

ЭФФЕКТЫ САЛИЦИЛОВОЙ И АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТ В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2024 г. Т.В. Ильич*, #, А.И. Савко*, Т.А. Коваленя*, Е.А. Лапшина*, И.Б. Заводник*

*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
бульв. Ленинского Комсомола, 5, Гродно, 230009, Беларусь

#E-mail: ilich_tv@grsu.by

Поступила в редакцию 16.01.2024 г.

После доработки 06.02.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

С целью дальнейшего выяснения механизмов фармакологических эффектов салициловой и ацетилсалициловой кислот изучены взаимодействия этих кислот с митохондриальными и эритроцитарными мембранами и оценена роль ионов кальция/протонов в эффектах салицилатов. Салициловая и, в меньшей степени, ацетилсалициловая кислоты в концентрации 0.5–2.0 мМ эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс, нарушая сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования, индуцировали деполяризацию митохондриальной мембраны и потенцировали Ca^{2+} -стимулируемое формирование митохондриальных пор высокой проницаемости в средах, не содержащих ЭГТА. Циклоспорин А и рутений красный частично ингибировали процесс открытия митохондриальных пор, индуцируемый салициловой и ацетилсалициловой кислотами как в отсутствие, так и в присутствии ионов Ca^{2+} . Салициловая кислота (180–360 мкМ) выраженно ускоряла протон-индуцированный лизис (при pH 3.2) эритроцитов человека и вызывала гиперполяризацию мембран эритроцитов (при pH 5.5, но не при pH 7.4), вероятно, в результате переноса протонов в цитоплазму клетки. Таким образом, салициловая и ацетилсалициловая кислоты взаимодействуют с митохондриальными и плазматическими мембранами, выступают эффективными протоно-/ Ca^{2+} -ионофорами, стимулируют митохондриальный кальциевый унипортер.

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота, салициловая кислота, митохондрии печени крыс, эритроциты человека, ионы кальция.

DOI: 10.31857/S0006302924050073, EDN: MKGOYO

Ацетилсалициловая кислота (АСК, аспирин), нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП), представляет собой наиболее известный и наиболее часто назначаемый лекарственный препарат, эффективное жаропонижающее, антитромбическое и обезболивающее средство. Противовоспалительное действие АСК проявляется в первую очередь опосредовано путем ингибирования синтеза простагландинов. Один из основных механизмов действия аспирина связан с прямой модификацией (ацетилированием) остатков аминокислоты серина в молекулах бел-

ков и ферментов [1]. Лечение острых и хронических сердечно-сосудистых заболеваний связано с длительным приемом НПВП, в первую очередь салицилатов. В то же время последние клинические и эпидемиологические исследования демонстрируют новые механизмы действия и новые, в том числе противораковые, эффекты аспирина и других НПВП [2], возможность коррекции нейродегенеративной патологии. Недавно показано, что салсалат (Salsalate), пролекарство, метаболизирующее в организме до салицилата, демонстрирует благоприятные эффекты при диабете 2 типа и неалкогольной жировой болезни печени, уменьшает уровень глюкозы и содержание липидов в печени [3]. Ранее мы показали благоприятные эффекты длительного введения АСК при экспериментальном диабете у крыс, которые, как мы предполагаем, связаны с конкуренцией реакций неферментативного гликозилирования и ацетилирования белков АСК [4].

Сокращения: АСК — ацетилсалициловая кислота, НПВП — нестероидный противовоспалительный препарат, СК — салициловая кислота, VDAC — потенциал-зависимый анионный канал, МРТР — митохондриальная пора высокой проницаемости, ЭГТА — натриевая соль этиленгликольтетрауксусной кислоты, RuR — рутений красный, CsA — циклоспорин А, DiSC3(5) — 3,3'-дипропил-тиадикарбоцианин иодид, MCU — митохондриальный кальциевый унипортер.

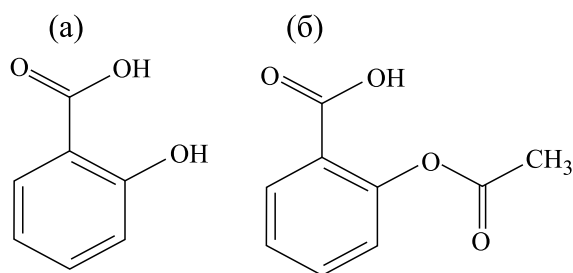


Рис. 1. Структурные формулы салициловой (а) и ацетилсалициловой (б) кислот.

Постоянный интерес к биохимическим эффектам салициловой и ацетилсалициловой кислот (рис. 1) направлен на выяснение тонких регуляторных механизмов и поиск новых фармакологических приложений этих лекарственных средств. Многие фармакологические и токсические эффекты салицилатов объясняют действием на организацию и стабильность биологических мембран. Ранее, используя эритроцитарные и липосомальные мембраны в качестве модельной системы, было показано прямое взаимодействие салициловой кислоты (СК) и ее производных с фосфолипидами и пертурбирующее воздействие на мембраны [5].

Хорошо охарактеризованы регуляторные эффекты салициловой кислоты как фитогормона в растительных клетках: СК в диапазоне 0.01–5 мМ, эффективно накапливаясь в клетках табака (*Nicotiana tabacum*), блокирует поток электронов в митохондриях к пулу убихинонов, ингибирует потребление кислорода в состоянии 3, разобщая митохондриальное дыхание, регулирует экспрессию ряда салицилат-зависимых генов [6]. СК изменяет морфологию и функциональную активность митохондрий в растительных клетках в зависимости от дозы и длительности воздействия, ингибирует процесс окислительного фосфорилирования, является эффективным регулятором митохондриально-опосредованной передачи сигналов защиты и апоптоза. Однако в деталях механизмы действия салицилата в растительной клетке неизвестны [7].

АСК и СК эффективно взаимодействуют с внутриклеточными сигнальными путями, включая митоген- и AMP-активируемый каскады протеинкиназ, рибосомальную S6-киназу, активируют факторы TGF- β и NF- κ B, регулируют рост и гибель клеток [8]. При этом митохондрии рассматриваются в качестве основной внутриклеточной мишени действия АСК и СК. Салицилаты увеличивают АТФ- и иономицин-зависимое поступление ионов Ca^{2+} в митохондрии, индуцируют апоптотическую гибель клеток, модулируют митохондриальный потенциалзависимый анионный канал (VDAC – voltage-dependent anion chan-

nel) [2]. Ростом митохондриальной протонной проводимости и прямым нарушением митохондриального сопряжения в присутствии СК объясняют подавление салицилатами липогенеза *de novo* [3].

Уже в классических работах 1950-х годов были показаны разобщение салицилатами дыхания и окислительного фосфорилирования, деполяризация митохондриальной мембраны, ингибирование АТФазы, набухание митохондрий за счет эффекта СК как переносчика протонов [9, 10]. Известно, что аспирин вызывает апоптоз многих типов клеток, в том числе тромбоцитов, при этом АСК дозозависимо индуцировала диссипацию митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), экспонирование фосфатидилсерина клеточных мембран и активацию каспазы-3 в тромбоцитах [11].

Авторы работы [12] продемонстрировали, что СК ингибирует поглощение и усиливает высвобождение кальция митохондриями, тем самым повышая уровень свободного кальция в цитоплазме. Одновременно СК стимулирует Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий, что приводит к ингибированию транспорта электронов в электрон-транспортной цепи, нарушению сопряжения окисления и фосфорилирования и нарушению синтеза АТФ из АДФ. При этом авторы предполагали, что нарушение гомеостаза ионов Ca^{2+} играет определяющую роль в индуцированной СК митохондриальной дисфункции [12]. В качестве одного из механизмов проапоптотического эффекта АСК было предположено формирование митохондриальной поры высокой проницаемости (MPTP – mitochondrial permeability transition pore) [13].

Митохондрии – динамичные и пластичные клеточные органеллы, биохимически они обеспечивают энергетические потребности клеток, участвуют в разнообразных регуляторных и метаболических процессах в клетке, интегрируют сигнальные каскады, во-многом определяют физиологию и патологию клетки, в том числе процессы апоптоза и некроза [14], выполняют функцию основного сенсора, регулятора и депо ионов кальция, декодера кальциевого сигнала [15]. Ca^{2+} – ключевой внутриклеточный вторичный мессенджер, один из важнейших внутриклеточных сигналов, регулирующих многочисленные физиологические процессы в клетке, ее метаболизм и выживание [16]. Избыточное накопление Ca^{2+} в митохондриях в сочетании с окислительным стрессом, индуцирует апоптотическую гибель клеток, вызывая открытие MPTP, диссипацию митохондриального мембранного потенциала, высвобождение цитохрома С и других проапоптотических факторов [17]. Дисфункция мито-

хондрией, в первую очередь в клетках с высоким потреблением энергии, нарушения энергетики клетки и кальциевого гомеостаза связаны со многими патологическими состояниями, такими как заболевания сердечно-сосудистой системы, нейродегенеративные расстройства, диабет, онкология [18].

Широко известны антиоксидантные свойства СК, которая при взаимодействии с $\cdot\text{OH}$ -радикалами, образует 2,3- и 2,5-дигидроксibenзойные кислоты. В то же время недавно показано, что аспирин и, в меньшей степени, салицилат (≥ 2.5 мМ) вызывали быструю генерацию активных форм кислорода в клетках, что, в свою очередь, приводило к деполяризации плазматической мембраны и активации потенциалзависимых кальциевых каналов, нарушению кальциевого гомеостаза, апоптотической и некротической гибели клеток независимым от каспаз путем [19].

Салицилат (0.3–5 мМ) концентрационно-зависимо индуцировал гибель гепатоцитов, присутствие ионов Ca^{2+} (2.5 мМ) в среде Кребса–Рингера потенцировало токсические эффекты СК [20]. Митохондриальная дисфункция, формирование МРТР, разобщение митохондрий, нарушения митохондриального дыхания и кальциевого гомеостаза, истощение АТФ, окислительный стресс, индуцируемые при окислительном метаболизме АСК в гепатоцитах с участием *сyt P450*, представляют основные факторы повреждения печени салицилатами и играют определяющую роль в патогенезе синдрома Рея (Reye's syndrome). При этом обнаружен синергизм в действии салицилатов и ионов Ca^{2+} [20–22].

Несмотря на многочисленные исследования, механизмы взаимодействия АСК и СК с митохондриальными и клеточными мембранами, во многом определяющие фармакологические и токсические эффекты этих лекарственных средств, эффекты салицилатов на Ca^{2+} -зависимые митохондриальные процессы, требуют дальнейшего выяснения [13]. Цель настоящей работы – сравнительный анализ мембранных эффектов СК и АСК в митохондриях печени и эритроцитах. Мы оценили действие салицилатов на респираторную активность, мембранный потенциал, процесс формирования МРТР в присутствии и в отсутствие ионов Ca^{2+} в изолированных митохондриях печени крыс и воздействие салицилатов на мембранный потенциал, кислотно-устойчивость эритроцитов человека. Полученные нами результаты позволяют предположить, что мишенью действия СК и АСК является липидный бислой митохондриальных и эритроцитарных мембран, где салицилаты выступают в качестве липофильного перенос-

чика ионов кальция/протонов, митохондриальный кальциевый унипортер.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использовали ацетилсалициловую кислоту, салициловую кислоту, динатриевую соль янтарной кислоты (сукцинат), моносодиевую соль глутаминовой кислоты (глутамат), натриевую соль малоновой (яблочной) кислоты, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис- HCl), сахарозу, сафранин О, натриевую соль этиленгликольтетрауксусной кислоты (ЭГТА), валиномицин, карбонилцианид *n*-трифторметоксифенилгидразон, рутений красный (RuR), циклоспорин А (CsA) (Merck KGaA, Германия; Sigma-Aldrich, США); хлорид калия, хлорид натрия, хлорид кальция, соляную кислоту, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, этанол (АО «РЕАХИМ», Россия); флуоресцентный зонд 3,3'-дипропил-тиадикарбоцианин иодид ($\text{DiSC3(5)} - 3,3'\text{-dipropylthiadicarbocyanine iodide}$) (Molecular Probes, США). Все растворы были приготовлены на воде, очищенной в системе Milli-Q Direct (Merck KGaA, Германия).

Эритроциты. Эритроциты человека получали из крови здоровых доноров (Гродненский областной центр трансфузиологии, Гродно, Беларусь), кровь стабилизировали антикоагулянтном цитратом натрия. Эритроциты выделяли центрифугированием при 4°C , 1 000 g, 5 мин (центрифуга Z 32 НК, Hermle Labortechnik GmbH, Германия), тремя циклами ресуспендирования и промывки в 20 объемах изотонического фосфатного буфера (150 мМ NaCl + 1.9 мМ KH_2PO_4 + 8.1 мМ K_2HPO_4 , pH 7.4), тщательно удаляя слой лейкоцитов. Эритроциты использовали непосредственно после выделения.

Мембранный электрический потенциал и кислотный лизис эритроцитов человека. Мембранный потенциал эритроцитов человека определяли, используя потенциал-чувствительный оптический зонд DiSC3(5) [23], как описано нами ранее [24]. Кратко, эритроциты (гематокрит 0.2%) суспендировали в 1 мл изотонического солевого раствора, содержащего 10 мМ Трис- HCl (pH 7.4 или 5.5) и 150 мМ (KCl + NaCl) с изменяющейся концентрацией ионов K^+ в диапазоне от 50 до 140 мМ, и 2 мкМ зонда DiSC3(5) . До и после внесения в суспензию АСК и СК после стабилизации интенсивности флуоресценции зонда в пробы вносили специфический K^+ -ионофор валиномицин (1 мкМ) и определяли концентрацию ионов калия во внеклеточной среде $[\text{K}^+]_{\text{out}}$, при которой интенсивность флуоресценции зонда не изменялась после внесения валиномицина. Значение

мембранного потенциала эритроцитов рассчитывали по уравнению Нернста:

$$E_m = RT/F \cdot \ln([K^+]_{out}/[K^+]_{in}),$$

где E_m — мембранный потенциал, R — газовая постоянная, F — константа Фарадея, T — абсолютная температура (295 К). СК, АСК, зонд DiSC3(5) и валиномицин вносили в виде концентрированных этанольных растворов. Внутриэритроцитарную концентрацию ионов калия $[K^+]_{in}$ принимали равной 150 мМ. Концентрация этанола в образцах не превышала 0.4%. Флуоресценцию DiSC3(5) возбуждали при 625 нм и регистрировали при 660 нм (спектрофлуориметр LS-5B, PerkinElmer Inc., Великобритания).

Кинетические кривые кислотного лизиса эритроцитов человека регистрировали спектрофотометрически (спектрофотометр V-650, Jasco, Япония) по изменению оптической плотности суспензии эритроцитов при 700 нм. Эритроциты вносили в 2 мл среды (конечный гематокрит — 0.3%), содержащей 0.05 М цитратно-фосфатный буфер, pH 3.2, 0.14 М NaCl и различные концентрации СК или АСК (исходная концентрация 72 мМ в этаноле) при 22°C. В качестве параметра, характеризующего устойчивость эритроцитов, использовали $t_{1/2}$ — время, соответствующее гемолизу половины клеток.

Митохондрии печени крыс. Митохондрии печени крыс-самцов выделяли в охлажденной среде, содержащей 0.25 М сахарозы, 0.02 М Трис-НСl, pH 7.2, при 4°C, используя метод дифференциального центрифугирования [25] (центрифуга Z 32 НК, Hermle Labortechnik GmbH, Германия). Концентрацию белка определяли методом Лоури [26]. Использовали клинически здоровых (Санитарно-гигиеническое заключение № 33-48/500 от 28.09.2017 г., Центр гигиены и эпидемиологии Первомайского района г. Минск) аутбредных крыс линии Wistar, массой 140–160 г. Каждая экспериментальная группа включала 5–7 животных.

Митохондриальный мембранный потенциал. Потенциал митохондриальной мембраны измеряли спектрофлуориметрически (спектрофлуориметр Solar 2203, Беларусь), используя положительно заряженный липофильный флуоресцентный зонд сафранин О [27, 28]. Объем пробы составлял 3 мл. Среда содержала 0.125 М хлорид калия, 0.05 М сахарозы, 2.5 мМ KH_2PO_4 , 0.01 М Трис-НСl, 5 мМ Mg_2SO_4 , pH 7.5 при 27°C. Концентрация белка в пробе — 0.3 мг/см³. Субстрат — 0.005 М сукцинат.

Формирование митохондриальных пор высокой проницаемости. Исследование Ca^{2+} -индуцируемого набухания митохондрий печени крыс проводили в среде следующего состава: 0.25 М саха-

розы, 0.02 М Трис-НСl, 0.001 М дигидроортофосфата калия, 0.005 М сукцината, pH 7.2 при 25°C. Концентрация белка в пробе — 0.5 мг/см³. Набухание митохондрий регистрировали спектрофотометрически по изменению оптической плотности суспензии митохондрий во времени при длине волны 520 нм, используя спектрофотометр V-650 (Jasco, Япония) [29].

Респираторная активность митохондрий. Респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс регистрировали полярографически при 26°C, используя электрод Кларка, встроенный в герметическую термостатируемую ячейку объемом 2 мл, измерения проводили с помощью полярографа Hansatech oxytherm+ chamber (Великобритания) [30]. Калибровку полярографического электрода осуществляли, используя сульфит натрия. Образцы суспензии митохондрий, концентрация белка в которых составляла 1 мг/мл, вносили в ячейку со средой, содержащей 0.05 М сахарозы, 0.01 М Трис-НСl, 0.125 М KCl, 2.5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, pH 7.2. В качестве субстратов дыхания использовали сукцинат (5 мМ) или глутамат (5 мМ) + малат (2 мМ), концентрация АДФ — 180 мкМ.

Статистический анализ. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием критерия Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Функциональное состояние изолированных митохондрий печени крыс в присутствии салициловой и ацетилсалициловой кислот. СК в концентрации 0.5–2.0 мМ эффективно ингибировала респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс, энергизованных смесью «малат + глутамат» или сукцинатом: в присутствии возрастающих концентраций салицилата скорость субстрат-зависимого потребления кислорода V_2 возрастала, скорость АДФ-стимулируемого потребления кислорода V_3 выражено уменьшалась, коэффициенты дыхательного контроля V_3/V_2 и фосфорилирования АДФ/О также уменьшались (рис. 2а–г), свидетельствуя о нарушении сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования (субстрат дыхания — малат + глутамат). Эффект АСК на респираторную активность митохондрий был значительно менее выражен по сравнению с СК.

Мы рассмотрели эффект ионов кальция на регуляторную активность салицилатов в митохондриях печени крыс. Рис. 3а–г демонстрирует эффекты СК и АСК на параметры респираторной активности митохондрий в присутствии ионов

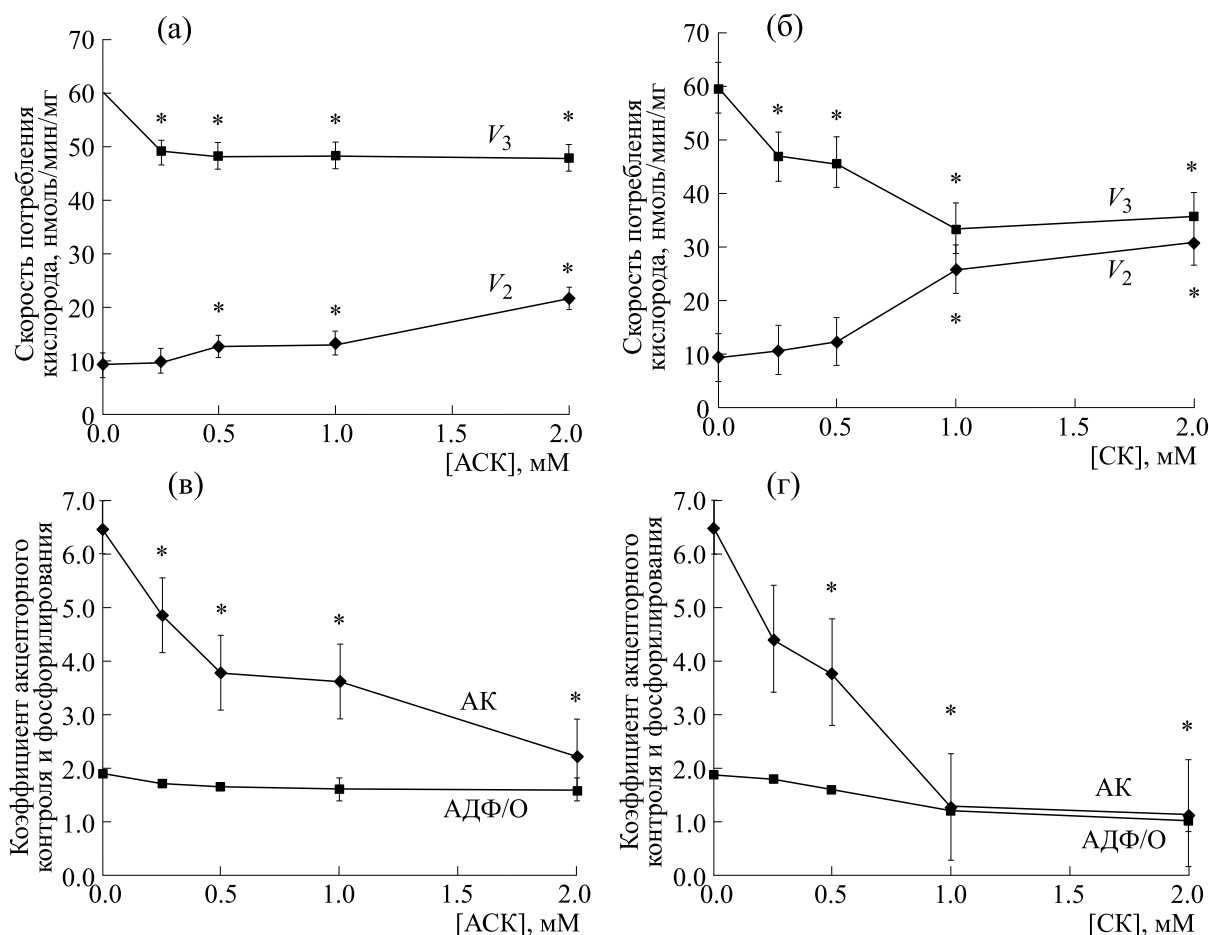


Рис. 2. Эффект СК и АСК на респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс (0.5 мг белка/мл): (а) — скорость потребления кислорода V_2 и V_3 в присутствии АСК, (б) — скорость потребления кислорода V_2 и V_3 в присутствии СК, (в) — коэффициенты акцепторного контроля V_3/V_2 и фосфорилирования АДФ/О в присутствии АСК, (г) — коэффициенты акцепторного контроля V_3/V_2 и фосфорилирования АДФ/О в присутствии СК. Состав среды: 0.05 М сахарозы, 0.01 М Трис-НСl, 0.125 М KCl, 2.5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgSO_4 , pH 7.2, 25°C; энергетические субстраты — 5 мМ L-глутамата + 2 мМ малата. * — Достоверное отличие по отношению к контролю, $p < 0.05$.

Ca^{2+} (30 мкМ). В исследуемой концентрации ионы Ca^{2+} ингибировали респираторную активность митохондрий и достоверно усиливали разобщающий эффект СК и АСК (рис. 3). (Использовали среды, не содержащие хелатора ионов Ca^{2+} — ЭГТА, субстрат дыхания — 5 мМ сукцинат.)

Мы оценили также эффекты АСК и СК на скорость Ca^{2+} -индуцируемого формирования МРТР. Рис. 4 представляет репрезентативные кинетические кривые формирования МРТР при внесении в суспензию митохондрий ионов Ca^{2+} , АСК и СК, а также при совместном внесении АСК/СК + Ca^{2+} . Рис. 4б и 4в демонстрируют эффекты RuR и CsA на процессы формирования МРТР соответственно. Внесение ионов Ca^{2+} (30–150 мкМ) концентрационно-зависимо индуцировало формирование МРТР в митохондриях

печени крыс, энергизованных сукцинатом (рис. 4). При этом предварительное внесение циклоспорина А, ингибитора поры, или рутения красного, конкурентного антагониста митохондриального кальциевого унипортера (MCU), полностью предотвращало Ca^{2+} -индуцируемое формирование МРТР.

СК и АСК (500 мкМ) в отсутствие ионов Ca^{2+} также индуцировали процесс формирования МРТР и стимулировали Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий (рис. 4). Регистрируемая скорость открытия МРТР в присутствии различных концентраций СК была значительно выше по сравнению с АСК. CsA и RuR частично ингибировали процесс формирования МРТР, индуцируемый АСК и СК, как в отсутствие, так и в присутствии ионов Ca^{2+} (рис. 4).

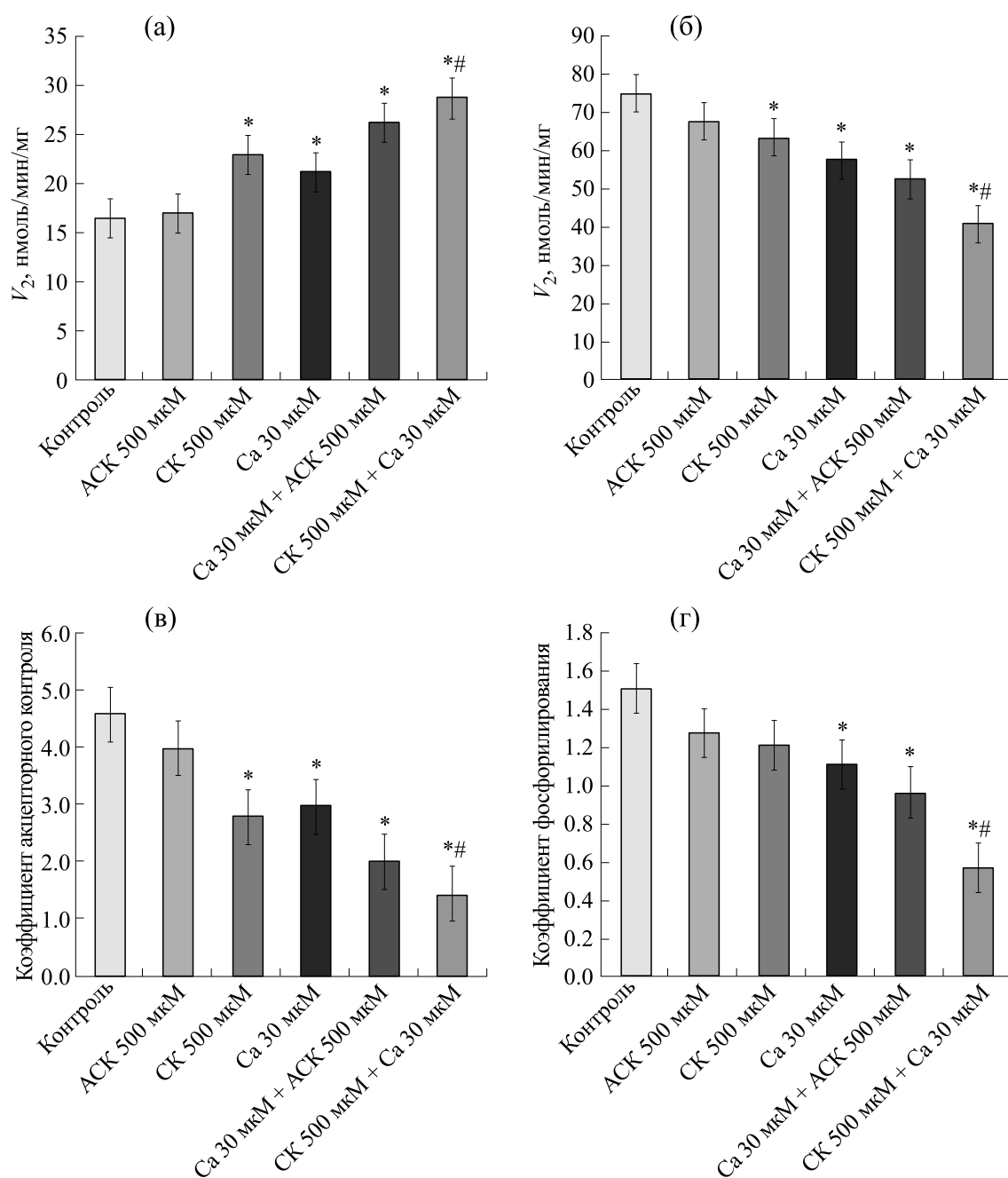


Рис. 3. Эффекты СК и АСК на респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс (0.5 мг белка/мл) в отсутствие и в присутствии ионов Ca^{2+} (30 мкМ): (а) – скорость субстрат-зависимого потребления кислорода V_2 , (б) – скорость АДФ-стимулируемого потребления кислорода V_3 , (в) – коэффициент акцепторного контроля, (г) – коэффициент фосфорилирования (АДФ/О). Состав среды: 0.05 М сахарозы, 0.01 М Трис-НCl, 0.125 М KCl, 2.5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgSO_4 , pH 7.2, 25°C, субстрат – 5 мМ сукцината. * – Достоверное отличие по отношению к контролю, $p < 0.05$; # – по отношению к Ca^{2+} (30 мкМ), $p < 0.05$.

Возможным результатом нарушения респираторной активности митохондрий и эффективности потребления кислорода, формирования МРТР, а также нарушения протонной проводимости митохондриальной мембраны в присутствии СК/АСК будет диссипация мембранного потенциала митохондрий. В наших условиях ис-

следуемые концентрации СК/АСК (0.5 мМ) не вызывали достоверной деполяризации мембран митохондрий. Внесение в среду ионов Ca^{2+} (30 мкМ) также не влияло на мембранный митохондриальный потенциал. (Более высокие концентрации ионов кальция (70 мкМ) вызывали выраженную диссипацию митохондриального

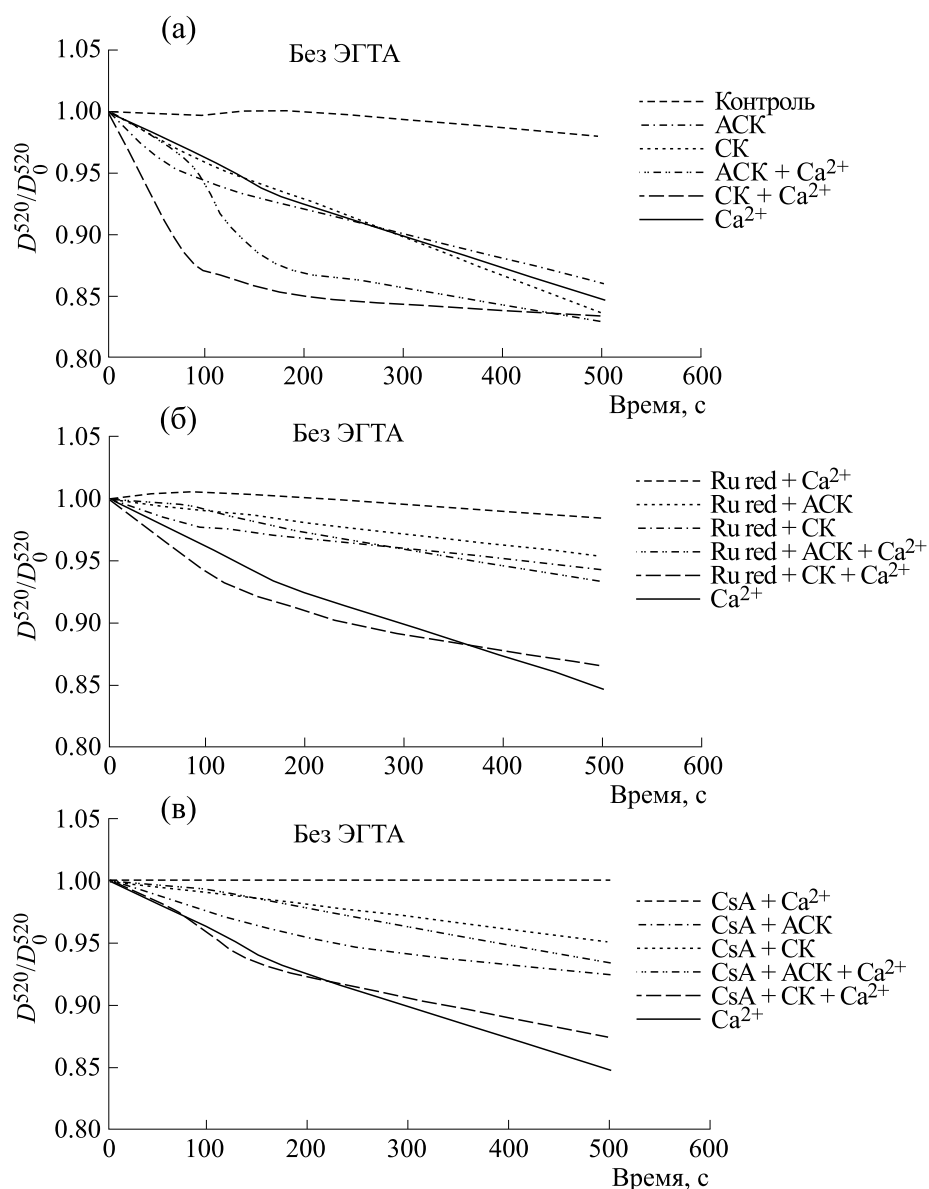


Рис. 4. Репрезентативные кинетические кривые осмотического набухания митохондрий печени крыс, регистрируемые по изменению интенсивности светорассеяния суспензии митохондрий, измеряемой как величина оптической плотности при 520 нм в отсутствие и в присутствии ионов Ca^{2+} (концентрация свободных ионов Ca^{2+} 30 мкМ): (а) — формирование МРТР в присутствии АСК (500 мкМ), СК (500 мкМ), Ca^{2+} (30 мкМ) и совместном внесении СК + Ca^{2+} , АСК + Ca^{2+} ; (б) — влияние рутения красного (Ru red, 1 мкМ) на формирование МРТР в присутствии АСК (500 мкМ), СК (500 мкМ), Ca^{2+} (30 мкМ), СК + Ca^{2+} , АСК + Ca^{2+} ; (в) — влияние циклоспорина А (CsA, 1 мкМ) на формирование МРТР в присутствии АСК (500 мкМ), СК (500 мкМ), Ca^{2+} (30 мкМ) и совместном внесении СК + Ca^{2+} , АСК + Ca^{2+} . В суспензию митохондрий (0.5 мг белка/мл) в среде, содержащей 0.25 М сахарозы, 0.02 М Трис-НCl и 0.001 М KH_2PO_4 , pH 7.2, в присутствии 5 мМ сукцината, вносили ионы Ca^{2+} (30 мкМ) и СК/АСК (500 мкМ).

потенциала, данные не представлены.) Внесение АСА (0.5 мМ) и, в большей степени, СК (0.5 мМ) в присутствии ионов Ca^{2+} (30 мкМ) приводило к выраженной деполяризации митохондриальных мембран (рис. 5). Интерес представляет тот факт, что RuR, ингибитор MCU, предотвращает деполяризацию мембран, вызванную совместным

внесением СК/АСК (0.5 мМ) и Ca^{2+} (30 мкМ), указывая на роль MCU в эффектах СК/АСК (рис. 5). Совместный деполяризующий эффект СК + Ca^{2+} на митохондриальный потенциал был значительно более выражен по сравнению с АСК + Ca^{2+} .

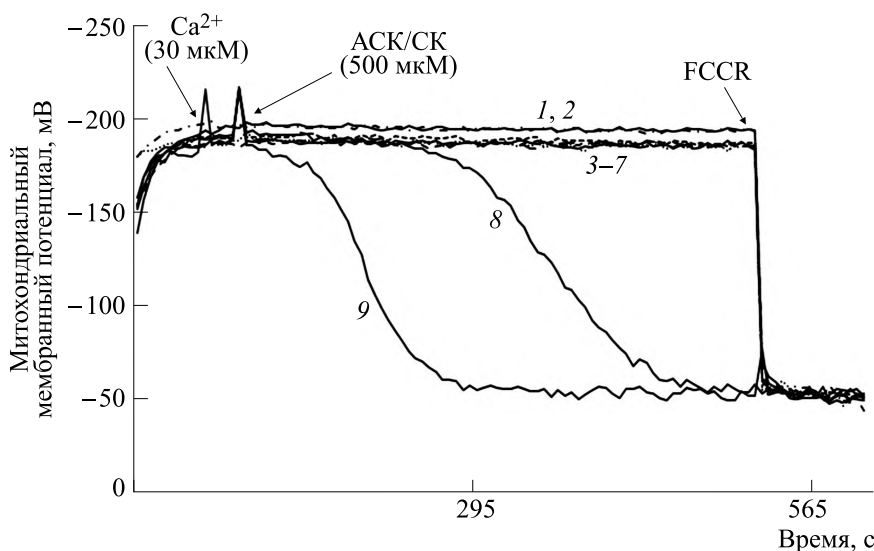


Рис. 5. Репрезентативные кинетические кривые диссипации мембранного потенциала в митохондриях печени крыс, регистрируемые по изменению интенсивности флуоресценции зонда сафранина О: кривая 1 – в отсутствие эффекторов (контроль), кривая 2 – Ca^{2+} (30 мкМ), кривая 3 – Ca^{2+} (30 мкМ) + CsA (1 мкМ), кривая 4 – Ca^{2+} (30 мкМ) + RuR (1 мкМ), кривая 5 – 500 мкМ СК/АСК, кривая 6 – 500 мкМ СК/АСК + Ca^{2+} (30 мкМ) + RuR, кривая 7 – СК/АСК + Ca^{2+} + CsA, кривая 8 – 500 мкМ АСК + Ca^{2+} (30 мкМ), кривая 9 – 500 мкМ СК + Ca^{2+} (30 мкМ). В суспензию митохондрий (0.5 мг белка/мл) в среде, содержащей 0.25 М сахарозы, 0.02 М Трис-НСl и 0.001 М $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, рН 7.2, в присутствии 5 мМ сукцината, вносили ионы Ca^{2+} (30 мкМ) и СК/АСК.

Мембранные эффекты СК и АСК в эритроцитах человека. Учитывая известный протонотропный эффект СК и АСК, мы оценили возможность воздействия СК и АСК на устойчивость эритроцитов человека к кислотному гемолизу, связанному с переносом протонов в цитоплазму эритроцитов. Рис. 6 представляет репрезентативные кинетические кривые лизиса эритроцитов, регистрируемые при внесении красных клеток крови в среду с рН 3.2 в присутствии СК (рис. 6а) и АСК (рис. 6б). СК в используемых концентрациях (180–360 мкМ) выражено ускоряла лизис эритроцитов человека (рис. 6а,в). Более гидрофильная АСК оказывала более сложный и менее выраженный эффект: при меньших концентрациях (180 мкМ) АСК уменьшала скорость гемолиза и увеличивала при более высоких концентрациях (360 мкМ), но менее эффективно по сравнению с СК (рис. 6б,в). Вероятно, помимо переноса в цитоплазму литического агента, протонов, АСК взаимодействует с мембраной, повышая ее устойчивость к повреждающему воздействию, при более высоких концентрациях преобладает протонотропный эффект АСК, менее выраженный по сравнению с СК.

Далее мы оценили изменение электрического мембранного потенциала эритроцитов в присутствии СК и АСК (рис. 7). Мембранный потенциал эритроцитов при рН 7.4 (полученное нами значение потенциала равно -14.0 ± 1.7 мВ) существенно не изменяется в присутствии

возрастающих концентраций СК и АСК (0.5–3.0 мМ). Вероятно, при этом значении рН не происходит существенного перемещения ионов в цитоплазму эритроцитов в присутствии салицилатов. При рН 5.5 мы наблюдали определенную деполяризацию мембран эритроцитов (полученное нами значение потенциала равно -4.9 ± 0.6 мВ) по сравнению с рН 7.4. Внесение возрастающих концентраций СК (0.5–3.0 мМ) приводит к существенной гиперполяризации мембраны эритроцитов при рН 5.5. Эффект АСК на электрический потенциал эритроцитарных мембран был менее выражен (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С целью лучшего понимания молекулярных и клеточных механизмов фармакологических и токсических эффектов ацетилсалициловой и салициловой кислот и поиска их молекулярных мишеней мы изучили закономерности взаимодействия АСК и СК с митохондриальными и эритроцитарными мембранами, оценили роль ионов кальция/протонов в эффектах салицилатов, что является необходимым условием эффективного применения НПВП, в том числе при планировании длительного лечения сердечно-сосудистых заболеваний и ряда других патологий, связанных с митохондриальной дисфункцией, нарушением гомеостаза Ca^{2+} .

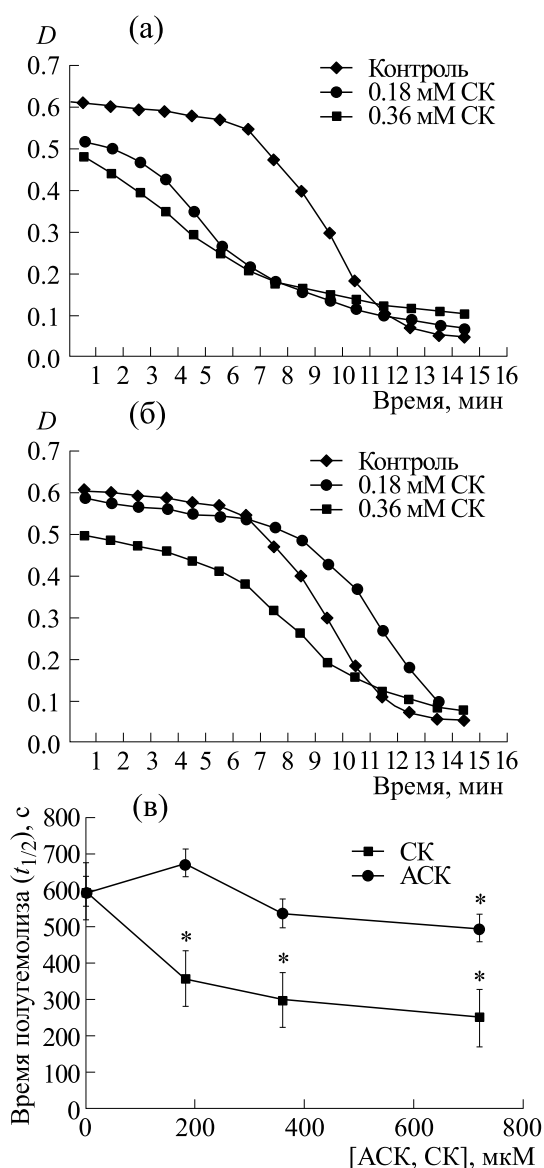


Рис. 6. Протон-индуцируемый лизис эритроцитов человека в присутствии СК и АСК. Лизис регистрировали по изменению интенсивности интегрального светорассеяния суспензии клеток, измеряемой как оптическая плотность суспензии при 700 нм. Эритроциты вносили в 2 мл среды (конечный гематокрит – 0.3%), содержащей 0.05 М цитратно-фосфатный буфер (рН 3.2) + 0.14 М NaCl, и различные концентрации СК или АСК, 22°C. (а) – Репрезентативные кинетические кривые лизиса эритроцитов в отсутствие (контроль) и в присутствии 180 и 360 мкМ СК; (б) – репрезентативные кинетические кривые лизиса эритроцитов в отсутствие (контроль) и в присутствии 180 и 360 мкМ АСК; (в) – зависимости характеристического времени лизиса половины эритроцитов $t_{1/2}$ от концентрации СК и АСК. * – Достоверное отличие по отношению к контролю, $p < 0.05$.

СК – продукт метаболизма и регулятор роста растений, который во многом определяет устойчивость растений к действию патогенов. В ин-

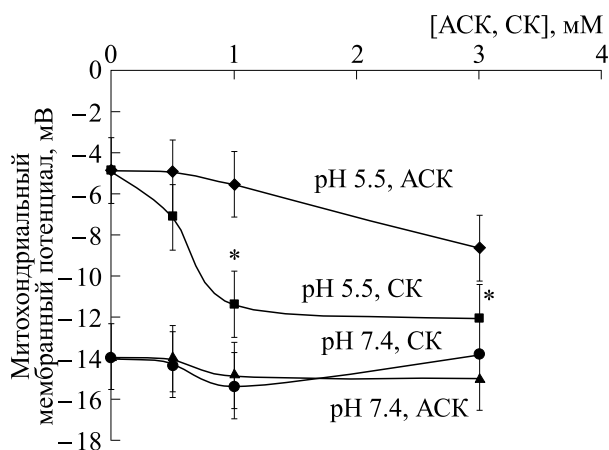


Рис. 7. Влияние СК и АСК на электрический потенциал мембран эритроцитов человека при рН 7.4 и 5.5. Эритроциты (гематокрит 0.2 %) суспендировали в 1 мл изотонического раствора, содержащего 10 мМ Трис-HCl и 150 мМ (KCl + NaCl), 22°C.

тактных клетках томата СК (1 мМ) вызывала рост продукции активных форм кислорода и азота, дезорганизацию митохондриальных крист, дезинтеграцию и вакуолизацию митохондрий, ингибирование митохондриальной гексокиназы, что приводило к гибели клеток [31]. В клетках табака СК в концентрации всего 20 мкМ ингибировала синтез АТФ и респираторную активность, при этом стимулировала альтернативные пути потребления кислорода [32].

В наших экспериментах СК и, менее эффективно, АСК в концентрациях 0.5–2.0 мМ, несколько превышающих фармакологические дозы, эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс в среде, не содержащей хелатор ионов Ca^{2+} ЭГТА, нарушая сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования. Ионы кальция (концентрация свободных ионов – 30 мкМ) также нарушают митохондриальное сопряжение в отсутствие салицилатов и потенцируют разобщающий эффект АСК и СК (0.5 мМ).

Одним из механизмов повреждающего воздействия салицилатов может быть индукция окислительных процессов в митохондриях, присутствие ионов Ca^{2+} может усилить этот процесс. Можно предположить роль окислительно-восстановительных превращений фенольной группы СК в генерации активных форм кислорода. Ранее мы показали, что присутствие ионов Ca^{2+} достоверно увеличивало степень повреждения митохондрий при окислительном воздействии органическим гидропероксидом [33].

Ионы кальция дозозависимо индуцирует формирование МПТР, неселективного высокопроводящего CsA-чувствительного канала во

внутренней митохондриальной мембране, который играет критическую роль в кальциевом обмене между митохондриями и цитоплазмой клетки и регуляции функциональной активности митохондрий и клеток; молекулярная природа канала полностью не выяснена. Предполагают участие АТФазы и адениннуклеотидтранслоказы в формировании этой высокопроводящей поры [34]. Оцененное нами ранее значение константы Михаэлиса K_M взаимодействия ионов Ca^{2+} с мембраной митохондрий печени крыс в процессе формирования МРТР равно 75 ± 20 мкМ [35].

В экспериментах авторов работы [13] взаимодействие салицилата (0.5 мМ) с электрон-транспортной цепью митохондрий печени крыс (предполагают участие Fe-S кластера комплекса I) сопровождалось образованием перекиси водорода и окислительным стрессом, окислением тиоловых групп белков и глутатиона, что далее приводило к индукции МРТР в присутствии ионов Ca^{2+} , истечению цитохрома *c* и проапоптотических факторов, коллапсу митохондриального мембранного потенциала, нарушению окислительного фосфорилирования и β -окисления. Авторы обсуждают несколько механизмов индукции салицилатом формирования МРТР: взаимодействие салицилата непосредственно с порообразующей структурой, интеркалирование в митохондриальную мембрану, что будет способствовать открытию пор, генерация активных форм кислорода [13]. Авторы работы [36] показали, что АСК (1–10 мМ), как и диклофенак (0.01–0.1 мМ), обратимо ингибировали глюконеогенез и стимулировали гликогенолиз и гликолиз в перфузируемой печени крыс, что связано с разобщающим воздействием на окислительное фосфорилирование и коллапсом митохондриального потенциала (при 5 мМ аспирина). В то же время меньшие концентрации АСК (250 мкМ) не влияли на параметры сукцинат-зависимого потребления кислорода в отсутствие ионов кальция и выраженно ингибировали потребление кислорода, фосфорилирование АДФ в присутствии 150 мкМ Ca^{2+} [22, 37]. Уже в ранних работах было показано, что СК и АСК увеличивали проницаемость внутренней митохондриальной мембраны [37], выраженно нарушали потребление кислорода в состоянии 3 в результате как ингибирования ключевого фермента цикла Кребса, α -кетоглутаратдегидрогеназы, так и разобщения митохондрий. При этом СК конкурирует с α -кетоглутаратом за центр связывания, в то время как ацетилсалицилат ингибирует фермент неконкурентно, ацетилируя активный центр [38].

В нашем эксперименте СК и АСК (0.5 мМ) потенцировали разобщающий и деполяризующий эффекты ионов Ca^{2+} , стимулировали Ca^{2+} -инду-

цируемое формирование МРТР в изолированных митохондриях печени крыс. RuR, специфический ингибитор MCU, при этом предотвращал формирование митохондриальной поры (частично) и деполяризацию мембран (полностью), индуцируемые СК/АСК + Ca^{2+} . Тот факт, что в нашем эксперименте СК и, в меньшей степени, АСК индуцируют процесс открытия МРТР в отсутствие ионов Ca^{2+} , свидетельствует о том, что стимуляция открытия пор салицилатами происходит не только за счет переноса ионов кальция в матрикс, но и за счет иных механизмов. Следует учитывать возможный протонотормонный эффект салицилатов и присутствие Ca^{2+} в следовых концентрациях в средах, не содержащих ЭГТА. Частичное ингибирование CsA салицилат-индуцируемого формирования МРТР позволяет предположить участие CsA-независимого механизма набухания митохондрий в присутствии СК/АСК или СК/АСК + Ca^{2+} . Ранее авторы работы [39] предположили существование двух типов каналов, формируемых в присутствии ионов Ca^{2+} — CsA-зависимого канала и CsA-независимого. Ингибирование RuR активации Ca^{2+} -индуцированного открытия МРТР в присутствии СК или АСК можно рассматривать как указание на роль стимулирования салицилатами митохондриального кальциевого унипортера наряду с прямым переносом ионов Ca^{2+} через мембрану. Подобным образом CsA, блокатор формирования МРТР, предотвращает диссипацию митохондриального потенциала, указывая на роль МРТР как причину деполяризации митохондриальной мембраны. В то же время недавно высказано предположение, что индуцируемая ионами кальция CsA-зависимая деполяризация митохондриальной мембраны может быть не связана с молекулярными компонентами МРТР, а предшествует открытию МРТР и происходит в результате активации мембранной поры с низкой проводимостью [34].

На следующем этапе нашей работы мы оценили роль протонотормонной активности салицилатов в эффектах СК и АСК, рассмотрев взаимодействие последних с эритроцитами человека. Салицилаты в высоких концентрациях (360–720 мкМ) выраженно ускоряли протон-индуцируемый лизис эритроцитов человека при pH 3.2, обеспечивая, вероятно, перенос протонов в цитоплазму.

Ранее было показано, что салицилат натрия, но не более гидрофильная ацетилсалициловая кислота, индуцирует обратимые изменения формы эритроцитов с насыщением при концентрации более 10 мМ [40]. Авторы предполагают, что встраивание фенольной кислоты во внешний монослой мембраны приводит к растяжению и изгибу мембраны, ведущему к эхиноцитозу и уменьшению текучести мембраны [40]. В одной

из наших ранних работ мы показали, что кислотному (протон-индуцируемому) лизису эритроцитов (рН 2.2–3.5) в изотонической среде предшествует структурная перестройка мембранных белков (спектрина), дестабилизация мембраны, набухание клеток, при этом лизис протекает не по осмотическому механизму [41]. Ранее в работе [42] было показано, что салицилат натрия, выступая эффективным протонифором, стимулирует гемолиз, индуцируемый HCl, а скорость лизиса определяется скоростью переноса кислотных эквивалентов в цитоплазму эритроцита.

Механизмы транспорта протонов СК и рядом ее производных в бислойных фосфолипидных и митохондриальных мембранах детально исследованы в работах [43, 44]. Было предположено, что салицилат и, в значительно меньшей степени, аспирин и бензоат действуют как переносчики протонов типа HA_2^- (анионный димер) при значениях рН, сравнимых с рК СК, и как липофильный анион A^- при нейтральных значениях рН, значительно увеличивая мембранную проводимость [43, 44]. Автор этих работ также предположил, что в митохондриях салицилат увеличивает пассивное поступление протонов в матрикс митохондрий в результате комбинации входа протонированной кислоты НА (по концентрационному градиенту) и истечения A^- (по электрическому и концентрационному градиентам) [43, 44]. Известные значения рК, равные 2.9 в случае СК и 3.5 в случае АСК, определяют протонифорную активность СК и АСК [43–45]. Мы предполагаем, что причиной деполяризации митохондриальной мембраны в первую очередь является индуцируемое СК/АСК формирование неселективных МРТР. Возрастание содержания протонированной формы СК и соотношение скоростей поступления и истечения анионной и нейтральной форм СК [43, 44] объясняет обнаруженную нами гиперполяризацию плазматических мембран эритроцитов в присутствии СК при рН 5.5, но не 7.4. В терапевтических и токсических концентрациях салицилат вызывает общий пассивный «вход» H^+ в митохондрии, достаточный для разобщения и набухания митохондрий и нарушения энергетического метаболизма. Эффект СК, сильной кислоты, объясняют внутримолекулярной водородной связью, которая обеспечивает делокализацию отрицательного заряда, стабилизирует салицилат-анион и увеличивает его мембранную проницаемость [45]. СК существенно и селективно повышает протонную проводимость биологических и искусственных мембран, значительно превышая (в 500–1500 раз) активность АСК [43, 44].

Ранее мы показали, что АСК и синтезированные нами бутирил-СК и пропионил-СК умень-

шают подвижность липидного бислоя изолированных мембран эритроцитов человека и эффективно ацилируют поли-L-лизин [46]. В то же время было обнаружено [47, 48], что АСК встраивается между полярными группами молекул фосфолипидов, формирует водородные связи в липидном бислое, локально нарушает структурную организацию мембран, предотвращает формирование рафтов, увеличивает текучесть мембран.

Таким образом, в наших исследованиях *in vitro* АСК и СК (0.5–2.0 мМ) демонстрируют выраженные мембранотропные эффекты, изменяют ионную проницаемость митохондриальных и эритроцитарных мембран, нарушают сопряжение реакций дыхания и фосфорилирования, стимулируют формирование пор высокой проницаемости и диссипацию митохондриального мембранного потенциала (в отсутствие ЭГТА, хелатора ионов кальция), ускоряют протон-индуцируемый лизис эритроцитов человека. Полученные результаты согласуются с предложением осторожного применения салицилатов у пациентов с митохондриальной дисфункцией [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие фармакологические и токсические эффекты СК и АСК объясняют действием на функциональную активность, стабильность и структуру митохондриальных и плазматических мембран. В настоящей работе проведен сравнительный анализ воздействия салицилатов на респираторную активность, мембранный потенциал, процесс формирования МРТР в изолированных митохондриях печени крыс в присутствии и в отсутствие ионов Ca^{2+} , и мембранный потенциал и устойчивость эритроцитов человека к протон-индуцируемому лизису. СК (0.5–2.0 мМ) и, в меньшей степени, АСК эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс, нарушая сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования, индуцировали формирование МРТР в отсутствие ионов Ca^{2+} и стимулировали Ca^{2+} -индуцируемое коллоидно-осмотическое набухание митохондрий, вызывали деполяризацию митохондриальных мембран. Ионы Ca^{2+} (30 мкМ) достоверно усиливали разобщающий и деполяризующий эффект СК и АСК, что можно объяснить переносом ионов Ca^{2+} /протонов в матрикс. Циклоспорин А и рутений красный частично ингибировали процесс открытия МРТР, индуцируемый АСК и СК, как в отсутствие, так и в присутствии ионов Ca^{2+} и диссипацию мембранного потенциала. СК (180–720 мкМ) выражено ускоряла протон-индуцированный лизис эритроцитов человека и вызывала гиперполяризацию мембран эритроцитов (при рН 5.5, но не рН 7.4), вероятно, в результате

переноса протонов в цитоплазму. Полученные нами результаты позволяют предположить в качестве мишеней действия салицилатов липидный бислой мембран, комплексы электрон-транспортной цепи митохондрий, митохондриальный кальциевый унипортер.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований-Министерства образования Республики Беларусь № Б22МВ-003 и проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № М23КИ-014.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными, выполняемые в эксперименте, были выполнены с соблюдением общепринятых норм гуманного обращения с лабораторными животными, одобрены этическим комитетом Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно (Протокол от 23.05.2019 г. № 29/19) и соответствовали ГОСТу 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Межгосударственный стандарт, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hawley S. A., Fullerton M. D., Ross F. A., Schertzer J. D., Chevtzoff C., Walker K. J., Pegg M. W., Zibrova D., Green K. A., Mustard K. J., Kemp B. E., Sakamoto K., Steinberg G. R., and Hardie D. G. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science*, **336** (6083), 918–922 (2012). DOI: 10.1126/science.1215327
- Tewari D., Majumdar D., Vallabhaneni S., and Bera A. K. Aspirin induces cell death by directly modulating mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC). *Sci. Rep.*, **22** (7), 45184 (2017). DOI: 10.1038/srep45184
- Smith B. K., Ford R. J., Desjardins E. M., Green A. E., Hughes M. C., Houde V. P., Day E. A., Marcinko K., Crane J. D., Mottillo E. P., Perry C. G. R., Kemp B. E., Tarnopolsky M. A., and Steinberg G. R. Salicylate (Salicylate) uncouples mitochondria, improves glucose homeostasis, and reduces liver lipids independent of AMPK- β 1. *Diabetes*, **65** (11), 3352–3361 (2016). DOI: 10.2337/db16-0564
- Lapshina E. A., Sudnikovich E. J., Maksimchik J. Z., Zabrodskaya S. V., Zavodnik L. B., Kubyshev V. L., Nocun M., Kazmierczak P., Dobaczewski M., Watala C., and Zavodnik I. B. Antioxidative enzyme and glutathione S-transferase activities in diabetic rats exposed to long-term ASA treatment. *Life Sci.*, **79** (19), 1804–1811 (2006). DOI: 10.1016/j.lfs.2006.06.008
- Suwalasky M., Belmar J., Villena F., Gallardo M. J., Jemioła-Rzeminska M., and Strzalka K. Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid interaction with the human erythrocyte membrane bilayer induce in vitro changes in the morphology of erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **539** (1), 9–19 (2013). DOI: 10.1016/j.abb.2013.09.006
- Norman C., Howell K. A., Millar A. H., Whelan J. M., and Day D. A. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.*, **134** (1) 492–501 (2004). DOI: 10.1007/s10725-009-9416-6
- Poór P. Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants. *Bio-molecules*, **10** (2), 341 (2020). DOI: 10.3390/biom10020341
- Ordan O., Rotem R., Jaspers I., and Flescher E. Stress-responsive JNK mitogen-activated protein kinase mediates aspirin-induced suppression of B16 melanoma cellular proliferation. *Br. J. Pharmacol.*, **138** (6), 1156–1162 (2003). DOI: 10.1038/sj.bjp.0705163
- Penniall R. The effects of salicylic acid on the respiratory activity of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **30** (2), 247–251 (1958). DOI: 10.1016/0006-3002(58)90047-7
- Brody T. M. Action of sodium salicylates and related compounds on tissue metabolism in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **117**, 39–51 (1956).
- Zhao L., Zhang W., Chen M., Zhang J., Zhang M., and Dai K. Aspirin induces platelet apoptosis. *Platelets*, **24** (8), 637–642 (2013). DOI: 10.3109/09537104.2012.754417
- Yoshida Y., Singh I., and Darby C. P. Effects of salicylic acid and calcium on mitochondrial functions. *Acta. Neurol. Scand.*, **85** (3), 191–196 (1992). DOI: 10.1111/j.1600-0404.1992.tb04026.x
- Battaglia V., Salvi M., and Toninello A. Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **280** (40), 33864–33872 (2005). DOI: 10.1074/jbc.M502391200
- Folmes C. D. L., Dzeja P. P., Nelson T. J., and Terzic A. Mitochondria in control of cell fate. *Circ. Res.*, **110** (4), 526–529 (2012). DOI: 10.1161/RES.0b013e31824ae5c1
- Zavodnik I. B. Mitochondria, calcium homeostasis and calcium signaling. *Biomeditsinskaya khimiya*, **62** (3), 311–317 (2016). DOI: 10.18097/PBMC20166203311

16. Contreras L., Drago I., Zampese E., and Pozzan T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 607–618 (2010). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.05.005
17. Rasola A. and Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, **50** (3), 222–233 (2011). DOI: 10.1016/j.ceca.2011.04.007
18. Rossi A., Pizzo P., and Filadi R., Calcium, mitochondria and cell metabolism: a functional triangle in bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1866** (7), 1068–1078 (2019). DOI: 10.1016/j.bbamer.2018.10.016
19. Fujikawa I., Ando T., Suzuki-Karasaki M., Suzuki-Karasaki M., Ochiai T., and Suzuki-Karasaki Y. Aspirin induces mitochondrial Ca^{2+} remodeling in tumor cells via ROS–depolarization–voltage-gated Ca^{2+} entry. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (13), 4771 (2020). DOI: 10.3390/ijms21134771
20. Trost L. C. and Lemasters J. J. Role of the mitochondrial permeability transition in salicylate toxicity to cultured rat hepatocytes: implications for the pathogenesis of Reye's syndrome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147**, 431–441 (1997). DOI: 10.1006/taap.1997.8313
21. Doi H. and Horie T. Salicylic acid-induced hepatotoxicity triggered by oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.*, **183** (3), 363–368 (2010). DOI: 10.1016/j.cbi.2009.11.024
22. Tomoda T., Takeda K., Kurashige T., Enzan H., and Miyahara M. Acetylsalicylate (ASA)-induced mitochondrial dysfunction and its potentiation by Ca^{2+} . *Liver*, **14** (2), 103–108 (1994). DOI: 10.1111/j.1600-0676.1994.tb00056.x
23. Schummer U., Schiefer H.-G., and Gerhardt U. Mycoplasma membrane potentials determined by potential-sensitive fluorescent dyes. *Curr. Microbiol.*, **2**, 191–194 (1979).
24. Augustyniak K., Zavodnik I., Palecz D., Szosland K., and Bryszewska M. The effect of oxidizing agents and diabetes mellitus on the human red blood cell membrane potential. *Clin. Biochem.*, **29** (3), 283–286 (1996). DOI: 10.1016/0009-9120(95)02045-n
25. Johnson D. and Lardy H. A. Isolation of rat liver and kidney mitochondria. *Methods Enzymol.*, **10**, 94–101 (1967). DOI: 10.1016/0076-6879(67)10018-9
26. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** (1), 265–275 (1951).
27. Akerman K. E. Qualitative measurements of the mitochondrial membrane potential in situ in Ehrlich ascites tumour cells using the safranin method. *Biochim. Biophys. Acta*, **546** (2), 341–347 (1979). DOI: 10.1016/0005-2728(79)90051-3
28. Moore A. L. and Bonner W. D. Measurements of membrane potentials in plant mitochondria with the safranin method. *Plant Physiol.*, **70**, 1271–1276 (1982). DOI: 10.1104/pp.70.5.1271
29. Petronilli V., Cola C., Massari S., Colonna R., and Bernardi P. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21939–21945 (1993).
30. Dremza I. K., Lapshina E. A., Kujawa J., and Zavodnik I. B. Oxygen-related processes in red blood cells exposed to tert-butyl hydroperoxide. *Redox Report*, **11** (4), 185–192 (2006). DOI: 10.1179/135100006X116709
31. Poór P., Patyi G., Takács Z., and Szekeres A. Salicylic acid-induced ROS production by mitochondrial electron transport chain depends on the activity of mitochondrial hexokinases in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Plant Res.*, **132** (2), 273–283 (2019). DOI: 10.1007/s10265-019-01085-y
32. Xie Z. and Chen Z. Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol.*, **120** (1), 217–226 (1999).
33. Zavodnik I. B., Dremza I. K., Cheshchevik V. T., and Lapshina E. A. Oxidative damage of rat liver mitochondria during exposure to t-butyl hydroperoxide. Role of Ca^{2+} ions in oxidative processes. *Life Sci.*, **92**, 1110–1117 (2013).
34. Neginskaya M. A., Morris S. E., and Pavlov E. V. Both ANT and ATPase are essential for mitochondrial permeability transition but not depolarization. *Science*, **25**, 105447 (2022). DOI: 10.1016/j.isci.2022.105447
35. Golovach N. G., Cheshchevik V. T., Lapshina E. A., Ilyich T. V., and Zavodnik I. B. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca^{2+} ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents. *Membrane Biol.*, **250** (2), 225–236 (2017). DOI: 10.1007/s00232-017-9953-2
36. Petrescu I. and Tarba C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **1318** (3), 385–394 (1997). DOI: 10.1016/S0005-2728(96)00109-0
37. Martens M. E. and Lee C. P. Reye's syndrome: salicylates and mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.*, **33** (18), 2869–2876 (1984). DOI: 10.1016/0006-2952(84)90209-0
38. Nulton-Persson A. C., Szweda L. I., and Sadek H. A. Inhibition of cardiac mitochondrial respiration by salicylic acid and acetylsalicylate. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **44** (5), 591–595 (2004). DOI: 10.1097/00005344-200411000-00012
39. Jonas E. A., Jr Porter C. A., Beutner G., Mnatsakanyan N., and Alavian K. N. Cell death disguised: the mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F1FO ATP synthase. *Pharmacol. Res.*, **99**, 382–392 (2015).
40. Li A., Seipelt H., Müller C., Shi Y., and Artmann M. Effects of salicylic acid derivatives on red blood cell

- membranes. *Pharmacol. Toxicol.*, **85** (5), 206–211 (1999). DOI: 10.1111/j.1600-0773.1999.tb02010.x
41. Zavodnik I. B. and Piletskaia T. P. Acid-induced hemolysis of human erythrocytes. *Biofizika*, **42** (5), 1106–1112 (1997).
 42. Ivanov I. T. The low pH-induced hemolysis of erythrocytes is preceded by entry of acid into cytosole and oxidative stress on cellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1415**, 349–360 (1999).
 43. Gutknecht J. Salicylates and proton transport through lipid bilayer membranes: a model for salicylate-induced uncoupling and swelling in mitochondria. *J. Membr. Biol.*, **115** (3), 253–260 (1990). DOI: 10.1007/BF01868640
 44. Gutknecht J. Aspirin, acetaminophen and proton transport through phospholipid bilayers and mitochondrial membranes. *Mol. Cell Biochem.*, **114** (1–2), 3–8 (1992). DOI: 10.1007/BF00240290
 45. Dunn G. E. and Penner T. S. Effect of intramolecular hydrogen bonding on the relative acidities of substituted salicylic acids in benzene solution. *Can. J. Chem.*, **45**, 1699–1706 (1967). DOI: 10.1139/v67-274
 46. Zavodnik I. B., Lapshina E. A., Sudnikovich E., Boncler M., Luzak B., Rózsalski M., Helińska M., and Watala C. Structure, stability, and antiplatelet activity of O-acyl derivatives of salicylic acid and lipophilic esters of acetylsalicylate. *Pharm. Reports.*, **61**, 476–489 (2009).
 47. Alsop R. J., Toppozini L., Marquardt D., Kučerka N., Harroun T. A., and Rheinstädter M. C. Aspirin inhibits formation of cholesterol rafts in fluid lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes*, **1848** (3), 805–812 (2015).
 48. Alsop R. J., Himbert S., Dhaliwal A., Schmalzl K., and Rheinstädter M. C. Aspirin locally disrupts the liquid-ordered phase. *R. Soc. Open Sci.*, **5** (2), 171710 (2018). DOI: 10.1098/rsos.171710

Effects of Salicylic and Acetylsalicylic Acids in Mitochondrial and Erythrocyte Membranes

T.V. Ilyich*, A.I. Savko*, T.A. Kovalenya*, E.A. Lapshina*, and I.B. Zavodnik*

*Yanka Kupala State University of Grodno, bulvar Leninskogo Komsomola 5, Grodno, 230009 Belarus

For further clarification of the mechanisms of pharmacological effects of salicylic and acetylsalicylic acids, the interactions of these acids with mitochondrial and erythrocyte membranes were studied and the role of calcium ions in the effects of salicylic and acetylsalicylic acids was examined. Salicylic acid and to a lesser extent acetylsalicylic acid at 0.5–2.0 mM concentration effectively inhibited the respiratory activity of isolated rat liver mitochondria, by uncoupling respiration and phosphorylation processes, induced depolarization of the mitochondrial membrane and potentiated Ca^{2+} -stimulated formation of mitochondrial permeability transition pores in EGTA-free media. Cyclosporine A and ruthenium red partially inhibited the mitochondrial pore opening process induced by salicylic and acetylsalicylic acids both in the absence and presence of Ca^{2+} ions. Salicylic acid (180–360 μM) markedly accelerated proton-induced lysis of human erythrocytes (at pH 3.2) and caused hyperpolarization of erythrocyte membranes (at pH 5.5, but not at pH 7.4), probably as a result of proton transfer to the cytoplasm of the cell. Thus, salicylic and acetylsalicylic acids interact with mitochondrial and plasma membranes, act as effective proton/ Ca^{2+} ionophores and stimulate the mitochondrial calcium uniporter.

Keywords: acetylsalicylic acid, salicylic acid, rat liver mitochondria, human erythrocytes, calcium ions