

ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА АТР-ЗАВИСИМОГО K^+ -КАНАЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ И ОТКРЫВАНИЕ ЦИКЛОСПОРИНЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ПОРЫ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС

О. В. АКОПОВА, В. И. НОСАРЬ, В. А. БУРЫЙ, Л. И. КОЛЧИНСКАЯ, И. Н. МАНЬКОВСКАЯ, В. Ф. САГАЧ

*Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев;
e-mail: a-dubensky@mail.ru*

Изучено влияние активатора митохондриального АТР-зависимого K^+ -канала ($K^+_{АТР}$ -канала) — диазоксиды — на потребление кислорода, функциональное состояние и открывание циклоспоринчувствительной поры в митохондриях печени крыс. Установлено, что активация $K^+_{АТР}$ -канала приводит к повышению стационарной скорости дыхания в условиях окисления субстрата дыхания (V_4^S) и разобщению дыхательной цепи вследствие ускорения K^+ -цикла митохондрий, которое снижает дыхательный контроль и скорость дыхания в состоянии 3 (V_3) при ее одновременном повышении в состоянии 4 ($V_4^{АТР}$). Показано, что снижение V_3 происходит вследствие ингибирования системы окислительного фосфорилирования, проявляющегося в замедлении как синтеза, так и гидролиза АТР, а также в снижении выхода АТР при кажущемся повышении показателя Р/О вследствие неполного превращения АДФ. Повышение АТР-зависимого входа K^+ в условиях открывания циклоспоринчувствительной поры (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) резко углубляет разобщение вследствие активации K^+ - и Ca^{2+} -циклов, поддерживаемых одновременной работой МРТР и Ca^{2+} -унипортера, а также K^+/H^+ -обмена и K^+ -каналов, включая $K^+_{АТР}$ -канал. При этом активация $K^+_{АТР}$ -канала приводит к частичному подавлению МРТР, однако недостаточному для восстановления функционального состояния митохондрий. Элиминация Ca^{2+} -цикла после открывания МРТР возвращает показатели функционального состояния митохондрий к контрольному уровню, что указывает на МРТР как механизм обратимой модуляции биоэнергетических эффектов, обусловленных активацией $K^+_{АТР}$ -канала.

Ключевые слова: $K^+_{АТР}$ -канал, диазоксид, потребление кислорода, окислительное фосфорилирование, митохондриальная пора, митохондрии печени.

Митохондриальный АТР-зависимый K^+ -канал ($K^+_{АТР}$ -канал) был открыт Иноуэ в 1991 г. [1]. Это открытие вскоре вызвало оживленный интерес исследователей в связи с достоверно установленной ролью митохондриального $K^+_{АТР}$ -канала в механизмах кардиопротекции, и соответственно — обещающими перспективами применения как уже известных, так и создания новых фармакологических модуляторов $K^+_{АТР}$ -канала митохондрий и плазматических мембран [2].

Кардиопротекторный эффект открывания $K^+_{АТР}$ -канала в митохондриях подтвержден многочисленными исследованиями [3—5]. В частности, известный феномен ишемической адаптации (preconditioning) связывают с активацией митохондриального $K^+_{АТР}$ -канала, поскольку защитный эффект хорошо воспроизводится его активаторами (диазоксидом, пинацидилем) и устраняется блокаторами — глибенкламидом и 5-гидроксидеканоевой

кислотой [2, 4]. Однако, несмотря на то, что история интенсивного изучения митохондриального $K^+_{АТР}$ -канала насчитывает уже два десятилетия, вопрос о защитных механизмах клетки, приводимых в действие открыванием $K^+_{АТР}$ -канала, и поныне остается дискуссионным.

Известно, что во внутренней мембране митохондрий присутствует сложная система каналов, обменников, транспортеров субстратов и продуктов метаболизма [6], благодаря которым поддерживается электролитный баланс между матриксом и внутриклеточной средой, а также — работа комплексов дыхательной цепи и синтез АТР. Физиологическая роль большинства этих транспортных систем еще далеко не ясна.

Электрохимический потенциал протонов, генерируемый на внутренней мембране митохондрий вследствие работы дыхательной цепи, обеспечивает протекание важнейших

энергозависимых процессов — синтеза АТФ и потенциалзависимого транспорта физиологически значимых катионов: Ca^{2+} , K^+ , Na^+ [7, 8]. Свободная энергия, высвобождаемая в ходе окислительно-восстановительной реакции, превращения субстрата, вследствие трансмембранного переноса протонов комплексами дыхательной цепи преобразуется в потенциальную энергию, электрохимический потенциал протонов, основными компонентами которого являются мембранный потенциал ($\Delta\psi_m$) и трансмембранный градиент концентрации протонов (ΔpH). Энергетическое сопряжение между окислением субстрата, синтезом АТФ и транспортом катионов, в свою очередь, обуславливает количественное сопряжение между этими процессами, которое выражается в определенных стехиометрических соотношениях между потреблением кислорода и переносом положительных зарядов в матрикс митохондрий, а также — между потреблением кислорода и количеством превращенного АДФ, субстрата окислительного фосфорилирования, которое выражают коэффициентом Р/О [9, 10].

Синтез АТФ, основного энергетического ресурса клетки, зависит от функционального состояния митохондрий, являющихся основными производителями клеточного АТФ [7, 8, 11]. В реальных условиях синтез АТФ неизбежно сопровождается энергетическими потерями, в частности из-за входа катионов в матрикс митохондрий, что ведет к снижению Р/О.

Роль транспорта катионов в регуляции энергетического метаболизма митохондрий в настоящее время оценена далеко не в полной мере. Помимо ионных каналов, в митохондриальной мембране присутствуют различные механизмы «утечки» катионов и протонов, посредством которых эти положительно заряженные частицы попадают в матрикс из среды [12, 13]. Утечка катионов и протонов в матрикс нелинейно возрастает в области высоких $\Delta\psi_m$, вследствие чего гиперполяризация мембраны, как и в случае разобщения при низких $\Delta\psi_m$, достаточно неожиданно, приводит к снижению Р/О [14, 15].

Открытие митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore, МРТР), сопровождаемое входом воды в матрикс митохондрий, набуханием, разрывом наружной мембраны, высвобождением цитохрома *c* из межмембранного пространства, блокированием транспорта электронов и синтеза АТФ приводит к глубокому нарушению энергетического метаболизма этих органелл [8, 16, 17]. Закономерно, что МРТР является

одной из основных молекулярных мишеней в терапии широкого спектра заболеваний и патологических состояний организма. Полагают, что упомянутые выше кардио- и цитопротекторные эффекты активаторов K^+ -канала обусловлены подавлением функциональной активности МРТР [2, 3, 5].

Известно, что активация K^+ -канала оказывает комплексное действие на функциональное состояние митохондрий, включая митохондриальный объем, потребление кислорода, транспорт Ca^{2+} , окислительное фосфорилирование и продукцию активных форм кислорода, АФК [2, 3, 18–21]. Согласно результатам большинства исследований, активация K^+ -канала снижает накопление Ca^{2+} и подавляет МРТР вследствие ограничения входа Ca^{2+} [18, 19], либо вследствие повышения продукции АФК и активации митохондриальной изоформы протеинкиназы С [22, 23] образующимся гидропероксидом [23]. По данным других авторов, активация K^+ -канала, напротив, снижает образование АФК, что также оказывает кардиопротекторное действие и предупреждает индукцию апоптоза кардиомиоцитов [3]. Как показали результаты наших собственных исследований, активация K^+ -канала митохондрий печени приводит к разобщению дыхательной цепи вследствие активации K^+ -цикла и подавлению МРТР, возможно, связанному с регуляцией митохондриального объема и активацией K^+/H^+ -обмена [24, 25].

Хотя перечисленные эффекты с высокой долей вероятности являются составляющими комплексного кардиопротекторного эффекта, механизм защитного действия активаторов K^+ -канала все еще мало понятен. Известно, что спектр действия активаторов K^+ -канала включает также и модуляцию синтеза АТФ [20, 26]. Однако, несмотря на то, что синтез АТФ является одной из важнейших функций митохондрий, влияние активаторов K^+ -канала на этот процесс остается мало изученным. В то же время, возможно, что модуляция системы окислительного фосфорилирования является одним из звеньев кардиопротекторного механизма, приводимого в действие путем активации K^+ -канала. Следует также отметить, что в литературе практически не показана роль МРТР как возможного модулятора биоэнергетических эффектов, обусловленных открыванием K^+ -канала. Поэтому в настоящей работе была поставлена задача изучить влияние активатора K^+ -канала, диазоксиды, на функциональное состояние и открывание циклоспоринчувствительной поры в митохон-

дриях печени крыс, а также изучить влияние открывания МРТР на основные показатели функционального состояния митохондрий в условиях активации K^+ _{АТР}-канала.

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс линии Вистар с массой тела 200–250 г. Печень промывали охлажденным 0,9%-ым раствором КСl (4 °С), измельчали и гомогенизировали в 5-кратном объеме среды: 250 мМ сахарозы, 20 мМ трис-НСl буфера, 1 мМ ЭДТА (рН 7,4). Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин при 700 g (4 °С); затем супернатант центрифугировали 15 мин при 11 000 g (4 °С). Осадок суспендировали в небольшом объеме среды без добавления ЭДТА и хранили на льду при 4 °С. Содержание протеина определяли методом Лоури.

Светопоглощение регистрировали при 520 нм, начиная с внесения митохондрий в среду инкубации: 120 мМ КСl, 2 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,4), 5 мМ глутамата Na, 1 мМ KH_2PO_4 ; конечная концентрация протеина 0,3 мг/мл. Изменение концентрации добавленного Ca^{2+} в среде регистрировали в присутствии 35 мкМ Ca^{2+} -индикатора, арсеназо-III с помощью спектрофотометра USB-2000 (Ocean Optics, США), используя стандартную двухволновую методику регистрации при 654 и 690 нм. Транспорт протонов регистрировали спектрофотометрически в той же среде в двухволновом режиме при 557 и 600 нм в присутствии рН-индикатора, фенолового красного (ФК), 100 мкМ [27]; конечная концентрация протеина 1,5–2 мг/мл. Потребление кислорода изучали в стандартных условиях полярографическим методом в закрытой ячейке с платиновым электродом при 26 °С в той же среде (конечная концентрация протеина 1,5–2 мг/мл). Диазоксид (DZ) вносили в среду в заданных концентрациях. В зависимости от условий эксперимента в среду также вносили: 15 мкМ $CaCl_2$, 1 мкМ циклоспорин А, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ 4-аминопиридина (4-АП), $5 \cdot 10^{-6}$ М ротенона, 10^{-6} М СССР (конечные концентрации). Олигомицин вносили в количестве 1 мкг/мг протеина.

В работе использовали Na-глутамат, Na_2 -АТР, трис (основание), циклоспорин А (Fluka, Швейцария), DZ, 4-аминопиридин, глибенкламид, ротенон, олигомицин, арсеназо-III, ФК, СССР, ЭДТА (Sigma, США) и другие реактивы марки осч и чда. Растворы готовили на бидистилляте. Достоверность результатов оценивали с помощью парного *t*-критерия Стью-

дента, $P < 0,05$ считали статистически значимой величиной.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты эксперимента, внесение активатора K^+ _{АТР}-канала, DZ приводит к достоверному повышению стационарной скорости дыхания митохондрий печени в условиях окисления субстрата, V_4^S (рис. 1, а). При этом, как уже показано нами ранее [24], ускорение дыхания происходит в области очень низких, наномолярных концентраций DZ. Для оценки активирующего эффекта DZ скорость дыхания выражали в относительных единицах: $J_{rel} = (J - J_0)/(J_{max} - J_0)$ (1), где J – скорость дыхания, регистрируемая в присутствии разных концентраций DZ, J_0 и J_{max} – скорость дыхания, регистрируемая в контроле, в отсутствие DZ и в присутствии концентраций DZ, при которых наблюдается максимальная активация дыхания. Оценка константы активации $K_{1/2}$, из линеаризованной экспериментальной зависимости скорости дыхания от концентрации активатора в координатах Хилла (рис. 1, б), дает величину $K_{1/2} \sim 140$ нМ, что находится в области концентраций, близких к данным для изолированного K^+ _{АТР}-канала митохондрий печени (~ 350 нМ [28]), опубликованным в литературе. Таким образом, ускорение дыхания происходит в области концентраций $DZ \leq 500$ нМ, и его максимальный прирост при окислении глутамата составляет 12–14 нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹. Повышение концентрации активатора (до 50 мкМ), по нашим данным, уже не приводит к дальнейшему ускорению дыхания митохондрий, что свидетельствует о высоком сродстве нативного K^+ _{АТР}-канала митохондрий печени к DZ.

Ранее с использованием селективного блокатора K^+ _{АТР}-канала, глибенкламида, на основании регистрации изменения светопоглощения суспензии, нами было показано, что DZ не является строго селективным активатором K^+ _{АТР}-канала, и в его присутствии происходит активация также АТР-нечувствительной компоненты входа K^+ . Чтобы убедиться в этом в данной работе нами была поставлена задача оценить влияние DZ собственно на АТР-зависимую компоненту входа K^+ . Для этого K^+ _{АТР}-канал селективно блокировали АТР в присутствии Mg^{2+} в условиях стационарного состояния, соответствующего установлению постоянной скорости дыхания и циклического транспорта K^+ , и оценивали влияние DZ на АТР-зависимую компоненту скорости дыхания. Исходили из того, что скорость дыхания

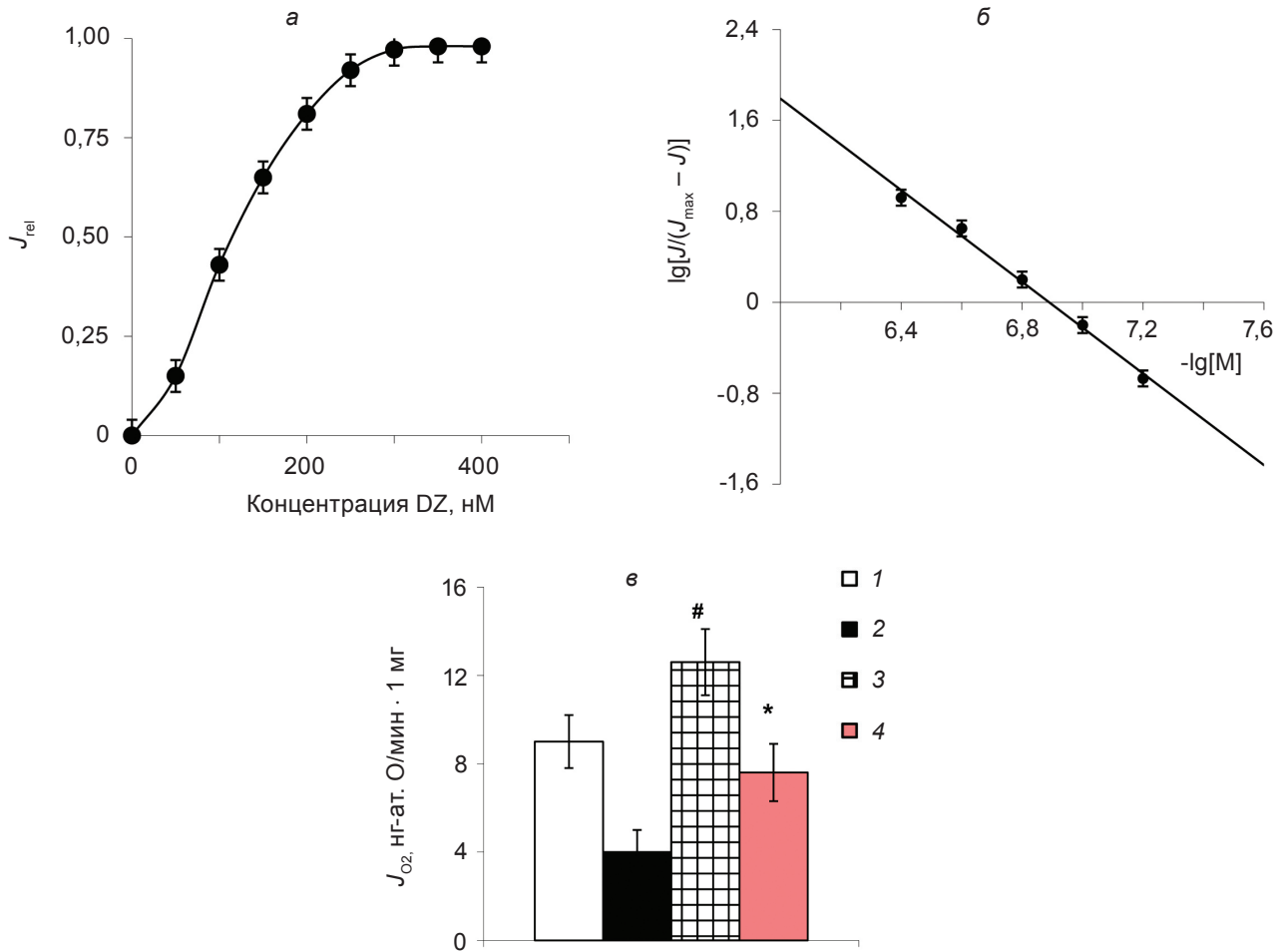


Рис. 1. Влияние активатора K^+_{ATP} -канала, диазоксид (DZ) на скорость дыхания при окислении субстрата в митохондриях печени крыс (а–б); б – данные в координатах Хилла; в – оценка вклада АТФ-независимой (1,3) и АТФ-зависимой (2,4) компонент транспорта K^+ в скорость дыхания (ΔJ_{O_2}) в условиях активации K^+_{ATP} -канала DZ (3,4). ΔJ_{O_2} находили как разность скоростей дыхания в контроле (в отсутствие добавок) и в присутствии 1 мМ Mg^{2+} (1,3), а также в присутствии 1 мМ Mg^{2+} до и после внесения 200 мкМ АТФ (2,4). В среду инкубации вносили: 1 мМ ЭДТА (а–в), 500 нМ DZ (в, 3, 4), 1 мкг/мг олигомицина (в); конечная концентрация протеина 1,5–2 мг/мл ($M \pm m$, $n = 9$); * $P < 0,05$ – достоверно относительно столбика 2; # $P < 0,05$ – достоверно относительно столбика 1 (в). По оси абсцисс: концентрация DZ, нМ (а); отрицательный логарифм концентрации DZ, М (б). По оси ординат: а – скорость DZ-стимулированного дыхания (J_{rel}) в относительных единицах: $J_{rel} = (J - J_0)/(J_{max} - J_0)$, где J_0 – скорость дыхания в отсутствие DZ, J_{max} – максимальная регистрируемая скорость дыхания; б – $\lg[J/(J_{max} - J)]$, где J_{max} – максимальная скорость дыхания; в – скорость дыхания, нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹

связана со скоростью транспорта K^+ известными стехиометрическими соотношениями [7, 9] и доля K^+_{ATP} -канала в потреблении кислорода соответствует его вкладу в скорость потенциалзависимого входа K^+ .

Согласно полученным данным (рис. 1, в), в нативных митохондриях печени, окисляющих глутамат, АТФ-независимая компонента скорости дыхания, блокируемая одними лишь ионами Mg^{2+} , составляет $9,0 \pm 1,2$ нг-ат.

О·мин⁻¹·мг⁻¹, тогда как вклад компоненты, блокируемой Mg -АТФ, составляет $4,0 \pm 1,0$ нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹ (рис. 1, в, столбцы 1, 2). При активации DZ (500 нМ) АТФ-независимая компонента скорости дыхания возрастает до $12,6 \pm 1,5$ нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹, тогда как вклад K^+_{ATP} -канала возрастает до $7,6 \pm 1,3$ нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹, что свидетельствует о его достоверной активации DZ (рис. 1, в, столбцы 2, 4). Таким образом, в присутствии DZ проис-

ходить активация также и АТР-независимой компоненты транспорта K^+ (рис. 1, в, столбцы 1, 3). Известно, что ионы Mg^{2+} блокируют потенциалзависимые K^+ -каналы митохондрий и плазматических мембран [6, 29] и подавляют митохондриальный K^+/H^+ -обмен [12]. Поэтому можно предположить, что снижение скорости дыхания при внесении Mg^{2+} в среду в значительной мере обусловлено блокированием потенциалзависимых K^+ -каналов митохондрий, функциональная активность которых обеспечивает ~60–70% потребления кислорода митохондриями в стационарном состоянии 4. С учетом того, что скорость дыхания при окислении глутамата в контроле составляет $11,5 \pm 1,2$ нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹, вклад нативного K^+_{ATP} -канала митохондрий печени в скорость потребления кислорода составляет ~33%. При активации DZ скорость дыхания возрастает до $26,0 \pm 1,0$ нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹, однако, несмотря на активацию K^+_{ATP} -канала (рис. 1, в, столбцы 1, 3), доля АТР-зависимого транспорта K^+ в скорости дыхания остается на уровне ~33–34%, что составляет ~40 нмоль K^+ ·мин⁻¹·мг⁻¹ в нативных митохондриях и ~76 нмоль K^+ ·мин⁻¹·мг⁻¹ при активации K^+_{ATP} -канала DZ (предполагая, что соотношение K^+/O при окислении глутамата равно 10 [9]). Это свидетельствует об одновременной с K^+_{ATP} -каналом активации АТР-независимой компоненты входа K^+ . Таким образом, полученные результаты подтверждают выводы, сделанные нами ранее [24] и показывают, что DZ не является строго селективным активатором K^+_{ATP} -канала и, возможно, активирует также другие типы K^+ -каналов, в частности, потенциалзависимые K^+ -каналы митохондрий печени. В пользу данного предположения свидетельствует и тот ранее установленный нами факт, что АТР-независимая компонента входа K^+ , активируемая DZ, блокируется неселективным блокатором потенциалзависимых K^+ -каналов, 4-аминопиридином (4-AP) [24].

Из энергетического сопряжения между окислением субстрата и энергозависимыми процессами – транспортом катионов и синтезом АТР, а также количественного сопряжения между транспортом катионов и потреблением кислорода в митохондриях [7, 9] следует, что максимальная скорость транспорта положительно заряженных частиц (протонов) при внесении разобщителя (СССР) прямо пропорциональна скорости разобщенного дыхания (J_U), при котором основная часть свободной энергии, высвобождаемой при окислении субстрата дыхания, расходуется на транспортный

процесс. Частичное повышение потребления кислорода, обусловленное активацией K^+ -цикла (J_K), пропорционально энергетическим затратам вследствие повышения потенциалзависимого входа K^+ . Поэтому для оценки разобщающего эффекта активатора K^+_{ATP} -канала в митохондриях печени использовали соотношение между максимальной скоростью разобщенного дыхания и скоростью дыхания, регистрируемого в присутствии DZ (J_U/J_K), которое характеризует повышение энергетических затрат вследствие активации потенциалзависимого входа K^+ . Скорость разобщенного дыхания (J_U), регистрируемого при окислении глутамата в митохондриях печени в присутствии 10^{-6} М СССР, составляет $104,0 \pm 1,6$ нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹. Зависимость соотношения J_U/J_K от скорости дыхания в присутствии DZ (рис. 2) показывает, что с повышением скорости потенциалзависимого входа K^+ под действием DZ возрастает доля энергетических затрат, обеспечивающих потенциалзависимый транспорт K^+ и K^+ -цикл, что согласуется с развиваемыми в литературе представлениями о «мягком разобщении» дыхательной цепи [2, 12, 13] в условиях активации K^+_{ATP} -канала.

В литературе неоднократно отмечалось, что активация K^+_{ATP} -канала влияет не только на потребление кислорода, но и на весь комплекс митохондриальных функций: объем матрикса, транспорт Ca^{2+} , продукцию АФК и синтез АТР [3, 12, 18, 19]. В то же время, опубликованные в литературе сведения о влиянии мягкого разобщения, индуцированного активацией K^+ -цикла, на систему синтеза АТР в митохондриях в настоящее время еще очень ограничены. Поэтому нами была поставлена задача – изучить влияние активатора K^+_{ATP} -канала на функциональное состояние митохондрий печени крыс. Для этого DZ вносили в концентрациях ≤ 500 нМ, при которых, по нашим данным (рис. 1, а, б), происходит ускорение дыхания и активация K^+ -цикла митохондрий.

Основные результаты изучения влияния DZ на функциональное состояние митохондрий печени представлены в таблице. Согласно полученным данным, разобщение дыхательной цепи вследствие активации K^+_{ATP} -канала проявляется в снижении дыхательного контроля, ДК, что соответствует данным, представленным на рис. 2, замедлению АDP-стимулированного дыхания (состояние 3), а также снижению скорости синтеза АТР (J_{ADP}) (таблица). Снижение ДК (V_3/V_4^{ATP}) обусловлено одновременным замедлением скорости

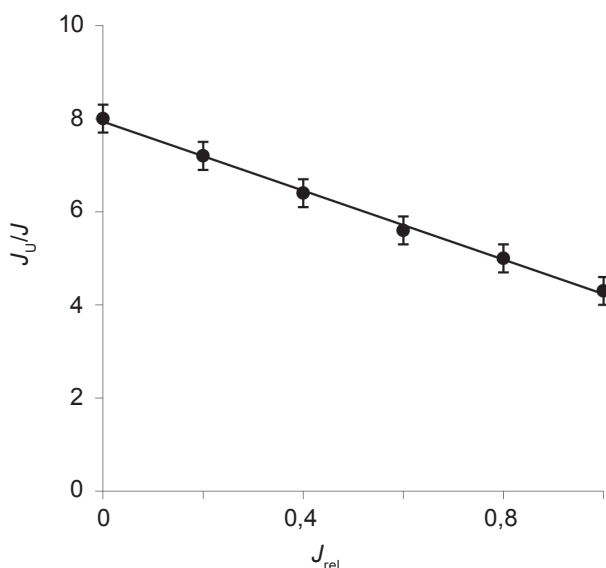


Рис. 2. Оценка разобщающего эффекта АТР-зависимого входа K^+ в условиях активации K^+ -канала. В среду инкубации вносили 1 мМ ЭДТА; конечная концентрация протеина 1,5–2 мг/мл ($M \pm m$, $n = 9$). По оси абсцисс: скорость дыхания, стимулированного диазоксидом (DZ) в относительных единицах (см. рис. 1, а): $J_{rel} = (J - J_0)/(J_{max} - J_0)$, где J_0 – скорость дыхания в отсутствие DZ, J – скорость дыхания в присутствии DZ, J_{max} – максимальная регистрируемая скорость дыхания; по оси ординат: отношение скоростей разобщенного дыхания (J_v) и дыхания, стимулированного DZ (J): J_v/J

дыхания в состоянии 3 (V_3) и ее некоторым ускорением в состоянии 4 (V_4^{ATP}), вызванным, как и в отсутствие ADP, активацией K^+ -цикла митохондрий. В то же время отмечается повышение показателя P/O, характеризующего сопряжение между окислением и фосфорилированием, энергетическую эффективность синтеза АТР (таблица), что достаточно неожиданно с учетом разобщающего эффекта DZ (рис. 2). Поэтому, чтобы выяснить природу наблюдаемого эффекта повышения показателя P/O в условиях K^+ -индуцированного разобщения дыхательной цепи, нами была поставлена задача – изучить непосредственное влияние активатора K^+ -канала на систему окислительного фосфорилирования митохондрий – синтез и гидролиз АТР V-комплексом дыхательной цепи. Для этого использовали то известное обстоятельство, что обе стадии обратимого превращения $ATP \leftrightarrow ADP$ сопровождаются одновременным транспортом протонов, соответственно направленным в матрикс (синтез АТР) либо в среду (гидролиз АТР)

[10, 30]. Транспорт протонов регистрировали спектрофотометрически, используя индикатор рН феноловый красный (ФК) [27]. Типичные кривые, характеризующие влияние активатора K^+ -канала, DZ, на изменение концентрации протонов в среде после внесения добавки ADP, представлены на рисунке 3. Скорость синтеза АТР, J_{ADP} , как и в случае полярографической регистрации, рассчитывали по времени превращения добавленного ADP и выражали в нмоль $ADP \cdot мин^{-1} \cdot мг^{-1}$. В контроле эта величина составляла $128,0 \pm 7,0$ нмоль $ADP \cdot мин^{-1} \cdot мг^{-1}$, что близко к данным таблицы.

Как показывают полученные кривые (рис. 3), после завершения превращения добавленного ADP устанавливается состояние стационарного равновесия между синтезом и гидролизом АТР, соответствующее установлению постоянной скорости дыхания в состоянии 4 (V_4^{ATP}). Блокирование транспорта электронов в дыхательной цепи ротеноном (ингибитором I комплекса) приводит, как известно, к обращению F_0F_1 -АТР синтазы, в результате которого синтез АТР блокируется и мембранный потенциал митохондрий формируется за счет гидролиза АТР, сопровождаемого выходом протонов в среду [11]. Известно, что регистрация гидролиза АТР требует присутствия протонофора в среде инкубации. Однако, как показывают полученные данные (рис. 3), в отсутствие протонофора после блокирования транспорта электронов в дыхательной цепи ротеноном наблюдается медленное снижение светопоглощения вследствие закисления среды инкубации, свидетельствующее о выходе протонов из митохондрий. Выход протонов подавляется олигомицином (рис. 3), что свидетельствует о регистрации активности F_0F_1 -АТРаза митохондрий. Хотя для полного демаскирования выхода протонов при гидролизе АТР необходимо присутствие протонофора [11], полученный результат показывает, что эндогенная протонная проводимость мембраны (proton leak [13]) способна обеспечить выход протонов, хотя и сравнительно медленный, однако, регистрируемый в условиях эксперимента после внесения ротенона в среду (рис. 3). Таким образом, использование ФК обеспечивает методическую возможность изучения влияния активатора K^+ -канала на систему окислительного фосфорилирования митохондрий. Скорость гидролиза АТР определяли по скорости изменения светопоглощения после превращения добавленного ADP и блокирования дыхательной цепи ротеноном и выражали в % от контроля, который в отсутствие DZ принимали за 100%.

Влияние активатора K^+_{ATP} -канала на показатели функционального состояния митохондрий печени крыс в условиях неактивного состояния МРТР (I–II) и в условиях открывания МРТР (III–IV). В среду вносили следующие добавки: 1 мМ ЭДТА (I, контроль); 500 нМ DZ, 1 мМ ЭДТА (II); 15 мкМ $CaCl_2$ (III); 15 мкМ $CaCl_2$, 500 нМ DZ (IV); 15 мкМ $CaCl_2$, 500 нМ DZ с последующим внесением 1 мМ ЭДТА (V). $M \pm m$, $n = 6$

	Скорость дыхания, нг-ат. О·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹			V_3/V_4^{ATP}	P/O	J_{ADP} , нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹
	V_4^S	V_3	V_4^{ATP}			
I	11,5 ± 1,2	92,0 ± 3,0	16,7 ± 1,5	5,5 ± 0,7	1,23 ± 0,08	154,0 ± 6,0
II	26,7 ± 1,5*	65,0 ± 4,0*	18,8 ± 1,2*	3,6 ± 0,4*	1,58 ± 0,12*	107,0 ± 5,5*
III	28,5 ± 2,2*	109,0 ± 4,0	33,0 ± 5,0*	3,3 ± 0,2*	0,89 ± 0,10*	86,0 ± 7,0*
IV	30,5 ± 1,8*	100,1 ± 2,0	45,0 ± 5,0*	2,2 ± 0,1*	н.о. **	н.о.
V	25,0 ± 1,0 [#]	75,0 ± 1,5* [#]	20,0 ± 1,4 [#]	4,0 ± 0,2 [#]	1,30 ± 0,4	120,5 ± 4,0

* $P < 0,05$ по отношению к контролю; [#] $P < 0,05$ по отношению к ряду IV; ** н.о. – не определено.

Изучение влияния DZ на транспорт протонов после внесения ADP (рис. 4) согласуется с результатами полярографической регистрации дыхания (таблица) и показывает, что активация K^+_{ATP} -канала приводит к замедлению синтеза АТР по мере повышения концентрации DZ и АТР-зависимого входа K^+ в матрикс митохондрий (рис. 4, кривая 1). Вместе с синтезом под действием активатора K^+_{ATP} -канала в той же области концентраций DZ замедляется также и гидролиз АТР (рис. 4, кривая 2). Известно, что количество образующегося АТР пропорционально количеству ионов H^+ , поглощаемых митохондриями в процессе синтеза [31]. Согласно полученным данным, активация АТР-зависимого входа K^+ приводит не только к замедлению окислительного фосфорилирования, но и к снижению входа протонов в матрикс, свидетельствующему о неполном превращении ADP в ходе реакции (рис. 4, кривая 3). Наблюдаемое снижение глубины превращения реакции, как и замедление синтеза АТР, происходит по мере активации транспорта K^+ (рис. 4). Обращает на себя внимание тот факт, что при отсутствии деполяризации активация K^+_{ATP} -канала приводит к ~50%-му ингибированию синтеза АТР (рис. 4, кривая 1). В той же области концентраций активатора, соответствующей повышению потенциалзависимого входа K^+ , происходит и одновременное торможение гидролиза АТР (рис. 4, кривая 2). Поэтому можно предположить, что в отличие от «классического» протонофорного разобщения дыхательной цепи, эффект DZ обусловлен не столько разобщением энергетического сопряжения в митохондриях, сколько непосредственным влиянием АТР-зависимого входа K^+

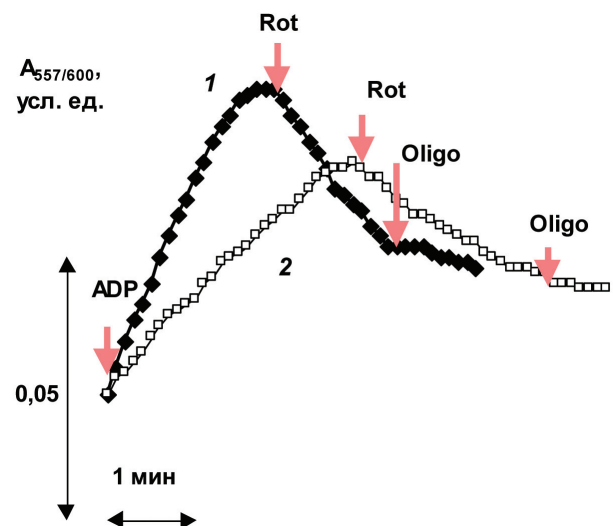


Рис. 3. Влияние диазоксид (DZ) на светопоглощение суспензии митохондрий в присутствии фенолового красного (ФК) в условиях АТР-стимулированного дыхания (типичные кривые). 1 – контроль, 2 – в присутствии 500 нМ DZ. В среду инкубации вносили 10 мкМ ЭДТА; конечная концентрация протеина 1,5–2 мг/мл. Внесение ADP (300 мкМ), ротенона ($5 \cdot 10^{-6}$ М) и олигомицина (1 мкг/мг) указано стрелкой. Регистрацию начинали от момента внесения ADP. По оси абсцисс: время, мин; по оси ординат: светопоглощение ФК, $A_{557/600}$ нм, усл. ед.

на АТРсинтазу (АТРазу) митохондрий. В пользу данного предположения свидетельствует ингибирование как синтеза, так и гидролиза АТР в той же области концентраций DZ (рис. 4).

Ингибирующий эффект активаторов K^+_{ATP} -канала на систему окислительного фос-

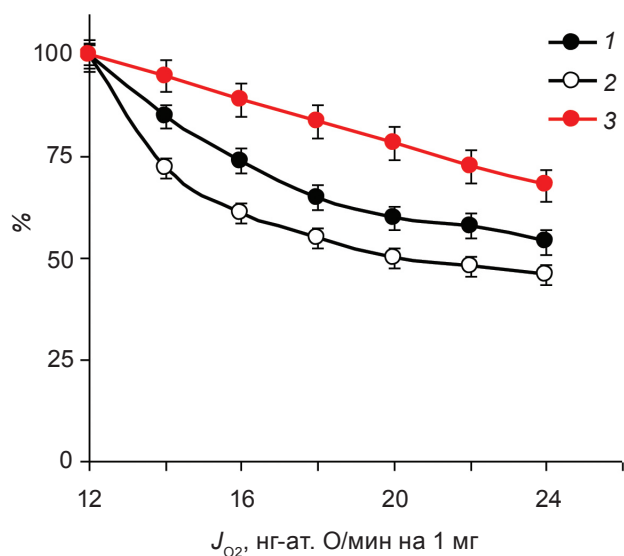


Рис. 4. Влияние АТФ-зависимого входа K^+ на систему окислительного фосфорилирования митохондрий печени крысы: синтез (1), гидролиз (2) и выход АТФ (3), в % от контроля. За 100% принимали показатели в отсутствие ДЗ ($M \pm m$, $n = 6$). По оси абсцисс: скорость диазоксидстимулированного дыхания, нг-ат. О·мин⁻¹·мг⁻¹

фосфорилирования отмечали и другие авторы [20, 26, 32], однако вопрос о природе данного феномена еще не нашел окончательного решения в литературе. Если не принимать во внимание деполяризацию [18], не являющуюся непосредственным следствием активации K^+_{ATP} -канала в митохондриях сердца и печени [24, 33], к ингибированию V-комплекса, как полагают некоторые авторы [20], может приводить набухание и изменение геометрических параметров мембраны митохондрий. В то же время, известно, что открывание МРТР, несмотря на сопоставимый масштаб набухания, замедляет только синтез АТФ вследствие разобщения дыхательной цепи, однако усиливает гидролитическую активность F_0F_1 -АТФазы вследствие повышения протонной проводимости мембраны митохондрий. Можно высказать предположение, что в условиях активации K^+_{ATP} -канала именно повышение входа K^+ является непосредственной причиной ингибирования АТФ-синтазного комплекса этих органелл. Известно, что молекулярный механизм функционирования V-комплекса включает стадию трансмембранного переноса протона [11,30]. Транспорт K^+ и, возможно, K^+/H^+ -обмен может на молекулярном уровне нарушать сопряженность между транслокацией протона и гидролизом либо синтезом АТФ на стадии от-

щепления, либо присоединения фосфата при работе этого энзима. Подобное разобщение молекулярного механизма функционирования F_0F_1 -АТФазы (decoupling) [34], может происходить без нарушения энергетического сопряжения, сопровождаемого снижением $\Delta\mu H^+$. Также показано [35], что в синтезе АТФ участвуют локальные рН-градиенты мембраны, образующиеся при работе дыхательной цепи. Закономерно предположить, что активация K^+/H^+ -обмена под действием ДЗ может разобщать работу F_0F_1 -АТФ-синтазы на молекулярном уровне (decoupling), а повышение входа K^+ , в свою очередь, может отчасти устранять локальные градиенты ионов H^+ вследствие возможной конкуренции K^+ и H^+ за связывание с мембраной [36] и, тем самым, ослаблять также и энергетическое сопряжение в митохондриях (uncoupling). Следует также отметить, что ингибирование окисления либо фосфорилирования может приводить к варьированию стехиометрии Р/О в определенном диапазоне значений [10]. С учетом сказанного, наблюдаемое нами повышение Р/О может являться непосредственным следствием ингибирования F_0F_1 -АТФ-синтазы митохондрий [10], но также может быть и результатом ошибочной оценки, предполагающей превращение всего добавленного АДФ в АТФ. Таким образом, активация K^+_{ATP} -канала, может оказывать достаточно сложный комплекс эффектов на систему окислительного фосфорилирования митохондрий, и помимо разобщения энергетического сопряжения в обычном смысле, возможно, приводит к разобщению молекулярного механизма окислительного фосфорилирования, что в итоге ведет к снижению продукции АТФ в митохондриях.

Согласно данным литературы, активация K^+_{ATP} -канала при различных патологических состояниях предотвращает индукцию апоптоза, обусловленную открыванием митохондриальной поры [2–4]. В то же время, как показывают результаты эксперимента, в условиях открывания МРТР активация K^+_{ATP} -канала не только не снижает, но, напротив, резко углубляет разобщение, вызываемое как активатором K^+_{ATP} -канала в отсутствие МРТР, так и открыванием МРТР в отсутствие ДЗ (таблица). Ослабление энергетического сопряжения выражается в резком повышении скорости дыхания в состоянии 4 (V_4^{ATP}) и падении ДК до минимальных значений, наблюдаемых в эксперименте (таблица). В качестве основных причин разобщения можно назвать ускорение циклического транспорта катионов (в данном

случае K^+ и Ca^{2+}), а также усиление гидролиза АТР вследствие открывания поры и повышения протонной проводимости мембраны митохондрий, показанного нами ранее [37]. В то же время, вклад этих двух составляющих разобщения в скорость потребления кислорода в состоянии 4 (V_4^{ATP}) может варьировать в зависимости от условий эксперимента. Согласно оценке доли олигомицинчувствительной компоненты потребления кислорода с помощью олигомицина, ингибитора F_0F_1 -АТРазы, она наиболее высока в присутствии Ca^{2+} при открывании МРТР, и составляет ~50% скорости дыхания, что может быть результатом непосредственной активации F_0F_1 -АТРазы ионами Ca^{2+} [8] и повышением протонной проводимости мембраны [37]. В то же время наименее чувствительна к олигомицину скорость дыхания в условиях одновременной активации K^+ АТР-канала и митохондриальной поры (олигомицинчувствительная компонента составляет только ~25% потребления кислорода), что указывает на преобладающий вклад циклического транспорта катионов (K^+ и Ca^{2+}) в разобщение в этом последнем случае (рис. 5, столбцы 4–6).

Ранее мы показали, что открывание МРТР приводит к одновременной активации циклического транспорта катионов: K^+ и Ca^{2+} [25], причем активатор K^+ АТР-канала, как и в отсутствие МРТР, активирует K^+ -цикл. Нами был предложен подход к оценке вклада МРТР в регуляцию митохондриального объема, который позволил проанализировать влияние DZ на активность МРТР в условиях стационарного состояния, которое устанавливается после накопления катионов K^+ и Ca^{2+} из среды и соответствует наблюдаемому отсутствию изменений митохондриального объема и светопоглощения суспензии митохондрий.

Так, в условиях открывания МРТР одновременно с входом K^+ после завершения набухания устанавливается состояние стационарного равновесия [25], соответствующее отсутствию изменения митохондриального объема, при котором наблюдаемая скорость изменения светопоглощения (V) равна нулю, и скорость сокращения матричного объема вследствие работы K^+/H^+ -обменника ($V_{K/H}$) равна скорости набухания вследствие работы МРТР и K^+ -каналов:

$$V = V_{K/H} - V_{MPTP} - V_{KNS} = 0, \quad (1)$$

откуда:

$$V_{K/H} = V_{MPTP} + V_{KNS}, \quad (2)$$

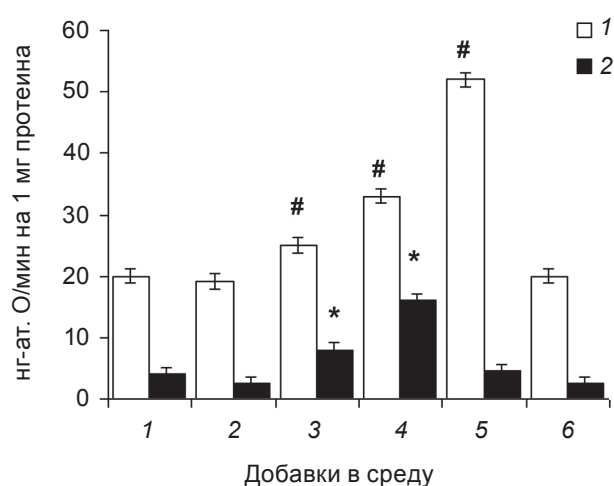


Рис. 5. Влияние активатора K^+ АТР-канала на скорость контролируемого дыхания в состоянии 4 (V_4^{ATP}). 1 – скорость дыхания в состоянии 4 (контроль); 2 – разность скоростей дыхания в отсутствие и в присутствии олигомицина. Олигомицин (2 мкг/мг) вносили после превращения добавленного АDP (200 мкМ). В среду вносили следующие добавки: 1 – 1 мМ ЭДТА (контроль); 2 – 1 мМ ЭДТА, 500 нМ DZ; 3 – 15 мкМ $CaCl_2$, 1 мкМ циклоспорино А; 4 – 15 мкМ $CaCl_2$, 15 мкМ $CaCl_2$, 500 нМ DZ; 6 – 15 мкМ $CaCl_2$, 500 нМ DZ с последующим внесением 1 мМ ЭДТА ($M \pm m$, $n = 6$); $P < 0,05$ – достоверно относительно контроля: # ряд 1, * ряд 2

где V_{MPTP} – скорость набухания вследствие осмотического транспорта воды через неселективную пору и V_{KNS} – скорость набухания вследствие входа K^+ через K^+ -каналы, неселективно блокируемые блокатором потенциалзависимых K^+ -каналов 4-АР. Соответственно после неселективного блокирования потенциалзависимых K^+ -каналов ($V_{KNS} = 0$) наблюдаемая скорость сокращения объема митохондрий равна разности скоростей сокращения вследствие работы K^+/H^+ -обмена и набухания вследствие работы МРТР (рис. 6, а, кривая 1):

$$V'_0 = V_{K/H} - V_{MPTP} \quad (3)$$

С учетом (2) и (3), после неселективного блокирования K^+ -каналов ($V_{KNS} = 0$) наблюдаемая скорость изменения матричного объема (V'_0) по абсолютной величине равна скорости набухания вследствие входа K^+ через K^+ -каналы:

$$V'_0 = V_{KNS} \quad (4)$$

В то же время, при одновременном блокировании МРТР и K^+ -каналов циклоспорином А и 4-АР ($V_{MPTP} = 0$, $V_{KNS} = 0$), с учетом (1),

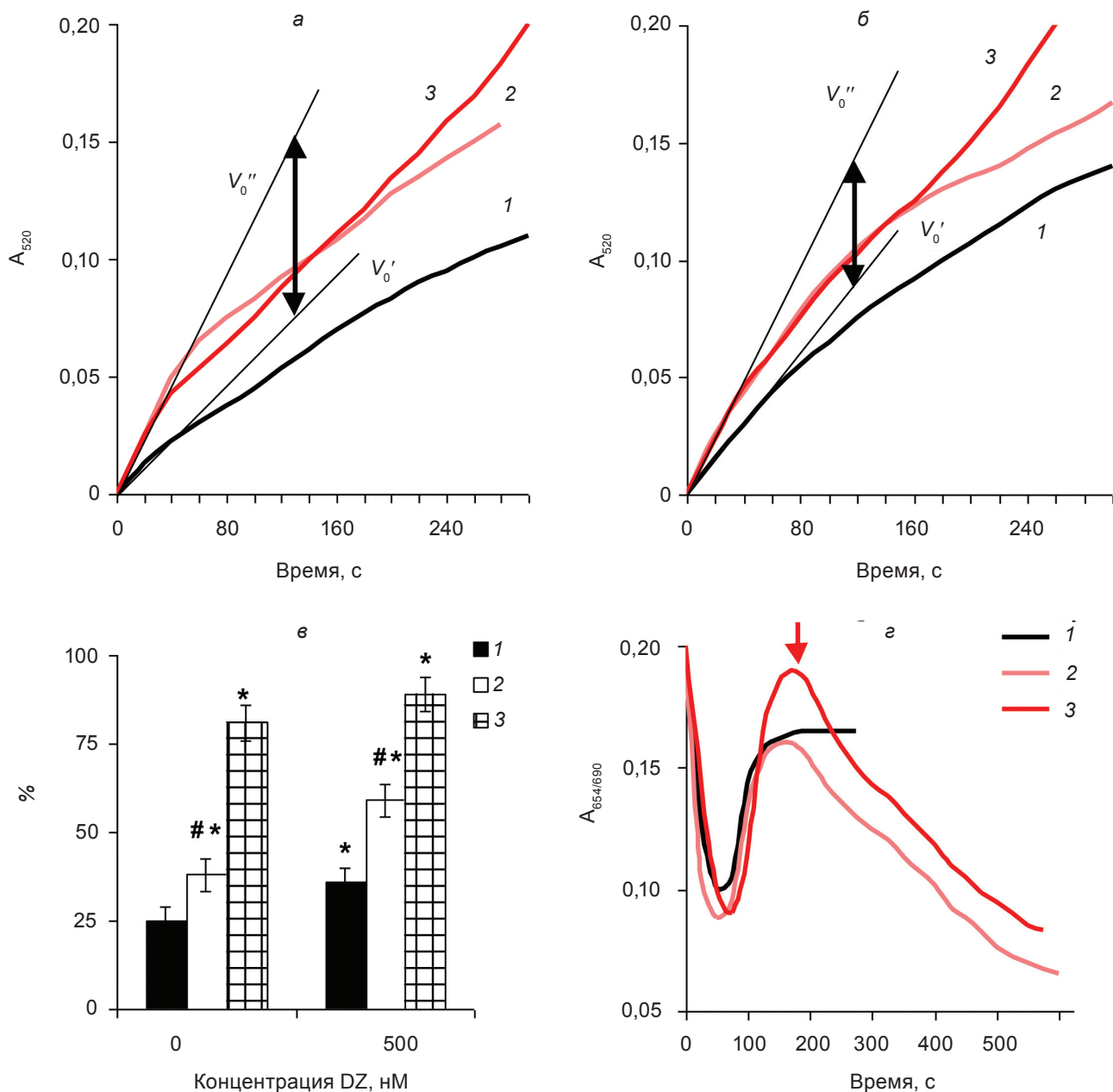


Рис. 6. Влияние блокаторов митохондриальных каналов, 4-АР и циклоспорина А, на изменение светопоглощения суспензии в отсутствие (а) и в присутствии (б) 500 мкМ диазоксид (DZ), восстановление митохондриального объема в % от контроля (в) и изменение концентрации Ca^{2+} в среде (г), типичные кривые. Блокаторы вносили после завершения набухания и циклоспоринчувствительного выхода Ca^{2+} : 4-АР (а-в, 1); 4-АР и циклоспорин А (а-в, 2); 4-АР, ЭДТА (а-в, 3). Внесение циклоспорина А в контроле и в присутствии DZ (г, 2,3) указано стрелкой. За нулевой момент времени принимали внесение блокаторов (а-в); регистрацию транспорта Ca^{2+} начинали от внесения в среду митохондрий, 0,3 мг/мл (г). в – за 100% принимали изменение объема при циклоспоринчувствительном набухании митохондрий ($M \pm m$, $n = 6$); * $P < 0,05$ – достоверно относительно контроля; # достоверно относительно столбцов 1. В среду инкубации вносили 15 мкМ $CaCl_2$. По оси абсцисс: время, с (а, б, г); концентрация DZ, нМ (в). По оси ординат: изменение светопоглощения суспензии при 520 нм (а, б), при 654/690 нм (г); % от контроля (в)

наблюдаемая начальная скорость сокращения митохондриального объема обусловлена только работой K^+/H^+ -обмена (рис. 6, а, кривая 2):

$$V_0'' = V_{K/H} \quad (5)$$

Таким образом, при одновременном блокировании МРТР и K^+ -каналов наблюдаемое изменение митохондриального объема обусловлено одним лишь транспортом K^+ через K^+/H^+ -обменник:

$$V_0'' = V_{MPTP} + V_{KNS}, \quad (6)$$

что подтверждает регистрация K^+/H^+ -обмена при полном удалении Ca^{2+} из среды после внесения 4-АР и ЭДТА (рис. 6, а, кривая 3). Соответственно, как следует из (4) и (6), разность между начальной скоростью сокращения митохондриального объема после внесения блокатора K^+ -каналов 4-АР в отсутствие и в присутствии циклоспорина А равна по абсолютной величине вкладу МРТР в набухание митохондрий. С учетом (4) и (6), вклад МРТР в набухание митохондрий равен разности начальных скоростей сокращения матричного объема и повышения светопоглощения после блокирования K^+ -каналов в отсутствие и в присутствии циклоспорина А:

$$V_{MPTP} = V_0'' - V_0' \quad (7)$$

Сказанное дает возможность оценить влияние активатора K^+_{ATP} -канала на функциональную активность МРТР по циклоспоринчувствительной разности начальных скоростей повышения светопоглощения (7) после блокирования K^+ -каналов 4-АР в присутствии и в отсутствие DZ (рис. 6, а, б, кривые 1, 2). Таким образом, анализ начальных скоростей сокращения объема матрикса после блокирования K^+ -каналов и МРТР соответственно 4-аминопиридином и циклоспорином А показывает, что доля МРТР в регуляции митохондриального объема в условиях активации K^+_{ATP} -канала снижается, тогда как доля K^+/H^+ -обмена и K^+ -каналов возрастает (рис. 6, в), что уже показано нами ранее [25]. Уменьшение циклоспоринчувствительной компоненты сокращения митохондриального объема в присутствии активатора K^+_{ATP} -канала (рис. 6, а, б, кривые 1, 2) свидетельствует о подавлении функциональной активности МРТР. В то же время, работа K^+/H^+ -обмена после блокирования МРТР и удаления Ca^{2+} приводит к сокращению матрикса и восстановлению митохондриального объема до первоначального уровня (рис. 6, в, столбец 3).

Соответственно, в случае Ca^{2+} -цикла, отсутствие изменений концентрации Ca^{2+} в среде после циклоспорин А-чувствительного выхода Ca^{2+} через пору (рис. 6, з, кривая 1) поддерживается одновременной работой Ca^{2+} -унипортера и МРТР, обеспечивающих в условиях постоянства $\Delta\Psi_m$ (данные не представлены) равновесие между входом и выходом Ca^{2+} :

$$V_{Ca} = V_{CaU} + V_{Ca/H} + V_{MPTP} = 0. \quad (8)$$

Из этого следует (без учета Ca^{2+}/H^+ -обмена, которым при открывании МРТР можно пренебречь), что блокирование МРТР в условиях стационарного равновесия ($V_{MPTP} = 0$) приводит к его сдвигу в сторону входа Ca^{2+} в матрикс через Ca^{2+} -унипортер: $V_{Ca} = V_{CaU}$ (9) (рис. 6, з, кривые 2, 3). Вход Ca^{2+} в матрикс после блокирования МРТР в условиях стационарного состояния (рис. 6, з, кривые 2, 3) свидетельствует о функциональной активности как МРТР, так и Ca^{2+} -унипортера, участвующих в обеспечении циклического транспорта Ca^{2+} в митохондриях. Активность Ca^{2+} -унипортера в условиях открывания МРТР обеспечивается поддержанием $\Delta\Psi_m$ на постоянном уровне в течение 5–6 мин от внесения митохондрий в среду (данные не приведены). Внесение циклоспорина А и блокирование МРТР предотвращает падение мембранного потенциала митохондрий (данные не приведены) и обеспечивает активность Ca^{2+} -унипортера (рис. 6, з, кривые 2, 3).

Поскольку активация Ca^{2+} - и K^+ -циклов приводит к повышению потенциал-зависимого входа катионов в матрикс, открывание МРТР тем самым вносит вклад в повышение скорости дыхания митохондрий (таблица), что и обнаруживается при полярографической регистрации стационарной скорости потребления кислорода в условиях окисления субстрата (V_4^S). Чтобы убедиться в справедливости выводов, сделанных на основании спектрофотометрических данных, функциональную активность МРТР в условиях активации K^+_{ATP} -канала оценивали также по циклоспоринчувствительной компоненте скорости дыхания митохондрий, которую находили по разности скоростей потребления кислорода в отсутствие и в присутствии циклоспорина А (рис. 7, столбик 1), и которая отвечает вкладу МРТР в циклический транспорт катионов в стационарных условиях. Как показали результаты эксперимента, внесение активатора K^+_{ATP} -канала снижает циклоспоринчувствительную компоненту скорости дыхания (рис. 7, столбик 2), что соответствует сделанным выше выводам о частичном ингибировании МРТР вследствие активации АТР-зависимого входа K^+ (рис. 6, а, б, кривые 1, 2).

Согласно сложившимся представлениям, угнетение активности МРТР и предупреждение индукции апоптоза лежит в основе цитопротекторного действия активаторов K^+_{ATP} -канала [2–5], однако клеточные механизмы подавления МРТР при активации транспорта K^+ все еще неясны. Можно предположить, что повышение АТР-зависимого входа K^+ приводит в действие целый ряд механизмов, в той или иной мере ведущих к снижению активности циклоспоринчувствительного неселективного канала МРТР. Поскольку в условиях нашего эксперимента активация K^+_{ATP} -канала не снижает накопление небольших добавок Ca^{2+} , 15 мкМ (рис. 6, з, кривые 2, 3), можно сделать вывод, что наблюдаемое ингибирование МРТР не является результатом уменьшения входа Ca^{2+} в матрикс митохондрий, как это часто допускают в литературе [3, 19]. В качестве возможных причин ингибирования МРТР можно предположить активацию K^+/H^+ -обмена под действием активатора K^+_{ATP} -канала – DZ. Ранее мы установили обратную зависимость между активацией K^+/H^+ -обмена и неселективной циклоспоринчувствительной проницаемостью митохондриальной мембраны [25]. Учитывая, что согласно данным литературы [38], сокращение митохондриального объема уже само по себе ведет к подавлению МРТР, можно высказать предположение, что активация K^+/H^+ -обмена, которой способствует также снижение содержания Ca^{2+} в матриксе вследствие открывания МРТР (рис. 6, з, кривая 1), уменьшение объема матрикса вследствие выхода K^+ (рис. 6, в), а также и вход протонов в матрикс через K^+/H^+ -обменник являются составляющими комплексного механизма частичного ингибирования митохондриальной поры, под действием DZ (рис. 6, а, б; 7, столбик 2). Помимо сокращения митохондриального объема, следует принять во внимание и то, что повышение входа протонов в матрикс при активации K^+/H^+ -обмена и закисление внутримитохондриальной среды может подавлять МРТР как непосредственно, так и опосредованно, путем снижения продукции АФК [13, 15].

Таким образом, в условиях активации K^+_{ATP} -канала совместно с открыванием МРТР функциональное состояние митохондрий определяется активацией K^+ - и Ca^{2+} -циклов, поддерживаемых одновременной работой K^+ -каналов и K^+/H^+ -обмена а также Ca^{2+} -унипортера и МРТР. Несмотря на то, что функциональная активность МРТР в условиях активации K^+_{ATP} -канала, как показывают данные (рис. 6, 7), частично подавляется, ускоре-

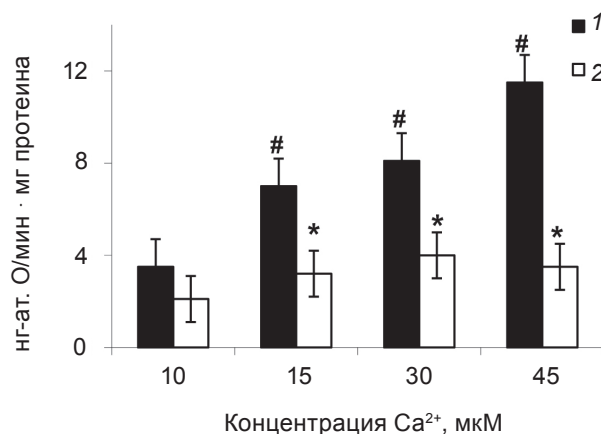


Рис. 7. Влияние активатора K^+_{ATP} -канала на циклоспоринчувствительную компоненту стационарной скорости дыхания (V_4^S). Функциональную активность МРТР оценивали по разности скоростей дыхания в отсутствие и в присутствии 1 мкМ циклоспорина А. Диазоксид вносили в концентрации 500 нМ (столбики 2). Ca^{2+} вносили как указано на оси абсцисс ($M \pm t$, $n = 6$); * $P < 0,05$ — достоверно относительно ряда 1; # относительно контроля

ние трансмембранного ионного обмена ведет к глубокому разобщению дыхательной цепи, исключая синтез АТР (таблица). Элиминация Ca^{2+} -цикла после открывания МРТР (и тем самым, блокирование поры) возвращает показатели функционального состояния, как и митохондриальный объем, близко к контрольному уровню (таблица; рис. 6, в, столбик 3), что свидетельствует об обратимости функциональных нарушений, вызванных МРТР вследствие активации циклического транспорта катионов в митохондриях.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что, возможно, в большей мере, чем МРТР, одной из непосредственных молекулярных мишеней активаторов K^+_{ATP} -канала является система окислительного фосфорилирования митохондрий. Несмотря на ее частичное ингибирование, подавление гидролиза АТР должно снижать непродуктивный расход АТР, синтезируемого в этих органеллах и обеспечивать оптимальные условия его использования. Возможно, именно такой механизм лежит в основе наблюдаемого нами снижения утомляемости крыс после введения активатора K^+_{ATP} -канала *in vivo*. Таким образом, модуляция системы окислительного фосфорилирования может являться одной из основных компонент комплексного терапевтического действия активаторов K^+_{ATP} -канала в

клинике и служит эффективным инструментом регуляции энергетического метаболизма митохондрий при ишемии и других состояниях, характеризующихся подавлением МРТР [39]. Однако, как показали результаты нашего исследования, одновременное с активацией K^+_{ATP} -канала открытие МРТР может оказаться сильным отрицательным модулятором биоэнергетических эффектов АТР-зависимого транспорта K^+ в митохондриях.

ВПЛИВ АКТИВАТОРА АТР-ЗАЛЕЖНОГО K^+ -КАНАЛА НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН І ВІДКРИВАННЯ ЦИКЛОСПОРИНЧУТЛИВОЇ ПОРИ В МІТОХОНДРІЯХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

*О. В. Аконова, В. І. Носар, В. А. Бурий,
Л. І. Колчинська, І. М. Маньковська,
В. Ф. Сагач*

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ;
e-mail: a-dubensky@mail.ru

Досліджено вплив активатора митохондріального АТР-залежного K^+ -канала (K^+_{ATP} -канала), – діазоксиду – на споживання кисню, функціональний стан та відкриття циклоспоринчутливої пори в митохондріях печінки щурів. Встановлено, що активація K^+_{ATP} -канала призводить до підвищення стаціонарної швидкості дихання за окислення субстрату (V_4^S) та роз'єднання дихального ланцюга внаслідок прискорення K^+ -цикла митохондрий, яке знижує дихальний контроль та швидкість дихання в стані 3 (V_3) за одночасного підвищення її в стані 4 (V_4^{ATP}). Показано, що зниження V_3 відбувається внаслідок інгібування системи окисного фосфорилування, яке виявляється в сповільненні синтезу та гідролізі АТР, зниженні його виходу і вдаваному підвищенні показника Р/О внаслідок неповного перетворення АDP. Підвищення АТР-залежного входу K^+ в умовах відкриття циклоспоринчутливої пори (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) різко поглиблює роз'єднання внаслідок активації K^+ - і Ca^{2+} -циклів, які підтримуються одночасною роботою МРТР й Ca^{2+} -уніпортера, а також K^+/H^+ -обміну й K^+ -каналів, включаючи K^+_{ATP} -канал. При цьому активація K^+_{ATP} -канала призводить до часткового пригнічення МРТР, проте недостатнього для відновлення функціонального стану митохондрий.

Елімінація Ca^{2+} -циклу після відкриття МРТР повертає показники функціонального стану митохондрий до контрольного рівня, що вказує на МРТР як механізм оборотної модуляції біоенергетичних ефектів, обумовлених активацією K^+_{ATP} -канала.

Ключові слова: K^+_{ATP} -канал, діазоксид, споживання кисню, окисне фосфорилування, митохондріальна пора, митохондрії печінки.

THE EFFECT OF ATP-DEPENDENT K^+ -CHANNEL OPENER ON THE FUNCTIONAL STATE AND THE OPENING OF CYCLOSPORINE-SENSITIVE PORE IN RAT LIVER MITOCHONDRIA

*O. V. Akopova, V. I. Nosar, V. A. Bouryi,
L. I. Kolchinskaya, I. N. Mankovska,
V. F. Sagach*

Bogomoletz Institute of Physiology, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: a-dubensky@mail.ru

The effect of mitochondrial ATP-dependent K^+ -channel (K^+_{ATP} -channel) opener diazoxide (DZ) on the oxygen consumption, functional state and the opening of cyclosporine-sensitive pore in the rat liver mitochondria has been studied. It has been established that K^+_{ATP} -channel activation results in the increase of the oxygen consumption rate (V_4^S) and the uncoupling due to the acceleration of K^+ -cycling, the decrease in state 3 respiration rate (V_3) and the respiratory control ratio (RCR). Under K^+_{ATP} -channel activation an inhibition of oxidative phosphorylation takes place which reduces the rate of ATP synthesis and hydrolysis as well as ATP production and consequently results in the seeming increase of P/O ratio. It has been shown that the increase in ATP-dependent K^+ -uptake accompanied by the opening of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) leads to dramatic uncoupling of the respiratory chain due to simultaneous activation of K^+ - and Ca^{2+} -cycling supported by MPTP and Ca^{2+} -uniporter as well as K^+ -channels and K^+/H^+ -exchange. K^+_{ATP} -channel activation leads to the partial inhibition of MPTP, but insufficient for the restoration of mitochondrial functions. Elimination of Ca^{2+} -cycling after MPTP opening is necessary to return mitochondrial functions back to the control level which shows that MPTP could serve as the mechanism of reversible modulation of bioenergetic effects of K^+_{ATP} -channel activation.

Key words: K^+_{ATP} -channel, diazoxide, oxygen consumption, oxidative phosphorylation, mitochondrial pore, rat liver mitochondria.

1. Inoue I., Nagase, H. Kishi K., Higuti T. // Nature. — 1991. — **352**. — P. 244–247.
2. Миронова Г. Д., Качаева Е. В., Крылова И. Б. и др. // Вестн. РАМН. — 2007. — **2**. — С. 44–50.
3. Facundo H. T. F., dePaula J. G., Kowaltowski A. J. // J. Bioenerg. Biomembr. — 2005. — **37**. — P. 75–82.
4. Oldenburg O., Cohen M. V., Yellon D. M., Downey J. M. // Cardiovasc. Res. — 2002. — **55**. — P. 429–437.
5. O'Rourke B. // Circ. Res. — 2004. — **94**. — P. 420–432.
6. Bernardi P. // Physiol. Rev. — 1999. — **79**. — P. 1127–1155.
7. Mitchell P. // Nature. — 1961. — **191**. — P. 144–148.
8. Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. L. et al. // Am. J. Physiol. — 2004. — **287**. — P. C817–C833.
9. Beavis A. D. // J. Biol. Chem. — 1987. — **262**. — P. 6165–6173.
10. Beavis A. D., Lehninger A. L. // Eur. J. Biochem. — 1986. — **158**. — P. 315–322.
11. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М.: Наука, 1972. — 203 с.
12. Garlid K. D., Paucek P. // Biochim. Biophys. Acta. — 2003. — **1606**. — P. 23–41.
13. Miva S., Brand M. D. // Biochem. Soc. Trans. — 2003. — **31**. — P. 1300–1301.
14. Stucki J. W. // Eur. J. Biochem. — 1976. — **68**. — P. 551–562.
15. Liu Sh.-S. // J. Bioenerg. Biomembr. — 1999. — **31**. — P. 367–376.
16. Skulachev V. P. // Mol. Aspects Med. — 1999. — **20**. — P. 139–184.
17. Kroemer G., Reed J. C. // Nature Med. — 2000. — **6**. — P. 513–519.
18. Holmuhamedov E. L., Jovanovic S., Dzeja P. P. et al. // Am. J. Physiol. — 1998. — **275**. — P. H1567–H1576.
19. Murata, M., Akao M., O'Rourke B., Marban E. // Circ. Res. — 2001. — **89**. — P. 891–898.
20. Facundo H. T., Fornazari M., Kowaltowski A. J. // Biochim. Biophys. Acta. — 2006. — **1762**. — P. 202–212.
21. Costa, A. D. T., Garlid K. D. // Am. J. Physiol. — 2008. — **295**. — P. H874–H882.
22. Korge P., Honda H. M., Weiss J. N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — **99**. — P. 3312–3317.
23. Costa A. D. T., Quinlan C. L., Andrich A. et al. // Am. J. Physiol. — 2006. — **290**. — P. H406–H415.
24. Акопова О. В., Носарь В. И., Бурый В. А. и др. // Биохимия. — 2010. — **75**. — С. 1273–1283.
25. Акопова О. В. // Укр. біохім. журн. — 2011. — **83**, № 3. — С. 46–55.
26. Cancherini D., Trabuco L. G., Reboucas N. A., Kowaltowski A. J. // Am. J. Physiol. — 2003. — **285**. — P. F1291–F1296.
27. Cockrell R. S. // Arch. Biochem. Biophys. — 1985. — **243**. — P. 70–79.
28. Garlid K. D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. et al. // J. Biol. Chem. — 1996. — **271**. — P. 8796–8799.
29. Мембраны: ионные каналы / Сб.: под ред. Ю. А. Чизмадзева. — М.: Мир, 1981. — 320 с.
30. Mitchell P., Moyle J. // Eur. J. Biochem. — 1968. — **4**. — P. 530–539.
31. Hinkle P. C., Yu M. L. // J. Biol. Chem. — 1979. — **254**. — P. 2450–2455.
32. Comelli M., Metelli G., Mavelli I. // Am. J. Physiol. — 2007. — **292**. — P. H820–H829.
33. Kowaltowski A. J., Seetharaman S., Paucek P., Garlid K. D. // Ibid. — 2001. — **280**. — P. H649–H657.
34. Rottenberg H., Koeppe R. E. // Biochemistry. — 1989. — **28**. — P. 4355–4360.
35. Солодовникова И. М., Юрков В. И., Тоньшин А. А., Ягужинский Л. С. // Биофизика. — 2004. — **49**. — С. 47–56.
36. Красинская И. П., Коршунов С. С., Качанов О. Ю., Ягужинский Л. С. // Биохимия. — 1997. — **62**. — С. 364. — 370.
37. Акопова О. В. // Укр. біохім. журн. — 2008. — **80**, № 3. — С. 40–47.
38. Nogueira V., Devin A., Walter L. et al. // J. Bioenerg. Biomembr. — 2005. — **37**. — P. 25–33.
39. Halestrap A. P., Kerr P. M., Javadov S., Woodfield K. Y. // Biochim. Biophys. Acta. — 1998. — **1366**. — P. 79–94.

Получено 03.12.2012