų mišinys, kaip esti sąlygose *in vitro*. Taigi, šioje eksperimentų serijoje buvo tirta K_m^{ADP} reikšmės priklausomybė nuo riebalų rūgščių koncentracijos. Eksperimentai atlikti, naudojant šiuos substratus:

- (1) piruvatas+malatas (6+6 mM),
- (2) 2,2 μM palmitoil-L-karnitino+piruvatas+malatas (6+6 mM),
- (3) 9 μM palmitoil-L-karnitino+piruvatas+malatas (6+6 mM).

Abiems atvejais, tiek esant mažesnei, tiek ir didesnei palmitoil-L-karnitino koncentracijai, tariamoji K_m^{ADP} reikšmė sumažėjo apie 2 kartus ($108 \pm 17 \mu M$, $n = 7$ ir $118 \pm 19 \mu M$, $n = 3$) lyginant su tariamąja K_m^{ADP} , nustatyta piruvato+malato oksidacijos metu ($243 \pm 19 \mu M$, $n = 5$) (12 pav.). Patikimi skirtumai ($p < 0,05$) tarp tar. K_m^{ADP} reikšmių gauti abiem atvejais, t.y. kai buvo

oksiduojamas substratų mišinys tiek su 9 μM palmitoil-L-karnitino, tiek su 2 μM palmitoil-L-karnitino.



12 pav. Tariamasis K_m^{ADP} priklausomybė nuo riebalų rūgščių koncentracijos.

1 – piruvatas+malatas (6 mM+6 mM), n = 5;

2 – palmitoil-L-karnitinas+malatas (9 μM +0,24 mM)+piruvatas+malatas (6 mM+6 mM), n = 7;

3 – palmitoil-L-karnitinas+malatas (2,2 μM +0,24 mM)+piruvatas+malatas, n = 3.

Matavimų temperatūra 37°C. *p < 0,05 su kontrole (tariamoji K_m^{ADP} reikšmė oksiduojant piruvatą+malatą). Duomenys palyginti dispersinės analizės Dunett kriterijumi.

Rezultatai rodo, jog oksidacinio fosforilavimo sistemos giminingumas ADP-ui padidėjo vienodu laipsniu, nepriklausomai nuo riebalų rūgščių koncentracijos, naudotos mūsų eksperimentuose. Taigi, žymų mitochondrijų oksidacinio fosforilavimo sistemos giminingumo ADP-ui padidėjimą lemia net labai mažos riebalų rūgščių koncentracijos (užtenka 2,2 μM palmitoil-L-karnitino).

Mitochondrijų kvėpavimo parametrai, oksiduojant substratų mišinį palmitoil-L-karnitinas (2,2 μM arba 9 μM)+piruvatas+malatas (6+6 mM) lyginant su piruvato+malato oksidacija, pateikti 2 lent. Iš pateiktų duomenų matyti, kad oksiduojant palmitoil-L-karnitiną (+piruvatas+malatas), mitochondrijų kvėpavimo parametrai išliko panašaus dydžio, kaip oksiduojant vien piruvatą+malatą. Taigi, buvo oksiduojamas substratų mišinys, kaip esti ir sąlygose *in vivo*, ir net maža riebalų rūgščių koncentracija (2 - 9 μM) substratų mišinyje nulėmė žymų tar. K_m^{ADP} reikšmės sumažėjimą.

Egzogeninio citochromo c pridėjimas į terpę kvėpavimo greičio trečioje metabolinėje būsenoje nepadidino (2 lent.). Tai rodo, kad esant terpėje riebalų rūgštims mitochondrijų išorinė membrana išlieka intaktiška ir tariamosios K_m^{ADP} sumažėjimas nėra susijęs su išorinės membranos pažeidimu, tačiau šio reiškinio mechanizmas kol kas neišskus. Toliau tiriant tiriant riebalų rūgščių oksidacijos poveikio mitochondrijų išorinės membranos laidumui būtų vertinga nustatyti, ar jo nedidina ypač mažos (apie 0,5 μ M) riebalų rūgščių koncentracijos.

2 lentelė. Saponinu permeabilizuotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo parametrai oksiduojant įvairius substratus: tariamosios K_m^{ADP} priklausomybė nuo riebalų rūgščių koncentracijos.

Substratai	n	V_o	V_{ADP}	$V_{ADP+citc}/V_{ADP}$	V_{ADP}/V_o
Piruvatas+malatas [6+6 mM]	5	29 ± 1	92 ± 8	1,0 ± 0,03	3,40 ± 0,6
Piruvatas+malatas+ palmitoil-L-karnitinas [6+6 mM+9 μ M]	7	35 ± 3	110 ± 7	1,0 ± 0,02	3,40 ± 0,2
Piruvatas+malatas+ palmitoil-L-karnitinas [6+6 mM+2,2 μ M]	3	30 ± 2	101 ± 7	1,0 ± 0,03	3,60 ± 0,5

V_o - kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje (nesant ADP); V_{ADP} - kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje (esant 1 mM ADP); $V_{ADP+citc}/V_{ADP}$ - citochromo efektas (kartais) po citochromo c (30 μ M) pridėjimo; V_{ADP}/V_o - kvėpavimo kontrolės koeficientas. Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio.

6.1.2. Įvairios cheminės struktūros riebalų rūgščių oksidacijos įtaka širdies mitochondrijų kvėpavimo reguliavimui

Mūsų darbo tikslas buvo palyginti, kokią įtaką mitochondrijų *in situ* kvėpavimui turi įvairių riebalų rūgščių, besiskiriančių grandinės ilgiu, sočiųjų ir nesočiųjų, aktyvuotų (palmitoil-CoA) ir neaktyvuotų (palmitoil-L-karnitinas), oksidacija. Ankstesni mūsų laboratorijoje atlikti darbai [4], tyrinėjant riebalų rūgščių oksidaciją, parodė, kad aktyvuotų riebalų rūgščių (palmitoil-CoA, palmitoil-L-karnitino, oktanoil-L-karnitino) oksidacija žymiai, tačiau panašiu laipsniu sumažina K_m^{ADP} , lyginant su piruvato+malato oksidacija. Buvo padaryta prielaida, kad riebalų rūgščių oksidacijos išdavoje taip pasikeičia mitochondrijų savybės, kad porinas tampa labiau pralaidus ADP.

Mitochondrijų kvėpavimo substratais tolimesniame tyrime naudojome arba nesočiąją riebalų rūgštį oleoil-CoA (+L-karnitiną), arba vidutinio ilgio grandinės sočiąją neaktyvuotą dekanoinę

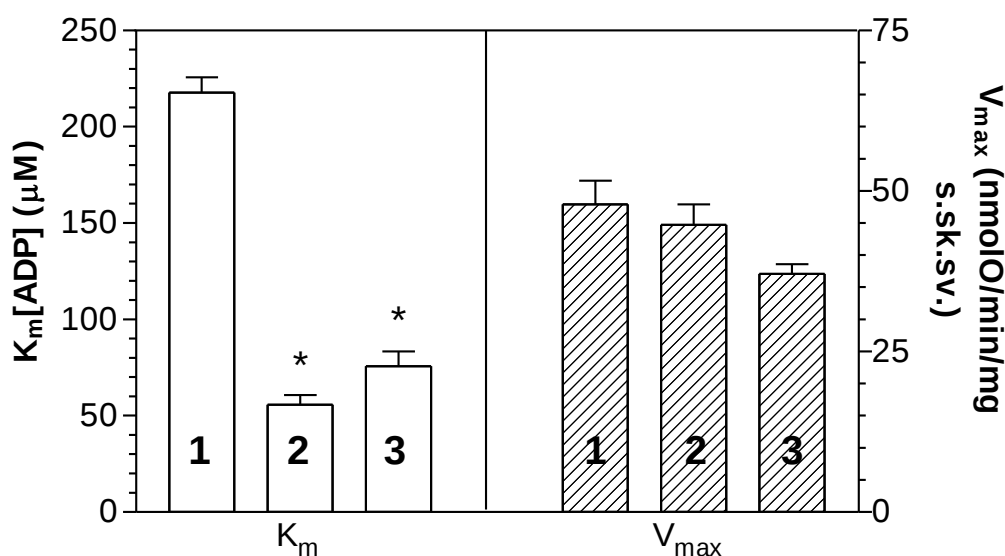
rūgštį (mišinys su piruvatu+malatu) bei kontrolei piruvatą+malatą (matavimai atlikti esant 37°C temperatūrai). Saponinu permeabilizuotų skaidulų kvėpavimo parametrai, naudojant šiuos substratus, pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Saponinu permeabilizuotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo parametrai oksiduojant skirtingus substratus (kontrolė piruvatas+malatas).

	Piruvatas+malatas (6 + 6 mM)	Oleoil-CoA+ L-karnitinas+malatas (6 μM+2,5 mM+0,24 mM)	Dekanoinė rūgštis piruvatas+malatas 0,3 mM+ (6+6 mM)
V_o	26,18 ± 0,2	24,3 ± 0,3	26,06 ± 0,3
V_{ADP}	50,27 ± 4	44,7 ± 3	37,08 ± 3
V_{ADP}/V_{atr}	2,20 ± 0,3	2,26 ± 0,3	1,62 ± 0,2
V_{citc}/V_{ADP}	0,93 ± 0,0	<i>n.n.</i>	0,93 ± 0,0

Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio. n = 3 poriniai eksperimentai; matavimai atlikti esant 37°C temperatūrai.

K_m^{ADP} ir V_{max} reikšmės, gautos su šiais trimis kvėpavimo substratais, grafiškai pavaizduotos 13 pav.



13 pav. Kvėpavimo substratų įtaka tariamajai K_m^{ADP} ir maksimaliam kvėpavimo greičiui V_{max} saponinu permeabilizuotose žiurkės širdies raumens skaidulose.

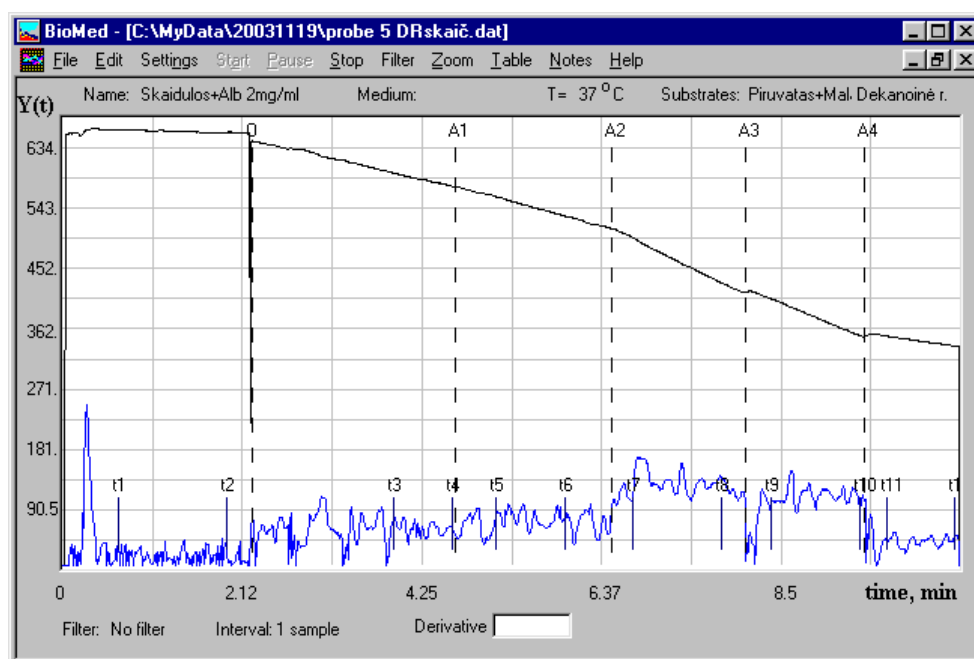
1 – Piruvatas+malatas (6 mM+6 mM), n = 5;

2 – Oleoil-CoA+L-karnitinas+malatas (6 μM+2,5 mM+0,24 mM), n = 3;

3 – Dekanoinė rūgštis + piruvatas+malatas (0,3 mM+6 mM+6 mM), n = 5; *p < 0.05 lyginant su stulpeliu 1. Duomenys palyginti dispersinės analizės Dunett kriterijumi. Matavimų temperatūra 37°C.

Oksiduojantis tiek oleoil-CoA+malatui (+L-karnitinui), tiek ir dekanoinėi rūgščiai+piruvatui+malatui, gavome statistiškai patikimai mažesnes K_m^{ADP} reikšmes (atitinkamai $55,7 \pm 5,1 \mu\text{M}$ ir $75,8 \pm 7,6 \mu\text{M}$) lyginant su piruvato+malato oksidacija. Taigi, oksiduojantis tiek sočiosioms neaktyvuotoms, tiek nesočiosioms, tiek ir vidutinio grandinės ilgio riebalų rūgštims gautas panašus tar. K_m^{ADP} sumažėjimas lyginant su tar. K_m^{ADP} reikšme, gauta oksiduojantis piruvatui+malatui. Kontroliniai eksperimentai parodė, kad toks riebalų rūgščių efektas negali būti dėl išorinės membranos pažeidų (tai parodo citochromo c testas) arba dėl mitochondrijų tūrio padidėjimo (mitochondrijos nebrinksta).

14 pav. pateiktas poliarografinės kreivės pavyzdys, kai kvėpavimo substratu naudojome vidutinio ilgio grandinės dekanoinę rūgštį mišinyje su piruvatu+malatu. Iš šių duomenų, gautų titruojant ADP, buvo nustatoma tar. K_m^{ADP} reikšmė. Kontrolei substratu naudojome piruvatą+malatą (6+6 mM). Citochromas c po ADP buvo dedamas tam, kad būtų įvertintas išorinės membranos intaktiškumas, o atraktilozidas po citochromo c priedo dedamas inhibuoti ANT ir įvertinti mitochondrijų kvėpavimo greitį ketvirtoje metabolinėje būsenoje.



14 pav. Poliarografinės kreivės pavyzdys.

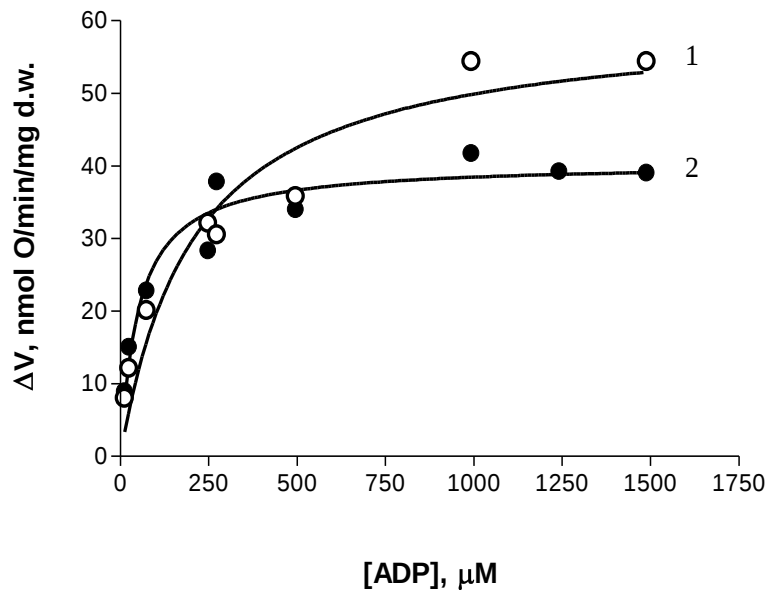
Substratas: dekanoinė rūgštis 0,3 mM+piruvatas+malatas (6+6 mM).

O – kvėpavimo substratai+skaidula; A₁ – 25 μM ADP; A₂ – 1 mM ADP; A₃ – 35 μM cit c; A₄ – 120 μM atr.

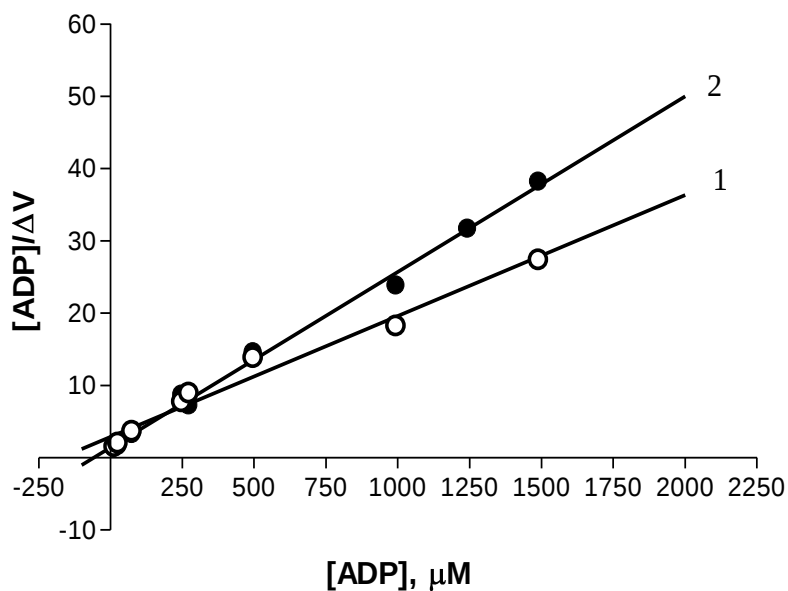
15 pav. pateikti rezultatai atskiro eksperimento, kai naudojant skirtingus kvėpavimo substratus (dekanoinę rūgštį+piruvatą+malatą bei piruvatą+malatą) buvo matuojamas kvėpavimo

greitis esant skirtingoms ADP koncentracijoms ($n = 5$). Matyti (kreivė 1), kad maksimalus kvėpavimo greitis su piruvatu+malatu yra pasiekiamas esant žymiai didesnei ADP koncentracijai (apie 1 mM), nei su dekanuatu+piruvatu+malatu (apie 300 μ M) (kreivė 2).

a)



b)



15 pav. Žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo greičio priklausomybė nuo išorinio ADP koncentracijos:

a) pagal Michaelis-Menten kinetiką; **b)** tie patys duomenys pateikti Hanes grafike, t.y. naudojantis tiesine Michaelis-Menten lygties transformacija. **1:** substratai piruvatas+malatas (6 mM+6 mM); **2:** substratai dekanuatas (0,3 mM)+piruvatas+malatas (6 mM+6 mM). Pateikti tipinio eksperimento duomenys.

K_m^{ADP} ir V_{max} reikšmių nustatymui naudotas mažųjų kvadratų metodas hiperbolei ($x=s$, $y=v$), o Hanes-Woolf grafikas naudotas vizualiai įvertinti, kaip eksperimentų duomenys atitinka Michaelis-Menten lygtį. Literatūros ir mūsų laboratorijoje atliktų tyrimų duomenimis [106], [Kopustinskiene D., magistro tezės] tik Hanes-Woolf grafikas iš visų trijų Michaelis-Menten lygties tiesinių transformacijų mažiausiai iškreipia paklaidas.

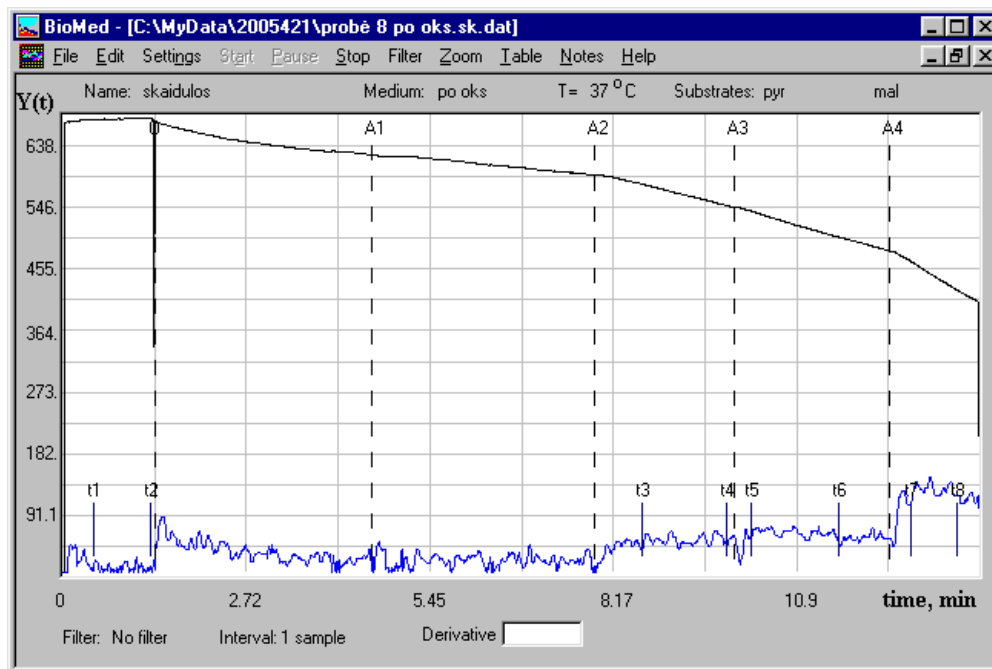
Kinetinę konstantą K_m^{ADP} oksiduojantis dekanoinėi rūgščiai nustatėme tiek pagal Michaelis Menten lygtį (dalis a) 15 pav.), tiek pagal tiesinę šios lygties transformaciją, būtent Hanes grafiką (dalis b) 15 pav.). Naudodamiesi abiem kinetinės konstantos skaičiavimo būdais gavome artimas K_m^{ADP} reikšmes (pvz. atskiro eksperimento atveju piruvatui+malatui 201,5 μM ir 167,5 μM , dekanatui+piruvatui+malatui 123,5 μM ir 117,3 μM). Tai rodo, kad iš tiesų Hanes grafikas mažiausiai iškreipia paklaidas lyginant su kitomis tiesinėmis Michaelis Menten lygties transformacijomis.

Yra žinoma [49], kad priešingai oleoil-CoA trumpos ir vidutinio ilgio grandinės (iki dvylikos anglies atomų) riebalų rūgštys pereina mitochondrijų membranas nedalyvaujant nuo karnitino priklausomai pernašos sistemai. Dekanoatas aktyvuojamas mitochondrijų viduje iki acil-CoA, tada oksiduojamas. Šią reakciją katalizuoja acil-CoA sintetazė, specifiška vidutinio ilgio riebalų rūgštims. Oleoil-CoA nereikalauja aktyvacijos ir iškart gali būti oksiduojama, tačiau oksidacijai reikalingas papildomas fermentas enoil-CoA izomerazė. Kaip matyti iš pateiktų duomenų, nepaisant transporto, aktyvacijos ir oksidacijos skirtumų, šie substratai panašiu laipsniu mažina tariamąją K_m^{ADP} . Taigi, mūsų duomenys, ankstesni (naudojant sočiąsias riebalų rūgštis) [4] ir aprašyti šiame darbe, rodo, kad K_m^{ADP} sumažėja, oksiduojantis visoms riebalų rūgštims (įvairaus grandinės ilgio, sotumo laipsnio, aktyvuotoms ir neaktyvuotoms). Pažymėtina, kad šios konstantos sumažėjimas yra panašus oksiduojantis įvairioms riebalų rūgštims. Matyt, kad riebalų rūgščių oksidacija sukelia tokius pokyčius mitochondrijų struktūroje, kad porinas tampa labiau pralaidus ADP. Detalus mechanizmas, koku būdu riebalų rūgštys didina išorinės mitochondrijų membranos laidumą ADP, iki šiol nėra aiškus.

6.1.3. Riebalų rūgščių poveikio oksidacinio fosforilinimo kinetikai grįžtamumas

Tolimesniuose eksperimentuose bandėme nustatyti, ar riebalų rūgščių poveikis oksidacinio fosforilinimo tar. K_m^{ADP} yra grįžtamas.

Kaip jau minėta, gavome, kad oksiduojantis riebalų rūgštis netgi labai mažomis koncentracijomis (2 μM) statistškai patikimai sumažėja tar. K_m^{ADP} , t.y. didėja oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumas ADP. Todėl vienoje eksperimentų serijoje pabandėme nustatyti K_m^{ADP} reikšmes piruvatui+malatui, t.y. pirmo kvėpavimo komplekso substratams, o kitoje eksperimentų serijoje – antro kvėpavimo komplekso substratui sukcinatui iškart po 1 μM palmitoil-L-karnitino oksidacijos. Poliarografinės kreivės pavyzdys naudojant substratus piruvatą+malatą pateiktas 16 paveiksle.



16 pav. Poliarografinės kreivės titruojant žiurkės širdies raumens skaidulą kvėpavimą ADP (substratas piruvatas + malatas) po 1 μM palmitoil-L-karnitino oksidacijos pavyzdys.

O – skaidula; A₁ – palmitoil-L-karnitinas 1 μM ; A₂ – piruvatas+malatas (6+6 mM); A₃ – adp 10 μM ; A₄ – ADP 1,2 mM.

Intervale 0–A₁ skaidulos buvo inkubuojamos terpėje be kvėpavimo substratų apie 3 min tam, kad susioksiduotų skaidulų endogeniniai substratai. Toliau dedama 1 μM palmitoil-L-karnitino (priedas A₁) ir leidžiama kvėpuoti apie 3 min, kad pilnai susioksiduotų riebalų rūgštis, tada jau dedamas piruvatas+malatas ir titruojama ADP. Kontroliniuose bandiniuose buvo titruojama ADP naudojant substratus piruvatą+malatą arba sukcinatą (+amitalį).

4 lentelėje pateikti kvėpavimo parametrai substratu naudojant piruvatą+malatą.

4 lentelė. Kvėpavimo parametrų palyginimas su kontrole (substratas piruvatas+malatas) žiurkės širdies raumens skaiduloms oksiduojant piruvatą+malatą po 1 μ M palmitoil-L-karnitino oksidacijos.

	K_m	$V_{ADP}-V_o$	V_{ADP}/V_o	V_{ADP}/V_{atr}	V_{ADP}	V_o
Piruvatas+malatas 6 + 6 mM	223 $\pm$ 56,0	46 $\pm$ 3,8	2,91 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,0	73,4 $\pm$ 6,3	26,6 $\pm$ 0,9
Piruvatas+malatas po 1 μ M palm-L- karn oksidacijos	211 $\pm$ 39,6	45,8 $\pm$ 4,5	2,33 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,0	57,7 $\pm$ 2,9	24,8 $\pm$ 0,9

Matavimų temperatūra 37°C, n = 5 (poriniai). K_m^{ADP} išreikšta μ M, kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio.

Toliau siekėme išsiaiškinti, ar riebalų rūgščių poveikis oksidacinio fosforilinimo tar. K_m^{ADP} yra grįžtamas, kai oksiduojamas antro kvėpavimo grandinės komplekso substratas. Tam naudojome substratą sukcinatą. Pirmą kvėpavimo kompleksą inhibavome amitaliu (galutinė koncentracija kiuvetėje 1 mM), jį dėdami į kiuvetę po to, kai susioksidavo endogeniniai substratai, po amitolio pridėtas sukcinatas, ir titruojama ADP (5 lentelė).

5 lentelė. Kvėpavimo parametrų palyginimas su kontrole (substratas sukcinatas) žiurkės širdies raumens skaiduloms oksiduojant sukcinatą po 1 μ M palmitoil-L-karnitino oksidacijos.

	K_m	$V_{ADP}-V_o$	V_{ADP}/V_o	V_{citc}/V_{ADP}	V_{ADP}	V_o
Sukcinatas 12 mM	183,7 $\pm$ 34,7	24,5 $\pm$ 1,87	1,37 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,06	72,9 $\pm$ 6,08	56,3 $\pm$ 2,9
Sukcinatas po 1 μ M palm-L- karn oksidacijos	164,8 $\pm$ 33,0	20,3 $\pm$ 2,5	1,29 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,04	68,03 $\pm$ 3,2	52,05 $\pm$ 1,48

Matavimų temperatūra 37°C, n = 5 (poriniai). K_m išreikšta μ M, kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio.

Gavome, kad 1 μ M palmitoil-L-karnitino oksidacija nekeitė po jos vykstančios nei piruvato+malato, nei sukcinato oksidacijos (statistiškai patikimai nepasikeitė nei tariamoji K_m^{ADP} , nei kvėpavimo greitis $V_{ADP}-V_o$, nei kiti kvėpavimo parametrai (4, 5 lentelės). Tai rodo, kad riebalų rūgščių oksidacija nesukelia negrįžtamų pokyčių mitochondrijose, todėl nedaro įtakos po jos vykstančio oksidacinio fosforilinimo kinetiniams rodikliams. Taigi, nors riebalų rūgščių oksidacijos

metu oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumas ADP yra padidėjęs, tačiau riebalų rūgščių oksidacija neturi įtakos po jos vykstančiai neriebalinės kilmės substratų oksidacijai. Kol kas nėra aiškus mechanizmas, koku būdu riebalų rūgščių oksidacija keičia oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumą ADP.

6.1.4. Riebalų rūgščių poveikis izoliuotų mitochondrijų brinkimui

Osmosinis brinkimas vyksta dėl jonų transporto per vidinę mitochondrijų membraną. Jei mitochondrijos suspenduotos izotoninėje matriksui terpėje, tai brinkimas nevyksta (nėra jonų pernašos per vidinę membraną). Brinkimo metu (kai terpė hipertininė matriksui) dėl padidėjusio jonų srauto į matriksą didėja matrikso tūris, vidinė membrana išsivynioja, galiausiai plyštant išorinei membranai [107]. Matriksui brinkstant sumažėja tarpmembraninė erdvė ir pagausėja kontaktinių vietų tarp vidinės ir išorinės membranų.

Mitochondrijų suspensijos yra drumstos ir išsklaido šviesą dėl refrakcijos indeksų tarp matrikso ir terpės skirtumų. Matrikso tūrio padidėjimas brinkstant dėl pralaidaus tirpinio pritekėjimo į matriksą nulemia sumažėjusį šviesos išsklaidymą, nes matrikso refrakcijos indeksas lyginamas su terpės refrakciniu indeksu [107].

Tiriant riebalų rūgštis buvo parodyta [40], kad abu palmitoilkarnitino izomerai, tiek L-, tiek D-, yra transportuojami katijonų formoje į mitochondrijas, ir abu panašiu laipsniu sukelia mitochondrijų matrikso brinkimą. Atsižvelgiant į tai buvo padaryta išvada, kad brinkimas arba kiti su riebalų rūgščių transportu susiję struktūriniai mitochondrijų pokyčiai nėra pakankami faktoriai, sukeliantys išorinės membranos laidumo ADP-ui pokyčius [4]. Matyt, yra būtinas bendras poveikis: tiek riebalų rūgščių oksidacijos, tiek riebalų rūgščių transporto sukulto mitochondrijų brinkimo. Atrodo, kad dėl riebalų rūgščių oksidacijos pakinta mitochondrijų savybės, o tai nulemia didesnę porino laidumą ADP-ui.

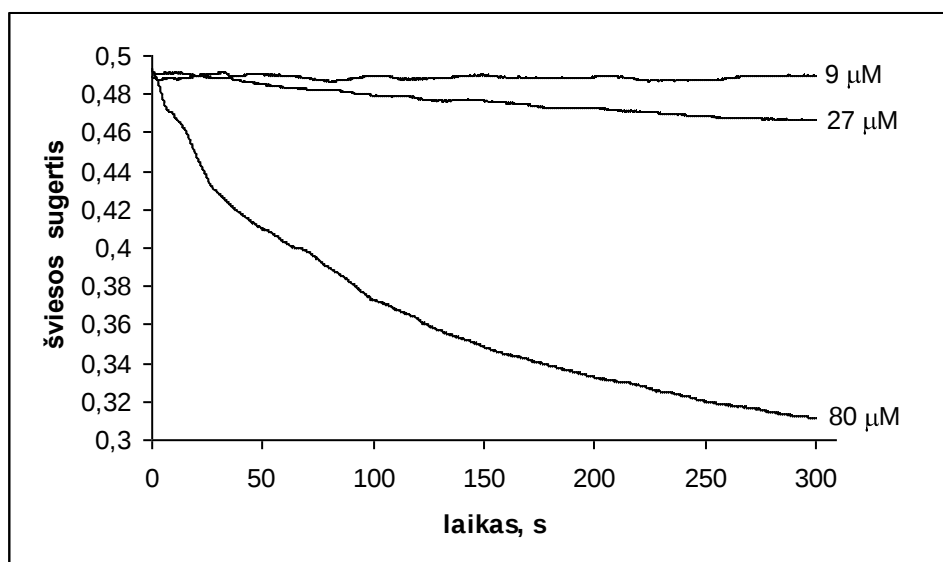
Naudodami KCl terpėje išskirtas iš žiurkės širdies mitochondrijas pabandėme įvertinti, ar oksiduojantis riebalų rūgštims mitochondrijos brinksta. Šių eksperimentų tikslas buvo nustatyti, ar mūsų įprastai naudojama palmitoil-L-karnitino koncentracija (9 μ M) sukelia izoliuotų mitochondrijų brinkimą.

Brinkimo matavimai atlikti spektrofotometru He λ ios α ties 540 nm ilgio banga esant 37°C skaidulų kvėpavimo matavimo terpėje, papildytoje gliukoze ir heksokinaze. Izoliuotų mitochondrijų kiuvetėje buvo 0,5 mg baltymo/ml. Naudotos įvairios palmitoil-L-karnitino koncentracijos mišinyje su malatu (0,24 mM), siekiant nustatyti, kurios iš jų sukelia izoliuotų mitochondrijų brinkimą. 6

lentelėje pateiktos riebalų rūgšties koncentracijos ir optinio tankio pokytis (sumažėjimas) per 5 minutes, o 17 paveiksle – tipinės mitochondrijų brinkimo kreivės.

6 lentelė. Palmitoil-L-karnitino koncentracijos įtaka izoliuotų mitochondrijų brinkimui, registruotam pagal optinio tankio pokytį ties 540 nm ilgio banga.

Palm-L-karnitino konc. kiuvetėje	Šviesos sugerties sumažėjimas po 5 min inkubacijos
9 μM	$4 \cdot 10^{-4}$
27 μM	0,02
80 μM	0,17
150 μM	0,2
300 μM	0,2



17 pav. Mitochondrijų brinkimo kreivės, naudojant skirtingas palmitoil-L-karnitino koncentracijas. Šviesos sugertis matuota ties 540 nm ilgio banga. Matavimai atlikti esant 37°C temperatūrai.

6 lentelėje ir 17 paveiksle pateikti duomenys rodo, kad mūsų įprastai naudota palmitoil-L-karnitino koncentracija 9 μM nesukelia izoliuotų mitochondrijų brinkimo fiziologinėje druskinėje terpėje, kuri naudojama skaidulų kvėpavimui matuoti. Tuo tarpu didesnės šios riebalų rūgšties koncentracijos, pradedant 27 μM , sukelia brinkimą. Toliau didinant palmitoil-L-karnitino koncentraciją brinkimo greitis didėjo (17 pav.). Taigi, mitochondrijos brinksta, naudojant 27 μM ir didesnes koncentracijas.

6.1.5. Didelių koncentracijų palmitoil-L-karnitino įtaka izoliuotų žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimui

Žinoma, kad riebalų rūgštys, naudojamos didelėmis koncentracijomis, gali permeabilizuoti išorinę mitochondrijų membraną [4]. Todėl norėjome įvertinti didelės koncentracijos (iki 80 μM) riebalų rūgščių įtaką izoliuotų mitochondrijų kvėpavimo parametrams.

Naudojome KCl terpėje izoliuotas žiurkės širdies raumens mitochondrijas, kurių baltymo kiekis buvo nustatytas Biureto metodu, aprašytu skyrelyje „Medžiagos ir metodai“. Apskaičiuotas 1,6 ml oksimetrinei kiuvetei reikiamas mitochondrijų suspensijos tūris, kad baltymo būtų 0,5 mg/ml. Naudotos palmitoil-L-karnitino koncentracijos ribose 9–80 μM , kontrolei substratu naudotas piruvatas+malatas (6+ 6mM). Gauti kvėpavimo parametrai pateikti 7 lentelėje.

7 lentelė. Palmitoil-L-karnitino įtaka izoliuotų žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimo parametrams (n = 2).

<i>Palm-L-karnitino koncentracija, μM</i>	V_{ADP}/V_o	V_o	V_{ADP}	$V_{\text{citc}}/V_{\text{ADP}}$
9	$5,8 \pm 0,32$	$45,4 \pm 3,65$	$315,9 \pm 1,05$	$0,98 \pm 0,02$
23	$5,2 \pm 0,16$	$52,7 \pm 0,77$	$297,6 \pm 0,15$	$1,01 \pm 0,02$
40	$4,6 \pm 0,39$	$55,3 \pm 5,65$	$284,5 \pm 2,41$	$1,02 \pm 0,03$
80	$4,4 \pm 0,18$	$47,9 \pm 0,85$	$239,3 \pm 8,15$	$1,01 \pm 0,24$
<i>Piruvatas+malatas 6+6 mM</i>	$6,2 \pm 0,33$	$39,9 \pm 3,21$	$296,9 \pm 5,12$	$1,09 \pm 0,05$

Palmitoil-L-karnitinas, naudotas didelėmis koncentracijomis, turėjo tendenciją mažinti (iki 24 proc.) kvėpavimo kontrolės koeficientą ir trečios metabolinės būsenos greitį, lyginant su parametrais, gautais, naudojant 9 μM , tačiau nekeitė kvėpavimo greičio antroje metabolinėje būsenoje bei citochromo c poveikio į trečią metabolinį greitį.

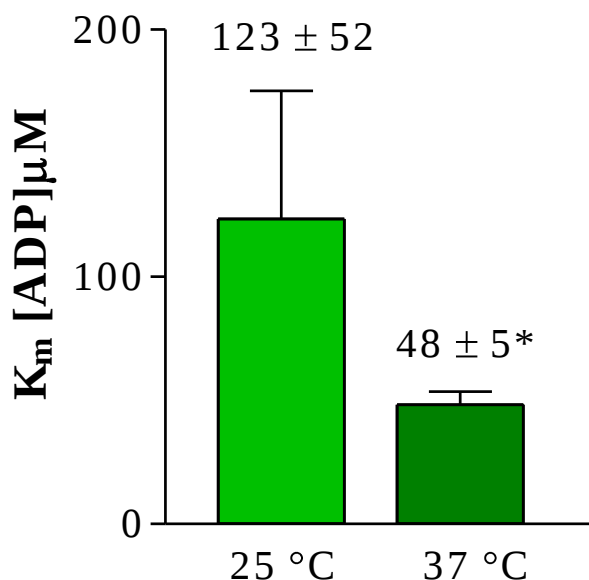
Gauti duomenys rodo, kad didžiausia palmitoil-L-karnitino koncentracija neturėjo įtakos mitochondrijų kvėpavimui antroje metabolinėje būsenoje (V_o), tačiau turėjo tendenciją mažinti tiek kvėpavimo kontrolę V_{ADP}/V_o , tiek trečios metabolinės būsenos greitį V_{ADP} atitinkamai 30 proc. ir 20 proc. lyginant su piruvatu+malatu; abu parametrai turėjo tendenciją mažėti 24 proc. lyginant su įprastai mūsų naudojama palmitoil-L-karnitino koncentracija (9 μM). Citochromas c nestimuliavo kvėpavimo, tai rodo, kad išorinė mitochondrijų membrana išliko nepažeista, netgi naudojant dešimt kartų didesnes riebalų rūgšties esterio koncentracijas.

6.1.6. Temperatūros įtaka riebalų rūgštis oksiduojančių mitochondrijų *in situ* kvėpavimo parametrams

Dažnai mitochondrijų kvėpavimas eksperimentinio pobūdžio darbuose tiriamas naudojant dirbtines izoliavimo terpes esant žemesnei temperatūrai (20°C, 25°C, 30°C), nei fiziologinė 37°C. Šiame darbe tiriant žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimą esant 37°C temperatūrai naudota artima fiziologinei druskinė terpė.

Medicinos praktikoje miokardo apsaugai aortos – vainikinių jungčių suformavimo operacijų metu taikomi skirtingi kardioplegijos metodai: kristaloidinė (4°C), drungno kraujo (29°C) ir šilto kraujo (35-37°C). Šie metodai skiriasi ne tik tirpalo sąstatu, bet ir tirpalo temperatūra. Taigi, naudojamas gana platus temperatūros intervalas. Vadinas, aktualu įvertinti mitochondrijų kvėpavimo parametrus esant tiek fiziologinei, tiek ir žemesnei temperatūrai.

Šiame darbe norėjome palyginti mitochondrijų kvėpavimo parametrus esant skirtingoms temperatūroms. Tyrėme temperatūros (25°C ir 37°C) įtaką mitochondrijoms *in situ* oksiduojant palmitoil-L-karnitiną. Temperatūros padidėjimas nuo 25°C iki 37°C palmitoil-L-karnitino oksidacijos atveju sumažino tariamąjį K_m^{ADP} 2,6 karto (18 pav.).



18 pav. Tar. K_m^{ADP} priklausomybė nuo temperatūros saponinu permeabilizuotose žiurkės širdies raumens skaidulose. Substratas: palmitoil-L-karnitinas+malatas (9 μM +0,24 mM), n = 7 poriniai eksperimentai. *p < 0,05, duomenys palyginti Stjudento t-testu.

Tačiau esant 37°C temperatūrai antros (ketvirtos) metabolinės būsenos greitis (V_o) turėjo tendenciją didėti, lyginant su V_o esant 25°C temperatūrai (8 lent.). Matyt, tai įvyksta dėl to, kad padidėjęs

membranos takumas esant aukštesnei temperatūrai sukelia padidėjusį protonų srautą į mitochondrijų matriksą.

8 lentelė. Temperatūros įtaka pagrindiniams žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo parametrams.

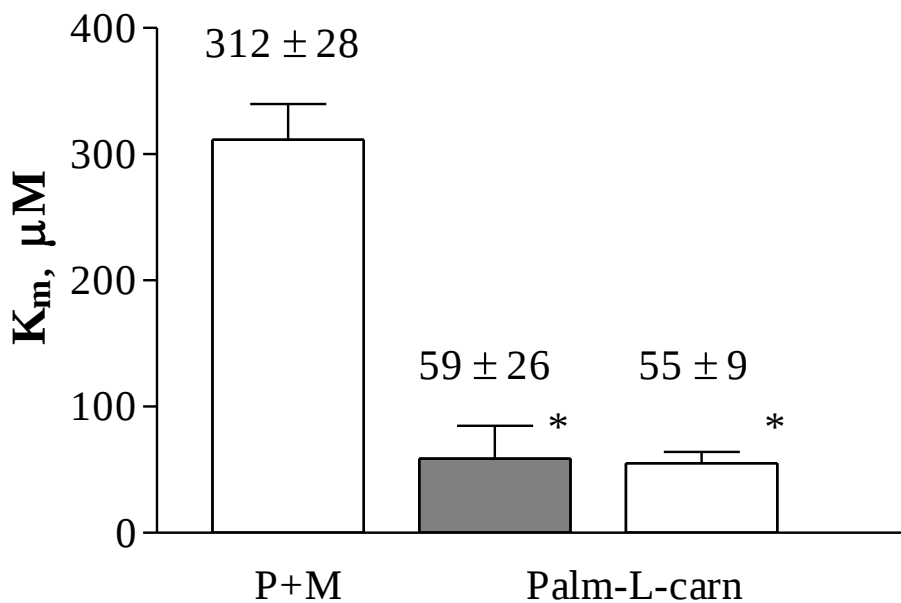
Matavimų temperatūra	n	V_o	V_{ADP}	$V_{ADP+citc}/V_{ADP}$	V_{ADP}/V_o
25°C	7	$11,4 \pm 0,9$	$29,4 \pm 2,8$	$1,1 \pm 0,03$	$2,7 \pm 0,3$
37°C	7	$24,2 \pm 2,1$	$36,0 \pm 3,5$	$1,05 \pm 0,02$	$1,6 \pm 0,1$

Substratas palmitoil-L-karnitinas 9 μ M+malatas 0,24 mM. Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio.

Įdomu pažymėti tai, kad ankstesni mūsų darbai su neriebalinės kilmės substratais (sukcinatu) taip pat parodė, jog temperatūros pakėlimas nuo 20°C iki 37°C sumažina tariamąją K_m^{ADP} panašiu laipsniu (2,3 kartus) [3]. Galbūt, tai įvyksta dėl fizinių-cheminių mitochondrijų išorinės membranos pokyčių (takumo, porų diametro kitimų) ar gali atspindėti pokyčius difuziniame sluoksnyje, esančiame prie mitochondrijų, vykstančius esant fiziologinei (37°C) temperatūrai. Tačiau ši K_m^{ADP} reikšmė 37°C temperatūroje oksiduojantis sukcinatui išlieka žymiai didesnė ($145 \pm 35 \mu$ M), nei oksiduojantis palmitoil-L-karnitinui. Tai leidžia manyti, jog oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumas ADP oksiduojant riebalų rūgštis širdies raumens ląstelėse yra reguliuojamas riebalų rūgščių oksidacijos fermentinės sistemos komponentų ir kad riebalų rūgščių poveikis oksidacinio fosforilinimo reguliavimui gali pasireikšti ir hipoterminės kardioplegijos atveju.

6.2. Mitochondrijų *in situ* kvėpavimo reguliavimo vykstant riebalų rūgščių oksidacijai palyginimas stimuliuojant kvėpavimą egzogeniniu ADP bei ATP

Palyginimui naudodami substratą palmitoil-L-karnitiną nustatėme K_m^{ADP} ir K_m^{ATP} reikšmes esant 37°C temperatūrai (n = 5) (19 pav.); kontrolei naudotas piruvatas+malatas.



19 pav. Kvėpavimo substrato įtaka K_m^{ADP} ir K_m^{ATP} reikšmėms. Balti stulpeliai: kvėpavimas stimuliuotas ADP, pilkas: kvėpavimas stimuliuotas ATP. Matavimų temperatūra 37°C; *p < 0,05 lyginant su piruvatu+malatu; n = 5 (neporiniai). Duomenys palyginti dispersinės analizės Dunett kriterijumi.

Tokiu būdu palyginome mitochondrijų kvėpavimo reguliavimo kinetiką tiek stimuliuojant kvėpavimą egzogeniniu ADP, tiek egzogeniniu ATP. Kai kvėpavimas buvo stimuliuojamas egzogeniniu ATP, miofibrilių ir sarkoplazminio tinklo ATP-azės gamino endogeninį ADP, kuris buvo tiesiogiai tiekiamas mitochondrijoms [108]. Dėl to terpėje aptinkama labai maža ADP koncentracija [7, 108].

Kvėpavimo parametrai pateikti 9 lentelėje. Kaip matyti 19 pav., su palmitoil-L-karnitinu gavome statistiškai patikimai nesiskiriančias reikšmes, būtent $K_m^{ADP}=59 \pm 26$, $K_m^{ATP}=55,1 \pm 9$. Be to, jos buvo labai mažos, lyginant su K_m^{ATP} reikšmėmis, būdingomis piruvatui+malatui ir panašios į K_m^{ADP} reikšmes, kurias gavome anksčiau [4]. Mažos K_m^{ATP} reikšmės saponinu apdorotose skaidulose su palmitoil-L-karnitinu buvo nustatytos pirmą kartą. Maža K_m reikšmė, gauta, titruojant

egzogeniniu ATP, ir nesiskirianti nuo K_m^{ADP} reikšmės, rodo, kad riebalų rūgščių efektas nepriklauso nuo ADP patekimo į mitochondrijas kelio (egzogeninio ar endogeninio, t.y. pagaminto ląstelės ATP-azių).

9 lentelė. Žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo parametrų palyginimas titruojant egzogeniniu ADP bei ATP.

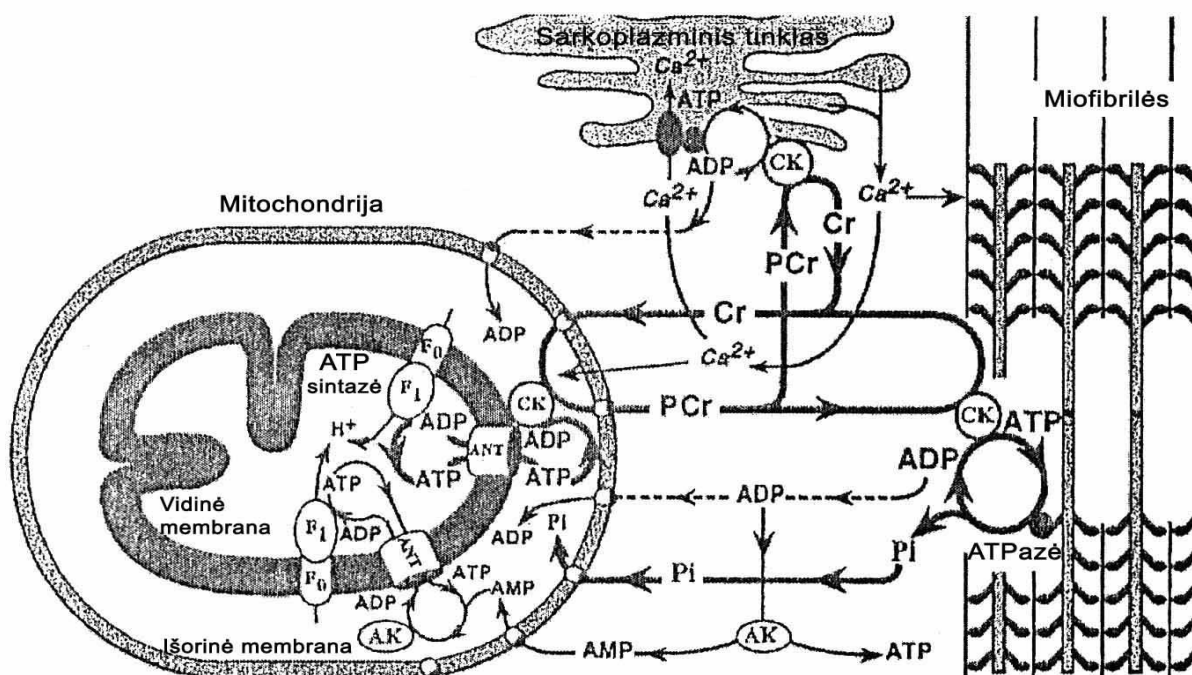
	titruojant ADP	titruojant ATP
K_m	58,8±26,0	55,1±9,2
V_o	24,9±2,5	27,1±2,7
V_{ADP}	49,1±4,5	48,2±3,8
V_{ADP}/V_o	1,99±0,2	1,69±0,1
$V_{ADP}-V_o$	33,4±8,7	21,8±6,0
V_{ADP}/V_{atr}	2,8±0,4	2,3±0,3

Substratas palmitoil-L-karnitinas 9 μ M+malatas 0,24 mM, n = 5 poriniai eksperimentai. Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sauso svorio. Matavimai atlikti esant 37° C temperatūrai.

Taigi, riebalų rūgščių oksidacijos sukeltas K_m sumažėjimo reiškinys stebimas ir fiziologiškesniame modelyje, nei naudotame anksčiau, būtent, stimuliuojant kvėpavimą egzogeniniu ADP [4]. Buvo parodyta [108], kad šiame modelyje ADP, pagamintas viduląstelių ATP-azių, yra tiesiogiai tuneliuojamas į mitochondrijas, neatsipalaiduojant į terpę, jei mitochondrijų oksidacinis fosforilinimas vyksta aktyviai.

6.3. Išorinės mitochondrijų membranos laidumo įvertinimas panaudojant egzogeninę ADP-suvartojančią sistemą. Kreatino efektas: tiesioginio metabolinio ADP tuneliavimo įrodymas

Mitochondrijas, sarkoplazminį tinklą ir miofibrilių ATP-azes per metabolinį tuneliavimą ir energijos pernašą sujungia kreatino kinazės – fosfokreatino ir adenilato kinazės sistemos [7, 61] (20 pav.).



20 pav. Schematinis viduląstelių energetinių vienetų (ICEU) raumenų ląstelėse pavaizdavimas [7].

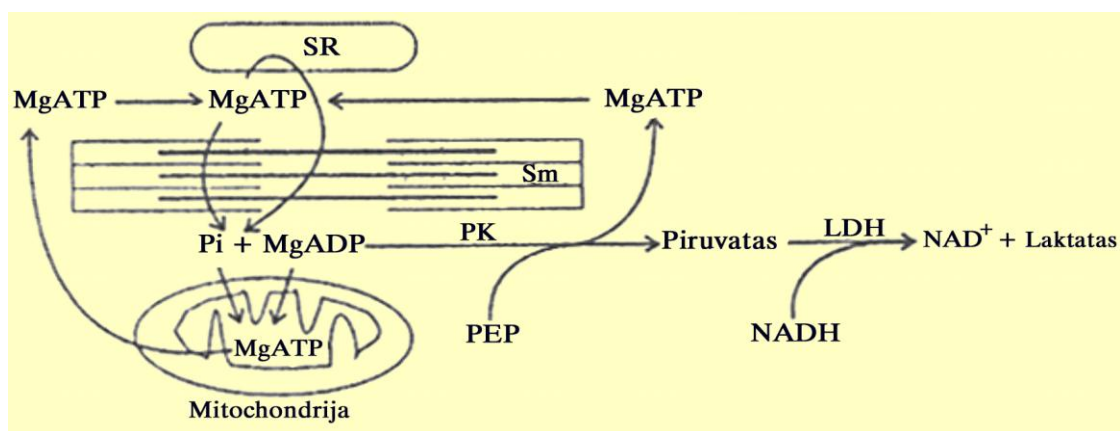
Iki šiol nėra žinoma, kaip tiksliai *in vivo* veikia grįžtamasis ryšys tarp miofibrilių ir ląstelių bei subląstelių membranų ATP-azių ir mitochondrijų, atsakingas už laisvosios energijos gamybos suderinimą priklausomai nuo energijos poreikių. Manoma, kad subląstelinėje lygyje kompartmentalizuoti kreatino kinazės (CK) izofermentai vaidina pagrindinį vaidmenį kontroliuojant energijos gamybą ir energijos transportą į citoplazminį kompartmentą [109].

Daugelis studijų [7, 35, 61] parodė, kad mitochondrijų kvėpavimą gali kontroliuoti tarpmembraninėje erdvėje esanti mitochondrinė kreatino kinazė (miCK), lokaliai gamindama ADP. Teigiama, kad raumenų ląstelėse skirtingi CK izofermentai yra funkciškai ir/arba struktūriškai susieti arba su energijos suvartojimo vietomis (ląstelės ATP-azės) arba su energijos gamybos vietomis (glikolizė ir mitochondrijos) tam, kad palengvintų energijos pernašą į citoplazminį

kompartimentą, panaudojant galinčius difunduoti tarpininkus kreatiną (Cr) ir fosfokreatiną (PCr). Sutinkamai su šiuo modeliu ADP, pagamintas miofibrilėse, veikiant citozolinei CK, yra nedelsiant refosforilinamas į ATP, panaudojant fosforilo grupę iš PCr, kai tuo tarpu Cr difunduoja atgal į mitochondrijas, kur, veikiant miCK tarpmembraninėje erdvėje, vėl refosforilinamas į PCr [109]. Turint omenyje tai, kad miCK funkciškai susieta su ADP/ATP nešikliu ir tai, kad išorinės mitochondrijų membranos laidumas adenino nukleotidams širdies raumens skaidulose yra apribotas, ADP, kurį pagamina miCK tarpmembraninėje erdvėje, yra efektyvesnis stimuliuojant kvėpavimą, nei ADP, pagamintas tiesiogiai citoplazmoje [10, 20].

Buvo parodyta [35, 46], kad saponinu permeabilizuotose raumenų ląstelėse miofibrilių ir sarkoplazminio tinklo ATP-azės yra intaktiškos, todėl šie preparatai yra tinkami tirti mitochondrijų kvėpavimo *in situ* reguliavimą endogeniniu ADP, kurį pagamina viduląstelinės ATP-azės, hidrolizuojančios egzogeninį ATP. Padidinto pralaidumo skaidulose ADP gamina tiek miofibrilių, tiek sarkoplazminio tinklo Ca,MgATP-azės.

Mūsų panaudotame eksperimentiniame modelyje ADP, generuotą ATP-azių reakcijoje, naudoja arba mitochondrijos oksidaciniam fosforilinimui, arba egzogeninė PK+PEP sistema (21 pav.).



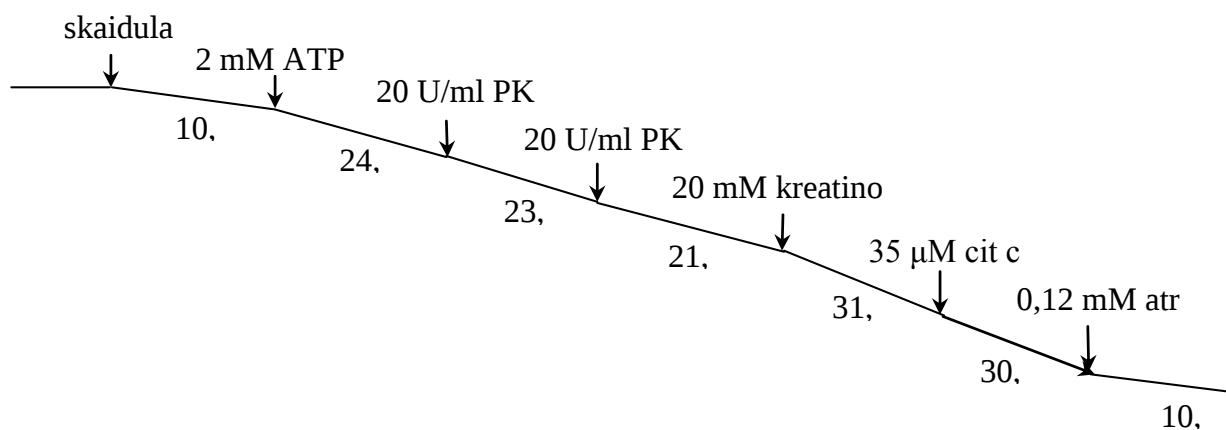
21 pav. Eksperimentinės modelinės sistemos naudojant egzogeninę PK+PEP schema.

SR - sarkoplazminis tinklas, Sm - miofibrilių sarkomeras, Pi - neorganinis fosfatas, PK - piruvato kinazė, PEP - fosfoenolpiruvatas, LDH - laktato dehidrogenazė

Taigi, egzogeninį ATP ATP-azės verčia ADP, dėl kurio mitochondrijos konkuruoja su PK+PEP sistema. Jei ADP tiesiogiai tuneliuojamas į mitochondrijas, egzogeninė PK+PEP sistema turėtų neslopinti kvėpavimo arba slopinti jį nežymiai. Mes pabandėme išsiaiškinti, ar skiriasi PK+PEP efektas oksiduojantis riebalinės (palmitoil-L-karnitinas) ir neriebalinės prigimties (glutamatas+malatas) substratams. Šis efektas rodytų, ar skiriasi išorinės membranos laidumas

oksiduojantis skirtingiems substratams. Remiantis ankstesniais darbais [4], parodžiusiais ženklų K_m^{ADP} sumažėjimą mitochondrijoms oksiduojant riebalų rūgštis, buvo iškelta prielaida, kad išorinė mitochondrijų membrana laidesnė ADP-ui, oksiduojantis riebalinės kilmės substratams.

Naudodami PK+PEP eksperimentinį modelį, mes tyrėme funkcinių kompleksų, kuriuos sudaro mitochondrijos ir miofibrilių bei sarkoplazminio tinklo Ca,MgATP-azės, funkcionavimą skirtingose sąlygose (esant skirtingoms temperatūroms 25°C ir 37°C ir skirtingiems substratams). Kvėpavimo registravimo schema pateikta 22 pav.



22 pav. Žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo greičio registravimo naudojant egzogeninę PK+PEP sistemą schema. Substratas palmitoil-L-karnitinas 9 μM+malatas 0,24 mM+PEP 8 mM. Nurodyti priedai, jų koncentracijos ir skaidulų kvėpavimo greičiai (atskiro eksperimento).

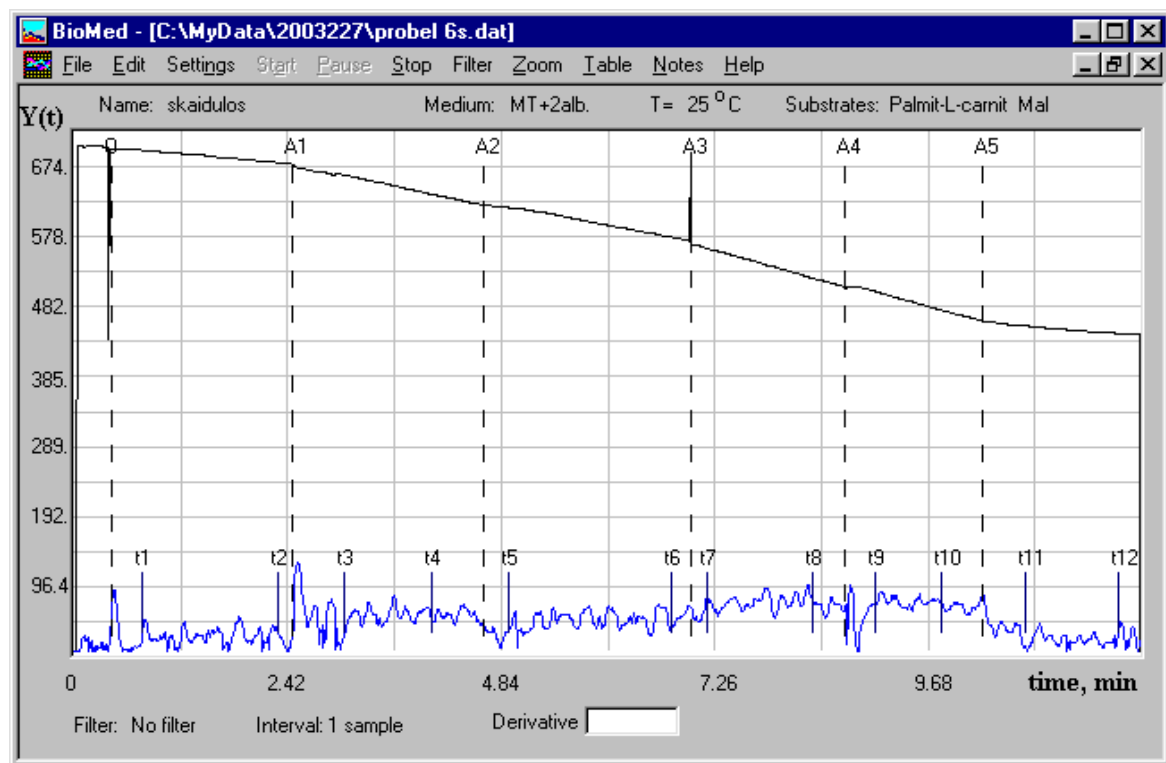
Priedų koncentracijos ir absoliutūs greičiai su abiem mūsų naudotais substratais glutamatu+malatu bei palmitoil-L-karnitinu pateikti 10 lent.

23 pav. pateiktas poliarografinės kreivės oksiduojantis palmitoil-L-karnitinui pavyzdys, kuris parodo priedų sudėjimo į kiuvetę tvarką, priedų galutines koncentracijas kiuvetėje bei užregistruotus kvėpavimo greičius.

10 lentelė. Kreatino kinazės sąryšio (angl. coupling) su ANT oksimetrinis tyrimas: ADP-suvartojančios PK+PEP sistemos ir kreatino efektai saponinu permeabilizuotų žiurkės širdies skaidulų kvėpavimo greičiui.

	Glutamatas + Malatas		Palmitoil-L-karnitinas + Malatas	
	25°C	37°C	25°C	37°C
V_o	$12,2 \pm 0,7$	$20,1 \pm 2,4$	$11,8 \pm 1,4$	$22,4 \pm 2,3$
V_{ATP} [2 mM]	$31,5 \pm 2,7$	$43,8 \pm 2,8$	$28,0 \pm 1,9$	$47,7 \pm 2,7$
V_{pk} [20 U/ml]	$26,3 \pm 2,4$	<i>n.n.</i>	$25,1 \pm 2,1$	<i>n.n.</i>
V_{pk} [40 U/ml]	$22,6 \pm 2,1$	$29,3 \pm 1,8$	$21,7 \pm 2,1$	$33,0 \pm 1,6$
V_{kreat} [20 mM]	$32,8 \pm 2,9$	$41,8 \pm 6,7$	$33,9 \pm 2,3$	$44,5 \pm 2,3$
V_{citc}/V_{kreat}	$1,02 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,02$	$1,04 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,02$

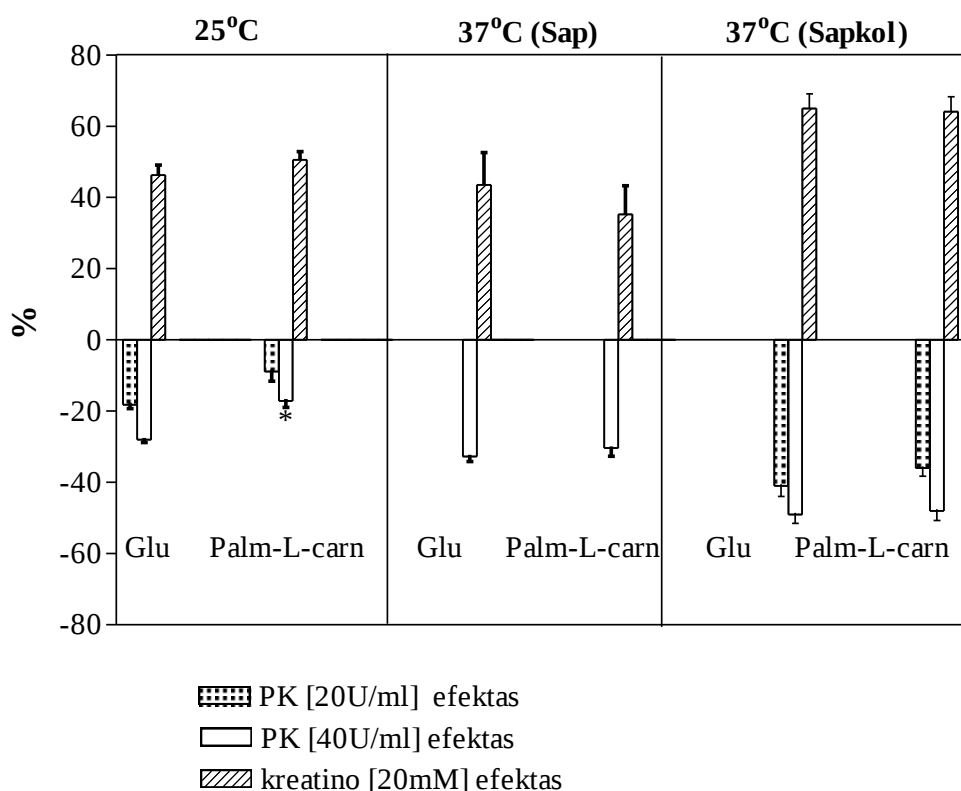
n = 5 poriniai eksperimentai. Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio. V_o -pradinis kvėpavimo greitis; V_{ATP} - kvėpavimo greitis pridėjus 2 mM ATP; V_{pk} [20 U/ml], V_{pk} [40 U/ml] - kvėpavimo greitis esant atitinkamai 20 arba 40 U/ml PK (n.n. - nenustatyta); V_{kreat} [20 mM] - kvėpavimo greitis pridėjus 20 mM kreatino.



23 pav. Poliarografinės kreivės pavyzdys. Kreatino kinazės sąryšio (coupling) su ANT oksimetrinis tyrimas. Priedų sudėjimo į kiuvetę tvarka (nurodyta galutinė koncentracija kiuvetėje): O – Palm-L-carn 9 μ M + Mal 0,24 mM + PEP 8 mM + skaidula; A₁ – ATP 2 mM; A₂ – PK 40 U/ml; A₃ – kreatinas 20 mM; A₄ – cyt c 35 μ M; A₅ – atr 125 μ M.

24 pav. pateikti santykiniai greičiai: V_{ATP} greičio sumažėjimas (proc.) dėl PK+PEP ADP sunaudojančios sistemos poveikio (tiek [20 U/ml], tiek [40 U/ml] PK priedų) bei kreatino priedo sukeltas greičio padidėjimas (proc.) po antro PK priedo [40 U/ml].

Egzogeninio citochromo c pridėjimas į terpę kvėpavimo greičio trečioje metabolinėje būsenoje nepadidino. Tiek oksiduojantis glutamatui+malatui, tiek ir palmitoil-L-karnitinui gautos nežymios citochromo c efektų reikšmės 0,9–1,04 rodo, kad mitochondrijų išorinė membrana oksiduojantis skirtingos prigimties substratams išlikusi intaktiška.



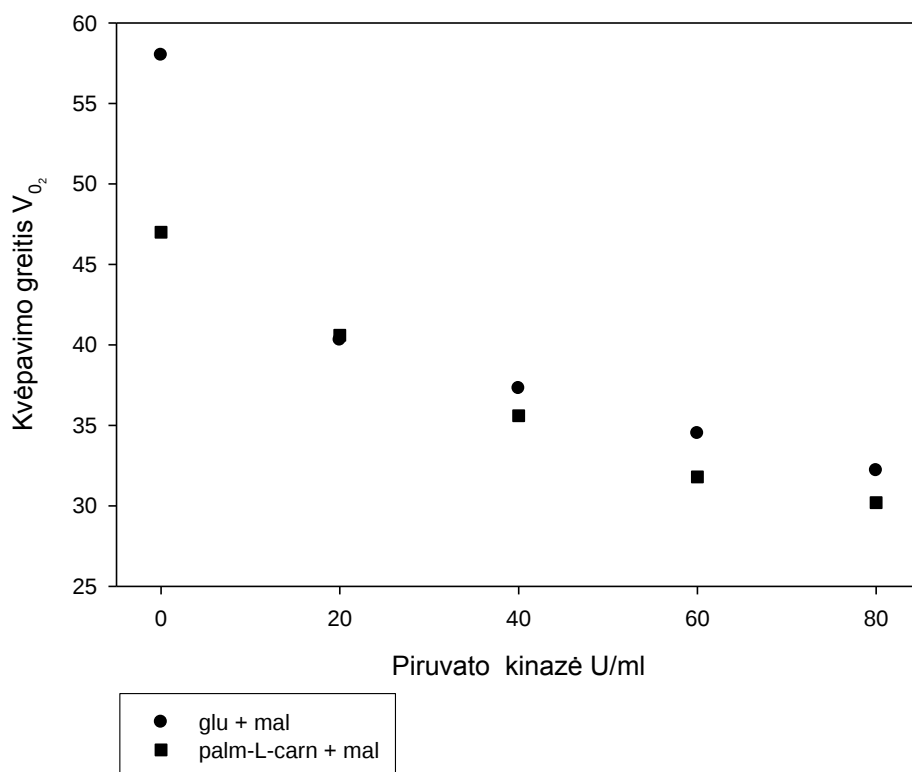
24 pav. PK+PEP ADP-suvartojančios sistemos ir kreatino įtaka saponinu apdorotų (Sap) bei saponinu+kolagenaze apdorotų (Sapkol) žiurkės širdies skaidulų kvėpavimui skirtingose temperatūrose naudojant kvėpavimo substratais glutamatą+malatą ir palmitoil-L-karnitiną. Pateikta PK [20 U/ml] efektas greičiui V_{ATP} ; PK [40 U/ml] efektas greičiui V_{ATP} ; kreatino efektas greičiui $V_{PK [40 U/ml]}$. $n = 5$ (poriniai eksperimentai). * $p < 0.05$ lyginant su 37°C su palmitoil-L-karnitinu; duomenys palyginti Tukey kriterijumi.

Akivaizdu (10 lent.), kad 2 mM ATP priedas dėl iš ATP susidariusio endogeninio ADP žymiai ir panašiai su abiem substratais stimuliuoja skaidulų kvėpavimą. 40 U/ml PK, esant terpėje PEP, slopino kvėpavimą apie 30 proc., šiek tiek mažesnis efektas (23 proc.) gautas tik su palmitoil-L-karnitinu esant 25°C (24 pav.). Slopinantis skaidulų kvėpavimą PK efektas su glutamatu+malatu gerai atitinka kitų tyrėjų [7, 108] gautus rezultatus naudojant šį substratą.

Analogiški eksperimentai buvo atlikti esant 37°C naudojant tiek saponinu, tiek ir kolagenaze apdorotas skaidulas. Gavome statistiškai patikimai tarp substratų nesiskiriančius tiek 20 U/ml, tiek 40 U/ml PK, tiek 20 mM kreatino priedų efektus, tačiau lyginant su saponinu apdorotomis skaidulomis šie efektai buvo didesni (24 pav.). Taigi, šie duomenys rodo, kad didžioji dalis endogeniškai generuoto ADP saponinu apdorotose skaidulose nėra lengvai prieinama egzogeninei PK+PEP sistemai, jei mitochondrijos kvėpuoja aktyviai. Aišku, kad dėl didesnio kolagenaze ir saponinu apdorotų skaidulų laidumo gauti didesni PK+PEP bei kreatino efektai. Egzogeninio citochromo c testas (kvėpavimas nepagreitėjo pridėjus citochromo c) rodo, kad išorinė membrana intaktiška ir ADP, lokalizuotas tarpmembraninėje erdvėje, nėra prieinamas PK; PK veikia išimtinai mitochondrijų išorėje.

Taigi, nei temperatūros padidėjimas (nuo 25°C iki 37°C), nei riebalų rūgščių oksidacija nekeičia slopinančio kvėpavimą egzogeninės PK poveikio, ir, matyt, ADP koncentracijos terpėje. Pažymėtina, kad 20 mM kreatino pridėjimas esant 2 mM ATP bei egzogeninei PK+PEP sistemai žymiai ir panašiai su abiem substratais (1,35–1,56 kartus) padidino kvėpavimo greitį. Taigi, remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad ryšio tarp mi-CK ir ANT efektyvumas nesiskyrė vykstant skirtingos prigimties substratų oksidacijai.

Toliau bandėme įvertinti, kiek PK reikia, kad būtų maksimaliai užinhibuotas skaidulų kvėpavimas. Mitochondrijų *in situ* kvėpavimą matavome esant 37°C temperatūrai. Titravome trečios metabolinės būsenos greitį, stimuliuotą 2 mM egzogeninio ATP. Gavome (25 pav.), kad 20-40 U/ml PK priedas sukelia staigų kvėpavimo greičio sumažėjimą, ypač ryškų oksiduojantis glutamatui+malatui; toliau didinant PK kiekį iki 80 U/ml kvėpavimas slopinamas nežymiai. Pilnos kvėpavimo inhibicijos nepavyko gauti, manoma, dėl skaidulų kvėpavimo greičio savaiminio mažėjimo ilgos jų inkubacijos metu, kada vienas po kito dedama daug priedų.

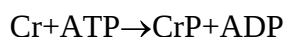


25 pav. Žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo greičio priklausomybė nuo pridėto PK kiekio. Matavimų temperatūra 37°C; n = 3 (poriniai). Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio.

Taigi, mūsų gauti duomenys rodo, kad kai ADP iš ATP-azių tiesiogiai tuneliuojamas į mitochondrijas, CK sistema vaidina svarbų vaidmenį energijos pernašoje tarp viduląstelių laisvosios energijos panaudojimo ir gamybos vietų, nepaisant žymaus K_m^{ADP} sumažėjimo, kuri sukelia tiek riebalų rūgščių oksidacija, tiek temperatūros padidėjimas.

6.4. Kreatino įtaka mitochondrijų *in situ* kvėpavimo reguliavimui

Šioje eksperimentų serijoje tyrėme kreatino įtaką mitochondrijų *in situ* kvėpavimo reguliavimui (saponinu permeabilizuotose žiurkės širdies raumens skaidulose). Kreatinas, kuriuo papildoma matavimo terpė, stimuliuoja kvėpavimą, aktyvuodamas mi-CK tarpmembraninėje erdvėje, taigi, mi-CK katalizuojamos reakcijos



pusiausvyra pasislenka dešinėn.

Tyrimo objektu pasirinkome padidinto pralaidumo (saponinu permeabilizuotas) žiurkės širdies raumens skaidulas. Permeabilizuotas skaidulas sudaro ląstelės, kurios dėl sarkolemos permeabilizacijos praradusios tirpius citozolio fermentus, bet visos struktūros, tokios, kaip mitochondrijos, miofibrilės, sarkoplazminis tinklas ir fermentai, asocijuoti su jomis, išlieka intaktiškai [12]. Taigi, kreatinas aktyvuoja ADP gamybą per mitochondrinę kreatinkinazę, kuri yra funkciškai susieta su adenino nukleotidų nešikliu, todėl gali vykti tiesioginis substratų ir produktų tuneliavimas [2, 110]. Šių sistemų (mi-CK ir ANT) sąveikos efektyvumą atspindi mitochondrijų kvėpavimą greitinantis kreatino poveikis [2, 38].

Sąveika tarp mi-CK ir ANT buvo nustatoma dviem būdais:

(1) Apskaičiuojant tariamasias K_m^{ADP} ir V_{max} reikšmes. Titruojant ADP buvo nustatoma nuo išorinio ADP priklausomo mitochondrijų kvėpavimo greičio $V-V_o$ priklausomybė nuo ADP koncentracijos matavimo terpėje nesant ir esant 20 mM kreatino;

(2) Užregistravus kvėpavimo greitį V_{adp} esant terpėje 60 μ M ADP koncentracijai, buvo pridėdama 20 mM kreatino. Kreatino efektas, t.y kvėpavimo stimuliavimas kreatinu, buvo išreiškiamas santykiu V_{kreat}/V_{adp} , čia V_{kreat} - kvėpavimo greitis su kreatinu, V_{adp} - kvėpavimo greitis be kreatino.

Kadangi buvo žinoma, kad oksiduojantis riebalų rūgštims mažėja K_m^{ADP} , tai buvo interpretuojama kaip išorinės mitochondrijų membranos pralaidumo ADP-ui padidėjimas [4]. Todėl norėjome išsiaiškinti, ar oksiduojantis riebalinės kilmės substratams išlieka funkcinė sąveika tarp mi-CK ir ANT. Įvertinome 20 mM kreatino poveikį skaidulų kvėpavimo parametrų, naudojant neriebalinės kilmės substratą piruvatą+malatą bei riebalinės kilmės substratą palmitoil-L-karnitiną (+malatą). 11 lentelėje pateikta priedų sudėjimo į kiuvetę tvarka ir nurodyta galutinė priedų koncentracija kiuvetėje. Gauti duomenys (11 lentelė) rodo, kad stimuliuojantis skaidulų kvėpavimą kreatino efektas V_{kreat}/V_{adp} , gautas su šiais abiem skirtingos prigimties substratais, yra panašus. Oksiduojantis piruvatui+malatui gavome didesnę greičių santykį V_{ADP}/V_{kreat} , nei oksiduojantis palmitoil-L-karnitinui, kadangi abiejų substratų atvejais gauti artimi greičiai V_{kreat} , tačiau gerokai didesnis maksimalus kvėpavimo greitis V_{ADP} , gautas oksiduojantis piruvatui+malatui. Pažymėtina, kad gavome gana aukštą ir panašią su abiem substratais kvėpavimo kontrolę V_{ADP}/V_o (11 lent.).

Tariamoji K_m^{ADP} , nustatyta naudojant šiuos du substratus esant 25°C temperatūrai, ženkliai skyrėsi : $275 \pm 165 \mu$ M piruvatui+malatui ir $106 \pm 48 \mu$ M palmitoil-L-karnitinui ($n = 6$). Tai rodo žymiai didesnę oksidacinio fosforilavimo sistemos giminingumą ADP oksiduojantis riebaliniam substratui palmitoil-L-karnitinui. Panašus citochromo c poveikis šių substratų oksidacijai trečioje metabolinėje būsenoje (1,01 ir 1,08) rodo, kad išorinė mitochondrijų membrana išlikusi intaktiška ir negalėjo turėti įtakos minėtam K_m^{ADP} skirtumui.

11 lentelė. Žiurkės širdies raumens skaidulų, apdorotų saponinu, kvėpavimo parametrai naudojant du skirtingus substratus: kreatino efektas.

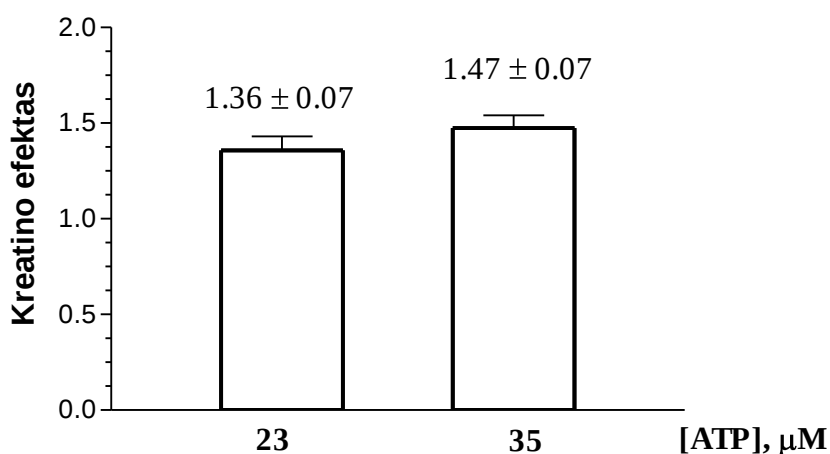
Priedai kiuvetėje	Galutinė koncentracija	Piruvatas+Malatas [6+6 mM]	Palm-L-karnitinas [9 μM]
V _o		8,7±0,8	7,1±0,6
V _{adp}	60 μM	16,9±1,1	15,2±1,3
V _{kreat}	20 mM	22,7±1,6	21,4±2,0
V _{ADP}	1,2 mM	61,1±6,1	45,7±0,9
V _{kreat} /V _{adp}		1,37±0,05	1,42±0,04
V _{ADP} /V _o		6,4±0,2	5,5±0,6
V _{ADP+c} /V _{ADP}		1,01±0,03	1,08±0,04

Matavimai atlikti esant 20°C temperatūrai. Pateikti 6 neporinių eksperimentų duomenys. Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio.

V_o - pradinis kvėpavimo greitis;

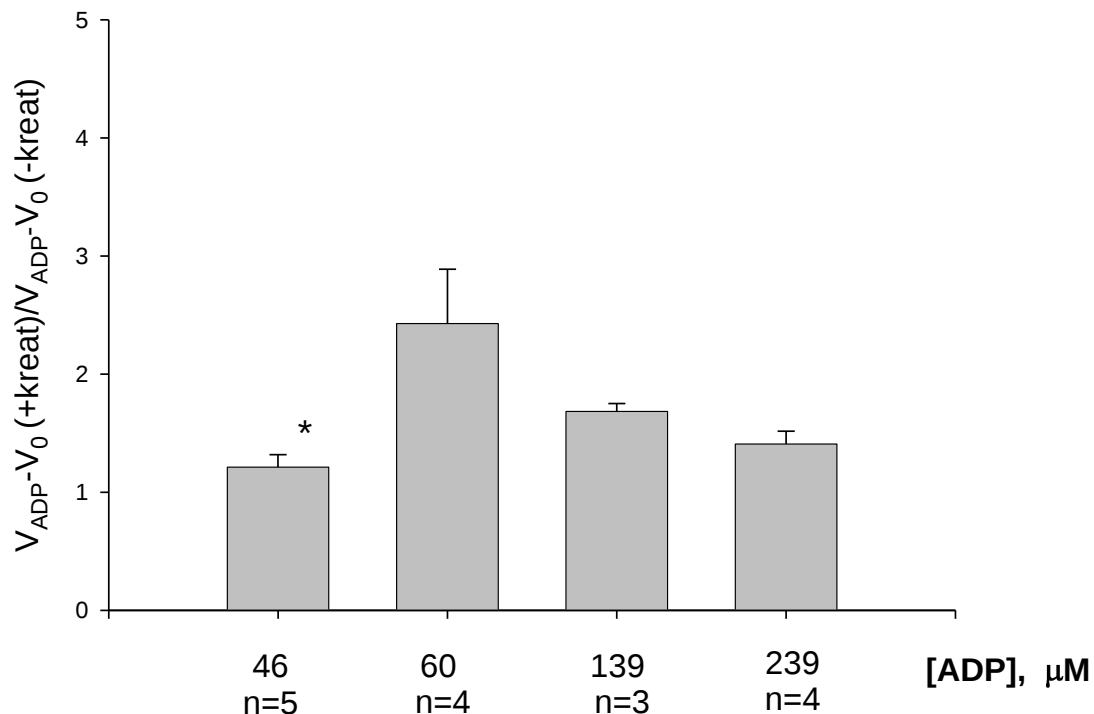
V_{ADP+c} - kvėpavimo greitis esant 1,2 mM ADP ir 30 μM citochromo c.

Kitoje eksperimentų serijoje, naudodami substratą palmitoil-L-karnitiną, širdies raumens skaidulų kvėpavimą analogiškai stimuliuojame egzogeniniu ATP (pridedami į terpę ne ADP, bet ATP). Šiuo atveju miofibrilių ir sarkoplazminio tinklo ATP-azės egzogeninį ATP verčia endogeniniu ADP, kuris tiesiogiai tiekiamas mitochondrijoms [111]. Duomenys, pateikti 26 pav. rodo, kad kreatino efektas, gautas stimuliuojant kvėpavimą egzogeniniu ATP, patikimai nesiskyrė nuo efekto, gauto stimuliuojant egzogeniniu ADP. Be to, naudojant skirtingas ATP koncentracijas, 23 μM ir 37 μM, gautos identiškos kreatino efekto reikšmės.



26 pav. Kreatino įtaka žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimui esant skirtingoms egzogeninio ATP koncentracijoms. Substratas: palmitoil-L-karnitinas 9 μM+malatas 0,24 mM. Pateikti penkių neporinių eksperimentų duomenys. Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio. Gauti tokie kvėpavimo parametrų vidurkiai: V_o = 5,8 ; V_{atp} = 7,6–8,1; V_{kreat} [20 mM] = 10,8; V_{ATP} [1 mM] = 18,2. Matavimų temperatūra 25°C.

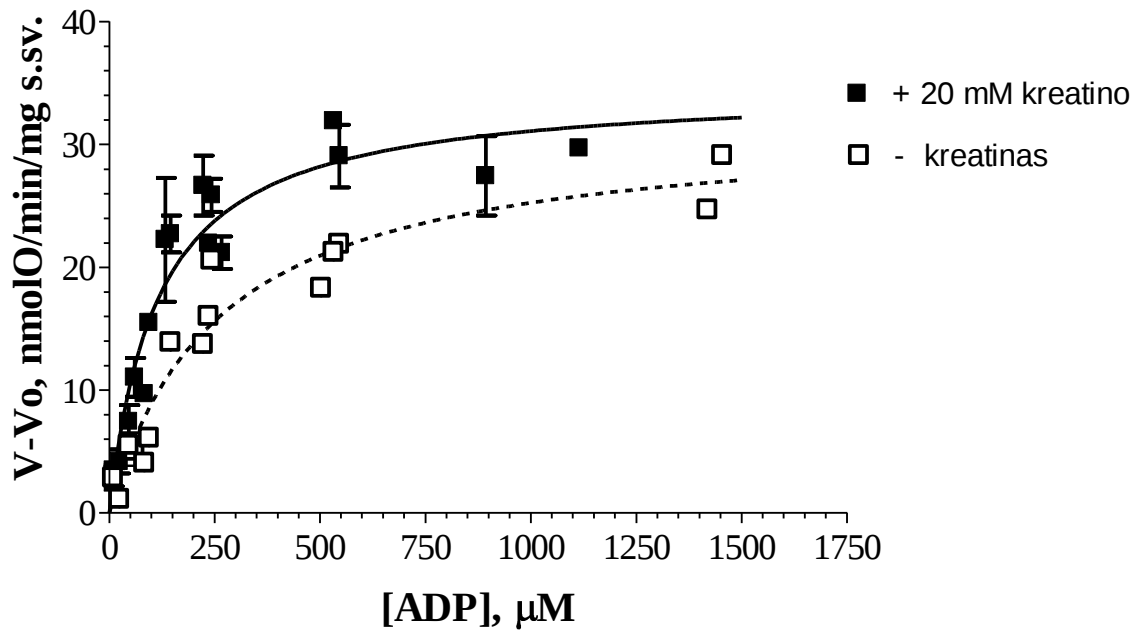
Be to, naudodami substratą oktanoil-DL-karnitiną, tyrėme, kaip kreatino efektas priklauso nuo egzogeninio ADP koncentracijos (27 pav.).



27 pav. Kreatino įtaka mitochondrijų kvėpavimui esant skirtingoms egzogeninio ADP koncentracijoms. Substratas: oktanoil-DL-karnitinas 0,36 mM+malatas 0,24 mM. * $p < 0.05$ lyginant su 60 μM ADP. Duomenys palyginti dispersinės analizės Tukey kriterijumi. Matavimų temperatūra 20°C.

Šioje eksperimentų serijoje skaidulų kvėpavimas buvo lygiagrečiai registruojamas tiek terpėje be kreatino, tiek su 20 mM kreatino. Iš pradinio ir maksimalaus trečios metabolinės būsenos kvėpavimo greičio reikšmių, gautų matuojant kvėpavimą abiejose terpėse, apskaičiuotas greičių skirtumas, t.y. greitis $V_{ADP}-V_0$. Kreatino efektas apskaičiuotas kaip greičių skirtumų $V_{ADP}-V_0$ santykis (27 pav.). Maksimalus kreatino efektas gautas, esant 60 μM ADP koncentracijai. Šis efektas patikimai skyrėsi nuo efekto, gauto, esant mažesnei egzogeninio ADP koncentracijai, būtent 46 μM. Ankstesniuose eksperimentuose, naudojant substratą piruvatą+malatą (6+6 mM), buvo gautas maksimalus kreatino efektas $1,88 \pm 0,14$ (Liobikas J, nepublikuoti duomenys), taigi, šie rezultatai, naudojant oktanoil-DL-karnitiną, patvirtina anksčiau gautus.

Kvėpavimo greičio priklausomybę nuo egzogeninio ADP koncentracijos pagal Michaelis-Menten lygtį nustatėme naudodami substratą oktanoil-DL-karnitiną 0,36 mM (+malatas 0,24 mM) (28 pav.).



28 pav. Žiurkės širdies skaidulų kvėpavimo greičio priklausomybė nuo išorinio ADP koncentracijos ir kreatino. Substratas: oktanoil-DL-karnitinas 0,36 mM+malatas 0,24 mM. Pateikti 7 porinių eksperimentų duomenys. Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio. Gautos nesiskiriančios $V_{\max}$ reikšmės: $29,9 \pm 1,8$ (terpėje be kreatino) ir $31,1 \pm 1,6$ (terpėje su kreatinu). K_m^{ADP} reikšmės: $235 \pm 16 \mu\text{M}$ (terpėje be kreatino), $98 \pm 11 \mu\text{M}$ (terpėje su kreatinu). Matavimų temperatūra 20°C .

Tariamąsias K_m^{ADP} reikšmes skaičiavome iš titravimo ADP-u duomenų. Gavome, kad K_m^{ADP} reikšmės ženkliai skyrėsi terpėje be kreatino ($235 \pm 16 \mu\text{M}$) ir terpėje su 20 mM kreatino ($98 \pm 11 \mu\text{M}$). Taigi, oksiduojantis riebalinės kilmės substratams ir esant matavimo terpėje kreatinui, stimuliuojama mi-CK katalizuojama reakcija, todėl padidėja oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumas ADP-ui.

Išvada, kad kreatinas ženkliai sumažina tariamąją K_m^{ADP} , neprieštarauja kitų darbų rezultatams, kai kvėpavimo substratu buvo naudotas piruvatas+malatas [112].

Kreatino sukeltas kvėpavimo pagreitėjimas esant mažoms ADP koncentracijoms ir tariamosios K_m^{ADP} sumažėjimas atspindi funkcinę sąveiką tarp mi-CK ir ANT mitochondrijų tarpmembraninėje erdvėje, oksiduojantis riebalų rūgštims. Akivaizdu, kad mitochondrijose išsaugoma funkcinė sąveika tarp ADP/ATP nešiklio ir kreatinkinazės, nepaisant ženkliai padidėjusio oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumo ADP-ui, indukuoto oksiduojantis riebalų rūgštims.

6.5. Dekstrano poveikis mitochondrijų *in situ* kvėpavimui bei morfologijai

6.5.1. Makromolekulių įtaka mitochondrijų *in situ* kvėpavimui

Mitochondrijos *in vivo* esti citoplazmoje, kurioje, kaip manoma, yra apie 20–30 proc. baltymų [63]. Yra gerai žinoma [14, 15], kad mitochondrijos, izoliuotos ir inkubuotos izotoninėje terpėje be makromolekulių, nėra panašios į mitochondrijas *in vivo*, priešingai mitochondrijoms *in situ*, t.y. lokalizuotoms saponinu permeabilizuotose širdies ir skeleto raumenų skaidulose [3, 35, 38]. Kadangi izoliavimo metu prarandamas koloidinis osmosinis slėgis, morfologinis mitochondrijų vaizdas yra stipriai pakitęs: padidėjusi tarpmembraninė erdvė, sumažėjęs kontaktinių vietų tarp išorinės ir vidinės membranų skaičius. Tokiose sąlygose mitochondrijos yra dirbtinai išbrinkusios [14, 64], tuo tarpu kai *in situ* jos yra kondensuotoje formoje [113]. Tokios makromolekulės, kaip albuminas, dekstranas, fikolis, polivinilpirolidonas, pridėtos į inkubacijos terpę, gali atstatyti morfologinius pokyčius išoriniame mitochondrijų kompartmente, įvykusius izoliavimo metu. Makromolekulės, nepraeidamos pro nepažeistą išorinę mitochondrijų membraną, sumažina (suspaudžia) mitochondrijų tarpmembraninę erdvę, sudarydamos inkubavimo terpės koloidines-osmosines sąlygas, panašias į esančias citoplazmoje. Manoma, kad dekstranas veikia mitochondrijų funkcijas dėl onkotinio slėgio, kuris priklauso nuo dekstrano koncentracijos [20].

Dekstranas [69] ir kitos makromolekulės [70] ne tik sumažina porino laidumą metabolitams, bet ir sukelia pokyčius įtampai jautriose porose. Dekstrano efekto porino laidumui mechanizmas molekuliniame lygyje buvo paaiškintas taip, kad dėl onkotinio slėgio sumažėja poros skersmuo [70].

Eilė darbų [Kopustinskienė D., magistro tezės], [5] rodo, kad makromolekulių efektas tariamajai oksidacinio fosforilinimo K_m^{ADP} yra skirtingas naudojant įvairius mitochondrijų preparatus, tokius, kaip izoliuotos žiurkės širdies mitochondrijos, saponinu permeabilizuotos žiurkės širdies raumens ir keturgalvio šlaunies raumens skaidulos. Taip yra todėl, kad skiriasi oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumas ADP-ui šiuose preparatuose [36]. Makromolekulių efektas gali būti aiškinamas tuo, kad makromolekulės sukelia struktūrinius pokyčius mitochondrijų išoriniame kompartmente [42]. Buvo iškelta hipotezė, kad makromolekulės mitochondrijų išoriniame kompartmente sudaro nesimaišantį sluoksnį, kuris veikia kaip difuzijos barjeras adenino nukleotidams [20].

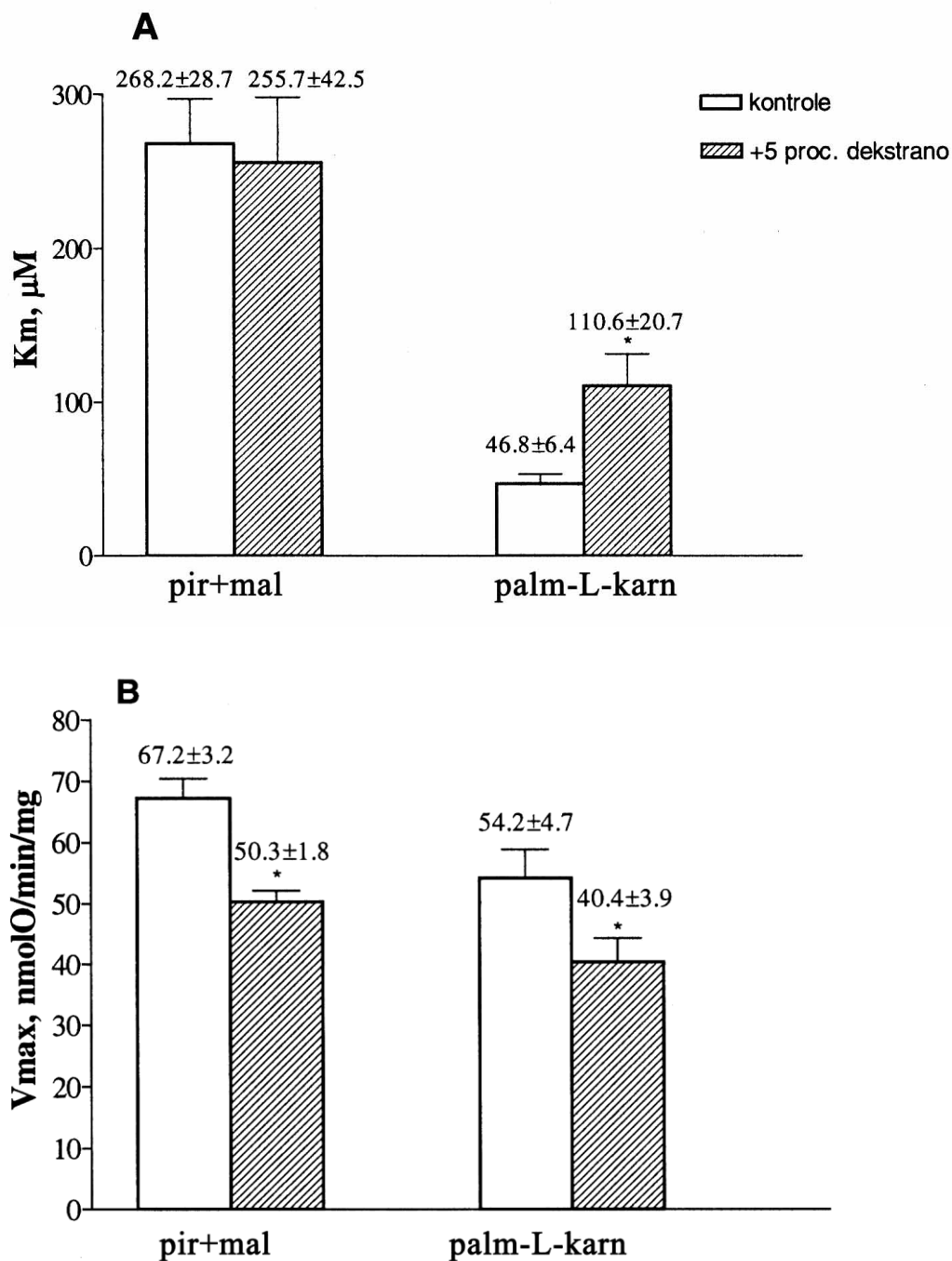
Šiame darbe, naudodami tiek riebalinės, tiek neriebalinės kilmės substratus, tyrėme dekstrano poveikį oksidacinio fosforilinimo sistemos kinetinėms savybėms. Skaidulų kvėpavimui

tirti naudota terpė buvo papildoma 5 proc. dekstranu T-70. Tokiu būdu buvo imituojamas ląstelės citoplazmos onkotinis slėgis. Buvo tiriamas dekstrano poveikis saponinu permeabilizuotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimui, t.y. mitochondrijų *in situ* kvėpavimui.

Prieštaringi rezultatai yra gauti tiriant dekstrano įtaką izoliuotų mitochondrijų kvėpavimo greičiui. Vieni autoriai [20, 42] yra parodę, kad dekstras mažina mitochondrijų kvėpavimo greitį trečioje metabolinėje būsenoje tuo labiau, kuo didesnė naudota dekstrano koncentracija. Kitos studijos [5] parodė, kad 10 proc. dekstrano neturėjo įtakos izoliuotų žiurkės širdies mitochondrijų kvėpavimui ketvirtoje ir trečioje metabolinėse būsenose, bet didino tar. K_m^{ADP} nuo $37 \pm 0.3 \mu M$ iki $94 \pm 6 \mu M$, t.y. 150 proc. Tačiau mūsų darbe tyrimo objektas buvo ne izoliuotos mitochondrijos, bet saponinu apdorotos skaidulos. Šie tyrimo objektai labai skirtingi tiek pagal struktūrą, tiek pagal tiriamus kvėpavimo parametrus.

Šiame darbe atlikti mitochondrijų *in situ* kvėpavimo tyrimai parodė, kad 5 proc. dekstrano vienodu laipsniu, būtent 25 proc. sumažino maksimalų kvėpavimo greitį su abiem substratais, t.y. tiek su piruvatu+malatu, tiek su palmitoil-L-karnitinu (29 pav.).

Gavome, kad mitochondrijoms oksiduojant neriebalinės kilmės substratą piruvatą+malatą terpėje su 5 proc. dekstrano, tariamoji K_m^{ADP} reikšmė nesikeitė ir išliko tokia pati aukšta, kaip ir terpėje be dekstrano. Pažymėtina, kad mažos tar. K_m^{ADP} reikšmės, gautos oksiduojantis palmitoil-L-karnitinui terpėje be dekstrano reikšmingai (50-60 proc.) padidėjo terpėje su 5 proc. dekstrano T-70. Taigi, dekstras keitė (mažino) išorinės mitochondrijų membranos laidumą tik oksiduojantis riebalų rūgštims, bet ne piruvatui+malatui. Svarbu tai, kad gautos K_m^{ADP} reikšmės su palmitoil-L-karnitinu ($110,6 \pm 20,7$) nesiekė K_m^{ADP} reikšmių, gautų su piruvatu+malatu, lygio ($255,7 \pm 42,5$), t.y. buvo daugiau nei dvigubai mažesnės (29 pav.).



29 pav. 5 proc. Dekstrano poveikis tar. K_m^{ADP} (A) ir V_{max} (B) saponinu apdorotose žiurkės širdies raumens skaidulose oksiduojantis skirtingos prigimtės substratams.

Matavimų temperatūra 37°C; n = 4 (neporiniai). *p < 0,05 lyginant be dekstrano. Duomenys palyginti dispersinės analizės Dunett kriterijumi.

5 proc. dekstrano įtaka kitiems saponinu apdorotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo parametrams pateikta 12 lentelėje.

12 lentelė. 5 proc. dekstrano T-70 įtaka saponinu apdorotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo parametrų oksiduojantis dviems skirtingiems substratams.

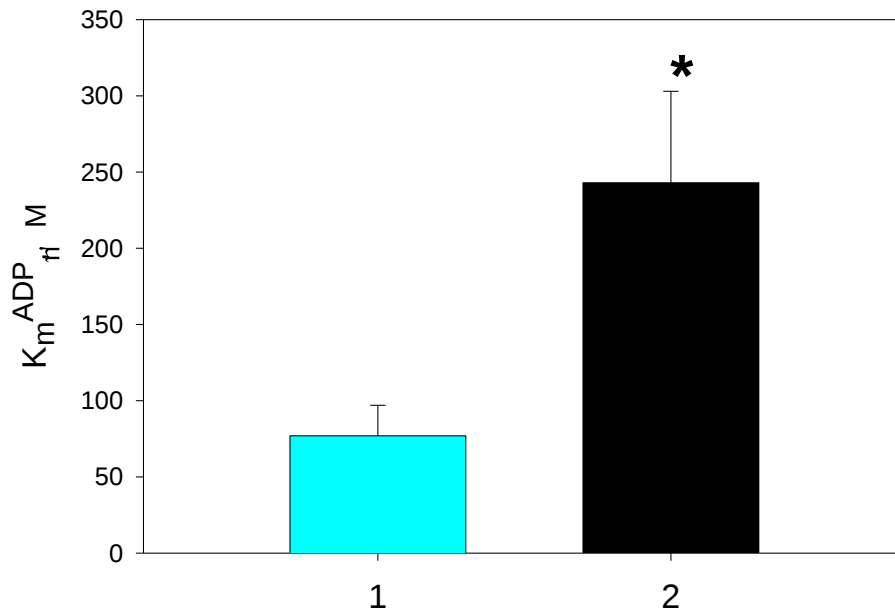
	Piruvatas+malatas (6 mM+6 mM)		Palmitoil-L-karnitinas+malatas (9 μ M+0.24 mM)	
	kontrolė	+5 proc. dekstrano	kontrolė	+5 proc. dekstrano
V_o	26,9 $\pm$ 0,6	27,0 $\pm$ 1,8	18,9 $\pm$ 1,6	19,9 $\pm$ 2,9
V_{ADP}	67,2 $\pm$ 3,2	50,3 $\pm$ 1,8	54,2 $\pm$ 4,7	40,4 $\pm$ 4,0
V_{ADP}/V_o	2,5 $\pm$ 0,2	2,08 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,3
V_{ADP}/V_{atr}	3,2 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,2
$V_{ADP+cvtc}/V_{ADP}$	0,95 $\pm$ 0,0	0,91 $\pm$ 0,0	1,05 $\pm$ 0,1	1,06 $\pm$ 0,1

Matavimų temperatūra 37°C, n = 5 (poriniai su vienu substratu). *p < 0,05 lyginant be dekstrano. Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sauso skaidulų svorio.

Paprastai sąlygose *in vivo* mitochondrijos oksiduoja ne vien riebalų rūgštis, bet substratų mišinį. Remiantis mūsų gautais rezultatais galima manyti, kad riebalų rūgštys *in vivo* mažina tar. K_m^{ADP} , taigi, didina oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumą ADP-ui. Galbūt, riebalų rūgščių oksidacijos sukeltas K_m^{ADP} mažėjimas yra susijęs su morfologiniais mitochondrijų pokyčiais. Kodėl dekstranas nedidina K_m^{ADP} piruvato+malato oksidacijos atveju lieka neaišku. Tačiau galima manyti, kad K_m^{ADP} reikšmė su šiais substratais jau terpėje be dekstrano yra maksimali.

Yra žinoma, kad dekstranas padidina kontaktinių vietų tarp išorinės ir vidinės membranos skaičių [20]. Manoma, kad kontaktinėse vietose suformuojama aplinka, palengvinanti nuo karnitino priklausomą ilgagrandžių riebalų rūgščių transportą [49]. Taigi, tuo remiantis galima paaiškinti dėl dekstrano poveikio sumažėjusį oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumą ADP-ui oksiduojantis ilgagrandėms riebalų rūgštims.

Kitoje eksperimentų serijoje mitochondrijų kvėpavimo substratu naudojome oktanoil-L-karnitiną+malatą (0,36 mM + 0,24 mM). Mūsų rezultatai rodo, jog oksiduojantis šiam substratui 5 proc. dekstrano pridėjimas į matavimo terpę apie 3 kartus padidino tariamąją K_m^{ADP} reikšmę ($243 \pm 60 \mu\text{M}$) lyginant su terpe be dekstrano ($77 \pm 20 \mu\text{M}$) (30 pav.).



30 pav. Dekstrano įtaka tariamajai K_m^{ADP} saponinu apdorotose žiurkės širdies raumens skaidulose.

1 – oktanoil-L-karnitinas+malatas (0,36 mM+0,24 mM), n = 7;

2 – oktanoil-L-karnitinas+malatas (0,36 mM+0,24 mM) + 5proc. dekstrano T-70, n = 7;

*p < 0.05 lyginant su kontrole (1). Duomenys palyginti Stjudento t-testu.

Matavimų temperatūra 37 °C.

13 lentelėje pateikti saponinu permeabilizuotų skaidulų kvėpavimo parametrai oksiduojant oktanoil-L-karnitiną+malatą. Esant terpėje 5 proc. dekstrano, kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje nesikeitė, o maksimalus trečios metabolinės būsenos mitochondrijų kvėpavimo greitis (V_{ADP}) sumažėjo 21 proc. lyginant su greičiu terpėje be dekstrano, t.y. panašiu laipsniu, kaip ir oksiduojantis palmitoil-L-karnitinui bei piruvatui+malatui. Dėl to sumažėjo ir mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientas.

13 lentelė. 5 proc. dekstrano T-70 įtaka saponinu permeabilizuotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo parametrams.

	Substratai		n	V_o	V_{ADP}	$V_{ADP+citc}/V_{ADP}$	V_{ADP}/V_o
1	Oktanoil-L-karnitinas malatas [0,36 mM+ 0,24 mM]	+	7	41 ± 2	135 ± 15	$1,06 \pm 0,02$	$3,27 \pm 0,3$
2	Oktanoil-L-karnitinas malatas [0,36 mM+ 0,24 mM] + 5 proc. dekstrano	+	5	39 ± 3	107 ± 14	$1,01 \pm 0,02$	$2,61 \pm 0,2$

V_o - kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje (nesant ADP); V_{ADP} - kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje (esant 1 mM ADP); $V_{ADP+citc}/V_{ADP}$ - citochromo efektas (kartais) po citochromo c (30 μ M) pridėjimo; V_{ADP}/V_o - kvėpavimo kontrolės koeficientas. Mitochondrijų kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio. Sausų skaidulų svoris = drėgnų skaidulų svoris/4.85.

Anksčiau laboratorijoje atlikti eksperimentai naudojant saponinu apdorotų skaidulų kvėpavimo substratu sukcinatą parodė, kad 10 proc. dekstrano-15 statistiškai reikšmingai mažino tiek trečios, tiek ir ketvirtos metabolinės būsenos (V_o) greičius atitinkamai 33 proc ir 17 proc. [Kopustinskienė D., magistro tezės]. Ankstesniuose darbuose su izoliuotoms mitochondrijoms gauta, kad dekstranas-15 nekeitė trečios būsenos greičio V_{ADP} nei su piruvatu+malatu, nei su sukcinatu, tačiau abiejų substratų atvejais didino (57 proc.) ketvirtos būsenos greitį V_o [Kopustinskienė D., magistro tezės].

Tolesniame darbe įvertinome didesnės (10 proc.) koncentracijos dekstrano T-70 poveikį piruvatą+malatą bei palmitoil-L-karnitiną oksiduojančių saponinu apdorotų skaidulų kvėpavimo parametrams, kurie pateikti 14 lentelėje.

Oksiduojant piruvatą+malatą pridėtas į matavimo terpę dekstranas statistiškai patikimai mažino kvėpavimo kontrolę (nuo $2,6 \pm 0,1$ iki $1,9 \pm 0,1$), t.y. 27 procentais, trečios metabolinės būsenos mitochondrijų kvėpavimo greitį (nuo $82,9 \pm 5,9$ iki $50,7 \pm 4,3$), t.y. 39 procentais, bei antros metabolinės būsenos greitį (nuo $31,4 \pm 1,8$ iki $26,1 \pm 1,1$), t.y. 17 procentų. Palmitoil-L-karnitino oksidacijos atveju dekstranas statistiškai patikimai mažino trečios metabolinės būsenos greitį – nuo $53,1 \pm 6,5$ iki $31,8 \pm 1,5$ (40 proc.).

14 lentelė. 10 proc. dekstrano T-70 įtaka saponinu apdorotų žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo parametrams naudojant du skirtingus substratus.

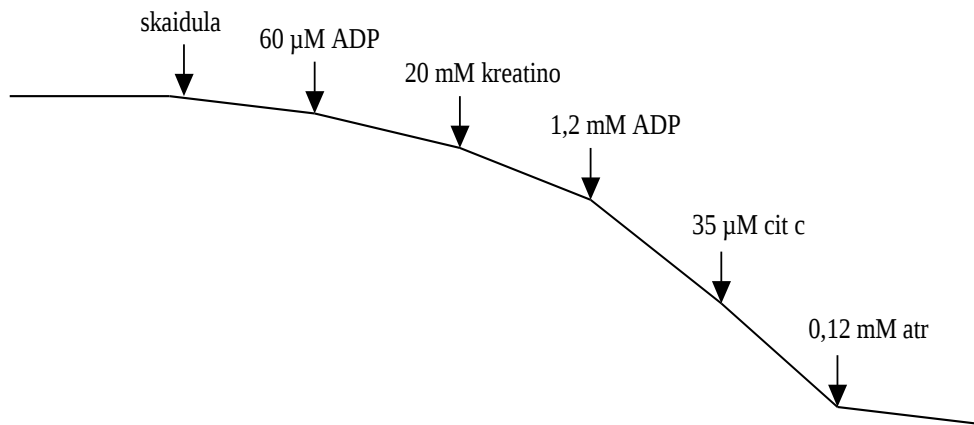
	<i>Piruvatas+malatas</i> (6 mM+6 mM)		<i>Palmitoil-L-karnitinas+malatas</i> (9 μM+0.24 mM)	
	<i>kontrolė</i>	<i>+10 proc. dekstrano</i>	<i>kontrolė</i>	<i>+10 proc. dekstrano</i>
V _o	31,4 ± 1,8	26,1 ± 1,1*	22,1 ± 1,9	21,6 ± 0,9
V _{ADP}	82,9 ± 6,0	50,7 ± 4,3*	53,1 ± 6,5	31,8 ± 1,5*
V _{ADP} /V _o	2,6 ± 0,1	1,9 ± 0,1*	2,2 ± 0,2	1,4 ± 0,1
V _{ADP} /V _{atr}	3,9 ± 0,3	3,1 ± 0,2	2,5 ± 0,6	1,5 ± 0,1
V _{ADP+citc} /V _{ADP}	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1

Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio. Matavimų temperatūra 37°C; n = 4 (poriniai). *p < 0,05 lyginant be dekstrano. Duomenys palyginti dispersinės analizės Tukey kriterijumi.

Be to, įvertinome 10 proc. dekstrano T-70 poveikį izoliuotų mitochondrijų kvėpavimo greičiui esant 37°C temperatūrai. Gavome, kad 10 proc. dekstrano T-70 skaidulų matavimo terpėje nekeitė nei antro, nei trečio izoliuotų mitochondrijų kvėpavimo greičio: V_o = 62,6 nmolO/min/mg, V_{ADP} = 551 nmolO/min/mg terpėje be dekstrano; V_o = 55,9 nmolO/min/mg, V_{ADP} = 492,8 nmolO/min/mg terpėje su dekstranu. Visuose eksperimentuose buvo įvertinama, ar nepažeista išorinė mitochondrijų membrana. Citochromo c poveikis į trečios metabolinės būsenos greitį kito nuo 0,91 iki 1,1, o į ketvirtos metabolinės būsenos greitį – nuo 1,3 iki 1,4. Taigi, 10 proc. dekstrano statistškai patikimai mažino kvėpavimo kontrolę bei trečią greitį, oksiduojantis tiek riebalinės, tiek ir neriebalinės kilmės substratui.

Kitoje eksperimentų serijoje siekėme nustatyti 5 proc. dekstrano T-70 įtaką funkicinei sąveikai tarp mi-CK ir ANT mitochondrijose *in situ* oksiduojantis riebalų rūgštims. Yra žinoma, kad kreatinas aktyvina ADP gamybą per mitochondrinę kreatinkinazę, kuri funkciškai susijusi su ANT, todėl stimuliuoja kvėpavimą. Taigi, vyksta betarpiškas (tiesioginis) substratų bei produktų tuneliavimas. Funkcinės sąveikos tarp mi-CK ir ANT efektyvumą atspindi kreatino efektas [2, 38]. Kuo ši sąveika stipresnė, tuo stimuliuojantis kvėpavimą kreatino efektas didesnis. Kreatinas, aktyvindamas mi-CK reakciją, gali tiesiogiai kontroliuoti energijos gamybą mitochondrijose [12].

Eksperimentas buvo atliekamas, kaip schematiškai parodyta 31 paveiksle: užregistravus pradinį greitį V_o, kvėpavimas buvo stimuliuojamas pridedant 60 μM ADP, tada pridedama 20 mM kreatino jo efektui įvertinti, po to 1,2 mM ADP maksimaliam kvėpavimui pasiekti. Po ADP buvo pridedama 35 μM citochromo c išorinės membranos intaktiškumui įvertinti ir galiausiai 0,12 mM atraktilozido (inhibuojant ANT) ketvirtos metabolinės būsenos greičiui įvertinti.



31 pav. Žiurkės širdies raumens skaidulų kvėpavimo greičio registravimo kreatinu aktyvinant kreatino kinazę schema.

15 lentelėje pateikta tiek kreatino efektas, tiek ir kvėpavimo parametrai naudojant 5 proc. dekstraną (terpė be dekstrano naudota kaip kontrolė).

15 lentelė. 5 proc dekstrano įtaka kreatino efektui naudojant du skirtingus substratus.

	<i>Piruvatas+malatas</i> (6 mM+6 mM)		<i>Palmitoil-L-karnitinas+malatas</i> (9 μM+0.24 mM)	
	<i>kontrolė</i>	<i>+5 proc. dekstrano</i>	<i>kontrolė</i>	<i>+5 proc. dekstrano</i>
V_o	11,8 ± 0,3	11.2 ± 0,5	9,8 ± 0,6	7,8 ± 0,6
V_{adp}	17,5 ± 0,5	15.1 ± 0,5	15,2 ± 1,1	13,6 ± 1,1
V_{kreat}	21,7 ± 0,5	17.6 ± 0,5	18,9 ± 1,1	14,6 ± 2,3
V_{ADP}	47,7 ± 1,6	34.6 ± 2,0	25,1 ± 1,7	19,8 ± 1,0
$V_{ADP+citc}/V_{ADP}$	0,93 ± 0,04	1,01 ± 0,02	1,05 ± 0,04	1,02 ± 0,03
V_{ADP}/V_{atr}	4,9 ± 0,7	3,2 ± 0,3	2,9 ± 0,4	2,3 ± 0,1
V_{citc}/V_{atr}	1,15 ± 0,09	1,05 ± 0,01	1,21 ± 0,03	1,18 ± 0,07
V_{kreat}/V_{adp}	1,25 ± 0,05	1,17 ± 0,02	1,25 ± 0,05	1,31 ± 0,10
V_{ADP}/V_o	4,0 ± 0,2	3,3 ± 0,3	2,6 ± 0,2	2,9 ± 0,3

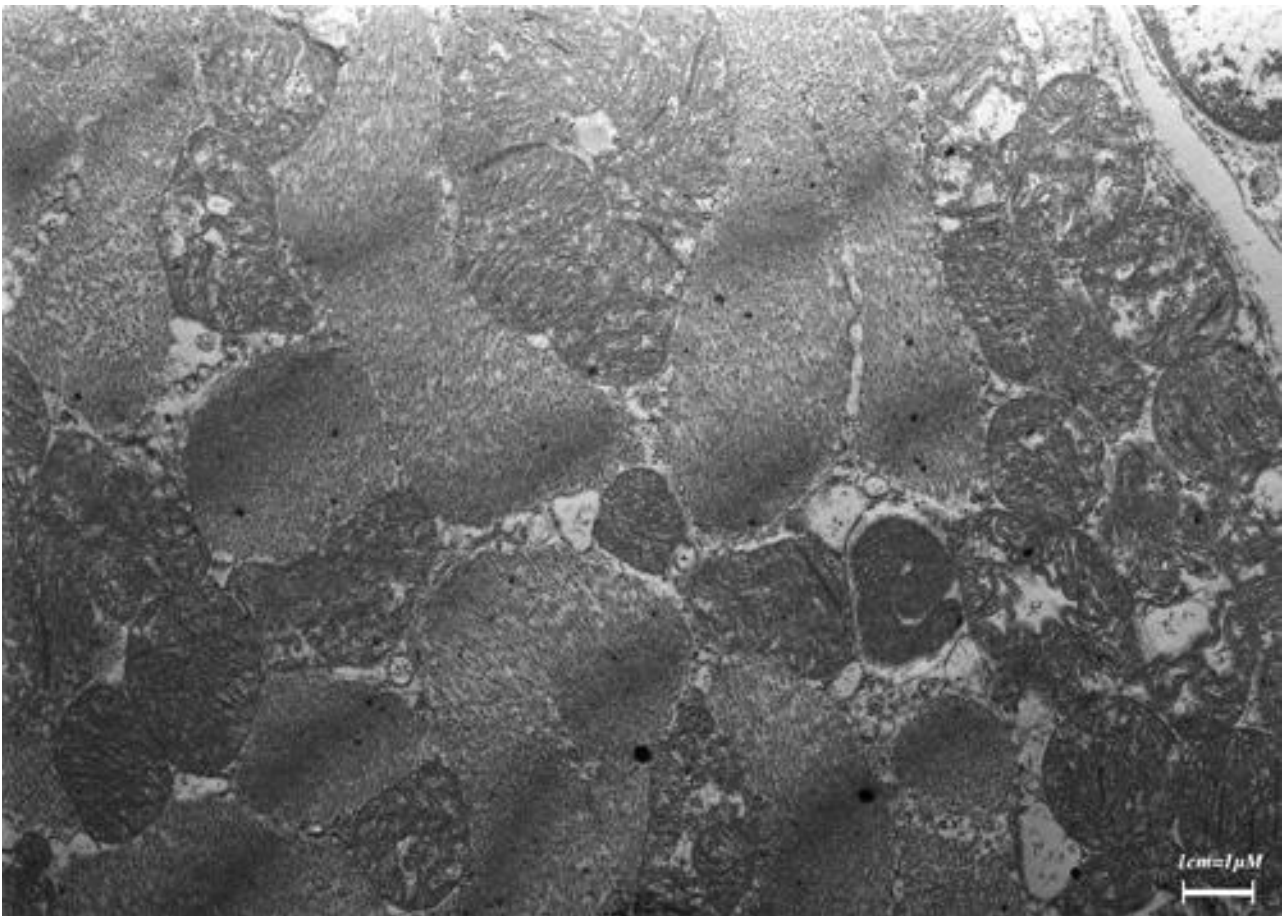
Kvėpavimo greitis išreikštas nmolO/min/mg sausų skaidulų svorio. Matavimų temperatūra 20°C; n = 4 (poriniai). V_{adp} - kvėpavimo greitis su 60 μM ADP, V_{ADP} - kvėpavimo greitis su 1,2 mM ADP.

Kreatino efektas terpėje be dekstrano reikšmingai nesiskyrė tarp piruvato+malato ir palmitoil-L-karnitino. Tai patvirtino anksčiau tokiam pat eksperimentiniame modelyje gautas nežymiai didesnes kreatino efekto reikšmes su šiais abiem substratais (žiūr.11 lent.).

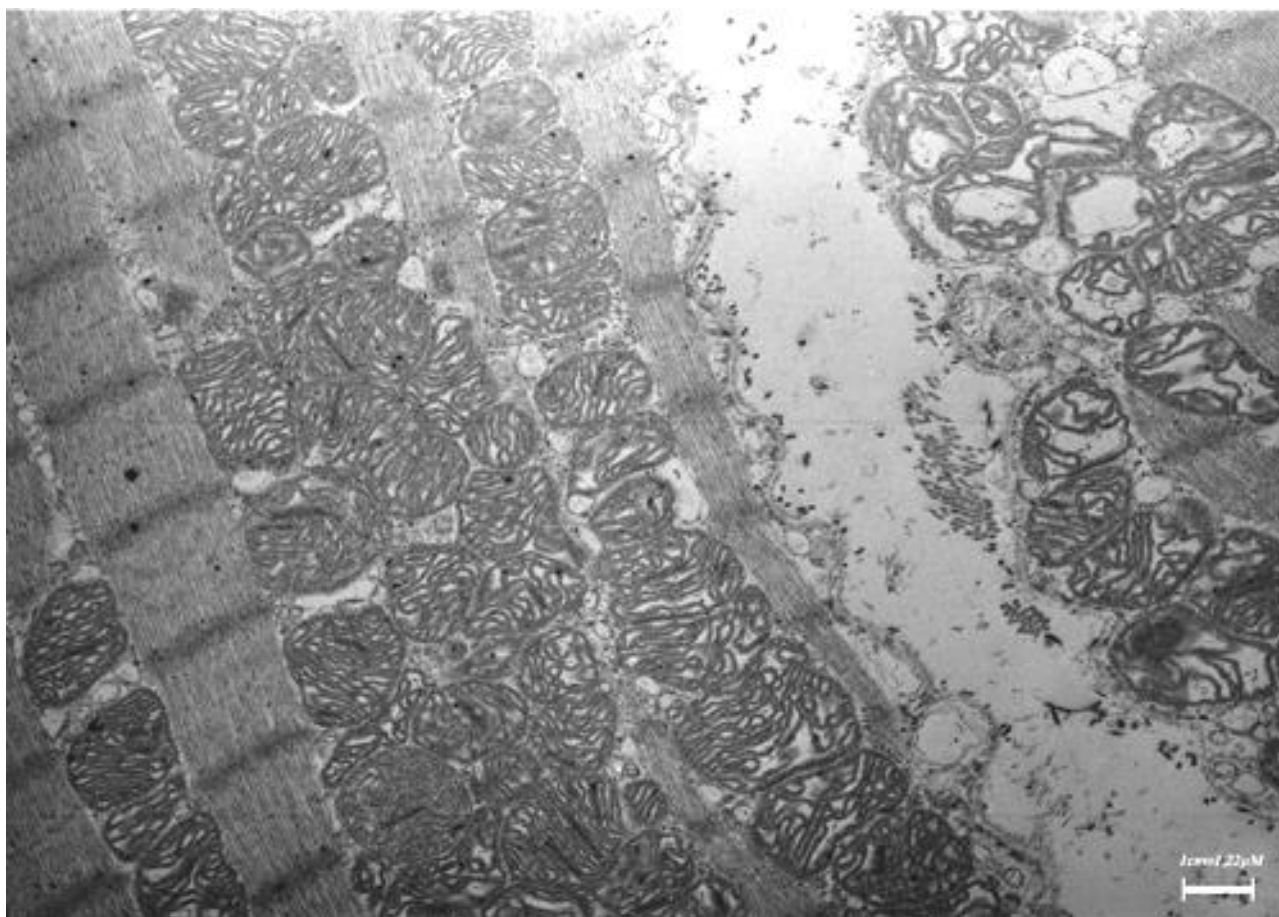
Terpėje su 5 proc. dekstranu taip pat neaptikome reikšmingų kreatino efektų skirtumų, gautų su šiais dviem substratais. Tai demonstruoja, kad makromolekulės, būtent 5 proc. dekstranas T-70, nekeičia funkcinės sąveikos efektyvumo tarp mi-CK ir ANT, oksiduojantis skirtingos prigimties substratams.

6.5.2. Riebalų rūgščių oksidacijos bei dekstrano poveikis mitochondrijų *in situ* morfologijai

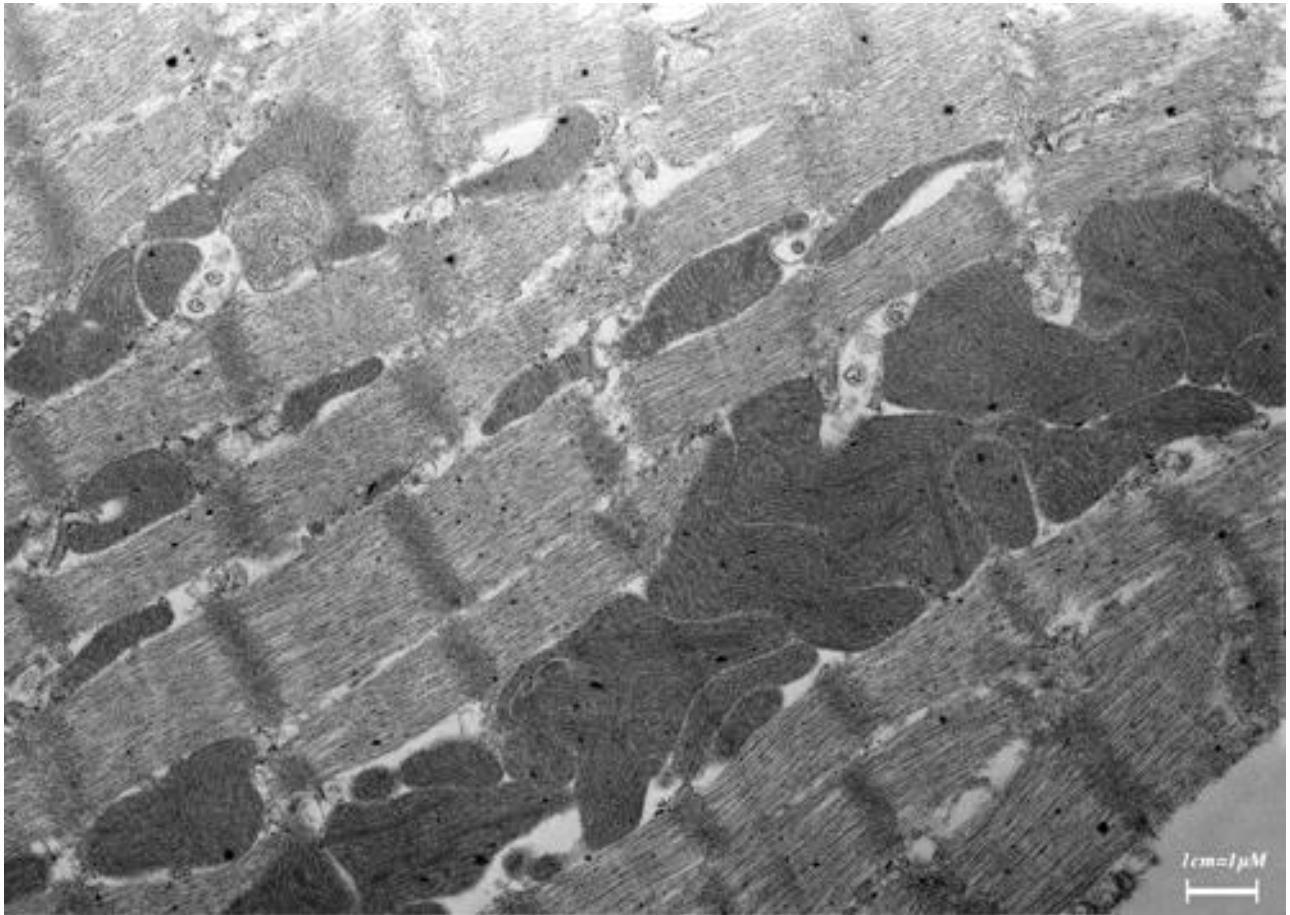
Elektroninės mikroskopijos metodu pabandėme įvertinti dekstrano T-70 poveikį žiurkės širdies raumens mitochondrijų morfologijai *in situ*. Tipinės nuotraukos pateiktos 32–34 paveiksluose, o 35 paveiksle parodytas padidintas mitochondrijų vaizdas, gautas iš tipinių nuotraukų.



32 pav. Mitochondrijų morfologija žiurkės širdies raumens saponinu permeabilizuotose skaidulose po inkubacijos (5 min 37°C) matavimo terpėje su piruvatu+malatu (6+6 mM); x 10 000.

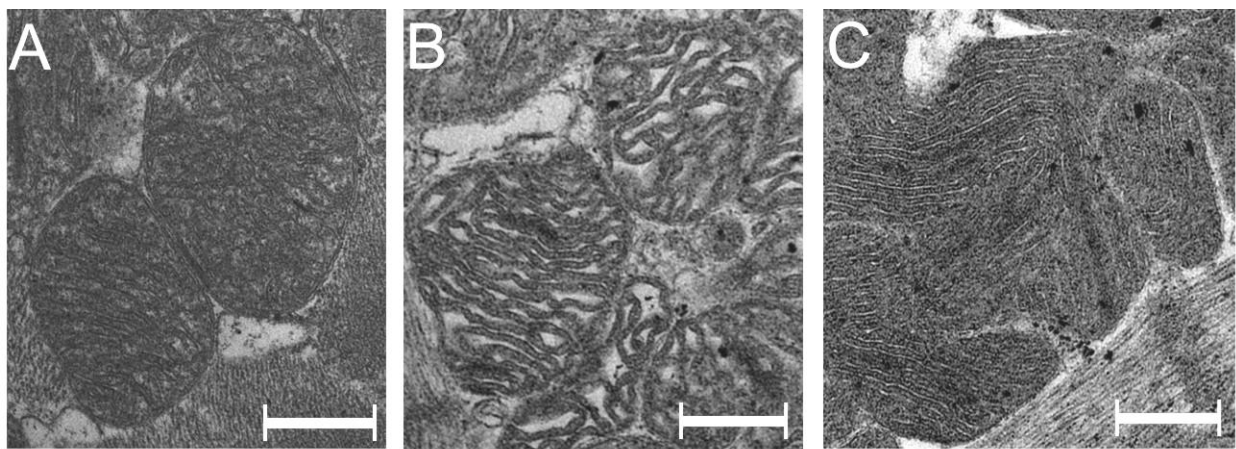


33 pav. Mitochondrijų morfologija žiurkės širdies raumens saponinu permeabilizuotose skaidulose po inkubacijos (5 min 37°C) matavimo terpėje su palmitoil-L-karnitinu (9 μ M); x 8200.



34 pav. Mitochondrijų morfologija žiurkės širdies raumens saponinu permeabilizuotose skaidulose po inkubacijos (5 min 37°C) matavimo terpėje su palmitoil-L-karnitinu (9 μ M) + 5 proc. dekstrano T-70; x 10 000.

Kai skaidulos buvo inkubuotos poliarografinėje kiuvetėje maišant realiose skaidulų kvėpavimo sąlygose su piruvatu+malatu (35 pav. **A**), mitochondrijos nuotraukoje atrodo tamsesnės ir kompaktiškesnės, nei inkubuotos su palmitoil-L-karnitinu (35 pav. **B**). Paimavus skaidulas su riebalų rūgštimis, dalyje mitochondrijų įvyksta morfologiniai pokyčiai, galbūt susiję su mitochondrijų ertmės tarp išorinės ir vidinės membranos padidėjimu ir matrikso susitraukimu (35 pav. **B**). Tačiau į terpę įdėjus 5 proc. dekstrano T-70, onkotinis slėgis pakeitė žiurkės širdies raumens skaidulų mitochondrijų morfologiją – stebimos „tamsios mitochondrijos“, matrikso sutankėjimas (35 pav. **C**).



35 pav. Mitochondrijų morfologija žiurkės širdies raumens saponinu apdorotose skaidulose.

A – saponinu permeabilizuotos skaidulos po inkubacijos (5 min 37°C) matavimo terpėje su piruvatu + malatu (6+6 mM).

B – saponinu permeabilizuotos skaidulos po inkubacijos (5 min 37°C) matavimo terpėje su palmitoil-L-karnitinu (9 μM).

C – saponinu permeabilizuotos skaidulos po inkubacijos (5 min 37°C) matavimo terpėje su palmitoil-L-karnitinu (9 μM) + 5 proc. dekstrano T-70.

Pastaba: terpė buvo pastoviai maišoma magnetine maišykle oksigrafo kiuvetėje greičiu, naudojamu oksigrafiniuose skaidulų kvėpavimo tyrimuose.

Galima manyti, kad mitochondrijų struktūros pokyčius nulemia riebalų rūgščių sąveika su adenino nukleotidų nešikliu ANT. Žinoma, kad šis nešiklis gali turėti 2 konformacijas: arba C-konformaciją (kai nukleotidus surišanti vieta nukreipta į citozolį; inhibitorius atraktilatas), arba M-konformaciją (kai surišanti vieta nukreipta į matriksą; inhibitorius bonkrekinė rūgštis) [107]. Gali būti, kad riebalų rūgščių oksidacijos sukeltas tariamosios K_m^{ADP} sumažėjimas yra susijęs su ANT konformaciniais pokyčiais: ANT pereina iš būsenos, pasižyminčios mažu giminingumu ADP

(didele tariamąja K_m^{ADP}) į būseną, kurioje giminigumas ADP yra didesnis (maža tariamoji K_m^{ADP}). Tariamosios K_m^{ADP} sumažėjimas taip pat vyksta išemijos metu, kai iš mitochondrijų išeina citochromas c [1]. Neseniai buvo susietas citochromo c išėjimas iš mitochondrijų su ANT konformaciniu perėjimu iš M į C būseną [114]. Remiantis šiais duomenimis, galima būtų padaryti prielaidą, kad ANT C konformacijoje pasižymi didesniu giminigumu ADP (maža tariamąja K_m^{ADP}).

Pridėjus dekstrano mitochondrijų struktūra darosi panašesnė į struktūrą *in vivo*. Tai, kad dekstranas vienodu laipsniu mažina maksimalų kvėpavimo oksiduojantis tiek piruvatui+malatui, tiek palmitoil-L-karnitinui, patvirtino kitų tyrėjų gautus rezultatus. Interpretuojant tokius rezultatus gali kilti klausimas, ar iš tiesų dekstranas ir kitokios makromolekulės imituoja onkotinį slėgį, kaip teigiama daugelyje darbų. Tačiau neaišku, ar mūsų naudota terpė be makromolekulių, pagal druskų sąstatą artima fiziologinei terpei, iš tiesų yra tikrasis teisingas atskaitos taškas. Galbūt sąlygose *in vivo* laidumas ADP-ui yra žemesnis, t.y. artimas nustatytam terpėje su makromolekulėmis *in vitro*. Tas faktas, kad dekstranas veikia suspausdamas tarpmembraninę erdvę ir padidindamas kontaktinių vietų skaičių, rodo eksperimentinių sąlygų priartinimą prie sąlygų *in vivo*.

7. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Šiame darbe, siekiant išsiaiškinti riebalų rūgščių vaidmenį reguliuojant oksidacinį fosforilinimą, tyrimo objektu pasirinkome saponinu permeabilizuotas žiurkės širdies raumens skaidulas. Ši skaidulų tyrimo metodika leidžia įvertinti visą ląstelės mitochondrijų populiaciją *in situ*, t.y. jų neišskiriant iš ląstelės, ir padeda suprasti, kaip mitochondrijų veikla reguliuojama *in vivo*.

Ankstesni darbai [4] parodė, kad tar. K_m^{ADP} reikšmė, gauta oksiduojantis sočiajai riebalų rūgščiai palmitoil-L-karnitinui, yra žymiai mažesnė, nei oksiduojantis piruvatui+malatui. Taigi, buvo padaryta prielaida, kad išorinė mitochondrijų membrana yra žymiai pralaidesnė ADP, oksiduojantis riebaliniam substratui palmitoil-L-karnitinui. Šio eksperimentinio darbo metu gauta, kad mitochondrijose *in situ* oksiduojantis įvairios struktūros riebalų rūgštims (nesočioji riebalų rūgštis oleoil-CoA+L-karnitinas+malatas, neaktyvuota dekanoinė rūgštis+piruvatas+malatas) oksidacinio fosforilinimo tariamoji K_m^{ADP} sumažėja panašiu laipsniu (iki 56–76 μM) lyginant su piruvato+malato oksidacija. Taip veikė netgi maža (2 μM) palmitoil-L-karnitino koncentracija mišinyje su piruvatu+malatu. Gavome, kad šis riebalų rūgščių poveikis tar. K_m^{ADP} yra grįžtamas. Kai piruvato+malato arba sukcinato oksidacija vyksta iškart po riebalų rūgščių oksidacijos, gautos didelės tar. K_m^{ADP} reikšmės (atitinkamai 210,6 μM ir 164,8 μM).

Svarbu buvo išsiaiškinti, ar išlieka funkcinė sąveika tarp mi-CK ir ANT oksiduojantis riebalinės kilmės substratams. Tuo tikslu įvertinome 20 mM kreatino poveikį skaidulų kvėpavimo parametrus, naudojant neriebalinės kilmės substratą piruvatą+malatą bei riebalinės kilmės substratą palmitoil-L-karnitiną (+malatą). Gavome panašų stimuliuojantį skaidulų kvėpavimą kreatino efektą $V_{\text{kreat}}/V_{\text{adp}}$ su šiais abiem skirtingos prigimties substratais. Šis parametras, mitochondrijoms oksiduojant palmitoil-L-karnitiną, nepriklausė nuo ADP patekimo į mitochondrijas kelio (iš inkubacijos terpės ar iš kitų ląstelės organelių). Pažymėtina, kad oksiduojantis oktanoil-DL-karnitinui, kreatinas sumažino tariamąją K_m^{ADP} reikšmę 2,4 karto. Remdamiesi gautais eksperimentiniais duomenimis galime teigti, kad oksiduojantis riebalų rūgštims išsaugoma funkcinė sąveika tarp kreatino kinazės ir ANT, nepaisant ženklaus tar. K_m^{ADP} reikšmės sumažėjimo.

Temperatūros padidėjimas nuo 25°C iki 37°C palmitoil-L-karnitino oksidacijos atveju sumažino tariamąją K_m^{ADP} 2,6 karto. Stimuliuojant kvėpavimą tiek egzogeniniu ADP, tiek ir egzogeniniu ATP nustatytos žemos tariamosios K_m^{ADP} ir K_m^{ATP} reikšmės, oksiduojantis palmitoil-L-karnitinui, lyginant su piruvato oksidacija. Tai rodo, kad reguliuojantis oksidacinį fosforilinimą

riebalų rūgščių efektas nepriklauso nuo ADP patekimo į mitochondrijas kelio (egzogeninio ar endogeninio, t.y. pagaminto ląstelės ATP-azių). Be to, jis pasireiškė abiejose minėtose temperatūrose.

Stimuliuojant kvėpavimą egzogeniniu ATP, esant terpėje ADP-suvartojančiai piruvatkinazės+fosfoenolpiruvato (PK+PEP) sistemai, buvo tiriama tiek neriebalinės (glutamato), tiek riebalinės kilmės (palmitoil-L-karnitino) substratų oksidacija. 40 U/ml PK panašiu laipsniu (apie 30 proc.) slopino šių substratų oksidaciją.

Užinhibuotą PK+PEP kvėpavimą kreatinas (20 mM) atstatė abiejų substratų oksidacijos atvejais. Gauti rezultatai rodo, kad didžioji dalis endogeninio ADP, susidariusio iš egzogeninio ATP, nėra prieinama egzogeninei PK+PEP sistemai ir kad tiesiogiai tuneliuojant ADP iš ATP-azių į mitochondrijas kreatinkinazės sistema vaidina svarbų vaidmenį reguliuojant kvėpavimą ir pernešant energiją tarp viduląstelių energijos panaudojimo bei pagaminimo vietų, nepaisant ženklaus K_m^{ADP} sumažėjimo, indukuoto riebalų rūgščių oksidacijos.

Papildydami terpę makromolekulėmis (dekstranu T-70) pabandėme imituoti onkotinį slėgį, būdingą ląstelei *in vivo* ir pabandyti atsakyti į klausimą, ar riebalų rūgščių poveikis reguliuojant oksidacinį fosforilinimą gali pasireikšti *in vivo*. Mitochondrijoms oksiduojant neriebalinės kilmės substratą piruvatą+malatą terpėje su 5 proc. dekstrano, tariamoji K_m^{ADP} reikšmė nesikeitė ir išliko tokia pati aukšta, kaip ir terpėje be dekstrano. Pažymėtina, kad mažos tar. K_m^{ADP} reikšmės, gautos oksiduojantis palmitoil-L-karnitinui terpėje be dekstrano reikšmingai (50–60 proc.) padidėjo terpėje su 5 proc. dekstrano T-70. Taigi, dekstranas mažino išorinės oksidacinio fosforilinimo sistemos giminingumą ADP-ui tik oksiduojantis riebalų rūgštims, bet ne piruvatui+malatui. Tačiau K_m^{ADP} reikšmės su palmitoil-L-karnitinu nepasiekė K_m^{ADP} reikšmių, gautų su piruvatu+malatu, lygio. Taigi, remiantis mūsų gautais rezultatais galima manyti, kad mažinantis tar. K_m^{ADP} riebalų rūgščių poveikis turėtų pasireikšti *in vivo*.

Šiame darbe atlikti mitochondrijų *in situ* kvėpavimo tyrimai taip pat parodė, kad 5 proc. dekstrano vienodu laipsniu, būtent 25 proc. sumažino maksimalų kvėpavimo greitį su abiem substratais, t.y. tiek su piruvatu+malatu, tiek su palmitoil-L-karnitinu. Naudojant substratu oktanoil-L-karnitiną+malatą šį parametą 5 proc. dekstrano priedas sumažino panašiu laipsniu – 21 proc.

Didesnė (10 proc.) dekstrano koncentracija ženkliau, tačiau vienodu laipsniu (39–40 proc.) mažino trečios metabolinės būsenos mitochondrijų kvėpavimo greitį oksiduojantis tiek riebalinės, tiek ir neriebalinės kilmės substratui. Taigi, dekstranas mažina trečios metabolinės būsenos mitochondrijų kvėpavimo greitį priklausomai nuo koncentracijos. Galima manyti, kad dėl padidėjusio terpės klampumo apsunkinamas substratų patekimas į mitochondrijas. Atviras lieka klausimas, ar dekstranas iš tiesų imituoja onkotinį slėgį *in vivo*.

Elektroninės mikroskopijos metodu pabandėme įvertinti dekstrano T-70 poveikį žiurkės širdies raumens mitochondrijų morfologijai *in situ*. Gavome, kad painkubavus skaidulas su riebalų rūgštimis, dalyje mitochondrijų įvyksta morfologiniai pokyčiai, susiję su mitochondrijų ertmės tarp išorinės ir vidinės membranos padidėjimu ir matrikso susitraukimu. Tačiau į terpę pridėjus 5 proc. dekstrano, onkotinis slėgis pakeitė žiurkės širdies raumens skaidulų mitochondrijų morfologiją – stebėtas matrikso sutankėjimas ir tarpmembraninės erdvės sumažėjimas.

Galima manyti, kad mitochondrijų struktūros pokyčius nulemia riebalų rūgščių sąveika su adenino nukleotidų nešikliu. Ši sąveika nulemia ANT perėjimą iš vienos konformacijos į kitą.

8. IŠVADOS

1. Riebalų rūgščių, vienu ar mišinyje su piruvatu, oksidacija žiurkės širdies saponinu apdorotų skaidulų mitochondrijose nepriklausomai nuo jų koncentracijos ir struktūros kelis kartus sumažina oksidacinio fosforilavimo kinetinės konstantos K_m^{ADP} reikšmes, lyginant su piruvato+malato oksidacija. Šis poveikis yra grįžtamas, t.y. riebalų rūgščių oksidacija nedaro įtakos po jos vykstančiai neriebalinės kilmės substratų oksidacijai.
2. Oksiduojantis riebalų rūgštims, tariamoji oksidacinio fosforilavimo sistemos K_m^{ADP} sumažėjo vienodai, nepriklausomai nuo to, ar mitochondrijų kvėpavimas buvo stimuliuotas egzogeniniu, ar endogeniniu ADP.
3. Vienodas slopinantis širdies raumens skaidulų kvėpavimą ADP-naudojančios egzogeninės PK+PEP sistemos efektas ATP stimuliuotam trečios metabolinės būsenos greičiui su tirtais skirtingos prigimties substratais (glutamatu+malatu ir palmitoil-L-karnitinu) rodo, kad mitochondrijų išorėje abiem atvejais yra panašus ADP kiekis. Tai leidžia teigti, kad riebalų rūgščių oksidacijos sąlygotas K_m^{ADP} sumažėjimas yra nesusijęs su mitochondrijų išorinės membranos laidumo ADP pokyčiais.
4. Oksiduojantis skirtingos prigimties substratams (piruvatui+malatui ir palmitoil-L-karnitinui) kreatino efektas yra panašus. Tai rodo, kad oksiduojantis riebalų rūgštims yra išlikusi funkcinė sąveika tarp ADP/ATP nešiklio ir kreatino kinazės ir kad kreatino kinazės sistema veikia vienodai efektyviai nepriklausomai nuo oksiduojamo substrato prigimties.
5. Sąlygoms *in vivo* būdingo onkotinio slėgio imitavimui naudotas 5 proc. dekstrano T-70 priedas ženkliai padidina tariamąją K_m^{ADP} reikšmę oksiduojantis palmitoil-L-karnitinui, tačiau nepasiekia reikšmės, būdingos piruvatui+malatui. Elektroninės mikroskopijos nuotraukų analizė rodo, kad riebalų rūgščių sąlygotas K_m^{ADP} sumažėjimas gali būti susijęs su mitochondrijų struktūros pokyčiais – galimu mitochondrijų tarpmembraninės ertmės išsiplėtimu.

9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Saks VA, Kapelko VI, Kupriyanov VV, Kuznetsov AV, Lakomkin VL, Veksler VI, et al. Quantitative evaluation of relationship between cardiac energy metabolism and post-ischemic recovery of contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21 Suppl 1:67-78.
2. Saks VA, Kuznetsov AV, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova JO, Kesvatera T, et al. Control of cellular respiration in vivo by mitochondrial outer membrane and by creatine kinase. A new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:625-45.
3. Kuznetsov AV, Tiivel T, Sikk P, Kaambre T, Kay L, Daneshrad Z, et al. Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur J Biochem* 1996;241:909-15.
4. Toleikis A, Liobikas J, Trumbeckaite S, Majiene D. Relevance of fatty acid oxidation in regulation of the outer mitochondrial membrane permeability for ADP. *FEBS Lett* 2001;509:245-9.
5. Liobikas J, Kopustinskiene DM, Toleikis A. What controls the outer mitochondrial membrane permeability for ADP: facts for and against the role of oncotic pressure. *Biochim Biophys Acta* 2001;1505:220-5.
6. Savabi F. Interaction of creatine kinase and adenylate kinase systems in muscle cells. *Mol Cell Biochem* 1994;133-134:145-52.
7. Saks VA, Kaambre T, Sikk P, Eimre M, Orlova E, Paju K, et al. Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J* 2001;356:643-57.
8. Neely JR, Denton RM, England PJ, Randle PJ. The effects of increased heart work on the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis in the perfused rat heart. *Biochem J* 1972;128:147-59.
9. Seppet EK, Eimre M, Andrienko T, Kaambre T, Sikk P, Kuznetsov AV, et al. Studies of mitochondrial respiration in muscle cells in situ: use and misuse of experimental evidence in mathematical modelling. *Mol Cell Biochem* 2004;256-257:219-27.
10. Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova OY, Kuznetsov AV. Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol Cell Biochem* 1994;133-134:155-92.

11. Voloshchuk SG, Belikova YO, Klyushnik TP, Benevolensky DS, Saks VA. Comparative study of respiration kinetics and protein composition of skinned fibers from various types of rat muscle. *Biochemistry (Mosc)* 1998;63:155-8.
12. Saks VA, Kongas O, Vendelin M, Kay L. Role of the creatine/phosphocreatine system in the regulation of mitochondrial respiration. *Acta Physiol Scand* 2000;168:635-41.
13. Dzeja PP, Terzic A, Wieringa B. Phosphotransfer dynamics in skeletal muscle from creatine kinase gene-deleted mice. *Mol Cell Biochem* 2004;256-257:13-27.
14. Bakeeva LE, Chentsov YS, Jasaitis AA, Skulachev VP. The effect of oncotic pressure on heart muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1972;275:319-32.
15. Gellerich FN, Laterveer FD, Zierz S, Nicolay K. The quantitation of ADP diffusion gradients across the outer membrane of heart mitochondria in the presence of macromolecules. *Biochim Biophys Acta* 2002;1554:48-56.
16. Laterveer FD, Nicolay K, Gellerich FN. ADP delivery from adenylate kinase in the mitochondrial intermembrane space to oxidative phosphorylation increases in the presence of macromolecules. *FEBS Lett* 1996;386:255-9.
17. Laterveer FD, Nicolay K, Gellerich FN. Experimental evidence for dynamic compartmentation of ADP at the mitochondrial periphery: coupling of mitochondrial adenylate kinase and mitochondrial hexokinase with oxidative phosphorylation under conditions mimicking the intracellular colloid osmotic pressure. *Mol Cell Biochem* 1997;174:43-51.
18. Gellerich FN, Khuchua ZA, Kuznetsov AV. Influence of the mitochondrial outer membrane and the binding of creatine kinase to the mitochondrial inner membrane on the compartmentation of adenine nucleotides in the intermembrane space of rat heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1993;1140:327-34.
19. Gellerich FN, Kapischke M, Kunz W, Neumann W, Kuznetsov A, Brdiczka D, et al. The influence of the cytosolic oncotic pressure on the permeability of the mitochondrial outer membrane for ADP: implications for the kinetic properties of mitochondrial creatine kinase and for ADP channelling into the intermembrane space. *Mol Cell Biochem* 1994;133-134:85-104.
20. Gellerich FN, Laterveer FD, Korzeniewski B, Zierz S, Nicolay K. Dextran strongly increases the Michaelis constants of oxidative phosphorylation and of mitochondrial creatine kinase in heart mitochondria. *Eur J Biochem* 1998;254:172-80.
21. Mildažienė V, Jarmalaitė S, Daugelavičius R. *Laistelės biologija*. Kaunas: Vytauto Didžiojo universiteto leidykla; 2004. p. 183.

22. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Hertel K, Zierz S, Muller-Werdan U, Werdan K, et al. Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. *Shock* 1999;11:336-41.
23. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1065-89.
24. Hoppel CL, Kerner J, Turkaly P, Turkaly J, Tandler B. The malonyl-CoA-sensitive form of carnitine palmitoyltransferase is not localized exclusively in the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1998;273:23495-503.
25. Fraser F, Zammit VA. Enrichment of carnitine palmitoyltransferases I and II in the contact sites of rat liver mitochondria. *Biochem J* 1998;329 (Pt 2):225-9.
26. Turkaly P, Kerner J, Hoppel C. A 22 kDa polyanion inhibits carnitine-dependent fatty acid oxidation in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 1999;460:241-5.
27. Zammit VA, Fraser F, Orstorphine CG. Regulation of mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase (CPT I): role of membrane-topology. *Adv Enzyme Regul* 1997;37:295-317.
28. Velasco G, Passilly P, Guzman M, Latruffe N. Loss of response of carnitine palmitoyltransferase I to okadaic acid in transformed hepatic cells. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1485-8.
29. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997;77:731-58.
30. Neely JR, Liebermeister H, Battersby EJ, Morgan HE. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol* 1967;212:804-14.
31. Lardy HA, Wellman H. The catalytic effect of 2,4-dinitrophenol on adenosinetriphosphate hydrolysis by cell particles and soluble enzymes. *J Biol Chem* 1953; 201:357-70.
32. Holian A, Owen CS, Wilson DF. Control of respiration in isolated mitochondria: quantitative evaluation of the dependence of respiratory rates on [ATP], [ADP], and [Pi]. *Arch Biochem Biophys* 1977;181:164-71.
33. Hansford RG. Dehydrogenase activation by Ca²⁺ in cells and tissues. *J Bioenerg Biomembr* 1991;23:823-54.
34. Mildaziene V, Baniene R, Nauciene Z, Bakker BM, Brown GC, Westerhoff HV, et al. Calcium indirectly increases the control exerted by the adenine nucleotide translocator over 2-oxoglutarate oxidation in rat heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1995;324:130-4.

35. Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, et al. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem* 1998;184:81-100.
36. Kay L, Li Z, Mericskay M, Olivares J, Tranqui L, Fontaine E , et al. Study of regulation of mitochondrial respiration in vivo. An analysis of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1997;1322:41-59.
37. Chance B, Williams GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 1956;17:65-134:65-134.
38. Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 1987;892:191-6.
39. Toleikis A, Majiene D, Trumbeckaite S, Dagys A, Jasaitis A. The effect of collagenase and temperature on mitochondrial respiratory parameters in saponin-skinned cardiac fibers. *Biosci Rep* 1996;16:513-9.
40. Levitsky DO, Skulachev VP. Carnitine: the carrier transporting fatty acyls into mitochondria by means of an electrochemical gradient of H^+ . *Biochim Biophys Acta* 1972;275:33-50.
41. Toleikis A, Trumbeckaite S, Majiene D. Cytochrome C effect on respiration of heart mitochondria: influence of various factors. *Biosci Rep* 2005;25:387-97.
42. Laterveer FD, Gellerich FN, Nicolay K. Macromolecules increase the channeling of ADP from externally associated hexokinase to the matrix of mitochondria. *Eur J Biochem* 1995;232:569-77.
43. Kay L, Saks VA, Rossi A. Early alteration of the control of mitochondrial function in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:3399-411.
44. Aflalo C. Localized firefly luciferase probes ATP at the surface of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29:549-59.
45. Wyss M, Wallimann T. Metabolite channelling in aerobic energy metabolism. *J Theor Biol* 1992;158:129-32.
46. Saks VA, Vasil'eva E, Belikova Y, Kuznetsov AV, Lyapina S, Petrova L, et al. Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: possible role of mitochondrial outer membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1993;1144:134-48.
47. Colombini M, Blachly-Dyson E, Forte M. VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels* 1996;4:169-202.

48. Brdiczka D, Wallimann T. The importance of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism. *Mol Cell Biochem* 1994;133-134:69-83.
49. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:1-17.
50. Dzeja PP, Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol Cell Biochem* 1998;184:169-82.
51. Kongas O, van Beek JH. Diffusion barriers for ADP in the cardiac cell. *Mol Biol Rep* 2002;29:141-4.
52. Kongas O, Wagner MJ, ter Veld F, Nicolay K, van Beek JH, Krab K. The mitochondrial outer membrane is not a major diffusion barrier for ADP in mouse heart skinned fibre bundles. *Pflugers Arch* 2004;447:840-4.
53. Goni FM, Requero MA, Alonso A. Palmitoylcarnitine, a surface-active metabolite. *FEBS Lett* 1996;390:1-5.
54. Elizarova GV, Sukhanov AA, Saks VA. [Myofibrillar creatine kinase: reversible binding to contractile proteins, stoichiometric ratio to myosin and its functional role]. *Biokhimiia* 1987;52:667-75.
55. Fritz-Wolf K, Schnyder T, Wallimann T, Kabsch W. Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature* 1996;381:341-5.
56. Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1992;1102:119-66.
57. ter Veld F, Bruggeman F, Jeneson J, Nicolay K. On the role of mi-cK and VDAC in mitochondrial function of heart muscle cells. *Mol Biol Rep* 2002;29:183-6.
58. van Dorsten FA, Reese T, Gellerich JF, van Echteld CJ, Nederhoff MG, Muller HJ, et al. Fluxes through cytosolic and mitochondrial creatine kinase, measured by P-31 NMR. *Mol Cell Biochem* 1997;174:33-42.
59. Schlattner U, Dolder M, Wallimann T, Tokarska-Schlattner M. Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem* 2001;276:48027-30.
60. Vyssokikh MY, Brdiczka D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 2003;50:389-404.
61. Dzeja PP, Terzic A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 2003;206:2039-47.

62. Saks VA, Kuznetsov AV, Vendelin M, Guerrero K, Kay L, Seppet EK. Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism. *Mol Cell Biochem* 2004;256-257:185-99.
63. Fulton AB. How crowded is the cytoplasm? *Cell* 1982;30:345-7.
64. Wrogemann K, Nylen EG, Adamson I, Pande SV. Functional studies on in situ-like mitochondria isolated in the presence of polyvinyl pyrrolidone. *Biochim Biophys Acta* 1985;806:1-8.
65. Hou L, Lanni F, Luby-Phelps K. Tracer diffusion in F-actin and Ficoll mixtures. Toward a model for cytoplasm. *Biophys J* 1990;58:31-43.
66. Luby-Phelps K. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol* 2000;192:189-221.
67. Luby-Phelps K. Physical properties of cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:3-9.
68. Wicker U, Bucheler K, Gellerich FN, Wagner M, Kapschke M, Brdiczka D. Effect of macromolecules on the structure of the mitochondrial inter-membrane space and the regulation of hexokinase. *Biochim Biophys Acta* 1993;1142:228-39.
69. Gellerich FN, Wagner M, Kapschke M, Wicker U, Brdiczka D. Effect of macromolecules on the regulation of the mitochondrial outer membrane pore and the activity of adenylate kinase in the inter-membrane space. *Biochim Biophys Acta* 1993;1142:217-27.
70. Zimmerberg J, Parsegian VA. Polymer inaccessible volume changes during opening and closing of a voltage-dependent ionic channel. *Nature* 1986;323:36-9.
71. Benz R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* 1994;1197:167-96.
72. Liobikas J. Išorinės mitochondrijų membranos barjerinė funkcija ir jos vaidmuo mitochondrijų energetiniam metabolizmui. Doktoro disertacija. Kauno Medicinos universitetas; 2000.
73. Vyssokikh MY, Zorova L, Zorov D, Heimlich G, Jurgensmeier JJ, Brdiczka D. Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect. *Mol Biol Rep* 2002;29:93-6.
74. Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1368:7-18.

75. Lemeshko VV, Solano S, Lopez LF, Rendon DA, Ghafourifar P, Gomez LA. Dextran causes aggregation of mitochondria and influences their oxidoreductase activities and light scattering. *Arch Biochem Biophys* 2003;412 :176-85.
76. Doran E, Halestrap AP. Cytochrome c release from isolated rat liver mitochondria can occur independently of outer-membrane rupture: possible role of contact sites. *Biochem J* 2000;348 Pt 2:343-50.
77. Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995;1241:139-76.
78. Halestrap AP. The regulation of the oxidation of fatty acids and other substrates in rat heart mitochondria by changes in the matrix volume induced by osmotic strength, valinomycin and Ca²⁺. *Biochem J* 1987;244:159-64.
79. Devin A, Guerin B, Rigoulet M. Dependence of flux size and efficiency of oxidative phosphorylation on external osmolarity in isolated rat liver mitochondria: role of adenine nucleotide carrier. *Biochim Biophys Acta* 1996;1273:13-20.
80. Tsujimoto Y, Nakagawa T, Shimizu S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:1297-300.
81. Van Nieuwenhoven FA, Van der Vusse GJ, Glatz JF. Membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Lipids* 1996;31 Suppl:S223-S227.
82. Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzell AV, Banaszak LJ. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr* 1997;17:277-303.
83. Kunau WH, Dommes V, Schulz H. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 1995;34:267-342.
84. Watkins PA. Fatty acid activation. *Prog Lipid Res* 1997;36:55-83.
85. Hesler CB, Olymbios C, Haldar D. Transverse-plane topography of long-chain acyl-CoA synthetase in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 1990;265:6600-5.
86. Praškevičius A, Ivanovienė L, Stasiūnienė N et al. Biochemija. Kaunas: KMU leidykla; 2003. p. 312.
87. Fraser F, Corstorphine CG, Zammit VA. Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. *Biochem J* 1997;323 (Pt 3):711-8.
88. Rostovtseva T, Colombini M. ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 1996;271:28006-8.

89. Mynatt RL, Greenhaw JJ, Cook GA. Cholate extracts of mitochondrial outer membranes increase inhibition by malonyl-CoA of carnitine palmitoyltransferase-I by a mechanism involving phospholipids. *Biochem J* 1994;299 (Pt 3):761-7.
90. Watmough NJ, Bhuiyan AK, Bartlett K, Sherratt HS, Turnbull DM. Skeletal muscle mitochondrial beta-oxidation. A study of the products of oxidation of [U-14C]hexadecanoate by h.p.l.c. using continuous on-line radiochemical detection. *Biochem J* 1988;253:541-7.
91. Eaton S, Pourfarzam M, Bartlett K. The effect of respiratory chain impairment of beta-oxidation in rat heart mitochondria. *Biochem J* 1996;319 (Pt 2):633-40.
92. Schaefer J, Pourfarzam M, Bartlett K, Jackson S, Turnbull DM. Fatty acid oxidation in peripheral blood cells: characterization and use for the diagnosis of defects of fatty acid oxidation. *Pediatr Res* 1995;37:354-60.
93. Nada MA, Rhead WJ, Sprecher H, Schulz H, Roe CR. Evidence for intermediate channeling in mitochondrial beta-oxidation. *J Biol Chem* 1995;270:530-5.
94. Dyck JR, Lopaschuk GD. Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1099-109.
95. Skulachev VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 1991;294:158-62.
96. Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1998;1363:100-24.
97. Schonfeld P. Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? *FEBS Lett* 1990;264:246-8.
98. Rottenberg H, Hashimoto K. Fatty acid uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochemistry* 1986;25:1747-55.
99. Andreyev AY, Bondareva TO, Dedukhova VI, Mokhova EN, Skulachev VP, Volkov NI. Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids. *FEBS Lett* 1988;226:265-9.
100. Andreyev AY, Bondareva TO, Dedukhova VI, Mokhova EN, Skulachev VP, Tsofina LM, et al. The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. *Eur J Biochem* 1989;182:585-92.
101. Samartsev VN, Smirnov AV, Zeldi IP, Markova OV, Mokhova EN, Skulachev VP. Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1997;1319:251-7.

102. Schonfeld P, Wieckowski MR, Wojtczak L. Long-chain fatty acid-promoted swelling of mitochondria: further evidence for the protonophoric effect of fatty acids in the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett* 2000;471:108-12.
103. Wieckowski MR, Brdiczka D, Wojtczak L. Long-chain fatty acids promote opening of the reconstituted mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* 2000;484:61-4.
104. Sultan A, Sokolove PM. Palmitic acid opens a novel cyclosporin A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *Arch Biochem Biophys* 2001;386:37-51.
105. Di Paola M, Cocco T, Lorusso M. Arachidonic acid causes cytochrome c release from heart mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:128-33.
106. Henderson P.J.F. Enzyme assays. A Practical approach. IRL Press; 1992. p. 277 -315.
107. Nicholls D.G., Ferguson S.J. Bioenergetics 3. Academic Press; 2001. p. 26.
108. Seppet EK, Kaambre T, Sikk P, Tiivel T, Vija H, Tonkonogi M, et al. Functional complexes of mitochondria with Ca,MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2001;1504:379-95.
109. Kay L, Nicolay K, Wieringa B, Saks V, Wallimann T. Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells in situ. *J Biol Chem* 2000;275:6937-44.
110. Saks VA, Kupriyanov VV, Elizarova GV, Jacobus WE. Studies of energy transport in heart cells. The importance of creatine kinase localization for the coupling of mitochondrial phosphorylcreatine production to oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 1980;255:755-63.
111. Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R. Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* 2001;89:153-9.
112. Laclau MN, Boudina S, Thambo JB, Tariosse L, Gouverneur G, Bonoron-Adele S, et al. Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:947-56.
113. Schwerzmann K, Hoppeler H, Kayar SR, Weibel ER. Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:1583-7.
114. Machida K, Hayashi Y, Osada H. A novel adenine nucleotide translocase inhibitor, MT-21, induces cytochrome c release by a mitochondrial permeability transition-independent mechanism. *J Biol Chem* 2002;277:31243-8.

10. PASKELBTI DARBAI

STRAIPSNIAI

1. **Kuršvietienė L., Toleikis A., Praškevičius A.** The role of creatine and fatty acids in the regulation of mitochondrial respiration // *Biologija-2003*, vol.4, p.3-6.
2. **Kuršvietienė L., Dagys A., Praškevičius A., Toleikis A.** Regulation of mitochondrial respiration by endogenous ADP versus exogenous ADP: influence of temperature and fatty acids // *Biologija-2004*, vol. 2, Suppl 2, p.46-49.
3. **Kuršvietienė L., Trumbeckaitė S., Majienė D., Praškevičius A., Toleikis A.** The role of different fatty acids in the regulation of mitochondrial respiration *in situ* // *Biologija-2006*, vol.3, p.35-37.

TEZĖS

1. **Kuršvietienė L., Trumbeckaitė S., Majienė D., Praškevičius A., Toleikis A.** Įvairių riebalų rūgščių vaidmuo reguliuojant mitochondrijų kvėpavimą *in situ* // *Biochemija: mokslas ir žinių visuomenė: Lietuvos biochemikų draugijos IX-asis suvažiavimas-konferencija: 2006 m.birželio mėn. 16-18 d., Tolieja (Molėtų raj.) - 2006*, p.49.
2. **Toleikis A., Trumbeckaitė S., Majienė D., Kuršvietienė L., Dagys A.** Relevance of fatty acid oxidation in regulation of the outer mitochondrial membrane permeability of ADP // *Российская биоэнергетика: от молекул к клетке: Москва, 21-23 февраля 2005 г.* с.65.
3. **Kuršvietienė L., Trumbeckaitė S., Majienė D., Toleikis A.** Relevance of fatty acid oxidation in regulation of the outer mitochondrial membrane permeability for ADP // *Mitochondria in Myocytes: methodological Aspects and Dysfunction in Cardiovascular Disease: First Nord-Baltic postgraduate summer school in cellular bioenergetics: Tartu, June 15-21, 2005*, p.65.
4. **Kuršvietienė L., Dagys A., Praškevičius A., Toleikis A.** Mitochondrijų kvėpavimo reguliavimas endogeniniu bei egzogeniniu adenozindifosfatu: temperatūros ir riebalų rūgščių įtaka // *Biochemija mokslų sandūroje: Lietuvos biochemikų draugijos VIII-asis suvažiavimas-konferencija: 2004 m.birželio mėn. 18-20 d., Tolieja (Molėtų raj.) - 2004*, p.47.

11. PADĖKA

Už pagalbą ruošiant disertaciją dėkoju visam BMTI Biochemijos laboratorijos kolektyvui, ypač dr. **Sonatai Trumbeckaitei** ir dr. **Daivai Majienei**.

Už geranoriškumą, pakantumą, kantrybę, pastabumą dirbant eksperimentinį darbą ir rašant disertaciją dėkoju darbo vadovui gerb. prof. **Adolfui Toleikiui**. Už patarimus ir vertingas pastabas dėkoju gerb. dr. **Vilmantei Borutaitei** bei **Jurgitai Grigienei**. Už paskatinimą imtis šio darbo ačiū gerb. prof. **Antanui Praškevičiui**.

Už moralinę pagalbą didelis ačiū mielai mano šeimynai: **Rimui, Indrei ir Laurai**.

Be jūsų visų šis darbas nebūtų išvydęs dienos šviesos. Sėkmės Jums visuose Jūsų darbuose, sveikatos, stiprybės, džiaugsmo. Telydi Jus visokeriopa sėkmė.