

УДК 577.352.4

**ВПЛИВ ЕФЕКТОРІВ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО
АТР-ЧУТЛИВОГО КАЛІЄВОГО КАНАЛУ ДІАЗОКСИДУ
ТА ГЛІБЕНКЛАМІДУ НА ГІДРОДИНАМІЧНИЙ ДІАМЕТР
ТА МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІТОХОНДРІЙ МІОМЕТРІЯ**

О. Б. ВАДЗЮК, О. Ю. ЧУНІХІН, С. О. КОСТЕРІН

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: vadzyuk@biochem.kiev.ua

Методом фотонної кореляційної спектроскопії було показано збільшення гідродинамічного діаметра мітохондрій у присутності активатора АТР-чутливого K^+ -каналу діазоксиду. Селективний блокатор цього каналу, глібенкламід, усуває цей ефект. Активація каналу діазоксидом призводить до часткової деполяризації мітохондріальної мембрани. При цьому, під дією глібенкламід спостерігається відновлення мітохондріального потенціалу, але у присутності валіноміцину разом з діазоксидом у середовищі інкубації глібенкламід не впливає на деполяризацію мітохондрій. Таким чином, в цій роботі було показано, що активація АТР-чутливого K^+ -каналу призводить до збільшення розмірів мітохондрій та часткової деполяризації внутрішньої мітохондріальної мембрани.

Ключові слова: мітохондріальний АТР-чутливий K^+ -канал, діазоксид, мембранний потенціал мітохондрій.

Вважається, що головним наслідком активації мітохондріального АТР-чутливого K^+ -каналу (міто $K_{\text{АТР}}$) для функціонування мітохондрій в умовах нормоксії є регуляція об'єму мітохондріального матриксу [1]. Регуляція цього об'єму має суттєве значення для функціонування мітохондрій [2]. Об'єм матриксу регулює інтенсивність дихання та виробництво АТР [1, 3–5]. Зменшення міжмембранного простору зменшує проникність зовнішньої мембрани для АТР та АDP шляхом регуляції активності АТР/АDP-трансферази, не допускаючи швидкого гідролізу АТР. З іншого боку, вхід іонів К через міто $K_{\text{АТР}}$ призводить до збільшення швидкості дихання мітохондрій, а інтенсифікація дихання спричинює збільшення утворення АТР [4]. Справді, на мітохондріях нирок, серця та нейронів головного мозку було показано, що активація міто $K_{\text{АТР}}$ супроводжується прискоренням дихання та збільшенням вмісту АТР [1, 3, 5]. Тому вважається, що активація міто $K_{\text{АТР}}$ може бути відповіддю на підвищені потреби клітини в АТР.

Існує загальноприйнята точка зору, згідно з якою об'єм мітохондріального матриксу контролюється потоками іонів К [4]. У мітохондріальному K^+ -циклі у внутрішній мітохондріальній мембрані беруть участь системи входу та викиду цих іонів [6]. Насамперед це K^+ -канали, які здійснюють транспортування

цих іонів у матрикс, та K^+/H^+ -обмінник, що виводить їх назовні [6].

Гомеостаз іонів К в мітохондріях зумовлюється наявністю градієнта їхньої концентрації між мітохондріальним матриксом та цитозолем [7]. Тонка регуляція об'єму матриксу здійснюється при сукупному функціонуванні двох K^+ -транспортувальних систем: міто $K_{\text{АТР}}$ та K^+/H^+ -обмінника. Вхід іонів К всередину мітохондрій призводить до активації аніонного каналу і накопичення іонів хлору, що, у свою чергу, спричинює осмотичний рух води в мітохондрії та набухання їх. А збільшення об'єму матриксу активує K^+/H^+ -обмінник, який викидає іони К в цитозоль. Одночасна дія цих двох структур приводить до встановлення нового рівноважного об'єму мітохондріального матриксу без порушення цілісності мітохондріальних мембран [4]. Збільшення об'єму відбувається за рахунок зменшення міжмембранного простору та зміни форми мітохондрії з видовженої на округлішу. Це підтверджено даними А. Каасік з колегами, які, використовуючи метод конфокальної мікроскопії, наочно продемонстрували зміну форми органел за активації міто $K_{\text{АТР}}$ [4].

Сьогодні найактивніше досліджуються властивості міто $K_{\text{АТР}}$ каналу в мітохондріях кардіоміоцитів [5, 8, 9], оскільки було виявлено, що його активація усуває наслідки ішемії-реперфузії [5, 9], а діазоксид (7-хлоро-3-

метил-4*H*-1,2,4-бензотіадіазин 1,1-діоксид) – активатор АТР-чутливого каналу – є відомим кардіопротектором [3, 8, 10].

Накопичено достатньо багато відомостей стосовно дії діазоксиду не тільки на мітохондріях серця, але й печінки, нирок, сітківки ока, мозку [1, 11–13]. Зокрема, у роботах, виконаних на мітохондріях різних тканин, показано, що діазоксид стимулює вхід K^+ крізь АТР-чутливий канал [10], інгібує апоптоз [5], зменшує масоване утворення активних форм кисню в умовах ішемії [15], частково деполяризує мітохондрії [16], прискорює дихання [1, 5], зумовлює набухання мітохондрій [1, 5, 14, 17]. Але дослідження властивостей АТР-чутливого каналу в мітохондріях гладеньких м'язів загалом, та, за дії діазоксиду зокрема, досить обмежені [18].

У роботах, виконаних на мітохондріях серця, печінки та нирок [1, 5, 14, 17, 19], методом спектрофотометрії було показано чутливе до АТР набухання мітохондрій під дією селективного активатора міто $K_{\text{АТР}}$ діазоксиду. Беручи до уваги, що регуляція об'єму матриксу вважається головним наслідком активації каналу, ми поставили задачу, по-перше, дослідити зміну гідродинамічного діаметра (ГД) мітохондрій в умовах активації каналу селективним активатором – діазоксидом. При дослідженні впливу активації міто $K_{\text{АТР}}$ на об'єм мітохондрій його зміну найчастіше визначають опосередковано, реєструючи на спектрофотометрі падіння світлорозсіювання [1, 5, 14, 17]. На відміну від спектрофотометрії, безумовною перевагою використаного в цій роботі методу фотонної кореляційної спектроскопії (ФКС) є можливість безпосередньо визначати ефективний ГД органел в конкретних умовах досліду. Цей метод дослідження базується на вивченні спектральних характеристик монохроматичного когерентного випромінювання під час проходження його крізь дисперсну нативну систему з подальшим визначенням функції розподілення розміру частинок, присутніх у середовищі інкубації. Цей метод є високочутливим і дозволяє визначати діаметр частинки в діапазоні від 0,002 до 2000 мкм [20]. Саме ці переваги методу обумовили доцільність його використання для поставленої нами задачі.

У літературі існують суперечливі дані щодо дії активації міто $K_{\text{АТР}}$ на утримання внутрішньою мітохондріальною мембраною потенціалу. Зокрема, деякими авторами було показано, що діазоксид суттєво не впливає на мітохондріальний потенціал [17], проте у роботах інших авторів було продемонстровано деполяри-

зацію мембрани за дії діазоксиду [9, 16]. Деякі автори взагалі вважають, що дія діазоксиду на мітохондрії не опосередкована активацією міто $K_{\text{АТР}}$, а здійснюється шляхом інгібування сукцинатдегідрогенази [16]. Але оскільки, як вважають більшість авторів, цей канал регулює об'єм мітохондріального матриксу, а зміна цього об'єму, у свою чергу, регулює інтенсивність переносу електронів електрон-транспортним ланцюгом, то нам цілком логічно вважається, що активація каналу має призводити до часткової деполяризації мітохондрій. Таким чином, щоб підтвердити це припущення, ми, по-друге, поставили наступну задачу: методом протокової цитометрії, використовуючи потенціалчутливий зонд родамін-123, дослідити зміну потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани за активації каналу діазоксидом.

Матеріали і методи

У роботі використовували самок шурів лінії Wistar. Фракцію ізольованих мітохондрій тканини міометрія одержували за допомогою двох послідовних центрифугувань відповідно при 3000 та 12 000 g у середовищі наступного складу (мМ): HEPES (pH 7,2, 4 °C) – 20, сахароза – 250, EDTA – 1. Осад після другого центрифугування ресуспендували в середовищі такого самого складу, але без EDTA, а потім зберігали на льоду. Концентрацію протеїну визначали за методом M. Bradford.

Вимірювання ефективного ГД мітохондрій здійснювали методом ФКС на лазерному кореляційному спектрометрі «ZetaSizer-3» (Malvern Instruments), (P = 25 мВт, $\lambda = 633$ нм). Час інкубації – 3 хв. Одержану автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode, v 1.61.

Дослідження мембранного потенціалу мітохондрій здійснювали на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США), оснащеному аргоновим лазером ($\lambda_{\text{збудж}} = 488$ нм, інтенсивність випромінювання реєстрували в першому каналі (FL1) $\lambda_{\text{фл.}} = 525$ нм). Для вимірювання використовували потенціалчутливий зонд родамін-123 (200 нМ), кількість протеїну у пробі становила 75 мкг/мл. Мітохондрії навантажували зондом протягом 1 хв. Дані наводили у відносних одиницях інтенсивності флуоресценції.

Усі вимірювання проводили у стандартному середовищі інкубації наступного складу (мМ): HEPES (pH 7,2, 20 °C) – 20, KCl – 125, $MgCl_2$ – 1, Na_2HPO_4 – 5, ротенон – 0,05, сукцинат – 5, олігоміцин – 0,01. АТР, діазоксид,

глібенкламід додавали в концентрації 200, 50 і 20 мкМ відповідно.

У роботі використовували наступні реактиви: родамін-123, НЕРЕС, EDTA, сукцинат, ротенон, олігоміцин, діазоксид та глібенкламід виробництва Sigma (США), валіноміцин та АТР виробництва Fluka (США). Сахароза та інші реактиви – вітчизняного виробництва, ступеня чистоти чда або хч.

Результати та обговорення

Методом ФКС було виявлено зміну ГД мітохондрій за дії блокатора мітоK_{АТР} АТР та активатора діазоксиду (час інкубації – 3 хв). У середовищі, яке містило 125 мМ КСІ, значення ГД мітохондрій на 3-й хв інкубації становило 459 ± 16 нм (n = 5) (рис. 1, А, колонка 1). Проте в тих самих умовах, але у присутності 200 мкМ АТР значення ГД мітохондрій становило 411 ± 16 нм (n = 5) (рис. 1, А, колонка 2). Тобто АТР, блокуючи функціонування K⁺-каналу, попереджає збільшення об'єму мітохондріального матриксу. У середовищі, яке містило еквімолярний NaCl, замість КСІ, залежності

ГД від АТР не спостерігали: на 3-тю хвилину інкубації мітохондрій їхній ГД становить 441 ± 23 нм (n = 5) (рис. 1, А, колонка 5); в тих самих умовах, але у присутності АТР він майже не змінюється – 439 ± 25 нм (n = 5) (рис. 1, колонка 6). Вплив АТР на значення ГД мітохондрій спостерігали в кінетичних дослідженнях (рис. 1, Б). У середовищі, яке містило КСІ, ГД мітохондрій становить 412 ± 16 нм на першій хвилині інкубації та зростає до 452 ± 20 нм (n = 5) на четвертій хвилині. Тобто, у разі активації мітоK_{АТР} ефективний діаметр мітохондрій в середньому зростає на 10%. У присутності 200 мкМ АТР ГД мітохондрій на першій хвилині інкубації становить 388 ± 29 нм, а на четвертій хвилині зростає лише до 405 ± 22 нм (n = 5), тобто менше ніж на 5%.

Присутність у середовищі інкубації діазоксиду в концентрації 50 мкМ, активатора мітоK_{АТР} на фоні 200 мкМ АТР сприяє збільшенню ГД мітохондрій до 451 ± 17 нм (n = 5) (рис. 1, А, колонка 3), що майже відповідає значенню ГД мітохондрій в контролі (рис. 1, А, колонка 1). Додавання глібенкламід, блокато-

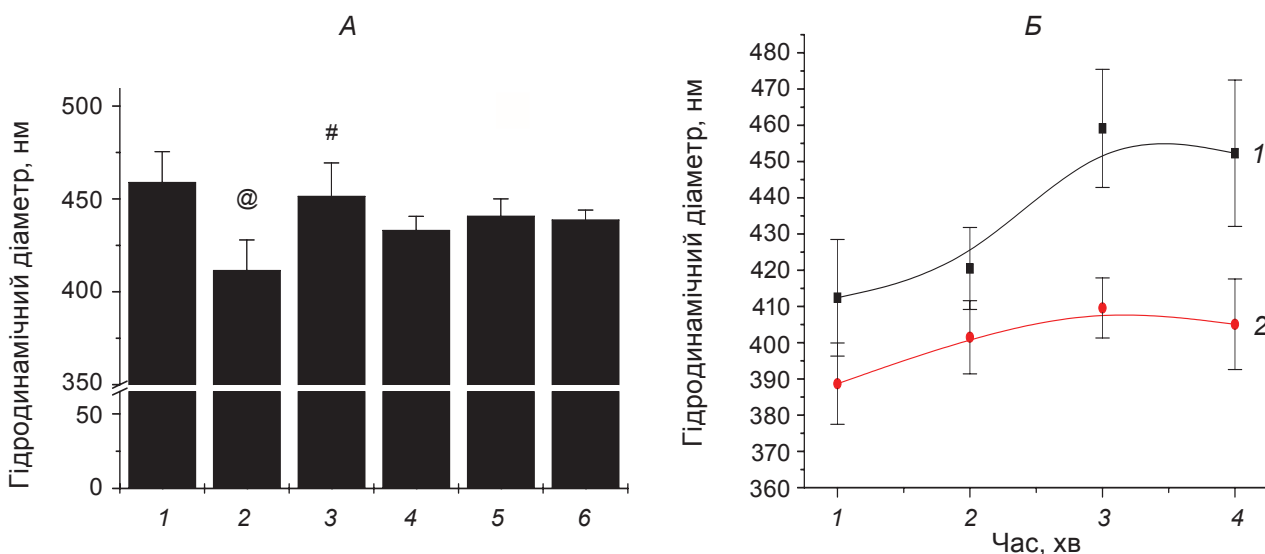


Рис. 1. Значення гідродинамічного діаметра мітохондрій міометрія, виміряне із використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії.

А – вплив модифікаторів мітоK_{АТР} (M ± t, n = 5): 1 – стандартне середовище інкубації (тут і далі див. розділ «Матеріали і методи»); 2 – стандартне середовище з додаванням 200 мкМ АТР; 3 – стандартне середовище з додаванням 200 мкМ АТР та 50 мкМ діазоксиду; 4 – стандартне середовище з додаванням 200 мкМ АТР, 50 мкМ діазоксиду та 20 мкМ глібенкламід; 5 – середовище інкубації, яке містить 125 мМ NaCl замість КСІ; 6 – як 5, але з додаванням 200 мкМ АТР.

Б – кінетичні закономірності зміни гідродинамічного діаметра під дією АТР (M ± t, n = 7): 1 – стандартне середовище інкубації; 2 – стандартне середовище, яке містить 200 мкМ АТР.

Тут і на рис. 4, @ відмінності вірогідні (P < 0,05) відносно контрольного значення (колонка 1); # відмінності вірогідні (P < 0,05) відносно колонки 2

ра мітоК_{АТР} (20 мкМ), призводить до зменшення ГД мітохондрій до 433 ± 7 нм ($n = 5$) (рис. 1, А, колонка 4).

Отже, методом ФКС було виміряно середній гідродинамічний діаметр мітохондрій в умовах активації та блокування мітоК_{АТР}. Виявилось, що у КСІ-вмісному середовищі ГД мітохондрій у присутності АТР має менше значення, ніж за його відсутності. Активатор мітоК_{АТР} діазоксид відновлює значення ГД мітохондрій майже до контрольних значень, а блокатор мітоК_{АТР} глібенкламід, навпаки, зменшує його, як і АТР.

Дані, одержані методом ФКС, добре корелюють з нашими даними, одержаними за допомогою бічного світлорозсіювання. Так, у присутності 200 мкМ АТР має місце майже повне блокування падіння світлорозсіювання мітохондрій у КСІ-вмісному середовищі, що свідчить про відсутність набухання мітохондрій в умовах інгібування мітоК_{АТР} АТР. Але у середовищі, яке містить еквімолярний NaCl, хоча падіння світлорозсіювання також спостерігається, АТР ніяким чином не впливає на цей процес. Діазоксид у концентрації 50 мкМ у КСІ-вмісному середовищі також істотно зменшує світлорозсіювання на фоні присутності 200 мкМ АТР у середовищі інкубації (дані не наведено).

Як виявили досліді з потенціалчутливим зондом збільшення об'єму матриксу мітохондрій супроводжується їхньою деполяризацією (рис. 2, 3). Потенціал внутрішньої мітохон-

дріальної мембрани вимірювали за допомогою флуоресцентного зонду родамін-123. Здатність позитивно зарядженої молекули родаміну-123 накопичуватись в енергізованих мітохондріях, внутрішня мембрана яких заряджена негативно, та збільшувати внаслідок цього інтенсивність власної флуоресценції, була показана раніше в роботі О. Vergun et al. [21]. У підібраних нами умовах, як свідчить рис. 2, додавання інгібітора дихання азиду натрію в концентрації 10 мМ у стандартне середовище інкубації, яке містило мітохондрії, енергізовані 5 мМ сукцинатом, спричинює зміщення положення піка в бік менших значень інтенсивності флуоресценції (рис. 2, гіст. 2) порівняно з контролем (рис. 2, гіст. 1). Тобто, в цих умовах досліді реєструється потенціал внутрішньої мітохондріальної мембрани, який нівелюється у разі додавання 10 мМ азиду натрію. Отже, за цих умов має місце деполяризація мітохондріальної мембрани.

Дослідження дії активатора мітоК_{АТР} діазоксиду на потенціал внутрішньої мітохондріальної мембрани являє значний інтерес для нас, оскільки дані в літературі стосовно цього питання є досить суперечливими. У деяких роботах, що стосуються мітоК_{АТР}, було показано відсутність впливу діазоксиду на мітохондріальний потенціал [17], тоді як в інших було виявлено деполяризацію мембрани під дією діазоксиду [9, 16]. Деякі автори припускають, що діазоксид зменшує негативні наслідки ішемії-реперфузії на тканині міокарда саме за-

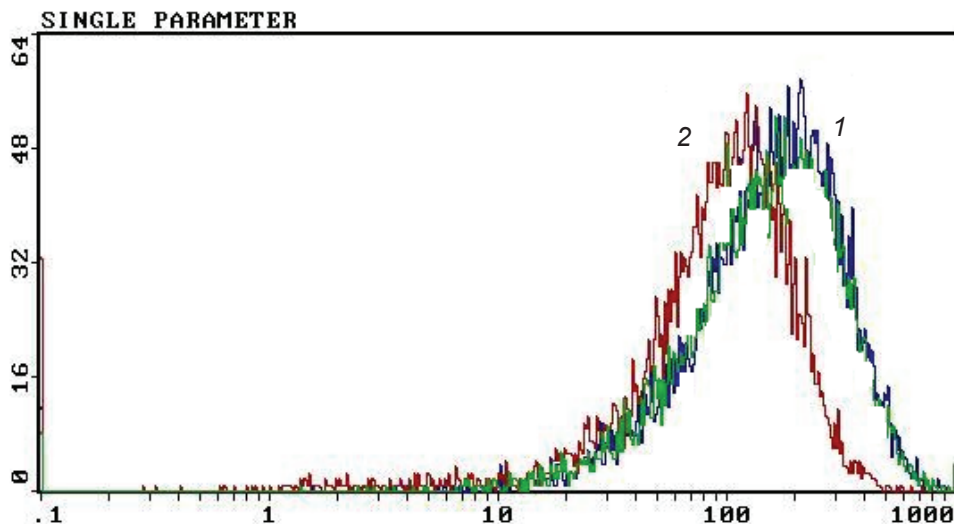


Рис. 2. Азидіндуковане зміщення положення гістограми інтенсивності флуоресценції зонду родамін-123 у стандартному середовищі інкубації мітохондрій міометрія: 1 – стандартне середовище інкубації (контроль); 2 – як 1, але з додаванням 10 мМ азиду Na. Тут і у досліді (рис. 4) використовували метод протокової цитофлуориметрії

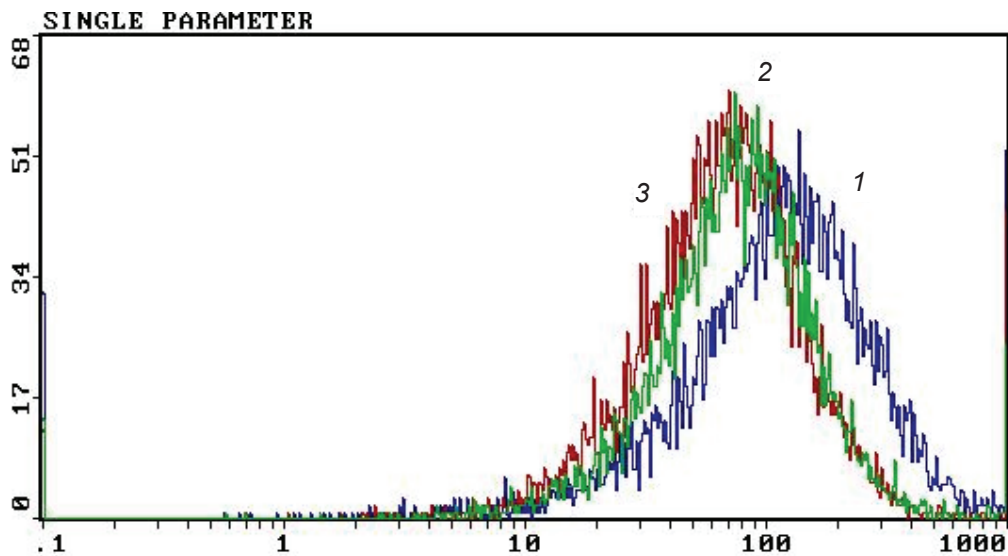


Рис. 3. Дослідження впливу діазоксиду на потенціал мітохондрій міометрія: 1 – стандартне середовище інкубації; 2 – як 1, але з додаванням 50 мкМ діазоксиду; 3 – як 1, але з додаванням 10 мМ азиду Na

вдяки частковій деполаризації мітохондрій та внаслідок цього прискоренню дихання. Очевидно така розбіжність результатів пояснюється різними умовами, які використовували дослідники [9, 16, 17]. Механізм деполаризуючої дії також досі викликає суперечливі припущення. Так, автори, що досліджували дію діазоксиду в широкому діапазоні концентрацій (від 0 мкМ до 1 мМ), вважають, що вплив діазоксиду на мембранний потенціал мітохондрій не пов'язаний з активацією мітоK_{АТР}, оскільки виявлявся в середовищі, яке не містило іони K [17]. Але наші результати свідчать, що деполаризація за дії діазоксиду спостерігається лише в середовищі, яке містить KCl (рис. 3 та 4), і не виявляється ні в середовищі, яке містить замість 125 мМ KCl еквімолярний розчин NaCl (рис. 4, колонка 5) або 250 мМ сахарозу (дані не наведено). Отже, діазоксид у концентрації 50 мкМ у KCl-вмісному середовищі інкубації деполаризує мітохондріальну мембрану (рис. 3 та 4). Дані Busija et al. [16] вказують на те, що дія діазоксиду на мітохондрії в певних умовах не пов'язана з мітоK_{АТР}. У роботі [16] показано інгібування сукцинатдегідрогенази за дії високих концентрацій діазоксиду. Також існують дані про інгібування F1Fo-АТР-ази діазоксидом у концентрації до 100 мкМ [22]. На нашу думку, виявлена нами деполаризація мітохондріальної мембрани за дії діазоксиду (рис. 3 та 4) найімовірніше пов'язана з функціонуванням K⁺-транспортувальної системи, оскільки, по-перше, деполаризація не спостерігається в

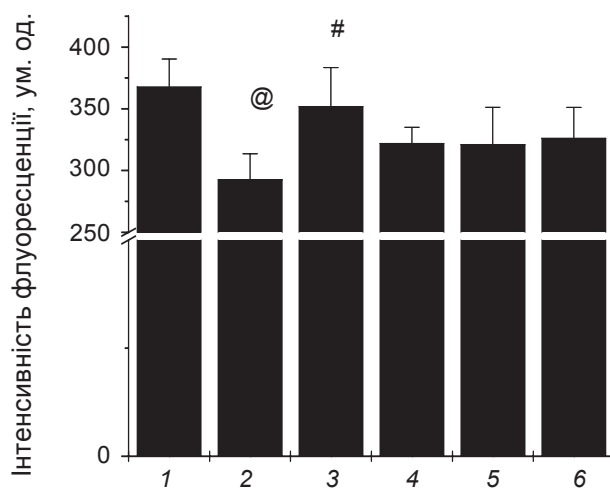


Рис. 4. Вплив діазоксиду та глібенкламідом на поляризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани міометрія (колонки 1–3 відповідають стандартному середовищу інкубації, колонки 4–6 – середовищу інкубації, яке містить еквімолярний NaCl замість KCl) ($M \pm m$; $n = 5$): 1 – стандартне середовище інкубації; 2 – як 1, але з 50 мкМ діазоксидом; 3 – як 1, але з 50 мкМ діазоксидом та 20 мкМ глібенкламідом; 4 – середовище інкубації, яке містить 125 мМ NaCl замість KCl; 5 – як 4, але з 50 мкМ діазоксидом; 6 – як 4, але з 50 мкМ діазоксидом та 20 мкМ глібенкламідом

безкалієвому середовищі (рис. 4), по-друге, у середовищі інкубації був присутній інгібітор F1Fo-АТР-ази олігоміцин (1 мкМ) (див. «Ма-

теріали і методи»), тому про інгібування F1Fo-АТР-ази діазоксидом в цьому разі не може бути мови. По-третє, інгібування сукцинатдегідрогенази діазоксидом, що було показано в роботі Busija et al. [16], виявлялось при значно вищих, ніж використані нами, концентраціях.

Як блокатор мітоK_{АТР} каналу ми використали глібенкламід – речовину сульфаніламідної природи ([2-(5-хлор-2-метоксибензамідо)-етил]бензенсульфоніл-N'-циклогексиламід). Показано, що канал містить регуляторну субодиницю, на якій знаходиться рецептор до сульфаніламідів [23]. Вибір глібенкламиду серед широкого спектра блокаторів, зумовлений його вищою спорідненістю до мітоK_{АТР}, ніж в інших блокаторів [2]. Значення константи інгібування (K_i) глібенкламідом мітоK_{АТР} знаходиться в межах 1–6 мкМ в мітохондріях різних тканин [2]. У роботах, виконаних на тканинах гладеньких м'язів судин, був використаний саме цей блокатор [18, 24].

Глібенкламід у концентрації 20 мкМ додавали у стандартне середовище інкубації разом із 50 мкМ діазоксиду. При цьому спостерігається підвищення флуоресценції (рис. 4, колонка 3) порівняно з тим, коли в середовищі присутній тільки діазоксид (рис. 4, А, колонка 2). Значення флуоресценції зонду в цьому разі повністю збігається зі значеннями флуоресценції, одержаними у стандартних умовах (рис. 4, колонки 1, 3). Тобто у присутності глібенкламиду на фоні діазоксиду мітохондрії міометрія здатні краще утримувати потенціал внутрішньої мембрани. На нашу думку, усунення деполяризуючої дії діазоксиду на мітохондріальний потенціал відбувається через блокування глібенкламідом активованого діазоксидом входу K⁺ крізь мітоK_{АТР}. У роботах [1, 25] показано, що дія глібенкламиду, що блокує вхід K⁺ у мітохондріальний матрикс, виявлялася у багатьох наслідках для функціонування мітохондрій, зокрема, у зменшенні об'єму та інгібуванні дихання [1, 25].

Оскільки, як було показано раніше, вхід K⁺ призводить до деполяризації мембрани та прискорення дихання [1, 3, 5, 9, 16], цілком логічно, що дія глібенкламиду виявляється у попередженні деполяризації.

Для доказу специфічності впливу цих речовин саме на мітоK_{АТР}-канал, ми дослідили їхню дію на фоні валіноміцину (рис. 5). Як відомо, валіноміцин є селективним K⁺-іонофором [26]. Вхід K⁺ в енергізовані мітохондрії під дією валіноміцину супроводжується зсувом флуоресценції в бік менших значень, що свідчить про деполяризацію мембрани мітохонд-

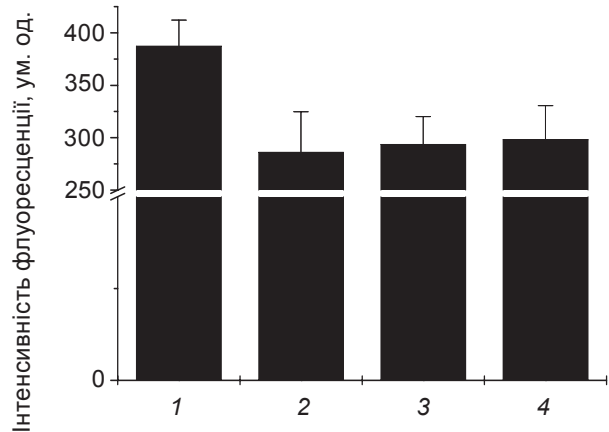


Рис. 5. Дослідження поляризації внутрішньої мітохондріальної мембрани за присутності валіноміцину ($M \pm m$; $n = 4$): 1 – стандартне середовище інкубації; 2 – як 1, але з 1 мкМ валіноміцином; 3 – як 1, але з 1 мкМ валіноміцином та 50 мкМ діазоксидом; 4 – як 1, але з 1 мкМ валіноміцином, 50 мкМ діазоксидом та 20 мкМ глібенкламідом

рій міометрія (рис. 5, колонки 1, 2). У цьому разі деполяризація спричинена не активацією селективного каналу для іонів K, а масованим входом цих іонів через мембрану за градієнтом їхньої концентрації у присутності іонофору. Внесення діазоксиду не зумовлює ніяких подальших змін (рис. 5, колонка 3) так само, як і внесення глібенкламиду на фоні присутності діазоксиду з валіноміцином (рис. 5, колонка 4) не супроводжується відновленням флуоресценції до контрольних значень, як було в умовах без валіноміцину (рис. 5, колонка 3).

У разі заміни 125 мМ KCl у середовищі інкубації на еквімолярний NaCl не спостерігається ніякого впливу ні діазоксиду, ні глібенкламиду на мітохондріальний потенціал (рис. 4, колонки 4, 5, 6). Таким чином, ми вважаємо, що деполяризуючий вплив діазоксиду на мітохондріальну мембрану та її реполяризація під дією глібенкламиду пов'язані саме з активацією та з блокуванням АТР-чутливого K⁺-каналу мітохондріальної мембрани.

Отже, було показано, що активатор мітоK_{АТР}-каналу діазоксид спричинює збільшення об'єму мітохондрій міометрія та частково деполяризує внутрішню мітохондріальну мембрану, що можна пояснити активацією входу іонів K через селективний АТР-чутливий мітохондріальний K⁺-канал. Дія діазоксиду ефективно блокується селективним блокатором мітоK_{АТР}-каналу глібенкламідом.

**ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРОВ
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО
АТР-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО
КАЛИЕВОГО КАНАЛА ДИАЗОКСИДА
И ГЛИБЕНКЛАМИДА НА
ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЙ ДИАМЕТР
И МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
МИТОХОНДРИЙ МИОМЕТРИЯ**

*О. Б. Вадзюк, А. Ю. Чунихин,
С. А. Костерин*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: vadzyuk@biochem.kiev.ua

Методом фотонной корреляционной спектроскопии было показано увеличение гидродинамического диаметра митохондрий в присутствии активатора АТР-чувствительного К⁺-канала диазооксида. Селективный блокатор данного канала, глибенкламид, устраняет этот эффект. Активация канала диазооксидом приводит к частичной деполяризации митохондриальной мембраны. При этом, под действием глибенкламида наблюдается восстановление митохондриального потенциала, но в присутствии валиномицина вместе с диазооксидом в среде инкубации глибенкламид не влияет на деполяризацию митохондрий. Таким образом, в данной работе показано, что активация АТР-чувствительного К⁺-канала приводит к увеличению размера митохондрий и частичной деполяризации внутренней митохондриальной мембраны.

Ключевые слова: митохондриальный АТР-чувствительный К⁺-канал, диазооксид, мембранный потенциал митохондрий.

**INFLUENCE OF THE EFFECTORS
OF MITOCHONRIAL ATP-DEPENDENT
POTASSIUM CHANNEL OF
DIAZOXIDE AND GLYBENCLAMIDE
ON HYDRODYNAMIC DIAMETER
AND MEMBRANE POTENTIAL OF THE
MITOCHONDRIA MYOMETRIUM**

*O. B. Vadzyuk, A. Yu. Chunikhin,
S. O. Kosterin*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: vadzyuk@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel (mitoK_{ATP}) is a main factor of regulation of K⁺ exchange in mitochondria. Using photon correlation spectroscopy we have shown diazoxide-induced increase of hydrodynamic diameter of mitochondrial particles from the rat myometrium. Selective channel blocker glybenclamide partially eliminates this effect.

By means of Rhodamine-123 fluorescence it was shown that activation of ATP-sensitive K⁺-channel in mitochondria caused partial depolarization of the mitochondrial membrane. This effect was absolutely blocked by glybenclamide. In the presence of valinomycin and diazoxide together, depolarization also was detected, but in this case glybenclamide failed to restore mitochondrial potential.

Thus, activation of mitoKATP from the rat myometrium causes the increase of the hydrodynamic diameter of organelles and partial depolarization of the inner membrane.

Key words: mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, diazoxide, mitochondrial potential.

1. *Cancherini D., Trabuco L., Rebousac N. et al.* // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – **285**. – P. F1291–F1296.
2. *Garlid K., Paucek P.* // *BBA.* – 2003. – **1606**. – P. 23–41.
3. *Liu Y., Sato T., O'Rourke B. et al.* // *Circulation.* – 1998. – **97**. – P. 2463–2469.
4. *Kaasik A., D. Safiulina, A. Zharkovsky et al.* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – **292**. – P. C157–C163.
5. *Costa A., Quinlan C. L., Andrukhiv A. et al.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – **290**. – P. H406–H415.
6. *O'Rourke B.* // *Circ. Res.* – 2004. – **94**. – P. 420–432.
7. *Zoetewij J. P., van de Water B., de Bont H. J. et al.* // *Biochem. J.* – 1994. – **299**. – P. 539–543.
8. *Forbes R. A., Steenbergen C., Murphy E.* // *Circ Res.* – 2001. – **88**. – P. 802–809.
9. *Holmuhamedov E. L., Jovanovic, Dzeja P. et al.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1998. – **275**. – P. H1567–H1576.
10. *Garlid K., Paucek P., Yarov-Yarovoï V. et al.* // *Circ. Res.* – 1997. – **81**. – P. 1072–1082.
11. *Bajgar R., Seetharaman S., Kowaltowski A. J. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276** (36). – P. 33369–33374.
12. *Roth S., Dreixler J. C., Shaikh A. R. et al.* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – **47**. – P. 2114–2124.
13. *Paucek P., Mironova G., Mahdi F. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1992. – **267** (36). – P. 26062–26069.
14. *Costa A., Jacob R., Costa C. et al.* // *Ibid.* – 2006. – **281** (30). – P. 20801–20808.
15. *Ozcan C., Bienengraeber M., Dzeja P. et al.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – **282**. – P. H531–H539.
16. *Busija D., Katakam P., Rajapakse N. C. et al.* // *Brain Res. Bull.* – 2005. – **66**. – P. 85–90.
17. *Kowaltowski A., Seetharaman S., Paucek P. et al.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – **280**. – P. H649–H657.
18. *Hu H. L., Zhang Z. X., Zhao J. P. et al.* // *Sheng Li Xue Bao.* – 2006. – **58**(3). – P. 262–268.
19. *Garlid K., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**(15). – P. 8796–8799.
20. *Henk G. Merkus.* Particle Size Measurements. Fundamentals, Practice, Quality. – Springer, 2009. – 533 p.
21. *Vergun O., Votyakova T., Reynolds I.* // *Biophys. J.* – 2003. – **85**. – P. 3358–3366.
22. *Comelli M., Metelli G., Mavelli I.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – **292**. – P. H820–H829.
23. *Cuong D. V., Kim N., Joo H. et al.* // *Mitochondrion.* – 2005. – **5**. – P. 121–33.
24. *Chen Y., Traverse J. H., Zhang J., Robert J.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. **281**(2). – P. H738–H744.
25. *Montoya-Perez R., Saavedra-Molina A., Trujillo X. et al.* // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2010. – **42**(1). – P. 21–27.
26. *Aldakkak M., Stowe D. F., Cheng Q. et al.* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2010. – **298**(3). – P. 530–541.

Отримано 27.04.2010